# การทำบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1, 3-กลูแคนจากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Purification and Characterization of Lipopolysaccharide- and β -1, 3-Glucan-Binding Protein from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

นันทภรณ์ เบ่าอุบล[1], อารีรัตน์ เชาว์สมบูรณ์[2] และประภาพร อุทารพันธุ์[3]

**บทคัดย่อ**

โปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP) มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน ซึ่งทำหน้าที่จดจำและจับจำเพาะกับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ การศึกษาครั้งนี้ ได้ตรวจหาการกระจายของโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อของกุ้งขาวโดยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งแชบ๊วย พบโปรตีน LGBP เฉพาะในตับของกุ้งขาว สามารถทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากสารสกัดตับของกุ้งขาวโดยคอลัมน์ Q-Sepharose และตามด้วยวิธี preparative PAGE พบว่าสามารถทำให้ LGBP บริสุทธิ์ได้ โดยปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ซึ่งมีมวลโมเลกุล 40.73 กิโลดาลตัน โปรตีน LGBP บริสุทธิ์สามารถจับจำเพาะได้กับแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งแชบ๊วยในการทำ Western blot นอกจากนี้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ยังทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio harveyi* ในขณะที่ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ไม่สามารถทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่ม ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน LGBP อาจเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรค

**คำสำคัญ**: กุ้งขาว โปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1 3-กลูแคน (LGBP)
การเกาะกลุ่มแบคทีเรีย

[1,2,3] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112 ประเทศไทย

**Abstract**

Lipopolysaccharide- and β -1, 3-glucan-binding protein (LGBP) plays a crucial role in the innate immune system of crustaceans. It can recognize and bind specifically to lipopolysaccharides and β -1, 3-glucan, the cell wall components of microorganism. In this study, distribution of LGBP in shrimp tissues was detected by Western blotting using antibody against recombinant LGBP (rcLGBP) of banana shrimp. The result showed that LGBP was found only in the hepatopancreas of white shrimp. LGBP was successfully purified from hepatopancreas extract by chromatography on Q-Sepharose column and subsequently by preparative PAGE. Purified LGBP showed a single protein band in SDS-PAGE with a molecular mass of 40.73 kDa. Moreover, it could react well with the anti-rcLGBP antibody in Western blot analysis. In addition, purified LGBP could agglutinate pathogenic *Vibrio harveyi* while bovine serum albumin (BSA) at the same concentration could not. This result suggested that LGBP may be involved in a shrimp immune response to pathogenic bacteria.

**Keywords**: White shrimp, Litopenaeus vannamei, Lipopolysaccharide- and β -1, 3-glucan-binding protein (LGBP), Bacterial agglutination

**บทนำ**

กุ้งขาวเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของไทย เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่ายโตเร็ว สามารถเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงและให้ผลผลิตในปริมาณสูง จึงทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาว จนในปัจจุบันมีเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวสูงถึง 99% ของพื้นที่ที่เลี้ยงทั้งหมด แต่ปัญหาที่พบและเป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล คือการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งซึ่งส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก แม้ยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคระบาดในกุ้งขาวในประเทศไทย แต่เชื้อก่อโรคกุ้งที่ก่อปัญหากับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยอย่างมากคือแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งจึงเป็นสิ่งสำคัญ กุ้งจัดเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะซึ่งถูกออกแบบเพื่อจดจำรายละเอียดที่บอกถึงความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยโครงสร้างของเชื้อต่างๆ มีรูปแบบที่เฉพาะตัวเรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Wang, Song, Li, Zhao, Zhang, Ni, & Xu, 2007; Medzhitov & Janeway, 2002) โปรตีนที่

สามารถจดจำโมเลกุลเหล่านี้เรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs) โปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน หรือโปรตีน LGBP เป็น PRP ชนิดหนึ่งซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนจดจำสำหรับเบตา-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราที่เป็นโพลิเมอร์ของ D-glucose และลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ปัจจุบันการทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมีน้อยมาก งานวิจัยนี้จึงสนใจทำบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของ LGBP บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเข้าถึงบทบาทของโปรตีน LGBP ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคในกุ้งขาว และเพื่อจะใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

