

การโคลนยีนและการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ของเลคตินแบบ C จากกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*)

Gene cloning and immune response to *Vibrio harveyi* infection of a C-type lectin from banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*)

พันทิพา รุณแสง^{1*}, อรณิชา รัตนภรณ์² และประภาพร อุทารพันธุ์³

Phanthipha Runsaeng^{1*}, Onnichia Rattanaporn² and Prapaporn Utarabhand³

^{1,2} ดร., ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

^{1,2} Dr., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

³ รองศาสตราจารย์ ดร., ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

³ Assoc. Prof. Dr., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

* Corresponding author, E-mail: pa.runsaeng@gmail.com

บทคัดย่อ

เลคตินแบบ C เป็นกลุ่มโปรตีนที่จดจำและจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตในภาวะที่ต้องการเคลือบ มีบทบาทสำคัญในการจดจำและช่วยกำจัดเชื้อก่อโรคในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดของกุ้ง การศึกษาครั้งนี้ได้โคลนยีนเลคตินแบบ C ชนิดใหม่ (FmL) จากตับของกุ้งแชบ๊วยโดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ rapid amplification of 5' and 3' cDNA end (RACE) พบว่ายีน FmL สายเต็มมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,148 คู่เบส ประกอบด้วย ส่วนแปลเป็นกรดอะมิโน 1,008 คู่เบส แปลเป็นสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 335 หน่วย ในสายเปปไทด์ของ FmL มีโดเมนจดจำคาร์โบไฮเดรต 2 โดเมน ได้แก่ motif คือ QPD และ EPQ ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ FmL มีความเหมือนมากกับโปรตีนในกลุ่มเลคตินแบบ C ได้แก่ FcLec5 ของกุ้งขาวจีน (82%) และ MjLectin-1 ของกุ้งกุลาดำ (73%) มีการแสดงออกในระดับ mRNA ของ FmL เฉพาะในตับเท่านั้น และไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่น ๆ จากการบ่มขึ้นต้นกับ *Vibrio harveyi* และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบการแสดงออกของ FmL เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 2.5 ชั่วโมงหลังการบ่มด้วยเชื้อก่อโรค ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่ายีน FmL ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งต่อเชื้อบุกรุก

คำสำคัญ: กุ้งแชบ๊วย, เลคตินแบบ C, *Vibrio harveyi*, โดเมนจดจำคาร์โบไฮเดรต

Abstract

C-type lectin is a family of carbohydrate-recognition proteins that are Ca^{2+} dependent. It plays a significant role in recognizing and eliminating pathogens in an innate immunity of shrimp. A new C-type lectin gene (FmL) was cloned from the hepatopancreas of *Fenneropenaeus merguensis* by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE). A full-length cDNA of FmL contained 1,148 bp including an open reading frame of 1,008 bp that encoded a peptide of 335 amino acids. The mature protein comprised two carbohydrate-recognition domains (CRDs), each of which contained a QPD and an EPQ motif. The deduced amino acid sequence of FmL showed high identity to members of C-type lectin superfamily including FcLec5 from *Fenneropenaeus chinensis* (82%) and MjLectin-1 from *Marsupenaeus japonicus* (73%). The mRNA expression of FmL in healthy shrimp was only detected in the hepatopancreas, none was found in other tissues. After being incubated the hepatopancreas fragments with *Vibrio harveyi* and analyzed by semi-quantitative RT-PCR, FmL expression was up-regulated and reached the highest level at 2.5 h after challenge. This result indicated that FmL responded towards challenging by pathogenic bacteria and was involved in a defense mechanism of shrimp against invading pathogens.

