การแสดงออกของยีนโปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูงจากกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis*) ที่กระตุ้นด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาว

Gene Expression of High Temperature Requirement Protein A2 (HtrA2) in banana shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) Challenged with WSSV

กนกวรรณ ขอค้า[1*], พันทิพา รุณแสง[2], อรณิชา รัตนาภรณ์[3], และประภาพร อุทารพันธุ์[4]
Kanokwan Khorha[1*], Phantipha Runsaeng[2], Onnicha Rattanaporn[3] and Prapaporn Utarabhand[4]

[1] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[1] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University
[1,3] ดร., ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[2,3] Dr., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University
[4] รองศาสตราจารย์ ดร., ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[4] Assoc. Prof. Dr., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University
[*] **Corresponding author, E-mail:** mew_tz@hotmail.com

บทคัดย่อ

ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเชื้อไวรัสก่อโรคที่ส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยทำให้กุ้งตายซึ่งนำไปสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจ อะพอพโทซิสหรือกระบวนการตายของเซลล์มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมถึงกุ้งด้วย โปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูงเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิส จากรายงานที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ทำการโคลนและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน HtrA2 จากกุ้งแชบ๊วย พบว่า ยีนสายเต็มที่โคลนได้มีความยาว 1,919 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้เป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 445 หน่วย ประกอบด้วย 5 โดเมนที่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยพบว่ายีน FmHtrA2 มีการแสดงออกมากที่สุดในตับและกล้ามเนื้อและพบเล็กน้อยในเนื้อเยื่ออื่น ๆ นอกจาก นี้ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงการตอบสนองของยีน FmHtrA2 ในตับของกุ้งแชบ๊วยเมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ในตับถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดที่ 72 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำด้วย WSSV จากข้อมูลเบื้องต้นที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจะนำไปสู่ความเข้าใจที่มากขึ้นเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองในการเกิดอะพอพโทซิสของกุ้ง

คำสำคัญ: โปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูง, กุ้งแชบ๊วย, ไวรัสตัวแดงดวงขาว, อะพอพโทซิส, ระบบภูมิคุ้มกัน

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most devastating viral pathogens in shrimp farming that causes high mortality and large economic loss. Apoptosis or programmed cell death plays an important role in the antiviral immunity of many organisms including shrimp. High temperature requirement protein A2 (HtrA2) is an apoptosis-activating protein to enhance apoptosis process. In the previous study, HtrA2 gene designated as FmHtrA2 has been cloned and characterized from banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis* in our lab. The full-length of this gene consisted of 1,919 bp encoding a polypeptide of 445 amino acids with five different domains. In this study, the tissue distribution profile of FmHtrA2 was examined. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed that the FmHtrA2 mRNA was expressed highly in the hepatopancreas and muscle but rarely in other tissues. In order to investigate molecular response of FmHtrA2 gene to WSSV infection, semi-quantitative RT-PCR analysis was also used to analyze gene expression pattern. The results showed that the temporal FmHtrA2 mRNA in the hepatopancreas was up-regulated to peak at 72 hr after stimulation with WSSV. From our preliminary data, the obtained results may lead to better understanding of defense mechanisms in term of apoptosis of shrimp.

Keywords: HtrA2, Apoptosis, *Fenneropenaeus merguiensis,* white spot syndrome virus, immune system

บทนำ

กุ้งแชบ๊วยเป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เป็นกุ้งขนาดใหญ่ ดูแลอนุบาลง่าย เจริญเติบโตรวดเร็ว มีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม แต่ปัจจุบันพบปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยาก คือ การติดเชื้อก่อโรคในกุ้งซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุหลักมาจากเชื้อตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) เมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นโรคตัวแดงดวงขาว ผลจากการติดเชื้อ WSSV ทำให้เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ เนื้อเยื่อใต้เปลือก เหงือก หัวใจ อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เม็ดเลือด และต่อมน้ำเหลืองซึ่งส่งผลทำให้กุ้งตาย (Söderhäll & Cerenius, 1998) ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันโรคมากขึ้น ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันหรือลดอัตราการตายของกุ้งอันเนื่องมาจากการติดเชื้อในกุ้งได้ โดยกลไกการป้องกันตนเองในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอาศัยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด แบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัย

