



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ GWAP
จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

โดย
ดร. ปิติ อ้าพ่ายัพ

กรกฎาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพ GWAP
จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. ปิติ อ่ำพ่าย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : DBG4980005
Project Title : Characterization of a glycine-rich-single whey acidic protein-domain (GWAP) antimicrobial peptide from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)
Investigator : Dr. Piti Amparyup
E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th
Project Period : 20 July 2006 – 19 July 2008

Proteins containing a whey acidic protein (WAP) domain have been found in several species of vertebrates and invertebrates and exhibit a variety of functions including proteinase inhibitory and antimicrobial activities. The WAP domain comprises of approximately 50 amino acids including eight cysteine residues which form a four-disulfide core. In this research, two novel genes of crustin-like antimicrobial peptide (Crus-like*Pm*) and single WAP domain (SWD)-containing proteins were identified from haemocytes of *Penaeus monodon*. The deduced amino acid sequence of a full-length Crus-like*Pm* cDNA consists of 124 amino acid residues of the mature peptide and a signal peptide of 17 amino acid residues. The mature peptide of a Crus-like*Pm* contains a glycine-rich domain at the *N*-terminus and 12 conserved cysteine residues containing a single WAP domain at the *C*-terminus. For SWD-containing proteins, the deduced peptides of the cDNAs representing three isoforms of SWD proteins (SWD*Pm*1, SWD*Pm*2 and SWD*Pm*3) revealed that they contain a putative signal peptide of 24 amino acids and encode for a mature peptide of 69, 68 and 56 amino acids, respectively, which contain typical characters similar to those of the shrimp SWD proteins with a Pro-Arg region and a WAP domain towards the *C*-terminus. Phylogenetic tree obtained indicates that Crus-like*Pm* is closely related to the other shrimp crustin proteins, while SWD*Pm* proteins were grouped within the cluster of SWD and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) from various shrimp species. Genomic organization of genes revealed the presence of two exons and one intron of a Crus-like*Pm* gene and three exons interrupted by two introns of a SWD*Pm*2 gene. The 5'-flanking regions of a Crus-like*Pm* gene contain multiple putative transcription factor binding sites. Tissue distribution analysis by RT-PCR showed that a Crus-like*Pm* and all three SWD*Pm* transcripts were primarily found in haemocytes. Transcript expression of a Crus-like*Pm* and SWD*Pm* were differentially

regulated upon bacterial and viral infections. To characterize the biological functions of Crus-like*Pm* and SWD*Pm*2 proteins, the mature protein encoding cDNA were cloned and expressed in *Escherichia coli*. The purified recombinant (r)Crus-like*Pm* and rSWD*Pm*2 showed strong antimicrobial activity at low MIC values. In addition, rSWD*Pm*2 exhibits proteinase inhibitory activity against subtilisin A and is a competitive inhibitor of subtilisin A with an inhibition constant (K_i) of 1.98 nM. The presence of Crus-like*Pm* and SWD*Pm* transcripts in hemocyte and its protein functions as an anti-bacteria and anti-proteinase suggested that they are potent immune effectors to protect the shrimp from pathogen infection.

Keywords : *Penaeus monodon*, antimicrobial peptide, WAP domain

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG4980005
ชื่อโครงการ : การศึกษาลักษณะสมบัติของของเปปไทด์ต้านจุลชีพ GWAP จากกุ้ง
กุลาดำ *Penaeus monodon*
Investigator : ดร. ปิติ อัมพาศัย
E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th
ระยะเวลาโครงการ: 20 กรกฎาคม 2549 – 19 กรกฎาคม 2551

โปรตีนที่ประกอบด้วย WAP domain พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง และมีหน้าที่ทางชีวภาพหลายชนิดประกอบด้วย การยับยั้งโปรตีนเนสและสมบัติการต้านทานจุลชีพ โดย WAP domain ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 50 ตัว และมีบริเวณอนุรักษ์กรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 8 ตัว ซึ่งสามารถสร้าง 4 พันธะไดซัลไฟด์ ในงานวิจัยนี้ได้ค้นพบยีนใหม่ 2 ยีนในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำซึ่งประกอบด้วย crustin-like antimicrobial peptide (Crus-likePm) และ single WAP domain (SWD)-containing proteins เมื่อทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน Crus-likePm พบว่ามีกรดอะมิโนของ mature peptide จำนวน 124 ตัว และ signal peptide จำนวน 17 ตัว โดย mature peptide ของยีน Crus-likePm ประกอบด้วย glycine-rich domain ที่ปลาย N และ บริเวณอนุรักษ์กรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 12 ตัว โดยรวม WAP domain ที่ปลาย C ในส่วน SWD-containing proteins พบยีน SWD จำนวน 3 ยีน (SWDPm1, SWDPm2 and SWDPm3) โดยโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนของ signal peptide จำนวน 24 ตัว และ mature peptide จำนวน 69, 68 และ 56 ตัว ตามลำดับ โดยโปรตีน SWD ของกุ้งกุลาดำมีลักษณะคล้ายกับ SWD ในกุ้ง ซึ่งประกอบด้วย Pro-Arg region และ WAP domain ที่ปลาย C จากการสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการพบว่ายีน Crus-likePm มีความใกล้ชิดกับยีน crustin ในกุ้ง ในขณะที่ยีน SWDPm จัดอยู่ในกลุ่มของยีน SWD และยีน SLPI ในกุ้งหลายชนิด การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนพบว่ายีน Crus-likePm ประกอบด้วย 2 exons และ 1 intron ส่วนยีน SWDPm2 ประกอบด้วย 3 exons และ 2 introns จากการศึกษาบริเวณทางด้าน 5'-flanking region ของยีน Crus-likePm พบ transcription factor binding site หลายตำแหน่งเมื่อตรวจการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ พบว่ายีน Crus-likePm และยีน SWDPm มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และพบว่ายีน Crus-likePm และ SWDPm มีการควบคุมการแสดงออกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส จากการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2 โดยการโคลน และแสดงออกใน *Escherichia coli* พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ

Crus-likePm และ SWDPm2 มีสมบัติในการต้านทานจุลชีพโดยมีค่า MIC ต่ำ นอกจากนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ SWDPm2 มีสมบัติในการยับยั้งโปรตีนเนส subtilisin A และมีค่า inhibition constant (K_i) เท่ากับ 1.98 nM ผลจากการศึกษายืนยัน Crus-likePm และ SWDPm ที่พบว่ามีการแสดงออกในเม็ดเลือดและการมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและการยับยั้งโปรตีนเนส แสดงให้เห็นว่า Crus-likePm และ SWDPm2 เป็นโมเลกุลที่สำคัญในการป้องกันกึ่งจากการติดเชื้อในกึ่ง

คำหลัก : กึ่งกลาดำ, เปปไทด์ต้านจุลชีพ, โดเมน WAP

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททุนวิจัยแบบมุ่งเป้า “การเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำเศรษฐกิจ” ในโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาลักษณะสมบัติของของเปปไทด์ต้าน จุลชีพ GWAP จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*” จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2549 ตามสัญญาเลขที่ DBG4980005 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ. ดร. อัญชลี ทศนาขจร หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการอนุชีววิทยาและจีโนม กุ้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบนิสิตและนักวิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

Executive summary

ชื่อโครงการ

- ภาษาไทย) การศึกษาลักษณะสมบัติของของเปปไทด์ด้านจุลชีพ GWAP จากกุ้ง
กุลาดำ *Penaeus monodon*
- (ภาษาอังกฤษ) Characterization of a glycine-rich-single whey acidic protein-domain
(GWAP) antimicrobial peptide from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

ชื่อหัวหน้าโครงการ

- (ไทย) ดร. ปิติ อัมพารยัพ (อังกฤษ) Dr. Piti Amparyup
- (ตำแหน่ง) นักวิจัย 1 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- ที่ทำงาน หน่วยปฏิบัติการอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
- โทรศัพท์ 02-2185414 โทรสาร 02-2185414
- โทรศัพท์มือถือ 0891296020
- อีเมล: piti.amp@biotec.or.th : amparyup@yahoo.com

1. รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่ง ปัญหาโรคระบาด จากไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง เปปไทด์ด้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides) เป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยมีคุณสมบัติสามารถต่อต้านการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อจุลชีพได้ โดยทั่วไปเปปไทด์ด้านจุลชีพเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กมีความยาวของกรดอะมิโนน้อยกว่า 50 อะมิโน และสามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัสได้ ในสัตว์จำพวกกุ้งได้มีการค้นหา และศึกษาหน้าที่เป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพในกุ้งหลายชนิด โดยปัจจุบันพบเปปไทด์ด้านจุลชีพอยู่ 3 ชนิด ประกอบด้วย (1) Penacidins (2) Antilipopolysaccharide factors และ (3) Crustins อย่างไรก็ตามการค้นหา และศึกษาหน้าที่ของเปปไทด์ด้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ ยังคงมีความสำคัญอย่างยิ่งโดยจะทำให้เราเข้าใจถึงหน้าที่ของเปปไทด์ด้านจุลชีพแต่ละชนิดต่อการต้านทานจุลชีพซึ่งมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

Whey Acidic Protein (WAP) domain ซึ่งเป็นโดเมนที่มีความสำคัญต่อกลไกในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) และฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีเนส (proteinase inhibitory activity) ที่พบในเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์และตัวยับยั้งโปรตีเนสหลายชนิด จากการค้นหายีนในฐานข้อมูลจีโนมกุ่มกุลาคำ (<http://pmonodon.biotech.or.th>) พบยีนที่มี WAP domain ที่น่าสนใจอยู่ 2 ยีนประกอบด้วย glycine-rich-single whey acidic protein-domain (GWAP) antimicrobial peptide และ single whey acidic protein domain (SWD) antimicrobial peptide จากข้อมูลข้างต้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการวิจัยพัฒนาอย่างต่อเนื่องในเรื่องโรคและระบบภูมิคุ้มกันในกุ่มกุลาคำ โดยงานวิจัยนี้จะศึกษายีน GWAPP_m และ SWDP_m ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี WAP domain ที่ได้จากองค์ความรู้ของงานวิจัยจากโครงการจีโนมกุ่มกุลาคำ โดยศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression) หากการจัดเรียงตัวของยีน (Genomic organization) และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Recombinant protein) โดยข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะทำให้สามารถเข้าใจกระบวนการ และหน้าที่ของยีนนี้ต่อกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคของกุ่มกุลาคำได้มากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full length cDNA) ของยีน GWAPP_m และ SWDP_m