Keywords: *Fenneropenaeus merguensis*, C-type lectin, *Vibrio harveyi*, carbohydrate recognition domain

บทนำ

กุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*) เป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง แต่ปัจจุบันประสบปัญหาด้านการเพาะเลี้ยง โดยปัญหาที่ติดขัดคือแบคทีเรียและไวรัส ส่งผลให้กุ้งตายจำนวนมาก การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยง สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียมีกลไกการป้องกันตนเองเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรค ผ่านโปรตีนในพลาสมา (plasma protein) หลายชนิดด้วยกัน เลคตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในฮีโมลิมฟ์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม pattern recognition proteins (PRPs) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของเชื้อก่อโรค (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) ผ่านบริเวณจดจำคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate-recognition domain, CRD) โดยเลคตินแบบ C จัดเป็นเลคตินชนิดที่พบมากที่สุดในการต้องการแคลเซียมในการเกิดปฏิกิริยา กลไกการทำงานของเลคตินเป็นด่านแรกที่สำคัญในการแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ของ

เชื้อก่อโรคและเซลล์ของสิ่งมีชีวิตงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษายีนเลคตินแบบ C และการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยแบคทีเรียก่อโรค เพื่อให้เข้าใจบทบาทของเลคตินที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแข็บวยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนและศึกษาสมบัติของยีนเลคตินแบบ C (FmL)
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน FmL ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแข็บวยปกติ
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน FmL ในเนื้อเยื่อของกุ้งแข็บวยที่เหนี่ยวนำด้วย *Vibrio*

harveyi

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

กุ้งเป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง เป็นที่นิยมบริโภค เนื่องจากกุ้งทะเลมีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีไขมันต่ำ กุ้งที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นกุ้งในสกุลฟีนีซิส (*Penaeus*) เช่น กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งแข็บวย (*Fenneropenaeus merguensis*) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งแข็บวยเป็นกุ้งชนิดหนึ่งที่มีความนิยมในการบริโภคมาก จึงมีความพยายามเพาะเลี้ยงกุ้งแข็บวยในรูปแบบพัฒนา แต่ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากกุ้งแข็บวยมีพฤติกรรมที่เลี้ยงยากและอ่อนแอต่อโรค ทำให้มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งมากขึ้น เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อมากขึ้น

กุ้งเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์มักใช้เซลล์เม็ดเลือดเป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม ในขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ อาศัยการร่วมกันทำงานของโปรตีนหลายชนิด เช่น เลคติน ซึ่งเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่สามารถจดจำและจับจำเพาะกับน้ำตาลที่มี รูปแบบเฉพาะตัวที่เรียกว่า PAMP เมื่อเลคตินจับกับเชื้อก่อโรคแล้วจะทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่ม หรือกระตุ้นให้เกิดการออปโซไนซ์ (opsonization) ต่อไป

เลคตินเป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งใน พืช สัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง รวมถึงในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น รา สาหร่าย ยีสต์ แบคทีเรีย หรือไวรัส ปัจจุบันมีการค้นพบเลคตินในกุ้งหลายชนิด เลคตินแบบ C เป็นเลคตินที่ต้องการ Ca^{2+} ในการเกิดปฏิกิริยา รวมทั้งมี CRD อย่างน้อย 1 โดเมน เป็นเลคตินชนิดที่มีการพบมากที่สุดในกุ้ง สำหรับในกุ้งแข็บวยมีการศึกษาเลคตินบางชนิดเช่น ได้มี

