การแสดงออกของยีนโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิสในกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis*) ที่กระตุ้นด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาว

Gene Expression of Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) in Banana Shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) Inoculated with White Spot Syndrome Virus (WSSV)

มนัลยา เพชรหวน[1*], พันทิพา รุณแสง[2], ประภาพร อุทารพันธุ์[3], และอรณิชา รัตนาภรณ์[4]

Manunya Phethuan[1*], Phantipha Runsaeng[2], Prapaporn Utarabhand[3] and Onnicha Rattanaporn[4]

[1] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

[2,4] ดร., ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[2,4] Dr., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

[3] รองศาสตราจารย์ ดร., ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[3] Associate Professor Dr., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

[*] **Corresponding author, E-mail:** me_Nerd-za@msn.com

บทคัดย่อ

อะพอพโทซิสเป็นโปรแกรมการตายของเซลล์เพื่อใช้ในการทำลายเซลล์ที่ต้องการหรือเซลล์ที่ติดเชื้อเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต โปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส (Inhibitors of apoptosis protein, IAP) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในควบคุมการเกิดอะพอพโทซิส งานวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้โคลนและศึกษาคุณลักษณะของยีนสายเต็มของ IAP จากกุ้งแชบ๊วย ที่มีชื่อว่า FmIAP พบว่า cDNA สายเต็มของยีนที่โคลนได้มีความยาว 4,748 คู่เบส มีส่วนที่แปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 698 หน่วย ประกอบด้วย โดเมน zinc-binding baculoviral IAP repeat (BIR) 3 โดเมน และโดเมน really interesting new gene (RING) 1 โดเมนอยู่ทางด้านที่ปลาย C งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน FmIAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยพบว่ายีน FmIAP มีการแสดงออกมากที่สุดในตับ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน FmIAP กับระบบภูมิคุ้มกัน ผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ white

spot syndrome virus (WSSV) พบว่ายีน FmIAP มีการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 หลังการกระตุ้น จากงานวิจัยนี้บ่งชี้ได้ว่า FmIAP เป็นยีนที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญและมีบทบาทในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งแชบ๊วย
คำสำคัญ: ยีนโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส กุ้งแชบ๊วย

Abstract

Apoptosis is genetically programmed cellular killing processes that execute unnecessary or infected cells. Inhibitors of apoptosis protein (IAPs) play important roles in apoptosis as anti-apoptotic regulators. Previously, we have cloned and characterized a full-length cDNA of IAP from *Fenneropenaeus merguiensis* (designated as FmIAP). The cDNA of FmIAP was 4,748 bp in length encoding a polypeptide of 698 amino acids. Its primary structure contains three zinc-binding baculoviral IAP repeat (BIR) domains and a C-terminal really interesting new gene (RING) domain. In the present study, the tissue distribution of FmIAP was studied by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. FmIAP mRNA was mainly expressed in hepatopancreas. To test whether FmIAP is related to shrimp immune defense, semi-quatitative RT-PCR was employed to quantify the time course expression of FmIAP in hepatopancreas of shrimp after injection with WSSV. The mRNA level of FmIAP was up-regulated and peaked at 24 h upon WSSV challenging. The collective results indicate that FmIAP is an essential immune gene that participates in influences the immune response against WSSV infection in *F. merguiensis*.
Keywords: inhibitor of apoptosis protein, *Fenneropenaeus merguiensis*, white spot syndrome virus

บทนำ

กุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย กุ้งที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่ คือ กุ้งแช บ๊วย มีชื่อสามัญว่า banana shrimp มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Fenneropenaeus merguiensis* อยู่ในวงศ์เดียวกับกุ้งกุลาดำ เปลือกบาง เนื้อมาก มีรสชาติดีจึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ ปัจจุบันการเพาะฟักและการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยประสบปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยาก คือ โรคติดเชื้อในกุ้งซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) เมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นตัวแดงดวงขาวทำให้กุ้งตาย (Söderhäll & Cerenius, 1998) ทำให้มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรค (immune system) ในกุ้งมากขึ้น จากองค์ความรู้ที่ได้สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้ง Bulgakov et al. (2004) พบว่า สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) ส่วนใหญ่มีการป้องกัน

ตนเองโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกัน 2 ระบบ คือระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ (humural immunity) นอกจากระบบภูมิคุ้มกันที่กล่าวมาแล้วนั้นยังมีรายงานว่า การเกิดอะพอพโทซิส (apoptosis) มีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิดต่อการติดเชื้อไวรัส (Miller & White, 1998; Everett & MaFadden, 1999) ซึ่งการเกิดอะพอพโทซิสมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องหลายชนิด เช่น เอนไซม์แคสเปส (caspase) ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หลักในการกระตุ้นกลไกสำคัญในการเกิดอะพอพโทซิส โปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส (inhibitor of apoptosis protein, IAP) (White, 1996) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการนี้ และยังมีโปรตีน A2 ที่ต้องการอุณหภูมิสูง (high temperature requirement, HtrA2) ทำหน้าที่ยับยั้งโปรตีน IAP ซึ่งจะทำให้เกิดอะพอพโทซิสขึ้นได้

โปรตีน IAP เป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิส แต่อย่างไรก็ตามรายงานการพบยีนโปรตีน IAP ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนยังมีไม่มากนัก โดยมีรายงานในกุ้งกุลาดำ (Leu et al., 2008) และในกุ้งขาว (Leu et al., 2012) จากการรายงานของโปรตีนดังกล่าวในกุ้งทั้งสองชนิดบ่งชี้ว่าโปรตีน IAP มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากยังไม่พบรายงานของยีนโปรตีน IAP จากกุ้งแชบ๊วย และการตอบสนองดังกล่าวต่อเชื้อ WSSV ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติระดับโมเลกุลของยีนโปรตีน IAP จากกุ้งแชบ๊วย (FmIAP) รวมถึงศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งแชบ๊วย ซึ่งงานวิจัยนี้ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานระดับโมเลกุลของยีนโปรตีน FmIAP จากกุ้งแชบ๊วยหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสของโรคตัวแดงดวงขาวมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีน IAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากกุ้งแชบ๊วย
2. เพื่อศึกษาผลของการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ต่อการแสดงออกของยีน IAP จากกุ้งแชบ๊วย

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

กลไกการป้องกันตนเองของสัตว์แบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) พบทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เพราะสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคมาจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Loker et al., 2004) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนซึ่งรวมทั้งกุ้งแชบ๊วย กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวและกุ้งชนิดอื่น ๆ มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ (Yu et al., 2002) ระบบแรกคือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มักใช้เซลล์ฮีโมไซท์เป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Bauchau, 1981) ระบบที่สองคือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยสารน้ำ โดยจะอาศัยโปรตีนหรือเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ไลโซไซม์

(lysozyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกด้วยวิธีการทำให้เซลล์แตก (hydrolysis) และเป็นกลไกการป้องกันตนเอง (defense mechanism) (Söderhäll & Cerenius, 1992)

อะพอพโทซิส เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immune response) ซึ่งมีความสำคัญทั้งในภาวะปกติ และภาวะที่ร่างกายมีพยาธิสภาพ ในภาวะปกติการเกิดอะพอพโทซิสจำเป็นสำหรับการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อ เช่น ในกระบวนการหมุนเวียนของเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ใหม่ การกำจัดเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย เซลล์ที่หมดอายุ หรือหมดหน้าที่ ตลอดจนการสร้างอวัยวะและเนื้อเยื่อในกระบวนการพัฒนาตัวอ่อนในครรภ์มารดา นอกจากนี้ในภาวะที่ร่างกายมีพยาธิสภาพ เช่น การติดเชื้อไวรัส ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองเพื่อกำจัดเซลล์ผิดปกติผ่านการเกิดอะพอพโทซิส ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีการควบคุมโดย multiple regulators หลายชนิด ทั้งที่เป็นควบคุมแบบ pro-apoptotic และ anti-apoptotic regulator ในการเกิดอะพอพโทซิสมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องหลายชนิด