สารน้ำ (humoral immunity) และนอกเหนือจากระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ระบบ ยังพบว่ามีอีกหนึ่งกระบวนการที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและมีความสำคัญต่อการต่อต้านเชื้อไวรัส กระบวนการดังกล่าว คือ อะพอพโทซิส (apoptosis)

อะพอพโทซิสเป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ที่มีแบบแผน มีความสำคัญในการพัฒนาการเจริญทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์และในการทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อหรือเซลล์ที่ไม่เป็นที่ต้องการเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต การเกิดอะพอพโทซิสขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ที่มีชื่อว่าแคสเปส (caspase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีสเตอีนโปรตีเอส (cysteine protease) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนหลายชนิด และเมื่อเอนไซม์แคสเปสถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Wyllie, Kerr, & Currie, 1980) ส่งผลให้เกิดการหดตัวของเซลล์ (cell shrinkage) การบวมของเซลล์ (blebbing) การแตกหักออกเป็นชิ้นส่วนของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) โครมาตินขดตัว (chromatin condensation) และดีเอ็นเอแตกหักเป็นท่อน (chromosomal DNA fragmentation) ทำให้เกิดการแยกสลายของเซลล์เป็นรูปแบบที่เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งจะถูกกินและย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) หรือเซลล์ข้างเคียง โดยในสภาวะปกติการเกิดอะพอพโทซิสจะถูกควบคุมโดยโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส (inhibitor of apoptosis protein, IAP) โปรตีน IAP จะหยุดการเกิดกระบวนการดังกล่าวโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แคสเปส ในความเป็นจริงแล้ว การเกิดอะพอพโทซิสถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดซึ่งล้วนแต่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสทั้งสิ้น โปรตีนหนึ่งในนั้น คือ โปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูง (High temperature requirement protein A2, HtrA2) (Cande et al., 2002)

โปรตีน HtrA2 จัดอยู่ในกลุ่ม high temperature requirement (HtrA) family พบทั้งในโปรคาริโอต (prokaryotes) และยูคาริโอต (eukaryotes) มีลักษณะเฉพาะตัวเป็นเอนไซม์ serine protease และมีโดเมน PDZ อยู่ภายในโครงสร้าง (Vande, Lamkanfi, & Vandenabeele, 2008) โปรตีนนี้มีบทบาทเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์โดยทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันการรวมตัวกันระหว่างโปรตีน IAP และเอนไซม์แคสเปส ส่งผลให้เอนไซม์แคสเปสเป็นอิสระทำให้สามารถไปกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสได้

ได้มีการศึกษาการเกิดอะพอพโทซิสในกุ้ง พบว่ากระบวนการดังกล่าวมีบทบาทในการหยุดการเพิ่มจำนวนของไวรัสเมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อ เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ให้กุ้งสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ และยังพบการรายงานถึงโปรตีน HtrA2 ในกุ้งกุลาดำ ที่มีชื่อว่า PmHtrA2 ภายในโครงสร้างของโปรตีนนี้ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสผ่านบริเวณจับของโปรตีน IAP ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน HtrA2 เป็น

โปรตีนที่มีความสำคัญในการเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสโดยผ่านบริเวณจับของโปรตีน IAP เพื่อไปหยุดการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อได้

แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบการรายงานถึงลักษณะ บทบาท หน้าที่ และกลไกการทำงานของโปรตีน HtrA2 ที่แน่ชัดในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง อีกทั้งยังไม่ปรากฏรายงานการศึกษาโปรตีน HtrA2 ในกุ้งแชบ๊วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ในการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ในกุ้งแชบ๊วย ซึ่งงานวิจัยอาจทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานระดับโมเลกุลของโปรตีน HtrA2 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสในกุ้งแชบ๊วยมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีน HtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากกุ้งแชบ๊วย
2. เพื่อศึกษาผลการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ต่อการแสดงออกของยีนโปรตีน HtrA2 ในกุ้งแชบ๊วย

