การผลิตโปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C (rLC) จากกุ้งแชบ๊วย *(Fenneropenaeus merguiensis)* โดย *Escherichia coli*

Production of Recombinant C-type Lectin Protein (rLC) from Banana Shrimp (Fenneropenaeus merguiensis) by *Escherichia coli*

พันทิพา รุณแสง[1] , สุพัตรา เทพณรงค์[2] , อรณิชา รัตนาภรณ์[3] , และประภาพร อุทารพันธุ์[4]

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน พบเลคตินแบบ C (LC) มากในกุ้ง โดยทำหน้าที่ในการจดจำ ทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่ม หรือช่วยในการจับกับจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ผ่านการจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์จุลินทรีย์และอาศัยแคลเซียมในการจับ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม LC ของกุ้งแชบ๊วย (rLC) โดย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 Star (DE3) และเวกเตอร์ pET32a(+) พบว่าเป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำและมีมวลโมเลกุล 55 kDa rLC บริสุทธิ์มีแอคทิวิทีจำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็น 8,975 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อ rLC บริสุทธิ์ในกระต่าย แล้วทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ยังพบว่า rLC บริสุทธิ์สามารถทำให้ *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* เกิดการเกาะกลุ่มได้ในสภาวะที่มีแคลเซียมเท่านั้น บ่งชี้ว่า LC อาจมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งในการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค ผ่านการทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่ม

คำสำคัญ: กุ้งแชบ๊วย, เลคตินแบบ C, โปรตีนลูกผสม

Abstract

Lectin plays crucial important roles in innate immunity of crustaceans. C-type lectin is abundantly found in shrimps. Its function is recognizing, agglutinating or opsonizing pathogens. It showed anti-microbial activity via binding specifically to carbohydrates on microbial surface in calcium-dependent. In this study, recombinant protein of *Fenneropenaeus merguiensis* C-type lectin (rLC) was produced from *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) strain using the pET32a(+) expression vector. It was expressed in insoluble form with molecular mass of 55 kDa. The specific activity of

purified rLC was 8,975 unit/mg protein that analyzed by hemagglutination method. The specificity of polyclonal antibody raised against purified rLC in rabbit, was determined by Western blotting that showed only one protein band. Purified rLC could induce the agglutination of *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* and *E.coli* only in the presence of calcium. The results suggested that LC may be involved in shrimp innate immune response against pathogenic infection via bacterial agglutination.

Keywords: Fenneropenaeus merguiensis, C-type lectin, Recombinant protein

บทนำ

กุ้งแชบ๊วยเป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ แต่ปัจจุบันปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ส่งผลต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นพื้นฐานในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งแบ่งเป็น 2 ระบบคือ ภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) มักใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ ในการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humural immunity) อาศัยการทำงานผ่านโปรตีนในพลาสมา เช่น เลคตินและโปรฟีนอลออกซิเดส เลคตินเป็น pattern recognition proteins (PRPs) จับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ผ่านบริเวณจดจำคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate recognition domain, CRD) (Medzhitov & Janeway, 2002) เลคตินในครัสเตเชียนส่วนใหญ่จัดเป็นแบบ C คือต้องการ Ca^{2+} ในการทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม (agglutinate) เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรค ก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้โคลนยีนเลคตินแบบ C (LC) และพบว่ายีนดังกล่าวสามารถถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากขึ้นเพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคได้ (Rattanaporn & Utarabhand, 2011) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาคุณสมบัติของ Recombinant protein ของยีน LC ของกุ้งแชบ๊วยในการทำให้จุลินทรีย์เกิดการเกาะกลุ่ม เพื่อเข้าใจบทบาทของเลคตินที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C (rLC) จาก *Escherichia coli*
2. เพื่อผลิตและทำบริสุทธิ์แอนติบอดีต่อ rLC
3. เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของจุลินทรีย์ก่อโรคโดย rLC