รายงานการพบเลคตินที่มีความจำเพาะกับน้ำตาลกรดไซอะลิก (sialic acid) ในฮีโมลิซของกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีระดับเพิ่มสูงขึ้นหลังการติดเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* (Utarabhand, Rittidach, & Paijit, 2007) ต่อมา Rittidach, Paijit และ Utarabhand (2007) ได้ทำบริสุทธิ์เลคตินชนิดนี้จากซีรัมของกุ้งแชบ๊วย พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียก่อโรค *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่มได้ แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียไม่ก่อโรคงู เช่น *Escherichia coli* ต่อมา มีการโคลนยีนเลคตินอีกชนิดจากกุ้งแชบ๊วยชื่อว่า FmLC โดยพบว่า FmLC มี CRD 2 โดเมน ที่มี QPD motif ที่จำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคส และ EPN motif ที่จำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส อยู่ใน CRD1 และ CRD2 ตามลำดับ (Rattanaporn & Utarabhand, 2011) ล่าสุดมีรายงานการพบยีนเลคตินชนิดใหม่จากตับของกุ้งแชบ๊วยชื่อว่า FmLC1 โดยเลคตินชนิดนี้มี CRD 1 โดเมน และมี EPS motif ที่จำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส อยู่ใน CRD (Thepnarong, Runsaeng, Rattanaporn, & Utarabhand, 2015) อีกทั้งยังพบว่าทั้ง FmLC และ FmLC1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แสดงว่าเลคตินเหล่านี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วย ปัจจุบันจึงมีการศึกษาเลคตินที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกันมากมาย ดังนั้นเพื่อให้เห็นถึงความหลากหลายของเลคตินที่พบในกุ้ง งานวิจัยนี้จึงได้รายงานการศึกษาเลคตินชนิดใหม่อีกหนึ่งชนิดชื่อ FmL โดยศึกษาเบื้องต้นในระดับยีนและการแสดงออกของ FmL ในกุ้งสภาวะปกติและสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค ผู้วิจัยคาดว่าผลงานวิจัยนี้จะนำไปสู่การวิจัยระดับลึกต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลทางวิชาการในการเตรียมความพร้อมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งฟิเนี่ยสในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีน FmL

โคลนยีน FmL ขึ้นกลางโดยการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) ของยีนเลคตินที่มี CRD 2 โดเมน ที่พบในกุ้งในสกุลฟิเนี่ยสชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธนาคารยีน (GenBank) แล้วใช้เป็นไพรเมอร์ในการสร้าง cDNA ขึ้นกลางของยีน FmL ด้วยการทำ PCR โดยใช้ cDNA สายแรก (first strand cDNA) ที่เตรียมได้จากตับของกุ้งแชบ๊วย เป็น DNA แม่แบบ นำ PCR product ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy vector (Promega) แล้วนำไปเพิ่มจำนวนต่อใน *E. coli* (DH5 α) จากนั้นสกัดพลาสมิด ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับของยีนเลคตินของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่พบในธนาคารยีน จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน FmL ด้านปลาย 5' และ 3' จากลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นกลางที่ได้ นำไพรเมอร์ที่ได้มาโคลนยีนขึ้นปลาย 5' และ 3' ด้วยเทคนิค rapid amplification of cDNA ends (RACE) นำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับยีนขึ้นกลาง จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสามชิ้นมาเชื่อมกัน สร้าง

เป็น cDNA สายเต็มของยีน FmL และศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ด้วยโปรแกรมใน ExPASy PROSITE (<http://www.expasy.org/tools/>)

การศึกษาการแสดงออกของยีน FmL ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

สกัด total RNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ คือ ตับ หัวใจ lymphoid กระเพาะ กล้ามเนื้อ ลำไส้ และฮีโมไซท์ ด้วย Tripure isolation reagent (Roche diagnostics) กำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNase I (Invitrogen) และนำ total RNA ไปเตรียมเป็น cDNA สายแรกด้วย SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) กำจัด mRNA ด้วย RNase H จากนั้นดูการแสดงออกในระดับ mRNA ของ FmL ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR

การศึกษาผลการบ่มขึ้นต้นด้วย *V. harveyi* ต่อการแสดงออกของยีน FmL

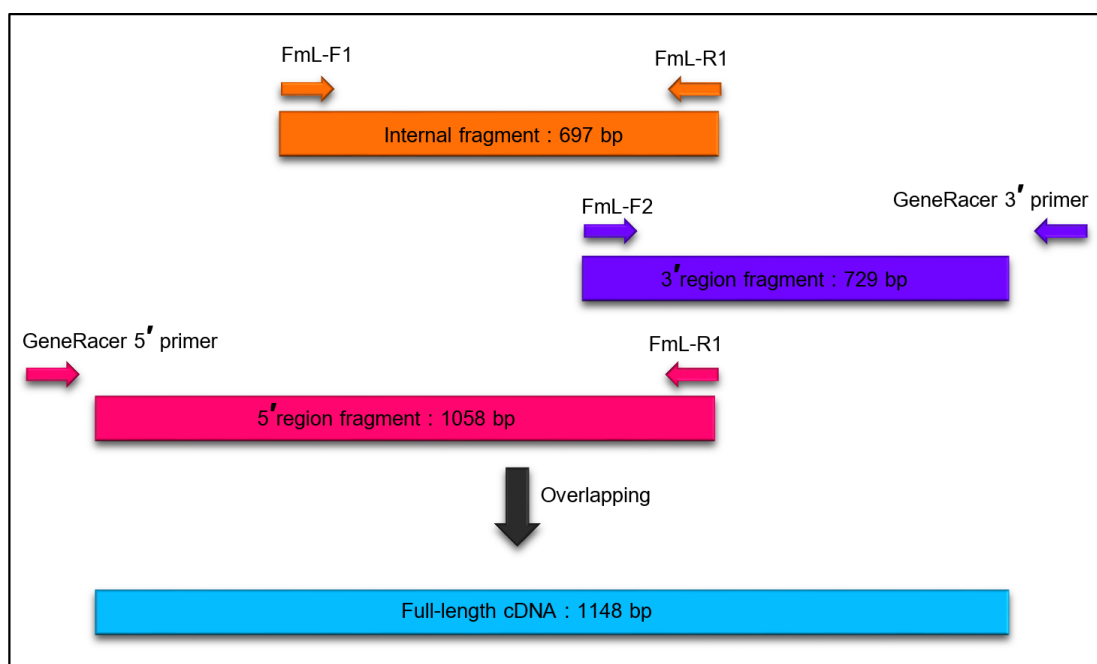
ศึกษาการตอบสนองของยีน FmL ต่อการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* โดยนำกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (ตัวละประมาณ 20 กรัม) จำนวน 4-5 ตัว ตัดตับเป็นชิ้นขนาดประมาณ 5 มิลลิกรัม บ่มกับ *V. harveyi* 5×10^7 cells ใน culture plate ที่มี K-199 ที่อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ในช่วง 0-4 ชั่วโมง นำชิ้นตับไปสกัด total RNA ด้วย Tripure isolation reagent กำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNase I และนำ total RNA ไปเตรียมเป็น cDNA สายแรก กำจัด mRNA ด้วย RNase H จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ FmL ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR เทียบกับการแสดงออกของ 18S rRNA ที่ใช้เป็น internal control

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การโคลนยีน FmL

จากการใช้ไพรเมอร์ FmL-F1 และ FmL-R1 โคลนยีน FmL ขึ้นกลางด้วยเทคนิค PCR แล้วส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีนขึ้นกลางที่โคลนได้มีขนาด 697 คู่เบส และมีความเหมือนกับ FcLec5 ของกุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) มากที่สุดคือ 89% หลังจากนั้นจึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นกลางไปออกแบบไพรเมอร์ FmL-F2 สำหรับนำไปใช้ในการทำ 3' RACE ในขณะที่ไพรเมอร์ FmL-R1 ถูกนำมาใช้อีกครั้งในการทำ 5' RACE เมื่อนำ FmL cDNA ขึ้นปลาย 5' และ ขึ้นปลาย 3' ที่โคลนได้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน FmL ขึ้นปลาย 5' และ ขึ้นปลาย 3' มีขนาด 1,058 และ 729 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพประกอบที่ 1) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสามชิ้นมาเชื่อมต่อกัน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์สายเต็มของยีน FmL มีขนาด 1,148 คู่เบส และแปลไปเป็นสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 335 หน่วย