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

กุ้งซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียนมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Loker, Adema, Zhang, & Kepler, 2004) มีกลไกการป้องกันตนเองเพื่อความอยู่รอดโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแบ่งออกได้ 2 ระบบ คือ

1. ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ มักใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์เป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การกลืนกินเซลล์ด้วยวิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการกักล้อม (encapsulation) สิ่งแปลกปลอม (Söderhäll & Cerenius, 1992)

2. ระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ ได้แก่ เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกด้วยวิธีการทำให้เซลล์แตก (hydrolysis) ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเอง (Söderhäll & Cerenius, 1992) สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ ไลโซไซม์มีฤทธิ์เล็กน้อยไม่สามารถทำให้เกิดการสลายของผนังเซลล์ และยังช่วยทำให้แบคทีเรียมีความไวต่อสารต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มากขึ้น

โปรตีน HtrA2 เป็นโปรตีนที่พบบริเวณไมโทคอนเดรียของเซลล์ มีลักษณะเฉพาะตัวเป็น serine protease และมีโดเมน PDZ โดยบทบาทสำคัญของโปรตีน HtrA2 พบการรายงานครั้งแรกโดยผ่านการจับกับโปรตีน IAP (Cande et al., 2002) ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์แคสเปสเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส นอกจากนี้ยังพบการรายงานถึง IBM ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ 4 ตัว คือ อะลานีน (alanine), วาลีน (valine), กลูตามีน (glutamine) และอะลานีน ซึ่งกรดอะมิโนอะ

ลานีนและวาลีน ในตำแหน่งที่ 1 และ 2 เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ ซึ่งสามารถจับกับโดเมน Zinc-finger baculovirus IAP repeat (BIR) ของโปรตีน IAP ได้

ปัจจุบันมีการศึกษาโปรตีน HtrA2 ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน โดยมีรายงานโปรตีน HtrA2 ในกุ้งกุลาดำ (PmHtrA2) พบว่า PmHtrA2 มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีน 2 ชนิด คือ Pmcaspase (Wongprasert, Sangsuriya, Phongdara, & Senapin, 2007) และ PmIAP (Leu, Kuo, Kou, & Lo, 2008) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิส และจากการศึกษาโปรตีน HtrA2 พบว่าประกอบด้วย 5 โดเมน คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดอะพอพโทซิส โดยในสภาวะปกติโปรตีน HtrA2 ถูกสร้างและเก็บในไมโทคอนเดรีย เมื่อเซลล์ได้รับสัญญาณการตายโดเมน MTS และ TM ซึ่งอยู่ที่ด้านปลาย N ถูกตัดพันธะเปปไทด์ออก ทำให้สายเปปไทด์ที่มีโดเมน IBM, serine protease และ PDZ เคลื่อนที่ออกจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาซึม และรวมตัวเป็นรูปทรงสามเหลี่ยมปิรามิด ซึ่งจะมี IBM เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่มีกรดอะมิโน 4 ตัว ได้แก่ อะลานีน วาลีน กลูตามีน และอะลานีน ทำหน้าที่จับกับโปรตีน IAP ผ่านโดเมน BIR ส่งผลทำให้โครงสร้างของโดเมน PDZ เปลี่ยนแปลงไป นำไปสู่การกระตุ้น serine protease ให้อยู่ในรูปที่ทำงาน ซึ่งจะไปย่อยโปรตีน IAP ทำให้เกิดอะพอพโทซิสขึ้นได้ (Li et al., 2002)

จากรายงานเกี่ยวกับโปรตีน HtrA2 พบว่าการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของโปรตีน HtrA2 และกลไกการเกิดอะพอพโทซิสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนยังมีน้อยมากและยังไม่พบรายงานในกุ้งแชบ๊วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ในการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ในกุ้งแชบ๊วย เพื่อที่จะทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานระดับโมเลกุลของโปรตีน HtrA2 ที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ในกุ้งแชบ๊วยมากยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีน HtrA2