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มักใช้เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) เป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การกลืนกินเซลล์ด้วยวิธีฟาโกไซโทซิส การสร้างนูดูล และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (Söderhäll & Cerenius, 1992) แบบที่สอง คือ ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ได้แก่ โปรฟีนอลออกซิเดส เอนไซม์ไลโซไซม์ และเลคติน เลคตินถูกออกแบบมาเพื่อจดจำรายละเอียดเล็ก ๆ น้อย ๆ ที่บอกถึงความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยที่โครงสร้างของเชื้อต่าง ๆ มีรูปแบบที่เฉพาะตัวเรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) โปรตีนที่สามารถจดจำโมเลกุลเหล่านี้เรียกว่า PRPs โดยจดจำและจับกับโมเลกุล PAMPs เลคตินเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านการเกิดโรคโดยแบคทีเรีย

เลคตินเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่สามารถจดจำและจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตได้ (Goldstein, Huges, Monsigny, Osawa, & Sharon, 1980) โดยทั่วไปเซลล์เมมเบรนหรือบริเวณผิวเซลล์มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนและลิพิด (lipid) หลายชนิด ส่วนใหญ่โครงสร้างเหล่านี้จะจับอยู่กับน้ำตาลต่าง ๆ โดยการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) และน้ำตาลเหล่านี้จะเป็นตำแหน่งที่เลคตินสามารถจับกับเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมได้ เลคตินมีตำแหน่งจับจำเพาะกับน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง และทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มหรือตกตะกอน (precipitate) ได้ โดยเลคตินจะจับกับน้ำตาลอย่างหลวม ๆ ด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์ (non-covalent bond) และสามารถผันกลับได้ (Sharon, 1977)

ในปัจจุบันมีการจำแนกเลคตินเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Drickamer, 1988) คือเลคตินแบบ C (C-type lectin) และเลคตินแบบ S (S-type lectin) เลคตินแบบ S ต้องการหมู่ thiol เป็นองค์ประกอบในบริเวณที่จับและทำปฏิกิริยากับน้ำตาล ส่วนเลคตินแบบ C ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในการเกิดปฏิกิริยา เลคตินที่พบในกุ้งส่วนใหญ่เป็นแบบ C ในกุ้งแชบ๊วยมีการค้นพบเลคตินแบบ C ที่จำเพาะต่อกรดไซอะลิค (sialic acid) โดยพบว่าเลคตินดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายหรือเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค (Utarabhand, Rittidach, & Paijit, 2007) หลังจากนั้นมีการโคลนยีนเลคตินแบบ C จากกุ้งแชบ๊วยพบว่ามี CRD 2 โดเมน ซึ่งมี QPD motif ที่จำเพาะต่อน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) และ EPN motif ที่จำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส (mannose) ใน CRD1 และใน CRD2 ตามลำดับ (Rattanaporn & Utarabhand, 2011) นอกจากนี้มีรายงานการค้นพบเลคตินแบบ C ในกุ้งบางชนิด ทั้งที่มี CRD 1 หรือ 2 โดเมน เช่นในกุ้งกุลาดำ

(*Penaeus monodon*) (Luo, Yang, Li, Zhang, & Xu, 2006), กุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) (Wang, Xu, Zhang, Zhao, Yu, & Wang, 2009) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (Ma, Tiu, He, & Chan, 2007)

มีรายงานว่าเมื่อเลคตินจับกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นให้มีการจับของเซลล์ฟาโกไซท์ในการเกิดออปโซไนซ์ เพื่อทำลายเซลล์แปลกปลอม (Hatakeyama, Ouchi, Kuroki, & Yamasaki, 1995) นอกจากนี้พบว่าเลคตินบริสุทธิ์จากกุ้งแชบ๊วยสามารถทำให้เฉพาะแบคทีเรียก่อโรคเกาะกลุ่มได้เป็นอย่างดีคือ *V. harveyi*, *V. parahemolyticus* และ *V. vulnificus* แสดงว่าเลคตินนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วย (Rittidach, Paijit, & Utarabhand, 2007) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาเลคตินที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งเพื่อใช้ในการป้องกันและ/หรือแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้ง งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาสมบัติของ Recombinant protein ของยีน LC ของกุ้งแชบ๊วยในการทำให้จุลินทรีย์เกิดการเกาะกลุ่ม เพื่อเข้าใจบทบาทของเลคตินที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C (rLC) จาก *Escherichia coli*