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิสซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญและเป็นองค์ประกอบหลักในระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิดและมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิส ซึ่งพบการรายงานในยีสต์ หนอนตัวกลม แมลงวัน สัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (O'Riordan et al., 2008) และในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมีโปรตีน IAP ซึ่งมีหน้าที่ในการจดจำโครงสร้างของโปรตีน โดเมนที่พบในโครงสร้างของโปรตีน IAP คือ โดเมน BIR (zinc-binding baculoviral IAP repeat) พบที่ปลาย N และโดเมน RING (really interesting new gene) พบที่ปลาย C โดเมน BIR ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 70 หน่วย จากจำนวนกรดอะมิโนของโปรตีน IAP ทั้งหมด โปรตีน IAP ส่วนใหญ่ที่มีการศึกษาในกุ้งมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโดเมน BIR สามโดเมน โดยโดเมน BIR สามารถจับโดยตรงและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แคสเปส ในขณะเดียวกันโดเมน BIR ยังสามารถจับกับโปรตีนที่ประกอบด้วยโดเมน IBM (Liston et al., 2003; O'Riordan et al., 2008) ซึ่งโปรตีนที่มีโดเมน IBM จะเป็นตัวต้านการทำงานของโปรตีน IAP เมื่อโปรตีนที่มีโดเมน IBM จับกับโดเมน BIR ของโปรตีน IAP ส่งผลให้โปรตีนดังกล่าวถูกย่อยโดยเอนไซม์แคสเปสที่เหลืออยู่ จึงเริ่มต้นการเกิดอะพอพโทซิส (Liston et al., 2003; O'Riordan et al., 2008)

การศึกษาเกี่ยวกับยีนโปรตีน IAP ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนยังมีไม่มากนัก โดยมีรายงานในกุ้งกุลาดำ (Leu et al., 2008) และในกุ้งขาว (Leu et al., 2012) และไม่พบรายงานในกุ้งแชบ๊วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งแชบ๊วย

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาสมบัติของยีน FmIAP

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ (gene specific primer) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน IAP จากกุ้งแชบ๊วยที่ได้มีการโคลนมาก่อนหน้านี้โดยมนัลยาและคณะ ด้วยโปรแกรม Vector NTI ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำ PCR โดยใช้ cDNA สายแรกที่เตรียมได้จากตับของกุ้งแชบ๊วยเป็น DNA แม่แบบ ทำการโคลนดีเอ็นเอแล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของยีน FmIAP ที่โคลนได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายเต็ม (full-length) ของยีน FmIAP ที่โคลนได้ก่อนหน้านี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นี้เป็นส่วนของยีน FmIAP จริง ใช้ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน FmIAP ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ และการตอบสนองของยีนต่อเชื้อไวรัสของโรคตัวแดงดวงขาวต่อไป

การศึกษาการแสดงออกของยีน FmIAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน FmIAP แต่ละชนิดในเนื้อเยื่อต่าง ๆ สกัด total RNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เซลล์ฮีโมไซท์ กล้ามเนื้อ ลำไส้ หัวใจ ตับ ลิมฟอยด์ เป็นต้น จากนั้นดูการแสดงออกของ mRNA ของยีน FmIAP โดยการทำ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วย SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) โดยนำผลผลิตของ FmIAP และ 18S rRNA ที่ได้จากการทำ PCR ตรวจสอบการแสดงออกด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1% วัดความเข้มของแถบ (band intensity) โดยใช้ Gel Document รุ่น BioDoc-It™ system ด้วยโปรแกรม Labworks 4.0 คำนวณค่าอัตราส่วนความเข้มของแถบของยีน FmIAP เทียบกับยีน 18S rRNA (relative intensity)