## วัตถุประสงค์

เพื่อทำบริสุทธิ์โปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP) จากกุ้งขาว และศึกษาบทบาททางชีวภาพของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันโรคในกุ้งขาว

## แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิด (open circulation system) มีการป้องกันตนเอง (defense mechanism) โดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งแบ่งระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นสองระบบ คือภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) มักจะใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ (hemocyte) ในการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก โดยอาศัยกระบวนการกลืนกินเซลล์โดยวิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) อีกระบบคือภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองผ่านโปรตีนในพลาสมา (plasma protein) หรือในน้ำเลือดที่เรียกว่าฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) และโปรตีนเหล่านี้จะถูกหลั่งออกมา ซึ่งพบมีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่อสัตว์เกิดการติดเชื้อ โดยถูกกระตุ้นได้จากเบตา-1,3-กลูแคน (β-1,3-glucan) ของยีสต์ หรือ peptidoglycan หรือ LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งโปรตีนที่ทำหน้าที่จดจำโมเลกุลเหล่านี้ เรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องในระบบป้องกันตนเอง PRPs ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP) โดยสามารถจับจำเพาะกับ LPS หรือเบตา-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ แล้วไปจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ฮีโมไซท์ (Barracco, Duvic, & Soderall, 1991; Duvic & Soderhall, 1990)

และกระตุ้นให้เซลล์ฮีโมไซท์มีบทบาทสำคัญในการกำจัดจุลินทรีย์ โดยเกิดฟาโกไซโทซิสเร็วขึ้น (Thornqvist, Johnansson, & Soderhall, 1994) หรือหลั่งสารหลายชนิดออกมาจากกรานูล (granule) ซึ่งเกิดควบคู่ไปกับการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system) (Johansson,Lind,Holmblad,Thornqvist,&Soderhall,1995;Sritunyalucksana,Wongsuebsantati, Johnansson, & Soderhall, 2001) ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานิน (melanin) ที่ช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรคผ่านการเกิดฟาโกไซโทซิส (Soderhall & Cerenius, 1998)

โปรตีน LGBP ได้มีการทำบริสุทธิ์ครั้งแรกจากฮีโมลิมฟ์ของหนอนไหม *Bombyx mori* โดยอาศัยการจับระหว่างโปรตีนในฮีโมลิมฟ์กับผิวเซลล์แบคทีเรียชนิด *Enterobacter cloacae* (Lee, Lee, Kravchenko, Ulevitch, & Brey, 1996) และต่อมามีการค้นพบโปรตีนดังกล่าวในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* มีหน้าที่เป็นโปรตีนจดจำจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคน และ LPS เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์จุลินทรีย์เช่นกัน สำหรับการศึกษา LGBP ในกุ้งชนิดแรก คือได้มีการทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากฮีโมไซท์ของกุ้งนาง (Crayfish) โดย มีคุณสมบัติจับจำเพาะกับ เบตา-1,3-กลูแคน เช่น laminarin และ curdlan (Lee, Wang, & Soderhall, 2000) จะเห็นได้ว่าการทำบริสุทธิ์และการศึกษาทั้งระดับโปรตีนและยีนของ LGBP ในกุ้งพีเนียสมีน้อยมาก ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาการทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP เพื่อศึกษาคุณสมบัติและบทบาททางชีวภาพของโปรตีน LGBP ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งขาว

