การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาวแวนนาไม

Cloning and Characterization of Fibrinogen–Related Protein Gene from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

วิลัยลักษณ์ เกลี้ยงคำหมอ[1], ประภาพร อุทารพันธุ์[2], และอรณิชา รัตนาภรณ์[3]

บทคัดย่อ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (FREP) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่มี fibrinogen-related domain (FReD) อยู่ภายในโครงสร้าง โปรตีนหลายชนิดในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญเป็นโปรตีนจดจำในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด งานวิจัยนี้ได้โคลน cDNA บางส่วนของ FREP (LvFREP) จากตับของกุ้งขาวแวนนาไม โดยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ rapid amplification of cDNA ends (RACE) cDNA ของยีนที่โคลนได้มีความยาว 600 คู่เบส มีส่วนที่แปลรหัสเป็นสายโพลีเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 128 หน่วย ประกอบด้วยส่วนปลาย 3' ที่ไม่แปลรหัสยาว 211 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ LvFREP ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความเหมือนกับ ficolin-2 จากหอยนางรม Crassostrea gigas มากที่สุดคือ 55% ภายในโครงสร้างของ LvFREP พบโดเมนที่คล้ายกับไฟบริโนเจน 1 โดเมน และมีบริเวณจับกับ Ca^{2+} 1 ตำแหน่ง จากการศึกษาโดยวิธี RT-PCR พบการแสดงออกของยีน LvFREP มากในตับ ในทำนองเดียวกับ FREP ของกุ้งชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน LvFREP ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากกระตุ้นด้วย white spot syndrome virus (WSSV) ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่าระดับ mRNA ของ LvFREP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ 3 ชั่วโมง เท่ากับ 2.04 เท่า หลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV จากผลการทดลองบ่งชี้ว่ายีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนอาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

คำสำคัญ: กุ้งขาวแวนนาไม, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน, ไวรัสตัวแดงดวงขาว

[1,2,3] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110 ประเทศไทย

Abstract

The family of fibrinogen-related proteins (FREPs) is a group of proteins with fibrinogen-related domain (FReD). Protein member in this family play crucial roles as pattern recognition proteins in innate immune responses. In present study, the partial cDNA of white shrimp Litopenaeus vannamei FREP (designated as LvFREP) was partially cloned from hepatopancreas by means of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The partial cDNA of LvFREP was 600 bp encoding a polypeptide of 128 amino acids with a 3' untranslated region of 211 bp. By BLAST analysis, the amino acid sequence of LvFREP has the highest homology (55% identity) with ficolin-2 of Crassostrea gigas. LvFREP contains FReD and a Ca^{2+} binding site. By RT-PCR analysis, LvFREP gene was mainly expressed in the hepatopancreas in similar to those of other shrimp FREPs. In addition, the temporal expression of LvFREP mRNA in the hepatopancreas was examined by semi-quantitative RT-PCR. The mRNA level of white shrimps challenged by white spot syndrome virus (WSSV) was significantly up-regulated and peaked to 2.04 fold at 3 hr after stimulation. This result suggests that LvFREP may be involved in the shrimp immune response.

Keyword: Litopenaeus vannamei, fibrinogen-related proteins, white spot syndrome virus

บทนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และสามารถเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงได้ ปัจจุบันการเพาะฟักและการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมประสบปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากคือ โรคติดเชื้อในกุ้งซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) เมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นตัวแดงดวงขาวทำให้กุ้งตาย (Söderhäll & Cerenius, 1998) ทำให้มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรค (immune system) ในกุ้งมากขึ้น เพื่อเป็นพื้นฐานในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้ง (Bulgakov, Park, Choi, Lim, & Chob, 2004) โดยพบว่าสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) ส่วนใหญ่มีการป้องกันตนเองโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกัน 2 ระบบ คือระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ (humural immunity) ได้แก่ เลคติน (lectin) เลคตินที่มีรายงานของสัตว์ในกลุ่มนี้มีองค์ประกอบได้แก่ carbohydrate recognition domain (CRD) หรือ fibrinogen-related domain