การศึกษาผลการฉีดกุ้งด้วย WSSV ต่อระดับการแสดงออกของยีน FmIAP

ศึกษาผลการเหนี่ยวนำด้วยจุลินทรีย์ต่อการแสดงออกของยีน FmIAP ในเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด จุลินทรีย์ก่อโรคกุ้งที่จะใช้ คือ ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (WSSV) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การเตรียม WSSV

เตรียม stock WSSV โดยตัดกล้ามเนื้อของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV บดให้ละเอียดใน TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 0.85% NaCl) ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักเนื้อเยื่อ:ปริมาตร TBS) (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543) แล้วปั่นตก ที่ความเร็ว 41,800xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่กรองผ่านกระดาษกรอง (0.45 ไมครอน) ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดลองต่อไป

การเตรียมกุ้งตัวอย่างก่อนการเหนี่ยวนำด้วย WSSV

เลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในถังพลาสติกกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกุ้งดังนี้ ล้างถัง ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อปริมาตร

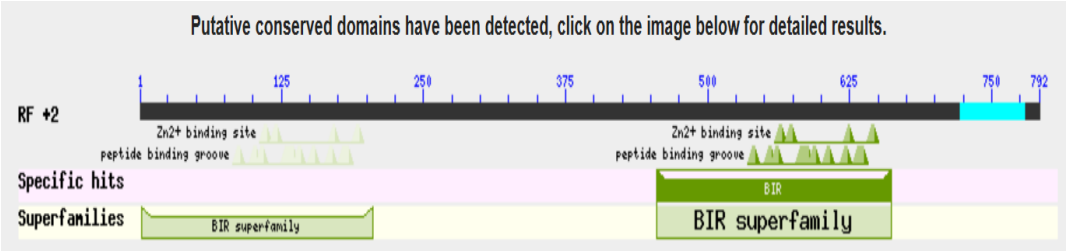
ประมาณครึ่งถัง ลงในถัง ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 อาทิตย์ แล้วนำกุ้งที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 10 - 15 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 5 - 7 ตัว โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถัง นาน 3 วัน โดยสังเกตว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ

การศึกษาผลการฉีดกุ้งด้วย WSSV ต่อการแสดงออกของยีน FmIAP

ฉีดกุ้งด้วย WSSV ที่เจือจาง 10^{-6} เท่า ปริมาตรตัวละ 100 ไมโครลิตร ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ ตัดตับจากกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม หลังการฉีดที่เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง กลุ่มละ 5 ตัวจากนั้นนำส่วนหนึ่งไปสกัด total RNA เพื่อวัดการแสดงออกของยีน FmIAP จากกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ 18S rRNA เป็นยีนควบคุม