1.2.2 ศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ และการตอบสนองต่อเชื้อโรคในกุ่มกุลาคำ

1.2.3 ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Recombinant protein) ของ GWAPP_m และ SWDP_m

1.2.4 การทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GWAPP_m และ SWDP_m

1.2.5 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ GWAPP_m และ SWDP_m

1.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

1.3.1 การสกัด Total RNA และ mRNA จากเม็ดเลือดกุ่มกุลาคำ

นำตัวอย่างกุ่มกุลาคำอายุประมาณ 4 เดือนขนาด 25 กรัม มาทำการดัดเลือด สกัด total RNA โดยใช้ TRI REAGENT ทำลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ RNase-free DNaseI (Promega, USA) และแยก mRNA โดยใช้ QuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

1.3.2 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (Full-length cDNA) โดยวิธี RACE-PCR

นำ mRNA ปริมาณ 2 µg ที่แยกได้จากเม็ดเลือด มาสร้าง First-stand cDNA โดยใช้ SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) นำ cDNA ที่ได้มาทำ 5'RACE-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีนและโคลนขึ้นต้นดีเอ็นเอเข้า pGEM^R-T easy

vector และนำมา transform เข้า *E. coli* XL 1- Blue โดยวิธี Electrotransformation และนำ recombinant clones ที่ได้มาตรวจสอบหา insert โดยการ digestion ด้วย *EcoRI* และวิเคราะห์ insert ใน 1% agarose gel electrophoresis สกัดพลาสมิดจาก recombinant clone ที่ได้แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1.3.3 วิเคราะห์ข้อมูลของยีน

วิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม GENETYX software (Software Development Inc.) และโปรแกรม SMART analysis (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLASTX และ BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Clustal W และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

1.3.4 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ทำการโคลนยีนเข้าสู่ Expression vector (pET28b) และนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-BLUE โดยวิธี electroporation คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนโดยวิธี colony PCR และหาขนาดของ insert DNA โดยการตัดด้วย restriction enzyme วิเคราะห์ขนาดของ DNA insert โดยวิธี agarose gel electrophoresis สกัดพลาสมิดที่อื่นของรีคอมบิแนนท์โคลน และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ automated DNA sequencer นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้นี้มา transformation เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยวิธี electroporation

1.3.5 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

ทำการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่อุณหภูมิ 37 °C และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1mM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนใน SDS-PAGE ตรวจสอบแถบโปรตีนด้วยการย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue

1.3.6 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column chromatography และวิเคราะห์โปรตีนใน SDS-PAGE นำโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ไปหาลำดับโมเลกุลโดยใช้ MALDI-TOF MASS spectrometry

1.3.7 การตรวจสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (antimicrobial assay)

นำโปรตีนบริสุทธิ์มาตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ หาค่า Minimum inhibition concentration (MIC) ค่าที่รายงานคือช่วงความเข้มข้นสูงสุดของโปรตีนที่ยังมีการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการยับยั้ง 100%

1.3.8 การตรวจสอบสมบัติการยับยั้งโปรตีนเนส (proteinase inhibitor)

นำโปรตีนบริสุทธิ์มาตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีนเนสจำนวน 5 ชนิดประกอบด้วย serine proteinases trypsin (bovine pancreas, Sigma), chymotrypsin (type II bovine pancreas, Sigma), elastase (porcine pancreas, Pacific Science), proteinaseK (*Tritirachium album*, Promega) และ subtilisin A (*Bacillus licheniformis*, Sigma) ที่ความเข้มข้น final concentrations เป็น 5, 3, 3.9, 10 และ 10 nM ตามลำดับ และใช้ซับสเตรท N-benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide (ที่ความเข้มข้น 146.8 และ 293.6 mM) สำหรับโปรตีนเนส trypsin and subtilisin A ตามลำดับ ซับสเตรท N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (ที่ความเข้มข้น 147.3 mM) สำหรับโปรตีนเนส chymotrypsin และ proteinaseK และซับสเตรท N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (ที่ความเข้มข้น 443.1 mM) สำหรับโปรตีนเนส elastase โดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ ของโปรตีน (final concentrations 0, 2, 4, 8.1, 16.3, 32.5, 65 และ 130 nM) มาบ่มร่วมกันเป็นเวลา 15 นาที ที่ 30 °C และหยุดปฏิกิริยาด้วย 50% (v/v) acetic acid วัดปริมาณของ p-nitroaniline ที่ถูกปลดปล่อยด้วย spectrophotometer ที่ 405 nm

1.3.9 ศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนใน genomic DNA ของกิ้งกูดดำ

1.3.9.1 การสกัดดีเอ็นเอของกิ้งกูดดำ

เตรียมดีเอ็นเอของกิ้งกูดดำจากส่วนขาว่ายน้ำ โดยวิธี Phenol-Chloroform proteinase K method วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค spectrophotometry และ agarose gel electrophoresis

1.3.9.2 สร้าง GenomeWalker library ของกิ้งกูดดำ

เตรียมห้องสมุด GenomeWalker ของกิ้งกูดดำโดยใช้ BD GenomeWalker Universal kit (BD Bioscience Clontech) นำ genomic DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* หรือ *StuI* โดยแยกกันแต่ละห้องสมุดและนำมาเชื่อมต่อกับ adaptor โดยใช้ T4 DNA ligase เก็บ GenomeWalker library ทั้ง 4 ไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.3.9.3 แยกยีนโดยใช้เทคนิค PCR

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GWAP cDNA จากบริเวณ 5' UTR และ 3' UTR เพื่อนำมาใช้เพิ่มปริมาณของยีนใน genomic DNA ของกิ้งกูดำ วิเคราะห์ PCR product โคลนยีนที่น่าสนใจและวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ DNA sequencer

1.3.10 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน

1.3.10.1 เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

สร้าง First-stand cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ วิเคราะห์ PCR products ใน 1.4% agarose gel electrophoresis วัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) ค่าการแสดงผลออกเป็น relative expression เทียบกับยีน EF1- α ที่ปรับค่า (normalized) ให้เป็น 100 คำนวณนัยสำคัญของการเปลี่ยนแปลงค่าการแสดงออกของยีนด้วย One Way Analysis of Variance (ANOVA) และ post hoc test (Duncan's new multiple range test)

1.3.10.1 เทคนิค real-time PCR

สร้าง First-stand cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค real-time RT-PCR โดยใช้เครื่อง iCycler-iQTM system (Bio-Rad Laboratories, USA) และใช้ชุดตรวจสอบ SYBR Green I dye detection

เนื้อหางานวิจัย

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของยีน *GWAPPm* และ *SWDPm*

Whey Acidic Protein (WAP) domain ซึ่งเป็นโดเมนที่มีความสำคัญต่อกลไกในการต้านทานเชื้อจุลชีพ (antimicrobial activity) และฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีเนส (proteinase inhibitor activity) ที่พบในเปปไทด์ด้านจุลชีพและตัวยับยั้งโปรตีเนสหลายชนิด เช่น human secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) และ mouse SWAM จากการค้นหายีนในฐานข้อมูลจีโนมกุ้งกุลาดำ (<http://pmonodon.biotech.or.th>) พบยีน Glycine-rich single whey acidic protein-domain (GWAP) antimicrobial peptide cDNA (accession no. BI784446) และ ยีน Single whey acidic protein domain (SWD) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้ Phylogenetic tree พบว่ายีน GWAP มีความคล้ายกับยีน crustin ที่พบในกุ้ง ดังนั้นเพื่อมิให้สับสนในงานวิจัยนี้เราเปลี่ยนชื่อยีน GWAP เป็น Crustin-like antimicrobial peptide (*Crus-likePm*)

เมื่อทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Crus-likePm* โดยใช้เทคนิค RACE-PCR พบว่ายีน *Crus-likePm* มีความยาวทั้งหมด 541 bp ประกอบด้วยบริเวณ 5'-untranslated region (UTR) ยาว 38 bp, บริเวณ open reading frame (ORF) ยาว 426 bp สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 141 ตัว และบริเวณ 3'-UTR ยาว 61 bp พบ putative polyadenylation signal sequence (AATAAA) อยู่ 1 ตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์บริเวณ signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) พบว่ามี signal peptide ยาว 17 ตัว และจากการหา *N*-glycosylation sites (NXT และ NXS) พบว่ามี putative *N*-glycosylation site อยู่ 1 ตำแหน่ง ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 128 (NDT) ซึ่งแสดงว่ายีน *GWAPPm* เป็นไกลโคโปรตีน เมื่อคำนวณ molecular mass ของ mature proteins (124 amino acid) พบว่ามี molecular mass 12.48 kDa และค่า *pI* 7.8 (รูปที่ 1)

```
AGTCCGTTTCATCGCACAGCCGAGAGAGGAAGTGTCAAGATGCTAAAGTTTGTAGTATTAT 60
                               M L K F V V L
CCGTTGTCGCTGTGGCTGTGGTACACGCGCAGGATAAAGGCAATGCCGATACTCGCTTCC 120
S V V A V A V V H A Q D K G N A D T R F
TAGGTGGAGTTGGAGTTCCTGGAGGTGGAGTTCCTGGAGTTGGAGTTCCTGGAGTTGGAG 180
L G G V G V P G G G V P G V G V P G V G
GTGGATTCTGCGGGGGTTCCTGGGCATGGTGGCGTTGTTCTGGAGGCGGTGGCCTTC 240
G G F L P G V P G H G G V V P G G G G L
TCCCTGGAGTCAATTCGAGTGAATTACTGCAGAACGAGGTACGGATACGTATGCTGCA 300
L P G G Q F E C N Y C R T R Y G Y V C C
AGCCCGGAGGTGCCACAGATTCGCGATACCTGCCAGGCCCTCAGAAAGGGTGTCCCGA 360
K P G R C P Q I R D T C P G L R K G V P
TCTGCCGTCAGGACACTGACTGCTTCGGCTCCGACAAATGCTGCTTCGACACCTGCTTGA 420
I C R Q D T D C F G S D K C C F D T C L
ACGACACCGTCTGCAAACCATCGTGGCAGGTTCTCAGGGATAGGCCTGCATGTTGACT 480
N D T V C K P I V A G S Q G *
CATCAATTCCTTTTATCAATAAATGCTATAGCTGTTAATTGTTAAAAA 539
```

รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *Crus-likePm* ใน hemocyte ของกุ้งกุลาดำ ตัวอักษรสีดำนเข้ม และขีดเส้นใต้แสดง putative signal peptide, start codon, stop codon และ putative poly (A) signal sequence

จากการค้นหายีน SWD ในฐานข้อมูลจีโนมกุ้งกุลาดำ พบยีนที่มีความเหมือนกับยีน SWD จำนวน 50 โคลน สามารถแบ่งได้เป็น 3 ไอโซฟอร์ม ประกอบด้วย SWDPm1 (17 โคลน), SWDPm2 (32 โคลน) และ SWDPm3 (1 โคลน) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานไว้ใน GenBank database พบว่ามีความเหมือนกับยีน SWD (AY464465) ของกุ้งกุลาดำ ที่ความเหมือน 96%, 86% และ 46% ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน SWDPm1 (EU623979), SWDPm2 (EU623980) และ SWDPm3 (EU623981) พบว่ามีความยาว 416, 472 และ 438 bp ประกอบด้วย ORF ยาว 279 bp , 282 bp และ 240 bp สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 92, 93 และ 80 กรดอะมิโน ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์บริเวณ signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP พบว่ามี signal peptide ยาว 24 กรดอะมิโน เมื่อคำนวณ molecular mass พบว่ามีขนาด 7.29, 7.39 และ 6.23 kDa และค่า pI 8.07, 8.29 และ 8.28 ตามลำดับ (ตาราง 1)

ตาราง 1 Characteristics ของยีน SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3 ของกุ้งกุลาดำ

Characteristics	SWDPm1	SWDPm2	SWDPm3
Accession no.	EU623979	EU623980	EU623981
Full-length sequence	416 bp	427 bp	438 bp
ORF	279 bp	282 bp	240 bp
Signal sequence	24 aa	24 aa	24 aa
Mature protein	68 aa	69 aa	56 aa
Molecular weight	7.29 kDa	7.38 kDa	6.23 kDa
Isoelectric point (pI)	8.07	8.29	8.28

2. การวิเคราะห์ function domains ของยีน Crus-likePm และ SWDPm

จากการวิเคราะห์โดเมนของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม SMART analysis (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) พบว่ายีน Crus-likePm และ SWDPm มี whey acidic protein (WAP) domain ที่ปลายด้านปลาย C ในขณะที่ปลายด้านปลาย N ของโปรตีน Crus-likePm และ SWDPm มี Glycine-rich region และ P-R-P region ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์โปรตีน Crus-likePm โดยใช้โปรแกรม BLASTX พบว่ายีน Crus-likePm ประกอบด้วย cysteine ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง โดย cysteine 8 ตำแหน่งสุดท้ายเป็น WAP domain ซึ่งมีความคล้ายกับยีน crustin antimicrobial peptide ที่พบในกุ้งหลายชนิด และยีน carcinin antimicrobial peptide ที่พบในปู แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระยะห่างของกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 4 และ 5 ของ Crus-likePm และ Crustin ค่อนข้างต่างกันมาก (รูปที่ 2) นอกจากนั้นพบว่าปลายด้าน N-terminus ของ โปรตีน Crus-likePm และ

Crustin มีบริเวณ Glycine-rich region เช่นเดียวกันแต่จำนวนซ้ำของ glycine ต่างกัน จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน Crus-likePm เป็นยีน crustin ชนิดใหม่ที่พบในกุ้งกุลาดำ

(B)

	C 1	C 2	CC 34	C 5	C 6
CrusPm1	PASC-----RRWC-----ETPENAFVCC-----ESRYEPEAPVGTKILDCKPVRDT-----CPPVRF				
CrusFc	PATC-----RRWC-----RTPERAAYCC-----ETSFEPEAPVGTKILDCKPVRDT-----CPPVRF				
CrusLs2	TSDC-----RYWC-----KTPEGQAYCC-----ESAHEPETPVGTKPLDCKPVRPT-----CP--RF				
CrusLv1	TSDC-----RYWC-----KTPEGQAYCC-----ESAHEPETPVGTKPLDCKPVRPT-----CP--RF				
CrusMj2	SSDC-----RYWC-----KTPGGQNYCC-----ERSHEPEGPVGTKPLDCKPVRPT-----CP--RF				
CrusHg	TPSC-----VFWCNFPDGVNAGASYCCINSNHRIVENTSSEPHAGRC AKHVF-----CARGDF				
CrusHa	TPSC-----VFWCNFPAAVNAGASYCCINSNQIRIVENTSLEPHAGRCI IHTF-----CARGDF				
CarCm	PKDC-----KYWC-----KDNLGINYCC-----GQPGVTYPFFT KSHLGRCPVVRDT-----CTGVR-				
CrusPl2	PEGC-----NYECKKEGPNKGSNYCC-----GPEYIPLKREEKHAGNCPPLKE-----CTRFP				
CrusPl1	IPGC-----VNTC-----QAKDKPGFFVCC-----DSKGLNAGTCPKVHLQPYERNVLC DRT--				
CrusPl3	GLDCSGNSLSPTGNCRYYLRNPVNRRYYC-----TRNQKPAYKCPLLRPD-----CPD--				
PET15Pa	DSTC-----TDFC-----EDPVLGLGHVYCC-----YHEGKCPSPRQF-----CPHHIG				
Crus-likeFc1	QFEC-----NYC-----RTRYGYVCC-----KPGRCPPVRDV-----CPG--				
Crus-likePm	GSGC-----NYC-----RTRYGYVCC-----KPGRCPPQIRDTC-----CPG--				

	C 7	C 8	CC 910	C 11	C 12
CrusPm1	-LAVEQPVPSSSDYKCGGLDKCCFDRCLGQHVCKPPSFY--EFFA				
CrusFc	--GGLAPVTCSSDYKCGGIDKCCFDRCLGEHVCKPPSFY--NFFN				
CrusLs2	---HGPPTTCSNDYKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGQQIFG				
CrusLv1	---HGPPTTCSNDYKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG				
CrusMj2	--QGGPVTCSNDYKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSVFGKPLFG				
CrusHg	--TPPAPIRCGHDDYCPYHEKCCYDACLKHHTCKGPIF-----				
CrusHa	--TPPSPIRCGHDDYCPYNEKCCYDACLKHHTCKGPLPH-----				
CarCm	--TQL-PTYCPHDGACQFRSKCCYDTCLKHHVCKTAEYPYY----				
CrusPl2	-----PPQVCPHDGHCYPNQKCCFDTCLDIHTCKPAHFYIN----				
CrusPl1	QFNYPNHLNCKDDEDQVFKECCYLPDNHQLICRNSEDI-----				
CrusPl3	-TRSGPPVECYTDNDCCGPLDKCCDACLDHYVCKPAA-----				
PET15Pa	--AKVGPTICEFDYQCSKTEKCCYDVCLKHKTCKRVV-----				
Crus-likeFc1	--LRQGVPI-CRQDTCDFGSDKCCYDVCLNDTVCKPIVLGSEG---				
Crus-likePm	-LRKGVPI-CRQDTCDFGSDKCCFDTCLNDTVCKPIVAGSQG---				

รูปที่ 2 แสดง Multiple alignments ของ 12 cysteins ที่พบในยีน Crus-likePm กับยีน crustin (*Penaeus monodon*; CrusPm1: *Litopenaeus vannamei* CrusLv1: *Litopenaeus setiferus*; CrusLs2: *Marsupenaeus japonicus*; CrusMj2: *Fenneropenaeus chinensis*; Crus-likeFc1: *Homarus americanus*; CrusHa: *H. gammarus*; CrusHg และ *Pacifastacus leniusculus*; CrusPl2 และ carcinin (*Carcinus maenas*; CarCm) และ putative antimicrobial protein (*Panulirus argus*; PET15Pa)

เมื่อวิเคราะห์ยีน SWDPm ที่พบทั้ง 3 ยีน พบว่ามี cysteine ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ในบริเวณของ WAP domain (รูปที่ 3) โดย WAP domain เป็นโดเมนที่พบในเปปไทด์ด้านจุลชีพมีความสำคัญต่อกลไกในการต้านทานหรือทำลายเชื้อจุลชีพหลายชนิด ในขณะที่ปลาย N ของยีน SWDPm1 และ SWDPm2 มีบริเวณของ Proline-rich region แต่ไม่พบในยีน SWDPm3

เมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนพบว่ายีน SWDPm1 มีความเหมือนกับยีน SWD ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (AY464465) ที่เคยมีรายงานไว้ถึง 96% มีเพียง 3 กรดอะมิโน ของ SWDPm1 ที่มีความแตกต่าง โดยเปลี่ยนจาก S3 เป็น N, R35 เป็น Q และ N79 เป็น R จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน SWDPm1 เป็นยีนเดียวกับยีน SWD ที่เคยมีรายงานไว้ โดยที่เป็น allelic form ของยีน SWDPm1 ของกุ้งแต่ละตัว ในขณะที่ยีน SWDPm2 และ SWDPm3 มีความเหมือนกับยีน SWDPm1 เพียงแค่ 86% และ 45% ตามลำดับ แสดงว่ายีน SWDPm2 และ SWDPm3 เป็นยีน SWD ใหม่ที่พบในกุ้งกุลาดำ