(FReD) เลคตินที่พบส่วนใหญ่จัดเป็นแบบ C (C-type lectin) ที่ต้องการ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงหรือจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย CRD หนึ่งหรือสองโดเมน ในขณะที่เลคตินที่มี FReD เป็นองค์ประกอบยังมีการศึกษาน้อยมากในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้และไม่พบรายงานในกุ้งขาวแวนนาไม โปรตีนที่มี FReD อยู่ภายในโครงสร้างหรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน (fibrinogen-related protein, FREP) เป็น pattern recognition protein (PRP) ที่ใช้ในการจดจำโครงสร้างของจุลินทรีย์บุกรุก การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในครัสเตเชียนมีไม่มากนัก และยังไม่มีรายงานของยีนนี้ในกุ้งขาวแวนนาไม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะโคลนยีนและศึกษาสมบัติระดับโมเลกุลของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาวแวนนาไม รวมถึงศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อให้เข้าใจบทบาทในการป้องกันตนเองของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนซึ่งเป็นเลคตินชนิดใหม่ของกุ้งขาวแวนนาไมมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาวแวนนาไม
2. เพื่อศึกษาสมบัติของยีนและการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาวแวนนาไม
3. เพื่อศึกษาผลของการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งต่อการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในกุ้งขาวแวนนาไม

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (cellular immunity) มักใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์เป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การกลืนกินเซลล์ด้วยวิธีฟาโกไซโทซิส การเกิดโนดูล และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (Söderhäll & Cerenius, 1992) อีกระบบคือ ระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยสารน้ำ (humoral immunity) เช่น เลคติน เลคตินถูกออกแบบเพื่อจดจำรายละเอียดเล็ก ๆ น้อย ๆ ที่บอกถึงความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยที่โครงสร้างของเชื้อต่าง ๆ มีรูปแบบที่เฉพาะตัวเรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Wang, Song, Li, Zhao, Zhang, & Xu 2007; Janeway & Medzhitov, 2002) โปรตีนที่สามารถจดจำโมเลกุลเหล่านี้เรียกว่า PRPs โดยจดจำและจับกับโมเลกุล PAMPs เลคตินเป็นโปรตีนหรือ

ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีคุณสมบัติในการจับคาร์โบไฮเดรทหรือน้ำตาลบริเวณผิวเซลล์ (cell surface) ได้อย่างจำเพาะ โดยทั่วไปมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนและไกลโคลิพิด (glycolipid) หลายชนิด น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตำแหน่งที่เลคตินสามารถเข้าจับกับเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมได้ (Bies, Lehr, & Woodley, 2004) เลคตินมีแหล่งจับจำเพาะที่จับกับน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง ความจำเพาะในการจับน้ำตาลขึ้นอยู่กับชนิดของเลคติน (Sharon, 1977) เลคตินสามารถจำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Drickamer, 1988) คือเลคตินแบบ C (C-type lectin) และเลคตินแบบ S (S-type lectin) เลคตินที่มีรายงานของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนมีองค์ประกอบได้แก่ carbohydrate recognition domain (CRD) หรือ fibrinogen-related domain (FReD) เลคตินที่พบส่วนใหญ่จัดเป็นแบบ C (C-type lectin) ที่ต้องการ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงหรือจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย CRD หนึ่งหรือสองโดเมน เช่นใน กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Luo, Yang, Li, Zhang, & Xu, 2006), กุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) (Wang, Xu, Zhang, Zhao, Yu, & Wang, 2009), กุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis*) (Rattanaporn & Utarabhand, 2011), กุ้งลายเสือ (*Marsupenaeus japonicus*) (Song, Zhang, Yang, Ruan, & Xu, 2010) และในกุ้งขาวแวนนาไม (Ma, Tiu, He, & Chan, 2007) ในขณะที่เลคตินที่มี FReD เป็นองค์ประกอบยังมีการศึกษาน้อยมากในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้และไม่พบรายงานในกุ้งขาวแวนนาไม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะโคลนยีนและศึกษาสมบัติยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาวแวนนาไม รวมถึงศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ WSSV ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งขาวแวนนาไม