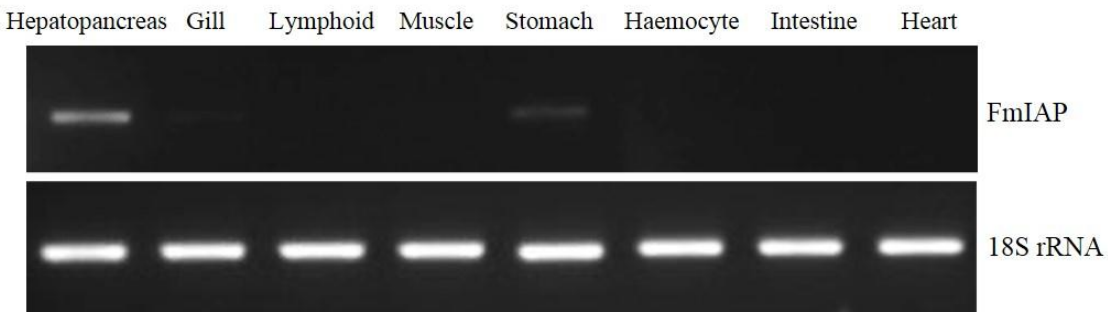
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษายีนสายเต็มของ FmIAP จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ายีนสายเต็มที่โคลนได้มีความยาว 4,748 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนปลาย 5' ที่ไม่แปลรหัส 584 คู่เบส มี open reading frame (ORF) ที่มีขนาด 2,097 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 698 หน่วย และมีส่วนปลาย 3' ที่ไม่แปลรหัส 2,067 คู่เบส ภายในโมเลกุลของโปรตีน FmIAP พบโดเมน zinc-binding baculoviral IAP repeat (BIR) 3 โดเมน และพบโดเมน really interesting new gene (RING) 1โดเมน ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย C ของโครงสร้างของโปรตีน จากข้อมูลที่ได้มีการศึกษาสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน FmIAP ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบได้เมื่อนำมาเพิ่มจำนวน DNA ของยีน FmIAP ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA สายแรกที่เตรียมได้จากตับของกุ้งแชบ๊วยเป็น DNA แม่แบบ พบว่าชิ้นส่วน DNA ของยีน FmIAP ที่ได้มีความยาว 791 คู่เบส เมื่อทำการโคลนและหาลำดับนิว คลีโอไทด์และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastP พบโดเมน BIR 1 โดเมนดังแสดงในภาพประกอบที่ 1และพบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน FmIAP ที่โคลนได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 94%, 89% และ 100% กับยีน PmIAP จากกุ้งกุลาดำ (*P. monodon* IAP), LvIAP1 (*L. vannamei* IAP1) จากกุ้งขาว และ FmIAP (*F. merguiensis* IAP) ตามลำดับ จากผลการทดลองบ่งชี้ว่ายีนที่โคลนได้เป็นยีนโปรตีน FmIAP ของกุ้งแชบ๊วย



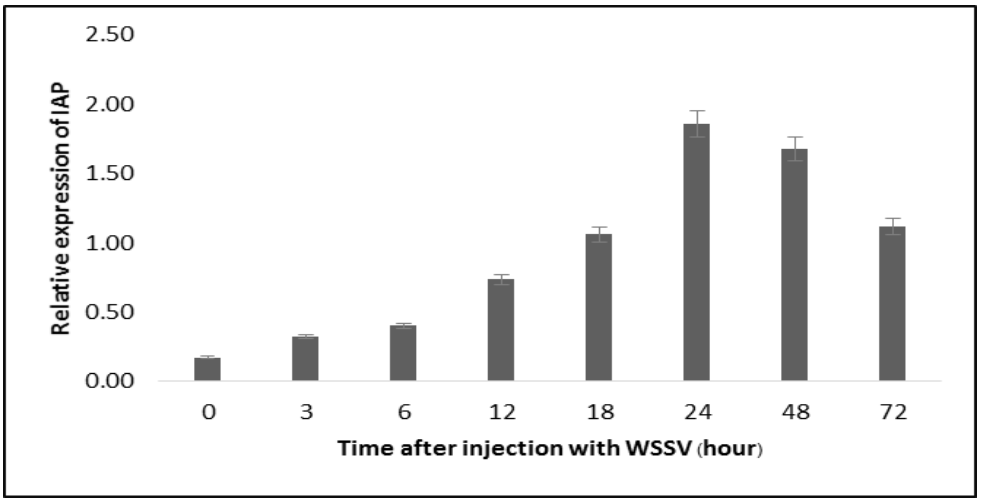
ภาพประกอบที่ 1 โดเมนอนุรักษ์ (BIR domain) ของชิ้นส่วนยีน FmIAP จากกุ้งแชบ๊วย

จากการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ FmIAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วย ได้แก่ ตับ หัวใจ ลำไส้ ลิมฟอยด์ กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อ เหงือก และฮีโมไซท์ พบมีการแสดงออกของยีน FmIAP มากที่สุดในตับ รองลงมาคือ กระเพาะอาหารและเหงือก ดังแสดงในภาพประกอบที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน IAP ที่มีรายงานในครัสเตเชียนที่มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อเช่นกัน ได้แก่ โปรตีน PmIAP จากกุ้งกุลาดำ พบการแสดงออกมากในตับ ลิมฟอยด์ และเหงือก และโปรตีน LvIAP1 จากกุ้งขาว พบการแสดงออกมากในลิมฟอยด์ และพบน้อยกว่าในหัวใจ และลำไส้ จากการเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในกุ้งต่างชนิดกันพบว่า ถึงแม้ว่ายีนนี้จะมีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อ แต่เนื้อเยื่อหลักที่พบการแสดงออกของยีนนี้ คือ ตับ ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารน้ำหรือโปรตีนชนิดต่าง ๆ รวมทั้งมีบทบาทในการกำจัดจุลินทรีย์ ดังนั้นในการพบการแสดงออกของยีน FmIAP มากในตับ บ่งชี้ว่า FmIAP น่าจะเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีความสำคัญในกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วย



ภาพประกอบที่ 2 การแสดงออกของ mRNA ของยีนโปรตีน FmIAP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับ 18S rRNA ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโปรตีน FmIAP จากตับของกุ้งแชบ๊วยหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน FmIAP มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 คือ 1.9 เท่า แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 และ 72 พบว่ายีน FmIAP มีการแสดงออกลดลง จากรูปแบบการแสดงออกของ mRNA ของ FmIAP ที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับ WSSV เพื่อตอบสนองต่อเชื้อผู้บุกรุก บ่งชี้ได้ว่า FmIAP เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วย อย่างไรก็ตามงานวิจัยต่อไปที่ผู้วิจัยจะทำการศึกษาคือการศึกษาคุณสมบัติของ FmIAP ในระดับโปรตีนเพื่อที่จะทราบบทบาทของโปรตีน FmIAP ในระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งแชบ๊วยต่อไป



ภาพประกอบที่ 3 การแสดงออกของ mRNA ของยีนโปรตีน FmIAP ในตับของกุ้งหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีน FmIAP จากกุ้งแชบ๊วย สามารถโคลนชิ้นส่วน DNA ของยีน FmIAP ที่มีความยาว 791 คู่เบส และพบว่าระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน FmIAP พบในตับมากสุด รองลงมาคือกระเพาะอาหารและเหงือก ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีนในหลายเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน IAP ที่มีรายงานในครัสเตเชียนที่มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อเช่นกัน

ส่วนการแสดงของยีน FmIAP ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำกุ้งให้ติดเชื้อ WSSV พบว่ายีนมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน FmIAP มีบทบาทในการตอบสนองต่อ WSSV ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทหน้าที่ และกลไกการทำงาน เพื่อต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและให้เกิดความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

มากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่ได้นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อไปในอนาคต

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.

Bauchau, A. G. (1981). Crustaceans. In N. A. Ratcliffe, & F. F. Rowley (Eds.), *Invertebrate Blood Cells* (pp. 385-420), London, LON: Academic Press Inc.

Bulgakov, A. A., Park, K., Choi, K. S., Lim, H. K., & Cho, M. (2004). Purification and characterization of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philipinarum* in Korea. *Fish and Shellfish Immunology, 16*, 487-499.

Everett, H., & MaFadden, G. (1999). Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiology, 7*, 160-165.

Leu, J. H., Chen, Y. C., Chen, L. L., Chen, K. Y., Huang, H. T., Ho, J. M., & Lo, C.F. (2012). *Litopenaeus vannamei* inhibitor of apoptosis protein 1 (LvIAP1) is essential for shrimp survival. *Developmental and Comparative Immunology, 38*, 78-87.

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.

Liston, P., Fong, W. G., & Korneluk, R. G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene, 22*, 8568-8580.

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.

Miller, L. K., & White, E. (1998). Introduction apoptosis in virus infection. *Seminars in Virology, 8*, 443-444.

O'Riordan, M. X., Bauler, L. D., Scott, F. L., & Duckett, C. S. (2008). Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation. *Developmental Cell, 15*, 497-508.

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.

White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Development, 10*, 1-15.

Yu, X. Q., Zhu, Y. F., Ma, C., Fabrick, J. A., & Kanost, M. R. (2002). Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32*, 1287-1293.