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ (gene specific primer) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน HtrA2 จากกุ้งแชบ๊วย (FmHtrA2) ที่คณะผู้วิจัยได้มีการโคลนมาก่อนหน้านี้ ด้วยโปรแกรม Vector NTI ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ cDNA สายแรกที่เตรียมได้จากตับของกุ้งแชบ๊วยเป็น DNA แม่แบบ ทำการโคลนดีเอ็นเอแล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของยีน FmHtrA2 ที่โคลนได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายเต็ม (full-length) ของยีน FmHtrA2 ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นเป็นส่วนของยีน FmHtrA2 จริง ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของยีน FmHtrA2 ของกุ้งแชบ๊วยที่โคลนได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีน HtrA2 จากกุ้งหรือครัสเต

เชียนชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในธนาคารยีน ผ่านฐานข้อมูล NCBI ใช้ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ และการตอบสนองของยีนต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อไป

การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีน HtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย

ศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีน HtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย โดยการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เซลล์ฮีโมไซท์ กล้ามเนื้อ ลำไส้ หัวใจ ตับ กระเพาะอาหารลิมฟอยด์ และเหงือก จากนั้นดูการแสดงออกของ mRNA ของยีนโปรตีน HtrA2 ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ด้วยการทำ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วย SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) โดยเทียบกับการแสดงออกของยีน 18S rRNA ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

การศึกษาการแสดงออกของยีน HtrA2 หลังจากถูกกระตุ้นด้วย WSSV

การเตรียมกุ้งตัวอย่างก่อนการเหนี่ยวนำด้วย WSSV

เลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในถังพลาสติกกลมความจุ 25 แกลลอน โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกุ้งดังนี้ ล้างถัง ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อประมาณครึ่งถัง ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 อาทิตย์ แล้วนำกุ้งที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 10-15 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 5-7 ตัว โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถัง นาน 3 วัน โดยสังเกตว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ

การเตรียม WSSV

สำหรับ WSSV เตรียม stock WSSV โดยตัดกล้ามเนื้อของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV บดให้ละเอียดใน TBS ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักเนื้อเยื่อ:ปริมาตร TBS) (กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffman, 2543) แล้วปั่นตก ที่ความเร็ว 41,800xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่กรองผ่านกระดาษกรอง (0.45 ไมครอน) ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดลองต่อไป

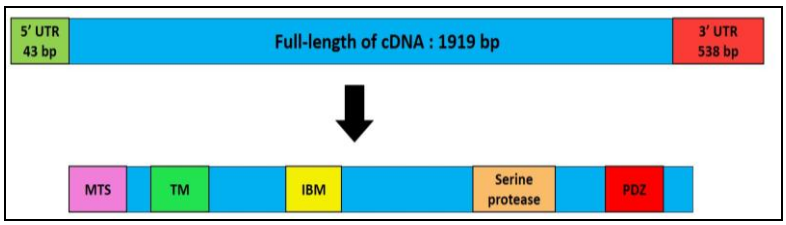
การศึกษาผลการฉีดกุ้งด้วย WSSV ต่อการแสดงออกของยีน HtrA2

ฉีดกุ้งด้วย WSSV ที่เจือจาง 10^{-6} เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ ตัดตับจากกุ้งทั้ง 2 กลุ่มหลังการฉีดที่เวลา 0, 3, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง กลุ่มละ 5-7 ตัว จากนั้นนำตับที่

ได้ไปสกัด total RNA เพื่อวัดการแสดงออกของยีนโปรตีน HtrA2 ของกุ้งด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ 18S rRNA เป็นยีนควบคุม