วิธีดำเนินการวิจัย

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน

ออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งได้มาจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารยีน (GenBank) ผ่านฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม Vector NTI พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนอยู่หลายบริเวณ ทำการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวมาใช้ออกแบบเป็น forward และ reverse primer ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอนุรักษ์โดยการทำ PCR โดยใช้ cDNA สายแรกที่เตรียมได้จากตับของกุ้งขาวแวนนาไมเป็น DNA แม่แบบ จากการโคลนดีเอ็นเอชิ้นกลางแล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า

ดีเอ็นเอชิ้นกลางที่โคลนได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับยีนของโปรตีน ficolin-2 ซึ่งจัดเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนชนิดหนึ่งของหอยนางรมถึง 54% บ่งชี้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้เป็นยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนของกุ้งขาวแวนนาไม จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอชิ้นกลางของยีน *Lv*FREP ที่โคลนได้นี้ ออกแบบ gene specific (GS) primer แล้วไปใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3' โดยวิธี rapid amplification of cDNA ends (RACE) โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากตับ ทำการโคลนดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3' แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากการวิเคราะห์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอชิ้นกลางและชิ้นปลาย 3' มาเหลื่อมต่อกัน (overlapping) เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวขึ้นของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนของกุ้งขาวแวนนาไม จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนของกุ้งขาวแวนนาไมที่โคลนได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งหรือ ครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในธนาคารยีน ผ่านฐานข้อมูล NCBI จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน โดเมน ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

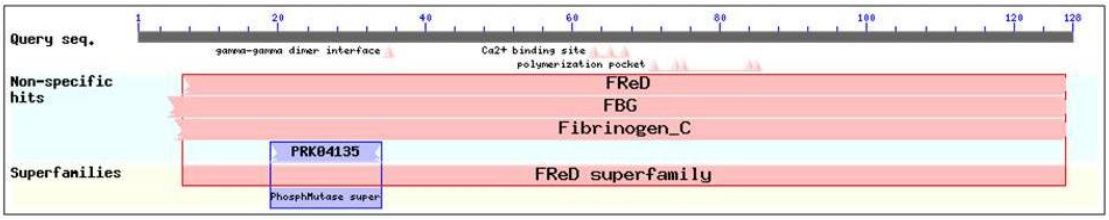
สกัด total RNA จากเม็ดเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาวแวนนาไม เช่น ตับ ลำไส้เหงือก กระเพาะ กล้ามเนื้อ หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง โดยใช้ TriPure Isolation Reagent (Roche) จากนั้นสังเคราะห์ cDNA สายแรก ด้วยวิธี reverse transcription โดยใช้ SuperScript™ III RT (Invitrogen) แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ β-actin เป็นยีนควบคุม

การศึกษาผลการฉีดกุ้งด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคต่อระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยว ข้องกับไฟบริโนเจน

ทำการฉีดกุ้ง ด้วย WSSV ที่เจือจาง 10^{-3} เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ ตัดตับจากกุ้งที่เวลา 0, 3, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง กลุ่มละ 5 ตัว จากนั้นนำตับที่ได้ไปสกัด total RNA เพื่อวัดการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนของกุ้งด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ β-actin เป็นยีนควบคุม