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้เปรียบเทียบกับของเลคตินชนิดอื่น พบว่ามีความเหมือนดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ FmL มีความเหมือนกับ FcLec5 ของกุ้งขาวจีนมากที่สุด คือ 82% และเนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของ FmL มีความเหมือนกับ FmLC ในกุ้งแชบ๊วย(Rattanaporn & Utarabhand, 2011) เพียง 52% จึงถือได้ว่า FmL เป็นเลคตินชนิดใหม่ที่พบในกุ้งแชบ๊วย จากผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าเลคตินในกุ้งแชบ๊วยมีหลายชนิด สอดคล้องกับเลคตินในกุ้งอื่น ๆ ที่มีการค้นพบเลคตินมากกว่า 1 ชนิดเช่นกัน เช่น ในกุ้งขาวจีนมีการค้นพบเลคตินแบบ C ถึง 7 ชนิด คือ FcLec1 FcLec2 FcLec3 FcLec4 FcLec5 FcLec6 และ FcLectin ทั้งนี้การที่เลคตินในกุ้งนั้นมีมากมายหลายชนิดอาจเนื่องมาจากเลคตินแต่ละชนิดมีโดเมนต่างกัน โครงสร้างโปรตีนก้อนกลม (globular protein) ก็ต่างกัน ส่งผลให้ความจำเพาะในการจับกับเชื้อก่อโรคที่บุกรุกต่างกัน อีกทั้งเลคตินแต่ละชนิดมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างกัน และมีการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย จากเหตุผลดังกล่าวนี้เองที่ทำให้เลคตินที่พบในกุ้งและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มีความหลากหลาย



ภาพประกอบที่ 1 แผนผังการโคลนยีน FmL โดยแสดงขนาดและไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนขึ้นกลาง ขึ้นปลาย 5' และขึ้นปลาย 3'

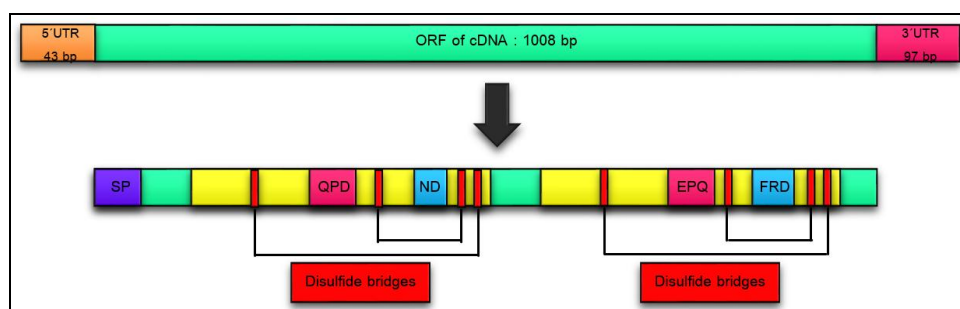
ตารางที่ 1 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ FmL กับของเลคตินของกุ้งชนิดอื่น

Name	Species	GenBank no.	% identity
FcLec5	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	ACJ06429	82

MjLectin-1	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AGW27416	73
FmLC	<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	ACR56805	52
LvLT	<i>Litopenaeus vannamei</i>	ABI97374	51