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

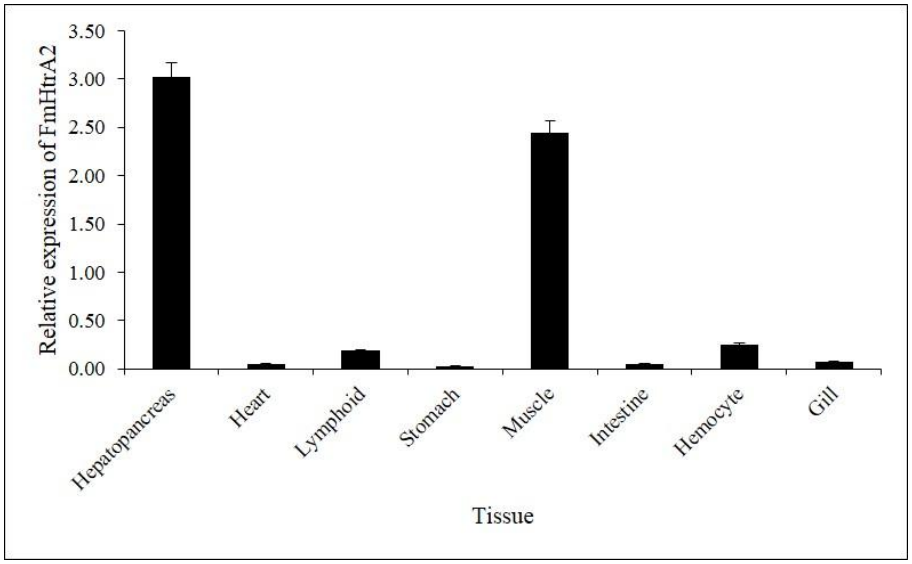
จากการศึกษายีนสายเต็มของ FmHtrA2 จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ายีนสายเต็มมีความยาว 1,919 คู่เบสซึ่งถอดรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 445 หน่วย ภายในโครงสร้างของ FmHtrA2 ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ mitochondria targeting signal (MTS), transmembrane (TM) domain, IAP-binding motif (IBM), serine protease domain และ PDZ domain (ภาพประกอบที่1) สามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบได้เมื่อนำมาใช้ในการโคลนดีเอ็นเอของยีน HtrA2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA สายแรกที่เตรียมได้จากตับของกุ้งแชบ๊วยเป็น DNA แม่แบบ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าดีเอ็นเอชิ้นกลางของยีน HtrA2 มีความยาว 851 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่ามีความเหมือนกับยีน PmHtrA2 จากกุ้งกุลาดำ 97% และเมื่อเปรียบเทียบกับยีน FmHtrA2 จากกุ้งแชบ๊วยพบว่ามีความเหมือนกัน 100% จากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้เป็นส่วนหนึ่งของยีนโปรตีน HtrA2 จากกุ้งแชบ๊วย



ภาพประกอบที่ 1 แบบแผนของยีน HtrA2 ของกุ้งแชบ๊วย

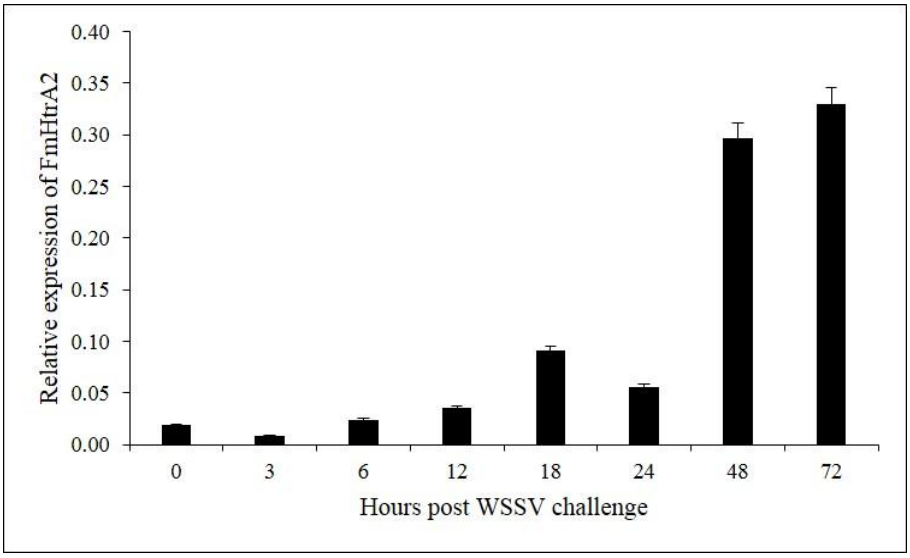
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ในระดับ mRNA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ 18S rRNA เป็นยีนควบคุม พบว่ามีการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ในทุกเนื้อเยื่อที่มีการทดสอบ คือ ตับ หัวใจ ลิมฟอยด์ กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อ ลำไส้ เซลล์ฮีโมไซท์ และเหงือก โดยพบการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับ รองลงมาคือ กล้ามเนื้อ ส่วนหัวใจ ลิมฟอยด์ กระเพาะอาหาร ลำไส้ เซลล์ฮีโมไซท์ และเหงือกมีการแสดงออกน้อย จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า โปรตีน FmHtrA2 น่าจะเป็นโปรตีนที่มีบทบาทกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วย เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ซึ่งภายในตับมีการแสดงออกของ