ผลการวิจัย

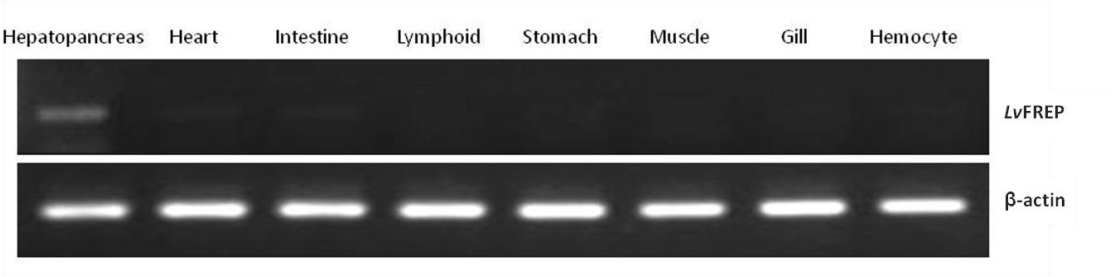
ยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนที่โคลนได้จากตับของกุ้งขาวแวนนาไมมีนิวคลีโอไทด์ 600 คู่เบส ที่เป็นส่วน 3' ที่ไม่แปลรหัส (3'-untranslated region) จำนวน 211 คู่เบส แปลเป็นสายโพลีเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 128 หน่วย มีโดเมนที่จดจำคาร์โบไฮเดรต (FReD) 1 โดเมน นอกจากนี้ยีน LvFREP ยังมีตำแหน่งจับกับ Ca^{2+} ซึ่งบ่งบอกความเป็นเลคตินแบบ C จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ LvFREP พบว่ามีความเหมือนกับ ficolin-2 จากหอยนางรม Crassostrea gigas 55% และมีความเหมือนกับ ficolin-1 like จากหอยแม่นทะเล Strongylocentrotus purpuratus และฟองน้ำทะเล Amphimedon queenslandica 52% และ 51% ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดจัดเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน ผลการทดลองบ่งชี้ว่ายีนที่โคลนได้เป็นยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาวแวนนาไม แต่มีความเหมือนกับเลคตินแบบ C ซึ่งมี CRD ที่เคยมีรายงานในกุ้งขาวแวนนาไมน้อยมาก บ่งชี้ว่ายีน LvFREP ที่โคลนได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเลคตินชนิดใหม่อีกชนิดหนึ่งที่พบในกุ้งขาวแวนนาไม และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastP พบว่าโปรตีน LvFREP จัดอยู่ในกลุ่ม FReD superfamily ซึ่งมีบริเวณสำคัญที่พบคือ fibrinogen-related domain (FReD) และ Ca^{2+} binding site ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โดเมนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน ซึ่งประกอบด้วย 1 โดเมนคือ fibrinogen-related domain (FReD)

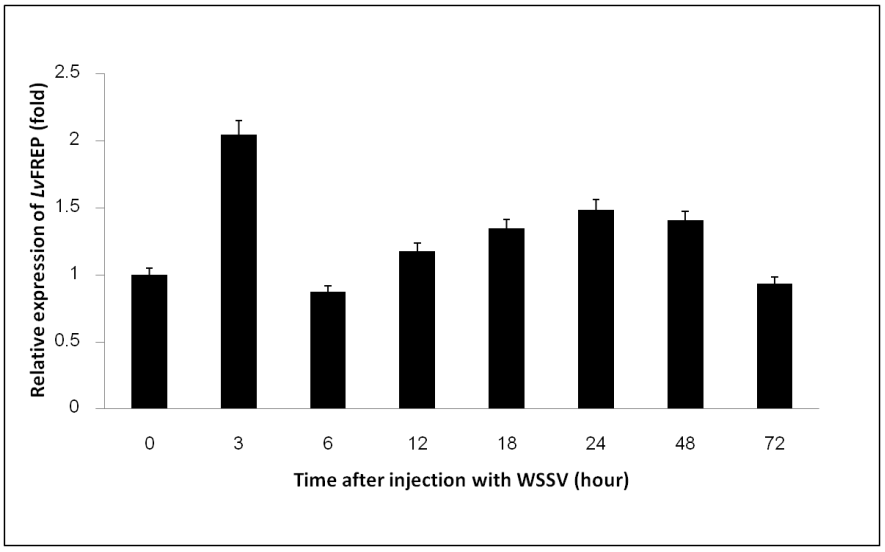
จากการศึกษาการแสดงออกของ *Lv*FREP mRNA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน *Lv*FREP มีการแสดงออกมากที่สุดในตับ รองลงมาคือหัวใจและลำไส้ (รูปที่ 2) การศึกษาดังกล่าวพบว่ามีการแสดงออกของยีนในหลายเนื้อเยื่อ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนที่มีรายงานในครัสเตเชียนที่มีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อเช่นกัน เช่น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งลายเสือ *M. japonicus* ชนิด *MjFREP1* พบการแสดงออกมากในเหงือก ตับและหัวใจ กุ้งนาง *Pacifastacus leniusculus* ชนิด *PlFLP1* พบการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อตับและพบการแสดงออกน้อยในเนื้อเยื่อหัวใจ และ