การศึกษาสมบัติของยีน FmL

จากการโคลนยีน FmL พบว่ายีน FmL มีนิวคลีโอไทด์สายเต็มจำนวน 1,148 คู่เบส โดยแบ่งเป็นส่วน 5' untranslated region (5' UTR) 43 คู่เบส 3' UTR 97 คู่เบส และส่วนที่แปลไปเป็นโปรตีน (open reading frame, ORF) 1,008 คู่เบส ซึ่งแปลไปเป็นสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 335 หน่วย มีมวลโมเลกุล 37.2 kDa และมีค่า pI เป็น 4.47 นอกจากนี้ในสายเปปไทด์ของ FmL มีส่วนของเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) 18 หน่วย แสดงว่าโปรตีนนี้ถูกส่งไปทำงานนอกเซลล์ได้ และมีส่วนของ CRD 2 โดเมน แต่ละโดเมนมีกรดอะมิโนซิสเทอีน 4 หน่วย ที่เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ได้ 2 พันธะ โดยแต่ละพันธะจะช่วยให้โครงสร้างของ CRD เสถียรมากขึ้น (Zelensky & Gready, 2005) นอกจากนี้ในแต่ละ CRD มี motif ที่ใช้จดจำและจับจำเพาะกับน้ำตาล พบว่าภายใน CRD1 มี QPD motif และ CRD2 มี EPQ motif ที่คาดว่าจะสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลกลาแลคโตสและแมนโนส ตามลำดับ ในรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า motif ที่ใช้จับจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนสมักเป็น EPN แต่งานวิจัยนี้ motif ที่ปรากฏใน CRD2 คือ EPQ แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการจดจำและจับจำเพาะของเลคติน เนื่องจากมีเลคตินแบบ C ชนิดที่มี EP* motif ชนิดอื่น ยังคงมีคุณสมบัติในการจดจำและจับจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส ได้ เช่น EPS motif ใน FcLec3 ของกุ้งขาวจีน EPQ motif ใน FcLec5 ของกุ้งขาวจีน และ EPD motif ใน LvCTL3 ของกุ้งขาวเป็นต้น (Wang & Wang, 2013) นอกจากนี้ภายในแต่ละ CRD โดเมนยังมีตำแหน่งจับของแคลเซียมคือ ND หรือ FRD ตามลำดับ (ภาพประกอบที่ 2) ซึ่งบ่งบอกว่าเป็นเลคตินแบบ C

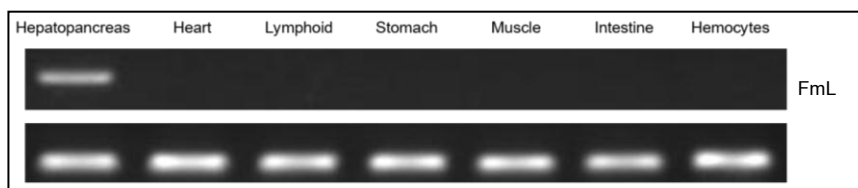


ภาพประกอบที่ 2 แผนผังโครงสร้างของ FmL แสดงตำแหน่งของโดเมนต่าง ๆ ที่สำคัญของ FmL

ประกอบด้วย signal peptide (SP) CRD 2 โดเมน ที่มี QPD และ EPQ motif และบริเวณจับกับแคลเซียมคือ ND และ FRD และตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเทอีนที่ใช้ในการเกิดพันธะไดซัลไฟด์

การศึกษาการแสดงออกของ FmL ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

จากการศึกษาการแสดงออกของ FmL ในระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีนนี้ในตับเท่านั้น โดยไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้แก่ หัวใจ lymphoid กระเพาะกล้ามเนื้อ ลำไส้ และฮีโมไซท์ (ภาพประกอบที่ 3) ก่อนหน้านี้มีการรายงานเลคตินหลายชนิดที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อตับเท่านั้น เช่น FmLC จากกุ้งแชบ๊วย FcLec1 FcLec2 FcLec5 จากกุ้งขาวจีน PmLT จากกุ้งกุลาดำ LvLT จากกุ้งขาว เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าตับเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการสังเคราะห์สารน้ำหรือโปรตีนต่าง ๆ ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของเลคตินที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น FcLectin ของกุ้งขาวจีนมีการแสดงออกในเม็ดเลือด (Liu et al., 2007) FcLec4 ของกุ้งขาวจีน และ hFcLec4 ของกุ้งครุมา (*Marsupenaeus japonicus*) มีการแสดงออกในกระเพาะ (Wang, Zhao, & Wang, 2014) เป็นต้น ทั้งนี้การพบเลคตินในเนื้อเยื่อที่หลากหลายอาจมีสาเหตุมาจากเลคตินเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการกำจัดเชื้อก่อโรคโดยการจดจำและจับจำเพาะกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์ของเชื้อก่อโรค จึงจำเป็นต้องมีการสร้างเลคตินไว้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เพื่อเผชิญหน้ากับเชื้อโรคบุกรุกที่หลากหลาย