ยีน FmHtrA2 จำนวนมาก เพื่อใช้ในกระบวนการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุกต่าง ๆ นอกจากนี้กล้ามเนื้อเป็นอวัยวะที่มีการสัมผัสกับเชื้อโรคโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้บ่อย จึงพบการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ในปริมาณมากเช่นเดียวกันแต่อย่างไรก็ตามยังมีปริมาณน้อยกว่าตับ (ภาพประกอบที่ 2)



ภาพประกอบที่ 2 การแสดงออกของ mRNA ของยีน FmHtrA2 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย

จากการศึกษาผลการตอบสนองของยีน HtrA2 จากตับของกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรค WSSV ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่า ยีน FmHtrA2 มีการแสดงออกลดลงเล็กน้อยที่ชั่วโมงที่ 3 และค่อย ๆ แสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 18 และลดลงในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากชั่วโมงที่ 48 ถึงชั่วโมงที่ 72 และมีการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 72 หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV (ภาพประกอบที่ 3) จากผลการทดลองหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ของยีน FmHtrA2 ในระดับ mRNA ของกุ้งแชบ๊วย แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ HtrA2 จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ WSSV จากรูปแบบการแสดงออกของยีน FmHtrA2 ในกุ้งแชบ๊วยบ่งชี้ได้ว่า FmHtrA2 เป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องในกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วย



ภาพประกอบที่ 3 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน HtrA2 ในตับของกุ้งแชบ๊วยหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ

สรุป

จากการโคลนยีนโปรตีน FmHtrA2 จากกุ้งแชบ๊วย สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสามารถใช้ในโคลนดีเอ็นเอชิ้นกลางของยีน FmHtrA2 จากตับของกุ้งแชบ๊วย ดีเอ็นเอที่โคลนมีความยาว 851 คู่เบส ไพรเมอร์ดังกล่าวยังสามารถใช้ในการติดตามการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และการแสดงออกของยีนในตับภายหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV ซึ่งพบว่าระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน FmHtrA2 พบได้ในตับมากที่สุด รองลงมาคือกล้ามเนื้อ และพบว่ายีน FmHtrA2 มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 18 จากนั้นจะมีการแสดงออกลดลงในชั่วโมงที่ 24 และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 48 และชั่วโมงที่ 72 หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน FmHtrA2 มีความเกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อ WSSV อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาท หน้าที่ และกลไกการทำงานของโปรตีน FmHtrA2 ในการต่อต้านไวรัสก่อโรคในกุ้งเพื่อก่อให้เกิดความเข้าใจระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสของกุ้งแชบ๊วยต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาภายใต้โครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffman. (2543). ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. *วารสารสงขลานครินทร์ 22 (ฉบับพิเศษ)*, 581-588.

Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie, 84*, 215-222.

Leu, J. H., Kuo, Y. C., Kou, G. H., & Lo, C. F. (2008). Molecular cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, *Developmental and Comparative Immunology, 32,* 121-133.

Li, W., Srinivasula, S. M., Chai, J., Li, P., Wu, J. W., Zhang, Z., Alnemri, E. S., & Shi, Y. (2002). Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nature Structural & Molecular Biology, 9*, 436-441.

Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M., & Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews, 198*, 10-24.

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1992). Crustacean Immunity. *Annual Review of Fish Diseases, 2,* 3-23.

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, *10,* 23-28.

Vande Walle, L., Lamkanfi, M., & Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell death and differentiation, 15*, 453-460.

Wongprasert, K., Sangsuriya, P., Phongdara, A., & Senapin, S. (2007). Cloning and characterization of a caspase gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)-infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Biotechnology, 131*, 9-19.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology, 68*, 251-306.