SWDPm (AY464465)	MVNIKAVLIVCVLVAAVAVSPADAVPTRHSRPRPQPKPRPGT	CPDTS	DIF	50
SWDPm1 (EU623979)	MVSIKAVLIVCVLVAAVAVSPADAVPTRHSRPRRPRPKPRPGT	CPDTS	DIF	50
SWDFc (EF216349)	MVNIKEVLIVSVLVAAVAVSPADAVPTRHARPRPQPRPGT	CPDTS	DI	50
SWDPm (Chen [22])	MVNIKAVLIVCVLVAAVAVSPADAVPTRHSKPRPQPLPRPGT	CPDTS	GIV	50
SWDPm2 (EU623980)	MVSIKAVLIVCVLVAAVAVSPADAVPTRHSKPRPQPLPRPGT	CPDTS	GII	50
SWDLv (AY465833)	MVSVKEVLIVLVLVAAVAVSPADAVPTRHSRPRPQPRPGT	CPDTS	DI	50
SWDMj (AU176270)	MVSIKEVLIVAVLVAAVAVSPANASPRRFD	-----	RPGT	CPNTD
SWDPm3 (EU623981)	MVSLKEVLIVLVLVAVAVSPADAVPTGLE	-----	KPGRCRR	PPEYH

Predicted scissile peptide bond

SWDPm (AY464465)	SICVVTERNCFS	DSECGPGQKCCPIGCGRECLAVVPPYGS	GR-	92
SWDPm1 (EU623979)	SICVVTERNCFS	DSECGPGQKCCPIGCGRECLAVVPPYGS	GR-	92
SWDFc (EF216349)	SICVVTERNCFS	DGECGAGQKCCPIGCGRECLAVGSPYK	---	90
SWDPm (Chen [22])	TTCEVTERNC	LSDSQCGPGQKCCSRGCGRECLAVVPPYGS	GR-	92
SWDPm2 (EU623980)	TTCEVTERNC	SDSQCGPGQKCCPLGCGRECLAVGPPYKG	GRW	93
SWDLv (AY465833)	GPCVITERNC	LSDSQCAPGQKCCPIGCGRECLAVGPPYGN	GRR	93
SWDMj (AU176270)	GICVITEAN	SLDAECGPRQKCCPYGCGRECLTVVPPYK	GGRW	85
SWDPm3 (EU623981)	SICPLRAIS	CNDSDRCSNGYKCCLVGCGKRCMPVAI	WT----	80

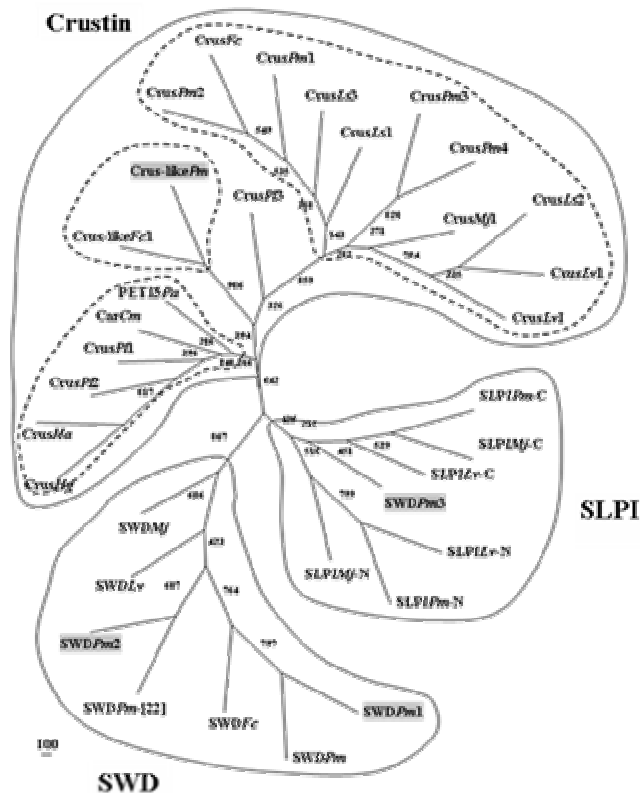
รูปที่ 3 แสดง alignments ของ WAP domain (8 cysteins) ของยีน SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ กับยีน SWD ที่เคยมีรายงานไว้ประกอบด้วย SWD ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (SWDPm; AY464465 และ Chen et al., 2005), กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (SWDLv; AY465833), กุ้ง kuruma *Marsupenaeus japonicus* (SWDMj; AU176270), กุ้งจีน *Fenneropenaeus chinensis* (SWDFc)

3. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากการสร้าง Phylogenetic tree จากบริเวณของ WAP domain ของยีน Crus-likePm และ SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และSWDPm3) ของกุ้งกุลาดำ กับโปรตีนที่มี WAP domain ซึ่งประกอบด้วยยีน Crustin, Carcinin และ Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) ที่พบในสัตว์จำพวก crustacean ที่มีรายงานไว้

จากผลพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของยีนที่มี WAP domain ใน crustacean ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่ม 1: Crustin กลุ่ม 2: SWD และกลุ่ม 3: SLPI (รูปที่ 4) โดยในกลุ่มที่ 1: Crustin สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยประกอบด้วย [1] Crustins จากกุ้ง (CrusPm1, CrusPm2, CrusPm3, CrusPm4, CrusLv1, CrusLvI, CrusLs1, CrusLs2, CrusLs3, CrusMj1 และ CrusFc), [2] Crustin-like peptide จากกุ้ง (Crus-likePm Crus-likeFc) และ [3] Crustins (และ Carcinin) จากปู (CarCm), crayfish (CrusPl1, CrusPl2) และ lobster (CrusHa, CrusHg, PET15Pa) จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน Crus-likePm จากกุ้งกุลาดำ มีความใกล้ชิดกับยีน Crustin-like protein ที่พบในกุ้งจีน *Fenneropenaeus chinensis* แต่อย่างไรก็ตามทั้งสองยีนก็มีความแตกต่างจากยีน crustin ที่พบในกุ้งและยีน carcinin ที่พบในปูอย่างชัดเจน ซึ่งทั้ง crustin และ carcinin เป็น antimicrobial peptide ที่พบใน crustacean

ในขณะที่ในกลุ่มของยีน SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และSWDPm3) จากผลของ Phylogenetic tree พบว่ายีน SWDPm1 และ SWDPm2 จัดอยู่ในกลุ่มของ SWD จากกิ่งชนิดต่าง ๆ และSWDPm3 จัดอยู่ในกลุ่มของ SLPI โดย SWDPm1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับยีน SWDPm ที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ จากผลแสดงให้เห็นว่าทั้ง SWDPm2 และSWDPm3 เป็นยีน SWD ชนิดใหม่ที่พบในกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 4 แสดง Phylogenetic tree ของยีน Crust-likePm และ SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และSWDPm3) ของกุ้งกุลาดำ กับโปรตีนที่มี WAP domain ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม crustacean ประกอบด้วยยีน SWD ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (SWDPm1-3, EU623979, EU623980 and EU623981, respectively; SWDPm, AY464465; SWDPm; Chen [22]), กุ้งขาว *L. vannamei* (SWDLv, AY465833), กุ้งจีน *F. chinensis* (SWDFc, XP623150) และกุ้ง *M. japonicus* (SWDMj, XP623150); ยีน Crustin ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Crust-likePm, EF654658; CrustPm1, CF415873; CrustPm2, BI018072; CrustPm3, BI018073; CrustPm4, CF415873), กุ้ง *M. japonicus* (CrustMj1, AB121740), กุ้งขาว *L. vannamei* (CrustLv1, AF430071; CrustLvI, AY488492), กุ้ง *L. setiferus* (CrustLs1, AF430077; CrustLs2, AF430078; CrustLs3, AF430079), กุ้งจีน *F. chinensis* (Crust-likeFc1, DQ097703; CrustFc, AY871268), ปลู *C. maenas* (CarCm, AJ237947), กุ้งมังกร *H. americanus* (CrustHa, CN853187), กุ้งมังกร *H. gammarus* (CrustHg, CAH10349), กุ้งน้ำจืด crayfish *Pacifastacus leniusculus* (CrustPl1, EF523612; CrustPl2, EF523613; CrustPl3, EF523614), กุ้งมังกร *Panulirus argus* (PET15Pa, AAQ15293); และยีนSecretory leukocyte protease inhibitors (SLPIs) ของกุ้ง *M. japonicus* (SLPIMj, ABW88999), กุ้งขาว *L. vannamei* (SLPILv; [Jimenez-Vega et al., 2007]) และกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (SLPIPm, BI784457).

4. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Crus-likePm* และ *SWDPm* (*SWDPm1*, *SWDPm2* และ *SWDPm3*) ของกุ้งกุลาดำ ในเม็ดเลือด (Heamocyte ; HC), ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas; HP), เหงือก (Gill; G), อวัยวะน้ำเหลือง (Lymphoid organ ;L), ลำไส้ (Intestine; I) และหัวใจ (Heart; HT) ของกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR และใช้ *EF1 α* เป็น internal control (รูปที่ 5) ผลพบว่ายีน *Crus-likePm* ยีนมีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และมีการแสดงออกบ้างในเหงือก และลำไส้ แต่ไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อ ตับและตับอ่อน อวัยวะน้ำเหลือง และลำไส้ ในส่วนของยีน *SWDPm* ทั้ง 3 ยีน ผลพบว่ายีน *SWDPm1*, *SWDPm2* และ *SWDPm3* มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และยีน *SWDPm2* มีการแสดงออกเล็กน้อยใน ตับและตับอ่อน และ เหงือก ผลจากการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่า ยีน *Crus-likePm* และ *SWDPm* (*SWDPm1*, *SWDPm2* และ *SWDPm3*) ของกุ้งกุลาดำเป็นยีนที่มีการสร้างจากเม็ดเลือด

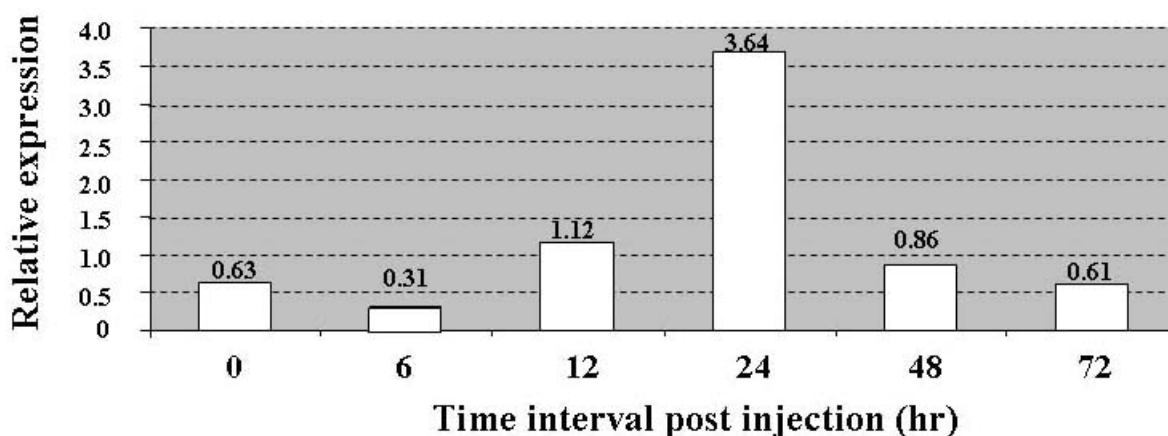


รูปที่ 5 การแสดงออกของยีน *Crus-likePm* (A) และ *SWDPm* (*SWDPm1*, *SWDPm2* และ *SWDPm3*) (B) ของกุ้งกุลาดำในเม็ดเลือด (Heamocyte ; HC), ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas; HP), เหงือก (Gill; G), อวัยวะน้ำเหลือง (Lymphoid organ ;L), ลำไส้ (Intestine; I) และหัวใจ (Heart; HT หรือ H) ของกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ยีน *EF-1 α* ใช้เป็น housekeeping gene control

5. ตรวจสอบตอบสนองของยีนหลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อโรค

5.1 การแสดงออกของยีน Crus-likePm ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Crus-likePm ในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลจากการวิเคราะห์พบว่ายีน Crus-likePm มีการแสดงออกลดลงที่ 6 ชั่วโมง และเริ่มมีการแสดงออกมากขึ้นที่ 12 ชั่วโมง และแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อ และเริ่มมีการแสดงออกลดลงสู่สภาวะปกติที่ 48-72 ชั่วโมง (รูปที่ 6) จากผลนี้ให้เห็นว่ายีน Crus-likePm น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำโดยถูกกระตุ้นหลังจากติดเชื้อ *Vibrio harveyi*



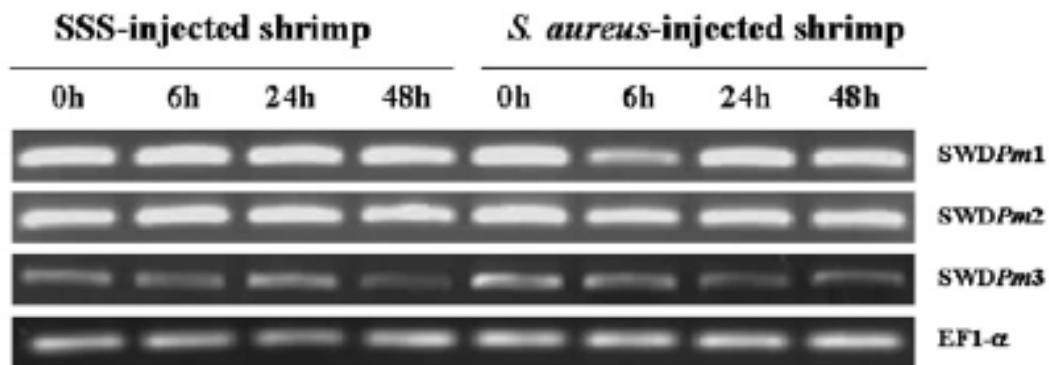
รูปที่ 6 แสดงระดับของการแสดงออกของยีน Crus-likePm ในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค real-time PCR

5.2 การแสดงออกของยีน SWDPm ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

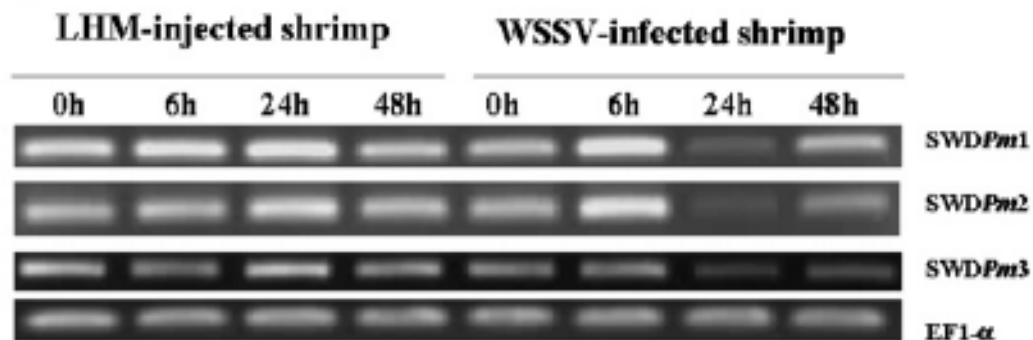
จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3) ในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และเชื้อไวรัส White spot syndrome virus (WSSV) ที่เวลา 0, 6, 24, และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 7) ผลจากการวิเคราะห์พบว่ายีน SWDPm1 มีการแสดงออกมากขึ้นที่ 6 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ในขณะที่ยีน SWDPm2 และ SWDPm3 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

เมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV พบว่ายีน SWDPm1 และ SWDPm2 มีการแสดงออกมากขึ้นที่ 6 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อ และทั้งสามยีน (SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3) มีการแสดงออกลดลงที่ 24 ชั่วโมง จากผลนี้ให้เห็นว่ายีน SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3) น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

A



B



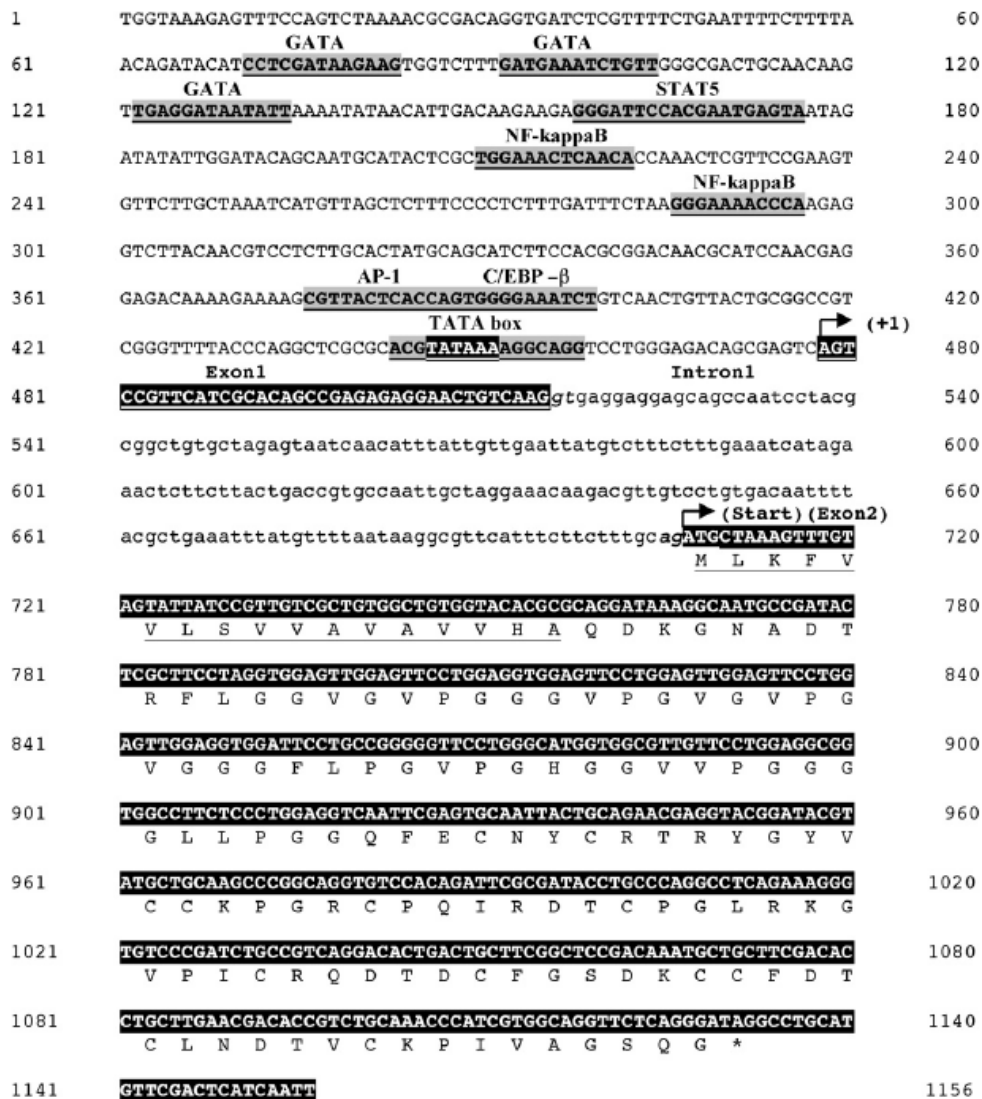
รูปที่ 7 แสดงระดับของการแสดงออกของยีน SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และSWDPm3) ในเม็ดเลือดของกุลาดำที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (A) และไวรัส WSSV (B) ที่เวลา 0, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

6. การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน *Crus-likePm* และ SWDPm2 ในกุ้งกุลาดำ

6.1 การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน *Crus-likePm*

จากการค้นหา genomic organization ของยีน *Crus-likePm* โดยออกแบบไพรเมอร์ที่บริเวณปลายด้าน 5' และ 3' ของยีนเพื่อเพิ่มจำนวนยีน *Crus-likePm* โดยใช้ดีเอ็นเอกุ้งกุลาดำเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 720 bp เมื่อนำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *Crus-likePm* มีขนาด 716 bp ประกอบด้วยประกอบ 2 exon และ 1 intron โดยที่ intron แทรกอยู่ระหว่าง 5'-UTR และ start codon และพบว่ายีน *Crus-likePm* มี boundary sequence ของ exon/intron ตาม GT/AG rule ในส่วนของการค้นหาลำดับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Crus-likePm* ในกุ้งกุลาดำ โดยการสร้างห้องสมุด GenomeWalking จำนวน 4 ห้องสมุดประกอบด้วย ห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* และ *StuI* หลังจากทำ PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ในห้องสมุด *DraI* จากนั้นนำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเป็นส่วนของโปรโม

เตอร์ของยีน *Crus-likePm* และเมื่อวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *Crus-likePm* มี transcription factor binding site ที่พบใน immune genes เช่น TATA box, GATA binding factor-binding sites, STAT5-binding sites, C/EBP β -binding site, NF- kappaB-binding site, AP1-binding sites, และCCAAT box (รูปที่ 8) จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน *Crus-likePm* น่าจะเป็นยีนที่สำคัญเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 8 แสดง genomic organization และบริเวณ upstream region และ putative transcription factor binding sites ของยีน *Crus-likePm* ส่วนของ exon แสดงด้วยตัวหนาและเน้นข้อความของตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ และ ส่วน intron แสดงด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์เล็ก

6.2 การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีน SWDPm2 ในกุ้งกุลาดำ

จากการค้นหา genomic organization ของยีน SWDPm2 ของกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค PCR และนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์พบว่ายีนมีความยาว 1811 bp ประกอบด้วย 3 exon และ 2 intron และพบว่าทั้ง 3 ยีนมี boundary sequence ของ exon/intron ตาม GT/AG rule (รูปที่ 9)

```

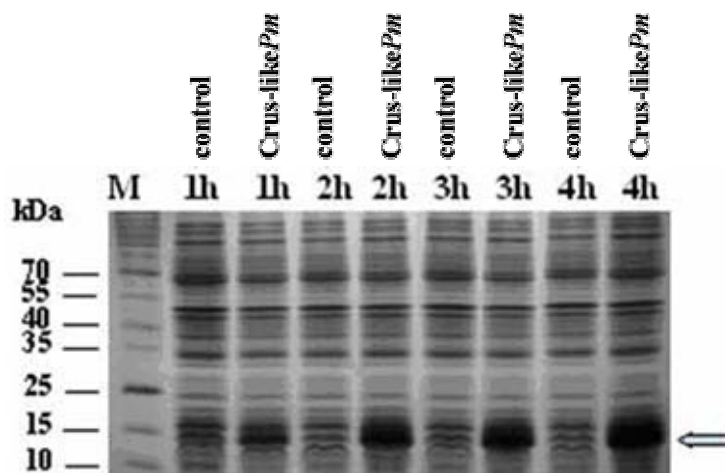
CACAGGATCTGATTCCAAAATGGTGAGCATCAAGGCAGTTCTGATCGTGTGCGTTTTGGTGCCCGCGG
      M V S I K A V L I V C V L V A A
TGGCTGTTTCTCCCGCCGATGCTGTTCCAAACGAGACACAGtaagtttttttttcttctctttagttta
V A V S P A D A V P T R H
agtgtcagttatataatgggtttcatctcagtcctgatcatgatatcgccatgatatttcggaaattgtct
tctgttaaattcactgtttgtcattgtgttataaaagggagagatagattgatagatagatagatagat
agatagagagagagagagggagagatagagtgaagagataaaataaattcatagatagacagacagacaga
tagatagatagatagatagatagatagatagatagagagagagagagagagagagagagagagagagag
agagatagagataaaagttatataatagattgggtggactgatagatagagagagagagagagagagagag
aaagtgagagaaaatagatagataaaatagacagataaaataaataatataatataatataatataatg
ccatcagtttaaattcatagtaaggagaatgcaaaagaaaaacatcacatcaaaaacttagttatgaa
caaaatactcgtacagcgtgaatcttctggatagagggtcatgaaacaaaccccttcttcttctgtttta
ttttttttattatgtcactttttgtctatcacattacctctaccacttttgctcctactactattgttt
gctactactactactgctactaccactattatatttgtcactggtagaagcagtagtaatcatcatca
tcatcgccatcatcatcattatcatctccattatcatcaccaccaccactgtcatcatcattatcatca
tcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatctca
gtaggggccattgttttccattatcattatcatcttttttatagGTAAGCCCCGTCTCAGCCTCTGCCCA
      S K P R P Q P L P
GGCCAGGAACGTGCCCAGATACGAGCGGCATCATCACCACGTGCGAGGTGACAGAACGCAACTGTTTCT
R P G T C P D T S G I I T T C E V T E R N C F
CGGACAGCCAGTGGCGACCCGGCCAGAAGTGCTGTCCGCTAGGCTGCGGGAGAGACTGCCTGGCTGTGG
S D S Q C G P G Q K C C P L G C G R E C L A V
gtgagtcacaggtgttgatgctgtctgtttgacaaaaagaaaagaaaaaaagaaaagaaaagaaaagaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaataatataatataatataatata
atataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataatata
tttgactgaaaaaatatgcattattccctgggtttatattgttggtgtgacacagtatgttcgggaaggtagt
gttggtttattatggttggtgctgtttcgtttgactgtaaaaaatgtgcattacttctcgatatgtaaagtgt
tactacagtaagttctggaatgtgtactatatacgtagaacatttgtaaagggtatcaaatttgatctta
ctagcttgtcaccttgccaaggataatgagcacacgaatatcatagacgtaactgccacagtaaatatg
ccatctgcaaccataatgcaaccagaaacagtatctttctgtctgcaactccacatttatcagttata
gaagggatctatcataacctgatctatgttctattcccttggtcccaatcttccagGTCCTCCCTACGGAA
      G P P Y G
AAGGAAGGTGGTAAGAG
K G R W

```

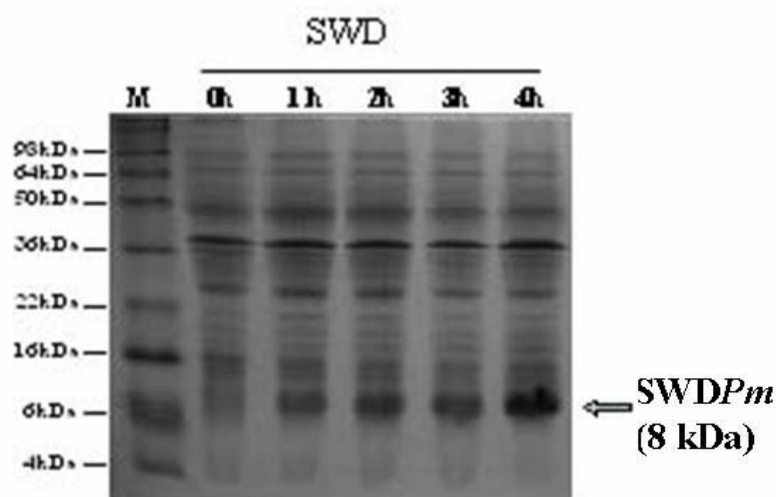
รูปที่ 9 แสดง genomic organization ของยีน SWDPm2 ส่วนของ exon แสดงด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ และ ส่วน intron แสดงด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กและเน้นข้อความ

7. การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm และ SWDPm

จากการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2 โดยใช้ pET28b expression vector เมื่อเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนโดยใช้ 1 mM IPTG และเก็บเซลล์ที่ได้ตั้งแต่ช่วงเวลา 1-4 ชั่วโมง และวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนใน 15% SDS-PAGE ผลพบว่ายีน Crus-likePm (รูปที่ 10) และ SWDPm2 (รูปที่ 11) สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมากที่สุดที่เวลา 4 ชั่วโมง และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13 kDa และ 8 kDa ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดตรงกับที่คาดไว้จากลำดับกรดอะมิโน



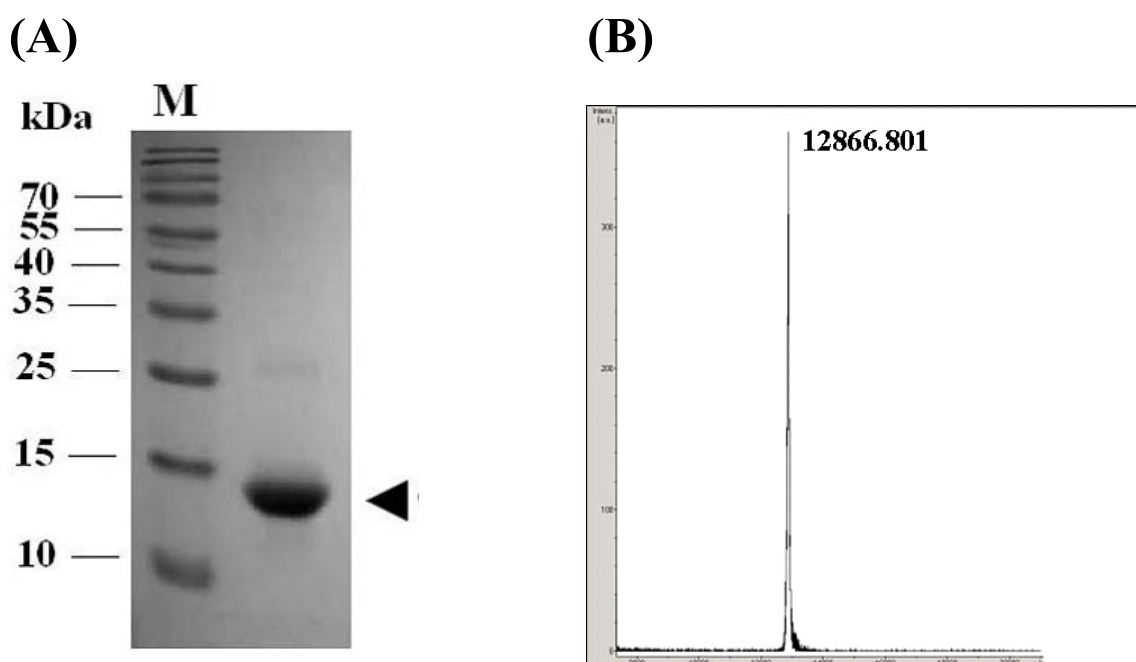
รูปที่ 10 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG ตั้งแต่ช่วงเวลา 1-4 ชั่วโมง ถูกสรแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm



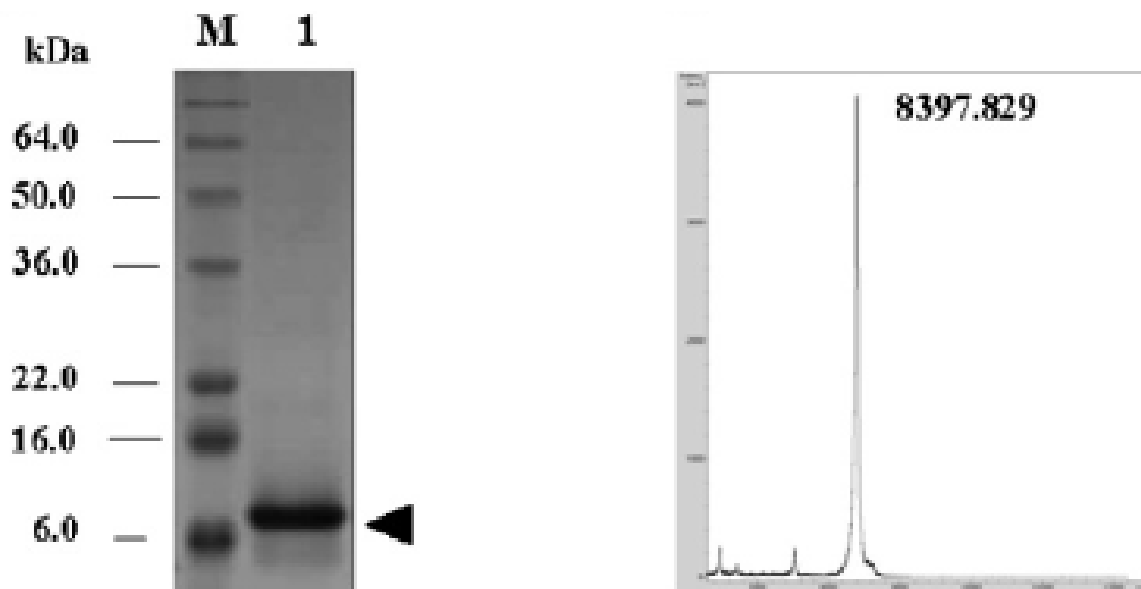
รูปที่ 11 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน SWDPm2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG ตั้งแต่ช่วงเวลา 1-4 ชั่วโมง ถูกสรแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน SWDPm2

8. การแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2

จากการแยกส่วนของ soluble fraction และ insoluble fraction หลังจากการทำให้เซลล์แตก ผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2 อยู่ในรูป inclusion bodies และจากการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column chromatography และวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2 ที่ขนาดประมาณ 13 kDa (รูปที่ 12A) และ 8 kDa (รูปที่ 13A) และเมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MASS Spectrometry เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล (MW) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน จากผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12.866 kDa (รูปที่ 12B) และ 8.397 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 13B)



รูปที่ 12 แสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm ที่แยกบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column chromatography และวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE (A) และน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MASS Spectrometry (B)



รูปที่ 13 แสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน SWDPm2 ที่แยกบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column chromatography และวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE (A) และน้ำหนักโมเลกุลรีคอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MASS Spectrometry (B)

9. การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2

จากการตรวจสอบ antimicrobial activity ของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Crus-likePm และ SWDPm2 ที่แยกบริสุทธิ์ และผ่านการ refolding แล้วกับเชื้อ gram-positive bacteria และ gram-negative-bacteria พบว่ารีคอมบิแนนท์เปปไทด์ Crus-likePm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ gram-positive bacteria (*Aerococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Bacillus megaterium* และ *Micrococcus luteus*) และ gram-negative bacteria (*Vibrio harveyi*, *Escherichia coli* 363 และ *Klebsiella pneumoniae*) โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.312-20 μM (ตารางที่ 2)

ในขณะที่รีคอมบิแนนท์เปปไทด์ SWDPm2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ gram-positive bacteria (*Aerococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Bacillus megaterium* และ *Micrococcus luteus*) โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.56-50 μM (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดง antimicrobial activity ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2

ค่า Minimum inhibition concentration (MIC) คือค่าที่รายงานช่วงความเข้มข้นสูงสุดของโปรตีนที่ยังมีการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการยับยั้ง 100%

Microorganism	MIC value (μM)	
	Crus-likePm	SWDPm2
Gram (+) bacteria		
<i>Aerococcus viridans</i>	0.312-0.625	0.3125-6.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	5-10	25-50
<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	2.5-5	>50
<i>Bacillus megterium</i>	1.25-2.5	12.5-25
<i>Micrococcus luteus</i>	2.5-5	1.56-3.125
Gram (-) bacteria		
<i>Salmonella thyphimurium</i>	NA ^a	NA ^b
<i>Escherichia coli</i> 363	2.5-5	NA ^b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10-20	NA ^b
<i>Erwinia carotovora</i>	NA ^a	NA ^b
<i>Enterobacter cloacae</i>	NA ^a	NA ^b
<i>Vibrio harveyi</i>	2.5-5	NA ^b

NA^a: Not active at 80 μM

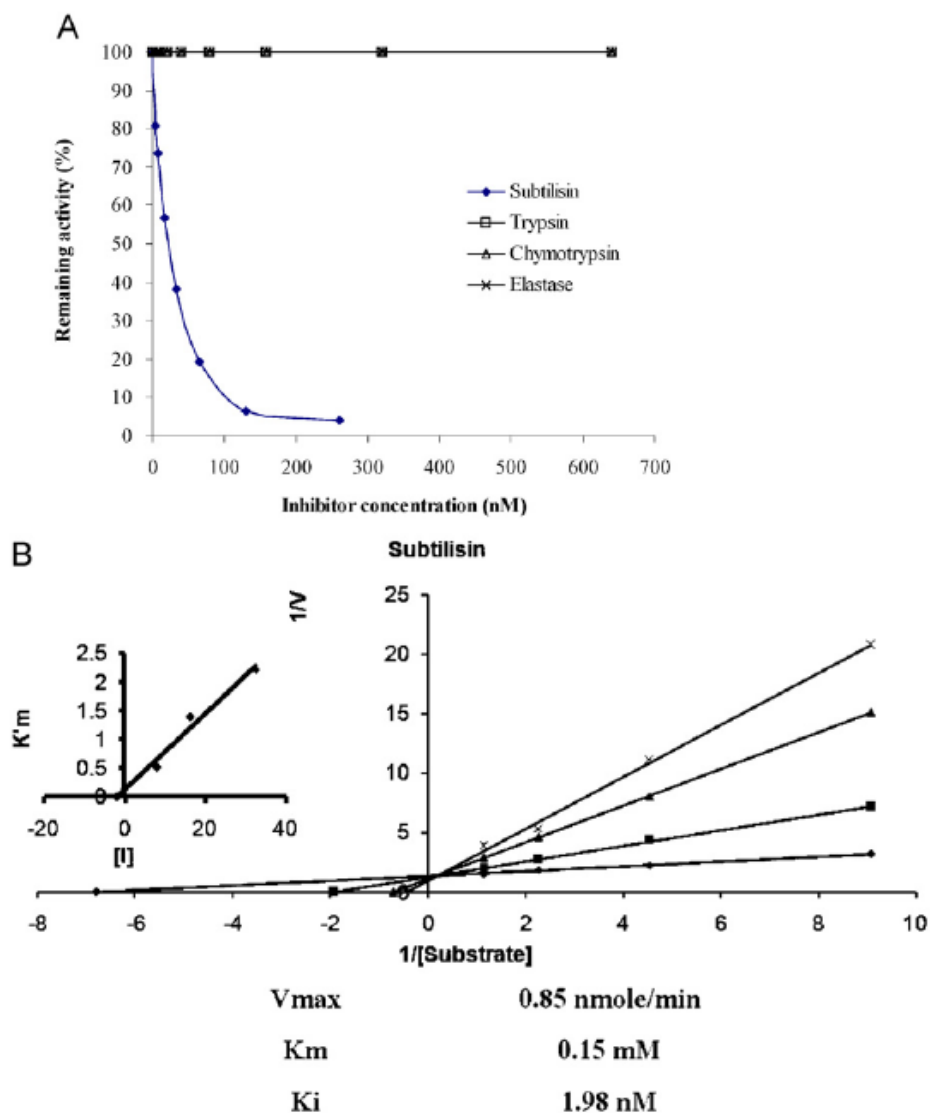
NA^b: Not active at 50 μM

10. การทดสอบสมบัติการยับยั้งโปรตีนเนสของโปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2