เพิ่มจำนวนยีน LC ที่สมบูรณ์ (Full-length) จากกุ้งแชบ๊วย (Rattanaporn & Utarabhand, 2011) ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Xho*I ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) นำชิ้นยีนที่ได้เชื่อมกับ pGEM-T Easy เพิ่มจำนวนใน *E. coli* (TOP10) สกัดพลาสมิด ย่อยพลาสมิดที่ได้และเวกเตอร์ pET32a(+) ด้วย *Eco*RI และ *Xho*I แล้วเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วย DNA T4 ligase และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* (BL21 Star (DE3) กระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนด้วย IPTG (isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside) ทดสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการเซนตริฟิวจ์ ทำการสกัดโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายน้ำจากเซลล์ นำไป dialyze ในบัฟเฟอร์ที่มี cysteine เพื่อให้โปรตีนกลับอยู่ในสภาพธรรมชาติ ทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) ชะ rLC ด้วย imidazole ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการทำ SDS-PAGE คำนวณมวลโมเลกุลของ rLC บริสุทธิ์โดยการเปรียบเทียบกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างใน SDS-PAGE พร้อมทั้งวัดปริมาณโปรตีนที่ได้ตามวิธีของ Bradford (1976)

การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C

ฉีด rLC บริสุทธิ์เข้ากระต่ายเพื่อกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อ rLC ทำบริสุทธิ์แอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายโดยปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 คืน หลังการเซนตริฟิวจ์ นำซีรัมไปตกตะกอนด้วยเกลือ ammonium sulphate ที่ความอิ่มตัว 50% จากนั้นแยกแอนติบอดีต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (Auttarat, Phiriyangkul, & Utarabhand,2006) ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี Western blot

การทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination)

ผสมสารละลายโปรตีนหยาบ (crude protein) หรือ rLC บริสุทธิ์ ที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ (1:2 serial dilution) กับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย ในไมโครไตเตอร์เพลทที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง โดยแอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating actitvity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของค่าไตเตอร์ (titer) ที่เป็นค่าการเจือจางสูงสุดของเลคตินซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้สมบูรณ์

การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C

นำ rLC บริสุทธิ์ ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มกับ *V. parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* ความเข้มข้น $2x10^9$ CFU/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียม (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$) และไม่มีแคลเซียม (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl) นาน 1 ชั่วโมง เขย่าเป็นระยะ สังเกตการเกาะกลุ่มแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการวิจัย

การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C จาก *E. coli*

จากการโคลนยีน LC ชิ้นเต็มของกุ้งแชบ๊วย ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Xho*I ด้วยวิธี PCR พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส จากนั้นโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วนำไปเพิ่มจำนวนใน *E. coli* นำพลาสมิดที่ได้ และเวกเตอร์ pET32a(+) ตัดด้วย *Eco*RI และ *Xho*I พบว่าชิ้นยีนที่ถูกย่อยออกจากพลาสมิดมีขนาดประมาณ 3,000 และ 1,000 คู่เบส และเวกเตอร์มีขนาดประมาณ 5,850 และ 50 คู่เบส จากนั้นจึงนำชิ้นยีน LC ที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส เชื่อมกับชิ้นของเวกเตอร์ที่มีขนาดประมาณ 5,850 คู่เบส แล้วนำไปเพิ่มจำนวนต่อใน *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 หลังจากนั้นสกัดพลาสมิด ตรวจสอบการมีชิ้นยีนแทรกอยู่ในพลาสมิดโดยการย่อยด้วย *Eco*RI และ *Xho*I พบชิ้นยีนขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (รูปที่ 1) จึงทรานสฟอร์มพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 Star (DE3)

แล้วกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนด้วย IPTG พบว่าหลังกระตุ้นนาน 4 ชั่วโมง มีแถบโปรตีน ขนาดประมาณ 55 kDa ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการกระตุ้นด้วย IPTG โดยพบว่าโปรตีนที่แสดงออกนี้ เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (inclusion body) เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาด 55 kDa (รูปที่ 2) และสามารถผลิตโปรตีน rLC ได้ในปริมาณมากเพียงพอสำหรับการนำไปศึกษาคุณสมบัติและใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต ทั้งนี้โปรตีนที่ผลิตได้จะมีขนาดใหญ่กว่าขนาดที่คาดคะเนไว้ประมาณ 20 kDa เนื่องจากมีส่วนของโปรตีนที่ติดมา (fusion protein) เช่น Trx-Tag (Thioredoxin), His-Tag และ S-Tag

การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C

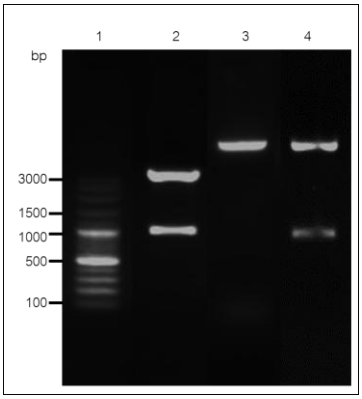
จากการผลิตแอนติบอดีต่อ rLC ในกระต่าย และทำบริสุทธิ์แอนติบอดีจากซีรัมด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีออกมาในพีคแรก เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดย Western blot พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว (รูปที่ 2)

การทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

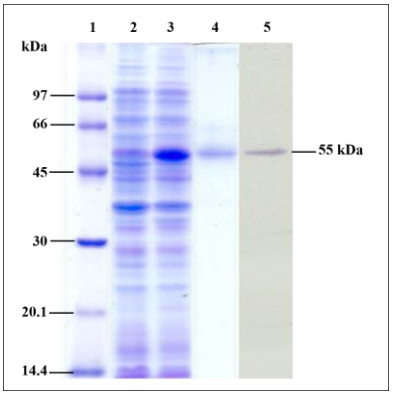
ในงานวิจัยนี้ได้ติดตามแอคทิวิที (activity) ของ rLC หรือเลคตินผ่านการทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง โดยเมื่อนำสารละลายโปรตีนหยาบ และสารละลาย rLC บริสุทธิ์ มาทดสอบการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงกระต่ายพบว่า สารละลายโปรตีนหยาบมีค่าแอคทิวิทีเป็น 80 หน่วย/มิลลิลิตร และมีค่าแอคทิวิทีจำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงเป็น 72 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่ rLC บริสุทธิ์มีค่าเป็น 320 หน่วย/มิลลิลิตร และ 8,975 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ จากค่าแอคทิวิทีของสารละลายโปรตีนทั้งสองส่วนจะเห็นเมื่อทำบริสุทธิ์ rLC ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA โปรตีน rLC ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 124 เท่า (รูปที่ 3 และตารางที่ 1)

การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C

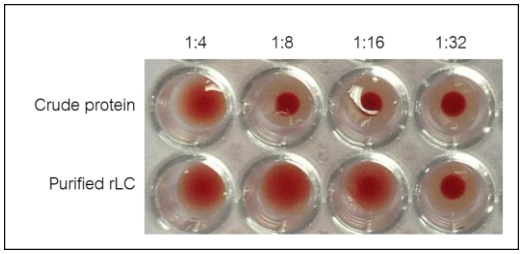
จากการทดสอบพบว่า rLC ที่ปริมาณเท่ากัน สามารถเกาะกลุ่มเซลล์แบคทีเรียได้ทั้งสามชนิด คือ *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* และ *E. coli* ในสภาวะที่มีแคลเซียม แต่ไม่มีการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่มีแคลเซียม (รูปที่ 4) บ่งชี้ว่าแคลเซียมมีความจำเป็นในการจับระหว่างเลคตินและแบคทีเรีย นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า rLC สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มใน *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจาก *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม *Vibrio* ในขณะที่ *S. aureus* และ *E. coli* ไม่ใช่แบคทีเรียในกลุ่มที่ก่อโรคในกุ้ง



รูปที่ 1 แบบแผนดีเอ็นเอใน agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน, แถวที่ 2 พลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน LC และถูกย่อยด้วย *Eco*RI และ *Xho*I, แถวที่ 3 เวกเตอร์ pET32a(+) ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI และ *Xho*I, แถวที่ 4 เวกเตอร์ pET32a(+) ที่มียีน LC และถูกย่อยด้วย *Eco*RI และ *Xho*I