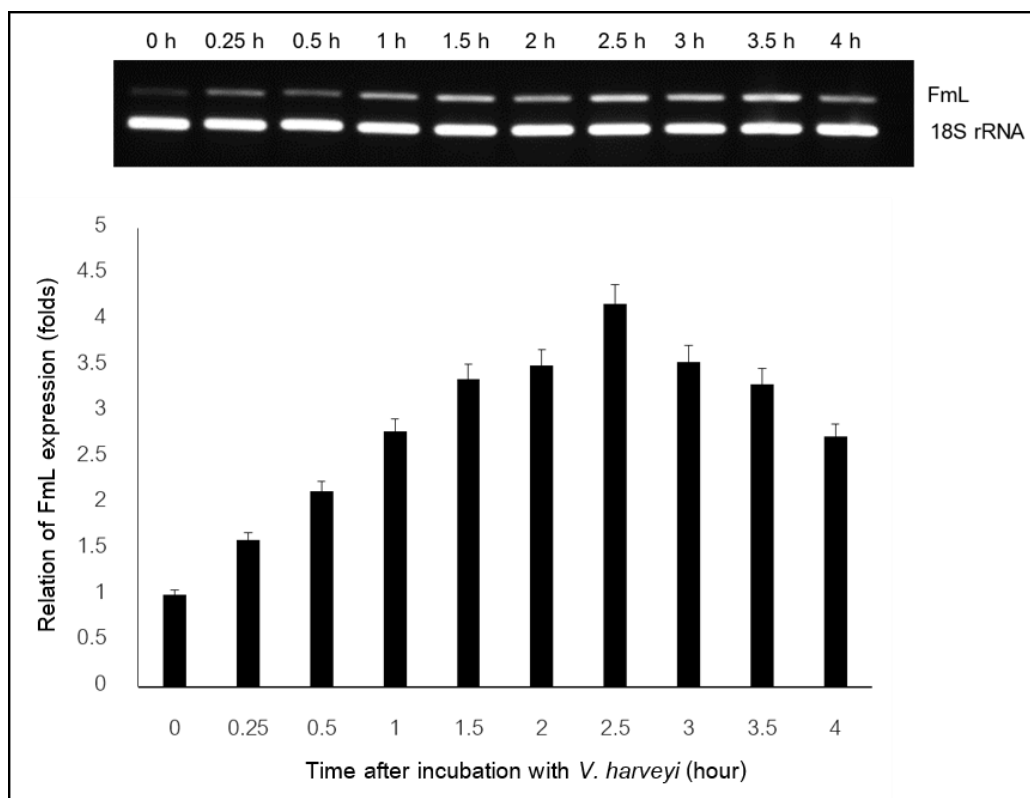


ภาพประกอบที่ 3 การแสดงออกของ FmL ในระดับ mRNA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้การแสดงออกของ 18S rRNA เป็นตัวควบคุม