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากกุ้งขาว

ดูดเลือดจากกุ้งขาวด้วยเข็มฉีดยาขนาด 1 ml ปล่อยให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ส่วนใสที่ได้คือฮีโมลิมฟ์ นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย 30% $NH_2SO_4$ ฮีโมไซท์กุ้งขาวเตรียมได้จากการนำเลือดผสมกับสารกันเลือดแข็งตัวในอัตราส่วน 1:1แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 800 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที นำมา โฮโมจีไนซ์ใน 10 mM sodium cacodylate, pH 7.4, 0.1 M $CaCl_2$, pH 6.5 เพื่อให้เม็ดเลือดแตก แยกเก็บส่วนใสคือสารสกัดฮีโมไซท์ หลังจากนั้นตัดแต่ละเนื้อเยื่อเช่น ตับ กล้ามเนื้อ เหงือก เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำแต่ละเนื้อเยื่อไปโฮโมจีไนซ์ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 จากนั้น เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บส่วนใสของแต่ละเนื้อเยื่อ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

**การตรวจหาการกระจายของโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อกุ้งขาวโดยวิธี Western blot**

เพื่อหาว่าโปรตีน LGBP พบในเนื้อเยื่อใดของกุ้งขาว ทำได้โดยแยกโปรตีนปริมาณเท่ากันจากฮีโมลิมฟ์ สารสกัดฮีโมไซท์และสารสกัดตับหรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่เตรียมไว้ข้างต้น ด้วย 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ซึ่งเตรียมตามวิธีของ Laemmli (1970) แล้ววิเคราะห์ต่อด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งแชบ๊วย (rcLGBP) (อารีรัตน์ เชาว์สมบูรณ์, อรณิชา รัตนาภรณ์ และประภาพร อุทารพันธุ์, 2556)

**การทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP ด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบชนิด Q-Sepharose และ Preparative PAGE**

ในการทำให้โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ แยกโปรตีนจากสารสกัดตับโดยคอลัมน์ Q-Sepharose แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 จากนั้นชะคอลัมน์ต่อด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 0.5 M NaCl ติดตามโปรตีน LGBP ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยวิธี Western blot และวัดปริมาณโปรตีนที่ถูกชะออกมาตามวิธีของ Bradford (1976) จากนั้นนำ LGBP ที่แยกได้จากคอลัมน์ Q-Sepharose ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี preparative PAGE แล้วทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน LGBP ที่แยกได้โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blot และหามวลโมเลกุลของโปรตีน LGBP บริสุทธิ์โดยทำควบคู่กับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-PAGE

**การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย *Vibrio harveyi***

นำโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ เจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.9% NaCl จากนั้นใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารแขวนลอยแบคทีเรีย *V. harveyi* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ($5x10^7$ cells) ตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เขย่า 1-2 ครั้ง จากนั้นสังเกตการเกาะกลุ่มแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับโปรตีน BSA

## ผลการวิจัย

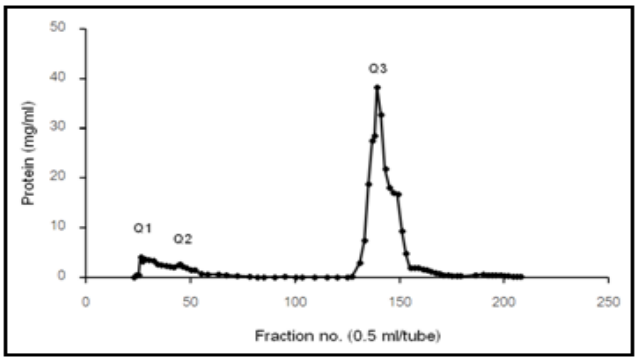
**การตรวจหาโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อของกุ้งขาว โดยวิธี Western blot**

จากการตรวจหาการกระจายของโปรตีน LGBP ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาวโดยติดตามโปรตีน LGBP ด้วยการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ rcLGBP (อารีรัตน์ เชาว์สมบูรณ์ และคณะ, 2556) โดยวิธี Western blot พบแถบโปรตีนที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีต่อ rcLGBP เฉพาะในสารสกัดตับเท่านั้น (รูปที่ 2 แถวที่ 4B) ซึ่งเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ดีเช่นเดียวกับโปรตีนลูกผสม LGBP ของกุ้งแชบ๊วย (รูปที่ 2 แถวที่ 7B) บ่งชี้ว่าแถบโปรตีนนี้เป็นโปรตีน LGBP ที่พบเฉพาะในตับของกุ้งขาว และไม่พบแถบโปรตีน LGBP ในฮีโมลิมฟ์ เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ หรือ