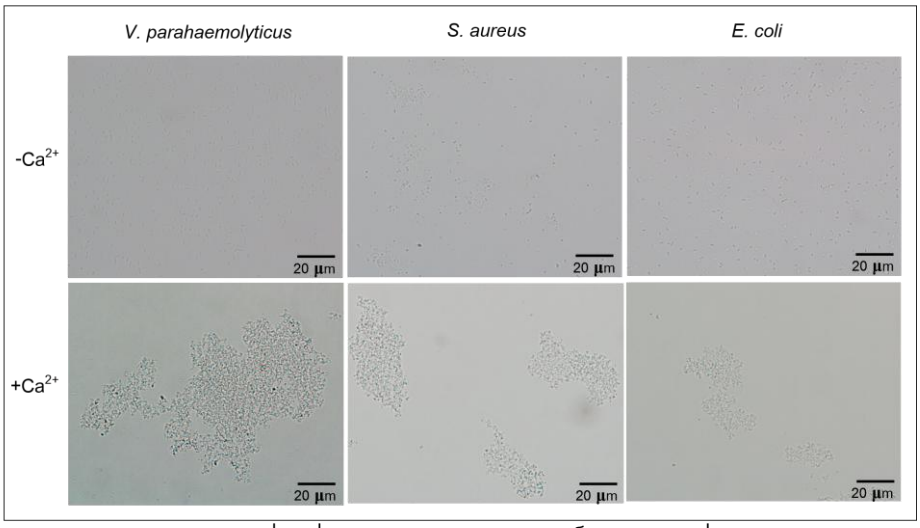
รูปที่ 2 แบบแผนโปรตีนใน SDS-PAGE ของ rLC แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน, แถวที่ 2 โปรตีนที่ไม่มีการกระตุ้นด้วย IPTG, แถวที่ 3 โปรตีนที่มีการกระตุ้นด้วย IPTG, แถวที่ 4 rLC บริสุทธิ์, แถวที่ 5 rLC บริสุทธิ์ในการทำ Western blot



รูปที่ 3 การทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารละลายโปรตีนหยาบ และ rLC บริสุทธิ์

ตารางที่ 1 แอคทิวิทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของ rLC ในขั้นตอนการทำให้ rLC บริสุทธิ์

rLC	Specific activity (unit/mg protein)	Purification fold
Crude	72	1
Purified	8,975	124



รูปที่ 4 การเกาะกลุ่มแบคทีเรียที่เหนี่ยวนำด้วย rLC บริสุทธิ์ในสภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียม

สรุป

โปรตีน rLC ที่ผลิตจากยีนเลคตินแบบ C (ยีน LC) ของกุ้งแชบ๊วยใน *E. coli* มีมวลโมเลกุล 55 kDa สามารถนำไปใช้สังเคราะห์แอนติบอดีต่อ rLC และมีสมบัติในการทำให้เซลล์แบคทีเรียทั้งก่อโรคและไม่ก่อโรคเกาะกลุ่มได้ในสภาวะที่มีแคลเซียม แสดงให้เห็นว่า LC มีความสำคัญในการจับจำเพาะกับแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทหน้าที่และกลไกการทำงานในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อให้เกิดความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยและทุนการศึกษาจากโครงการมหาวิทยาลัยแห่งชาติ สกอ. ผ่านมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Auttarat, J., Phiriyangkul, P. & Utarabhand, P. (2006). Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguiensis.Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 143*, 27-36.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.

Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domain in animal lectin. *Journal of Biological Chemistry, 263*(20), 9557-9560.

Goldstein, I.J., Huges, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980). What should be called a lectin. *Nature, 285*(5760), 66.

Hatakeyama, T., Ouchi, K., Kuroki, M. & Yamasaki, N. (1995). Amino acid sequence of a C-type lectin CEL-IV from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59*(7), 1314-1317.

Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., & Xu, X. (2006). Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology, 30*(7), 607-617.

Ma, T. H.T., Tiu, S. H.K., He, J.G., & Chan, S.M. (2007). Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish and Shellfish Immunology, 23*(2), 430-437.

Medzhitov, R. & Janeway, Jr., C.A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science, 296*(5566), 298-300.

Rattanaporn, O. & Utarabhand, P. (2011). Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*: Early gene up-regulation after *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Invertebrate Pathology, 106*(2), 196-204.

Rittidach, W., Paijit, N. & Utarabhand, P. (2007). Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis* hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta, 1170*(1), 106-114.

Sharon, N. (1977). Lectins. *Scientific American, 236*(6), 108-119.

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

Utarabhand, P., Rittidach, W. & Paijit, N. (2007). Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguiensis. Science Asia, 33*, 41-46.

Wang, X.W., Xu, W.T., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q., & Wang, J.X. (2009). A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish and Shellfish Immunology, 27*(4), 556-562.