การศึกษาผลการบ่มด้วยเชื้อก่อโรคต่อการแสดงออกของ FmL

จากการศึกษาผลการตอบสนองของ FmL ต่อเชื้อก่อโรค ด้วยการบ่มด้วย *V. harveyi* และวิเคราะห์ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่า FmL มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 0.25 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 2.5 ชั่วโมงหลังการบ่ม จากนั้นการแสดงออกของ FmL ลดลง (ภาพประกอบที่ 4) การแสดงออกของ FmL ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถูกกระตุ้นด้วย *V. harveyi* สอดคล้องกับการแสดงออกของ FmLC จากกุ้งแชบ๊วยซึ่งพบว่าการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าหลังจากดับถูกบ่มด้วย *V. harveyi* เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนเลคตินอื่น ๆ ที่มีการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคในกลุ่ม *Vibrio* ตัวอย่างเช่น FmLC1 ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการเหนี่ยวนำด้วยการฉีดด้วย *V. harveyi* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง รวมถึง FcLec3 และ FcLec5 จากกุ้งขาวจีน ซึ่งพบว่าการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังการเหนี่ยวนำด้วย *Vibrio anguillarum*

และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 12 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ (Wang et al., 2009; Xu et al., 2010) ส่วน LvLectin-1 และ LvLectin-2 ของกุ้งขาวมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการเหนี่ยวนำด้วย *V. anguillarum* เป็นเวลา 12 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ (Wei et al., 2012) จากรูปแบบการแสดงออกหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคในกลุ่ม *Vibrio* ของเลคตินในกุ้งที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคของเลคตินจะมีการแสดงออกของ mRNA เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับเชื้อก่อโรค ซึ่งน่าจะเป็นผลเพื่อตอบสนองต่อเชื้อบุกรุก บ่งชี้ได้ว่า FmL เป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเองของกุ้งแพบว้ย เช่นเดียวกับเลคตินชนิดอื่น ๆ ที่มีการรายงานก่อนหน้านี้



ภาพประกอบที่ 4 การแสดงออกของ FmL ในตับที่บ่มกับ *V. harveyi* ที่เวลาต่าง ๆ โดยภาพบน แสดงแบบแผนการแสดงออกของ FmL ใน agarose gel electrophoresis ภาพล่าง กราฟผลการแสดงออกของ FmL ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

สรุปผล

FmL เป็นเลคตินแบบ C ที่โคลนได้จากตับของกุ้งแชบ๊วย FmL ประกอบด้วย CRD 2 โดเมน ในแต่ละ CRD มี motif สำหรับจับจำเพาะกับน้ำตาล คือ QPD และ EPQ พบการแสดง ออกของยีน FmL เฉพาะในตับเท่านั้น นอกจากนี้พบว่า FmL มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า FmL เป็นเลคตินที่มีความสำคัญในการตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรค ทั้งนี้ยังจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทหน้าที่ และกลไกการทำงานของเลคตินเพื่อต่อต้านเชื้อก่อโรค และเพื่อเพิ่มพูนให้เข้าใจระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากโครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- Liu, Y. C., Li, F. H., Dong, B., Wang, B., Luan, W., Zhang, X. J., Zhang, L. S., & Xiang, J. H. (2007). Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Immunology*, 44(4), 598-607.
- Rattanaporn O., & Utarabhand P. (2011). Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: Early gene up-regulation after *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2), 196-204.
- Rittidach, W., Pajit, N., & Utarabhand, P. (2007). Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(1), 106-114.
- Thepnarong, S., Runsaeng, P., Rattanaporn, O., & Utarabhand, P., (2015). Molecular cloning of a C-type lectin with one carbohydrate recognition domain from *Fenneropenaeus merguensis* and its expression upon challenging by pathogenic bacterium or virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 1-8.
- Utarabhand, P., Rittidach, W., & Pajit, N. (2007). Bacterial agglutination by Sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the Banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. *Science Asia*, 33, 41-46.

- Wang, X. W., & Wang, J. X. (2013). Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 39(1-2), 27-38.
- Wang, X. W., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2014). C-type lectin binds to β -integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 2405-2414.
- Wei, X., Liu, X., Yang, J., Fang, J., Qiao, H., Zhang, Y., & Yang, J. (2012). Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(1), 132-140.
- Zelensky, A. N., & Gready, J. E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*, 272(24), 6179-6217.