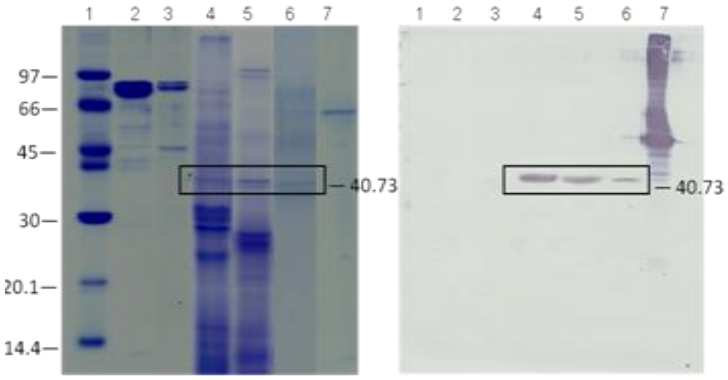
เนื้อเยื่ออื่นเช่นกล้ามเนื้อ หรือเหงือกของกุ้งขาว เนื่องจากตับเป็นอวัยวะสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนต่าง ๆ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง งานวิจัยนี้จึงเลือกทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากตับของกุ้งขาวต่อไป

**การทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากสารสกัดตับ**

ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากสารสกัดตับของกุ้งขาวโดยคอลัมน์ Q-Sepharose พบโปรตีนอื่นที่ไม่จับกับคอลัมน์ถูกล้างออกมาในพีค (peak) Q1 และ Q2 ส่วนโปรตีน LGBP จับกับคอลัมน์ถูกชะออกมาในพีค Q3 (รูปที่ 1) เมื่อนำโปรตีนพีค Q3 ไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี preparative PAGE แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ย้อมติดสีคูมาซี (coomassie brilliant blue) (รูปที่ 2 แถวที่ 6A) และเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ rcLGBP (รูปที่ 2 แถวที่ 6B) บ่งชี้ว่าสามารถแยกโปรตีน LGBP ได้บริสุทธิ์ เมื่อคำนวณเทียบกับโปรตีนมาตรฐานพบว่าโปรตีน LGBP บริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 40.73 กิโลดาลตัน (รูปที่ 2) ซึ่งมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน LGBP ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดฮีโมไซท์ของกุ้งนาง (Lee et al., 2000) และโปรตีนลูกผสม LGBP ที่ผลิตได้จากกุ้งแชบ๊วย (อารีรัตน์ เชาว์สมบูรณ์ และคณะ, 2556)




**รูปที่ 1** กราฟแสดงการแยกโปรตีน LGBP จากตับของกุ้งขาวด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose

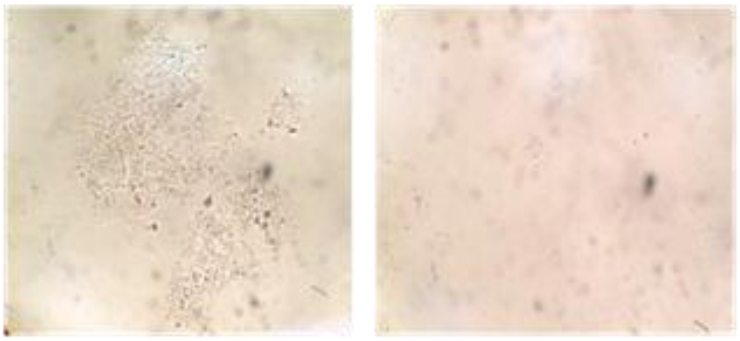



A B

**รูปที่** 2 แบบแผนโปรตีนของ LGBP ใน SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบูล (A) และ ใน Western blot ซึ่งย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ rcLGBP (B) โดยแสดง โปรตีนมาตรฐาน (1), ฮีโมลิมฟ์ (2), สารสกัดฮีโมไซท์ (3), สารสกัดตับ (4), LGBP ในพีค Q3 ที่ได้จากคอลัมน์ Q-Sepharose (5), LGBP บริสุทธิ์ที่ได้จากการทำ preparative PAGE (6), rLGBP จากกุ้งแชบ๊วย (7)

**การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยโปรตีน LGBP บริสุทธิ์**

จากการทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* โดยโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มได้ (รูปที่ 3A) และเมื่อเปรียบเทียบกับ BSA ซึ่งใช้เป็นโปรตีนควบคุมที่ความเข้มข้นเท่ากันไม่ทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่ม (รูปที่ 3B) *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในกุ้งซึ่งมีลิโพโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบบนผนังเซลล์ จึงทำให้โปรตีน LGBP สามารถจับจำเพาะกับ ลิโพโพลีแซคคาไรด์และทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเซลล์ได้ การทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียถือเป็นกลไกหนึ่งที่ใช้ป้องกันตนเองของกุ้งจากจุลินทรีย์บุกรุก เพื่อช่วยไม่ให้แบคทีเรียแพร่กระจายในตัวกุ้งและเป็นการช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดกำจัดแบคทีเรียได้ดีขึ้น บ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP เป็น PRP ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาว มีรายละเอียดตามรูปที่ 3



A B

**รูปที่** 3 การเกาะกลุ่มแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยโปรตีน LGBP บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml (A) เทียบกับโปรตีน BSA (B) ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เท่ากัน

**สรุป**

งานวิจัยนี้สามารถทำบริสุทธิ์โปรตีน LGBP จากตับกุ้งขาวโดยคอลัมน์ Q-Sepharose และวิธี preparative-PAGE โปรตีน LGBP บริสุทธิ์ที่แยกได้มีมวลโมเลกุล 40.73 กิโลดาลตัน และที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่มได้ บ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP อาจทำหน้าที่จับจำเพาะกับองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ และเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคในกุ้ง ซึ่งจะมีการศึกษาบทบาทของ LGBP อย่างละเอียดต่อไป

**คำขอบคุณ**

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2556 และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาจากโครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี

**เอกสารอ้างอิง**

อารีรัตน์ เชาว์สมบรูณ์, อรณิชา รัตนาภรณ์ และประภาพร อุทารพันธุ์. (2556). การโคลนยีนและสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ของโปรตีนจับลิโพโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคนจากกุ้งแชบ๊วย. *การประชุมวิชาการระดับชาติสวนดุสิต*: วันนักวิทยาศาสตร์ 2013 *มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต*. กรุงเทพฯ.

Barracco, M.A., Duvic, B., & Soderhall, K. (1991). The β-1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. when reacted with a β-1,3-glucan induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell and Tissue Research, 266*(3). 491-497.

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

Duvic, B., & Soderhall, K. (1990). Purification and characterization of β-1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(16). 9332-9337.

Johansson, M.W., Lind, M., Holmblad, T., Thornqvist, P.O., & Soderhall, K. (1995). Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *216*(3). 1079-1087.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*. 680-685.

Lee, W.J., Lee, J.D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J., & Brey, P.T. (1996). Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Immunology, 93*(15). 7888-7893.

Lee, S.Y., R. Wang., & Söderhäll, K. (2000). A lipopolysaccharide- and β-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leninusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(2). 1337-1343.

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

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, *10*(1). 23 - 28.

Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M.W., & Soderhall, K. (2001). Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the ProPO system from

the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, *25*(5-6). 353-356.

Thornqvist, P.O., Johansson, M.W., & Soderhall, K. (1994). Opsonic activity of cell adhesion proteins and β-1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*, *18*(1). 201-209.

Wang, H., L. Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D., & Xu, W. (2007). Cloning and characterization of a novel C-type lectin from zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology*, *44*(5). 722-731.