ลำไส้ (Wu, & Söderhäll, 2011) จากการเปรียบผลการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในกุ้งต่างชนิดกันพบว่าถึงแม้ว่ายีนนี้จะมีการแสดงออกในหลายเนื้อเยื่อ แต่เนื้อเยื่อหลักที่พบการแสดงออกของยีนนี้คือ ตับ ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารน้ำหรือโปรตีนชนิดต่าง ๆ รวมทั้งมีบทบาทในการกำจัดจุลินทรีย์ ดังนั้นในการพบการแสดงออกของยีน *Lv*FREP มากในตับ บ่งชี้ว่า *Lv*FREP น่าจะเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งขาวแวนนาไม



รูปที่ 2 การแสดงออกของ mRNA ของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับ β-actin ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน จากตับของกุ้งขาวแวนนาไมหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน *Lv*FREP มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 คือ 2.04 เท่า และลดลงที่ชั่วโมงที่ 6 หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 จากนั้นระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจะลดลงสู่ระดับปกติในชั่วโมงที่ 72 การแสดงออกของยีน *Lv*FREP ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถูกกระตุ้นด้วย WSSV สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *MjFREP1* หลังการเหนี่ยวนำด้วย WSSV ซึ่งพบว่ายีน *MjFREP1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังมีการเหนี่ยวนำด้วย WSSV ที่ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นพบการแสดงออกของ *MjFREP1* ลดลงในชั่วโมงที่ 6 แล้วจึงมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 12 ชั่วโมง หลังการเหนี่ยวนำ (Chai, Zhu, Yu, Zhao, Wang, 2012) จากรูปแบบการแสดงออกหลังการเหนี่ยวนำด้วย WSSV ของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน ในกุ้งทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคของยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจน จะมีการแสดงออกของ mRNA เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับ WSSV ซึ่งน่าจะเป็นผลเพื่อตอบสนองต่อเชื้อผู้บุกรุก บ่งชี้ได้ว่า *Lv*FREP เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งขาวแวนนาไม



รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนในตับของกุ้งหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ

สรุป

จากการโคลนยีนบางส่วนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนจากกุ้งขาวแวนนาไม (LvFREP) มีความยาว 600 คู่เบส ซึ่งแปลเป็นสายโพลีเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 128 หน่วย มี FReD 1 โดเมนและตำแหน่งจับกับ Ca^{2+} 1 ตำแหน่ง บ่งชี้ได้ว่าเป็นเลคตินแบบ C พบการแสดงออกของ mRNA ของยีน LvFREP ในเนื้อเยื่อตับมากที่สุด รองลงมาคือเนื้อเยื่อหัวใจและลำไส้ ซึ่งคล้ายกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไฟบริโนเจนของกุ้งชนิดอื่น ๆ บ่งชี้ว่า LvFREP น่าจะมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ได้ศึกษาบทบาทของยีน LvFREP ที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำกุ้งให้ติดเชื้อ WSSV พบว่ายีนมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV โดยมีการแสดงเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 3 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน LvFREP มีความสำคัญในการตอบสนองต่อ WSSV ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทหน้าที่และกลไกการทำงาน เพื่อต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและให้เกิดความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่ได้นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและใช้ในการป้องกันปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาภายใต้โครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี

เอกสารอ้างอิง

Bies, C., Lehr, C.M., & Woodley, J.F. 2004. Lectin-mediated drug targeting: History and applications. *Advanced drug delivery reviews*, *56*(4), 425-435.

Bulgakov, A.A., Park, K., Choi, K.-S., Lim, H.K., & Chob, M. (2004). Purification and characterization of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philipinarum* in Korea. *Fish and Shellfish Immunology, 16*(4), 487-499.

Chai, Y., Zhu, Q., Yu, S.S., Zhao, X.F., & Wang, J.X. (2012). A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response *of Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology, 32*(2), 307-315.

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

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.

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.

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

Song, K.K., Li, D.F., Zhang, M.C., Yang, H.G., Ruan, L.W., & Xu, X. (2010). Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology, 28*(4), 596-603.

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.

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.

Wu, C., Söderhäll, K., & Söderhäll, I. (2011). Two novel ficolin-like proteins act as pattern recognition receptors for invading pathogens in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Proteomics*, *11*(11), 2249-2264.