จากการศึกษาคุณสมบัติของ Proteinase inhibitor activity ของโปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2 กับ proteinase จำนวน 4 ชนิด ประกอบด้วย trypsin, chymotrypsin, elastase, proteinase K และ subtilisin A ผลเบื้องต้นพบว่าโปรตีน Crus-likePm ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง proteinase ทั้ง 5 ชนิด เมื่อใช้ปริมาณของ Crus-likePm มากถึง 10 เท่าต่อปริมาณ proteinase ในขณะที่โปรตีน SWDPm2 ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง proteinase 3 ชนิด (trypsin, chymotrypsin และ elastase) เมื่อใช้ปริมาณของ SWDPm2 มากถึง 10 เท่าต่อปริมาณ proteinase อย่างไรก็ตามพบว่า SWDPm2 มีคุณสมบัติในการยับยั้ง proteinase K และ subtilisin A (รูป 14A)

9. การกำหนดค่า inhibition constant ของโปรตีน SWD*Pm*2 ต่อโปรตีนเนส Subtilisin

จากการหาค่า Equilibrium dissociation constant K_i สำหรับการเกิด interaction ของ subtilisin A (Proteinase) กับโปรตีน SWD*Pm*2 (Proteinase inhibitor) โดยการเพิ่มปริมาณของ substrate ต่อ equilibrium mixture ระหว่าง Proteinase และ inhibitor และทำการวัดอัตราการปลดปล่อยของ reaction product จากผลการทดลอง Lineweaver–Burk plots แสดงดังรูปที่ 14B ผลจากการหาค่า K_M และค่า V_{max} พบว่ามีค่าเท่ากับ $0.15 \times 10^{-3} M$ และ 0.85 nmole/min ตามลำดับ และเมื่อทำการ replotting ค่า apparent K_M 's ต่อค่าความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (inhibitor concentrations) พบว่าโปรตีน SWD*Pm*2 (Proteinase inhibitor) มีค่า K_i เป็น $1.98 \times 10^{-9} M$



รูปที่ 14 (A) แสดง inhibitory activity ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rSWD*Pm*2 ต่อโปรตีนเนส subtilisin A และ serine proteinases อีก 3 ชนิด (trypsin, chymotrypsin และ elastase) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (B) แสดง Lineweaver–Burk plot ของโปรตีนเนส subtilisin A activity ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ rSWD*Pm*2 (0, 8.125, 16.25 และ 32.5 nM)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการค้นหาและศึกษาลักษณะสมบัติของยีนกลุ่มที่มี WAP domain ประกอบด้วย Crustin-like antimicrobial peptide (*Crus-likePm*) และ ยีน Single whey acidic protein domain antimicrobial peptide (*SWDPm*) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของยีน *Crus-likePm* โดยเทคนิค RACE-PCR พบยีนมีความยาวทั้งหมด 541 bp และมีน้ำหนักรหัสโมเลกุลของ mature protein ขนาด 12.49 kDa เมื่อวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของยีนพบว่า *Crus-likePm* ประกอบด้วย Glycine-rich domain ที่ปลาย *N* และ 12 conserved cysteines ที่รวม WAP domain ที่ปลาย *C* ซึ่งมีความคล้ายกับยีน Crustins อย่างไรก็ตามผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนและการสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่ายีน *Crus-likePm* เป็นยีน Crustins ใหม่ที่พบในกุ้ง

เมื่อทำการค้นหายีน *SWDPm* จากฐานข้อมูลกุ้งกุลาดำพบยีน *SWDPm* จำนวน 3 isoforms (*SWDPm1*, *SWDPm2* และ *SWDPm3*) โดยมี ORF ที่สมบูรณ์ 279, 282 และ 240 bp และมีน้ำหนักรหัสโมเลกุลของ mature protein ขนาด 7.29, 7.38 และ 6.23 kDa จากการวิเคราะห์โดเมนของยีนพบว่า *SWDPm1* และ *SWDPm2* มี Pro-Arg-Pro domain ที่ปลาย *N* และ *SWDPm1*, *SWDPm2* และ *SWDPm3* มี WAP domain ที่ปลาย *C* เมื่อทำการสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการพบว่ายีน *SWDPm1* และ *SWDPm2* มีความใกล้ชิดกับยีน SWD ที่พบในกุ้ง และ *SWDPm3* มีความใกล้ชิดกับ SLPI จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน *SWDPm2* และ *SWDPm3* เป็นยีน SWD ชนิดใหม่ที่พบในกุ้ง

จากรายงานการศึกษาของ Smith และคณะ 2008 ได้จัดยีน crustin ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) Type I crustin พบได้ในปู (Crab) กุ้งมังกร (Lobster) และ กุ้ง Crayfish โดยโปรตีนประกอบด้วย cysteine-rich region (4 cysteines) และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย *C-terminus*; (2) Type II crustin พบได้ในกุ้ง Shrimp และ กุ้ง Crayfish โดยโปรตีนประกอบด้วย Glycine-rich region ที่ปลาย *N-terminus* และ Cysteine-rich region (4 cysteines) และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย *C-terminus* และ (3) Type III crustin (หรือ SWD) พบได้ในกุ้ง Shrimp โดยโปรตีนประกอบด้วย Proline-rich region ที่ปลาย *N-terminus* และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย *C-terminus*

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีนในกลุ่มของ Type II crustin (crustin ในกุ้ง รวม *Crus-likePm*) และ Type III crustin (SWD) ประกอบด้วยยีนที่เป็น subtype ของแต่ละชนิด โดยแต่ละ subtype อาจจะมีหน้าที่สำคัญทางชีวภาพที่แตกต่างกัน

จากการค้นหาลำดับการจัดเรียงตัวของยีน *Crus-likePm* และ *SWDPm2* พบว่ายีน *Crus-likePm* ประกอบด้วย 2 exon และ 1 intron และยีน *SWDPm2* ประกอบด้วย 3 exon และ 2 intron และเมื่อทำการค้นหาลำดับบริเวณควบคุมของยีน *Crus-likePm* พบโปรโมเตอร์และ putative transcription factor ที่สำคัญเช่น NF- κ B-binding sites, STAT5-binding sites และ C/EBP-binding sites เมื่อทำการ

เปรียบเทียบโครงสร้างการจัดเรียงตัวของ Crus-likePm (Type II crustin) และ SWDPm2 (Type III crustin) กับยีนในกลุ่ม Crustin (Type I crustin) ในปูทะเล *Scylla paramamosain* พบว่าประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron (Imjongjirak et al., 2008) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน Crustin แต่ละ type มีลักษณะการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างกันและอาจมีการควบคุมการทำงานที่แตกต่างกัน

การศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ พบยีน Crus-likePm และ SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3) มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด ผลจากการทดลองนี้ สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน CrustinPm1 ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Supungul et al., 2004) และยีน Crustin-like protein ของ กุ้งจีน *F. chinensis* (Zhang et al., 2007) และยีน SWD ของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Jimenez-Vega et al., 2004) ซึ่งพบว่าการแสดงออกในเม็ดเลือด จากผลแสดงว่าเม็ดเลือดอาจเป็นแหล่งสร้าง mRNA ของยีน Crus-likePm และ SWDPm ในเม็ดเลือดของสิ่งมีชีวิตจำพวกกุ้งและครัสตาเซียน พบว่าจะเป็นแหล่งสร้างและเก็บโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Bachère, 2000)

การตรวจสอบหน้าของยีน Crus-likePm และ SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3) ต่อการตอบสนองการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำโดยการฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส ผลจากการใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจการแสดงออกของยีน Crus-likePm ในเม็ดเลือดของกุ้งที่กระตุ้นด้วยเชื้อเป็นของแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ *Vibrio harveyi* พบว่าการแสดงออกของยีนมากขึ้นที่ 24 ชั่วโมงหลังกระตุ้นด้วยเชื้อโรค จากผลแสดงว่ายีน Crus-likePm เป็น inducible gene ที่สามารถตอบสนองการติดเชื้อโรค ลักษณะการตอบสนองนี้คล้ายกับยีน penaeidin 5 ของกุ้งจีน *F. chinensis* หลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อ (Kang et al., 2007) อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีน crustin-I ของกุ้งขาว *L. vannamei* (Vargas-Albores et al., 2004) และ crustin-like peptides ของกุ้งมังกร *Homarus gammarus* (Hauton et al., 2006) ที่กระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Listonella anguillarum* พบว่ายีนมีการแสดงออกลดลงและมีการแสดงออกมากขึ้นหลังกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Aerococcus viridans* var. *homari* ในขณะที่กุ้ง crayfish *Pacifastacus leniusculus* พบว่ายีน CrustinP11 และ CrustinP13 มีการแสดงออกมากขึ้นในเม็ดเลือดหลังกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่ยีน crustinP12 มีการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลงจากระดับปกติ (Jiravanichpaisal et al., 2007)

เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของกลุ่มยีน SWDPm (SWDPm1, SWDPm2 และ SWDPm3) โดยการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และเชื้อไวรัส WSSV ที่ก่อโรคในกุ้ง ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ผลพบว่ายีน SWDPm1 มีการแสดงออกลดลงที่ 6 ชั่วโมงหลังกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ในขณะที่ยีน SWDPm2 และ SWDPm3 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีน SWD

ของกุ้งขาว *L. vannamei* โดยการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Vibrio alginolyticus* พบว่ายีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 3-6 ชั่วโมงหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ (Jimenez-Vega et al., 2004)

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ และจากรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Crustin และ SWD ต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อหลายชนิด สรุปได้ว่าการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้ต่อการตอบสนองของเชื้อแบคทีเรีย มีความแตกต่างกันไม่มีรูปแบบที่คงที่ ขึ้นอยู่กับยีนในแต่ละสิ่งมีชีวิตที่อาจจะมีหน้าที่ปกป้องต่อการติดเชื้อที่ทำให้เกิดโรคแตกต่างกัน โดยแต่ละยีน Crustin อาจมีหน้าที่ทางชีวภาพที่แตกต่างกันในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตพวกครัสเตเชียน

จากการศึกษาการตอบสนองของยีน SWDPm ต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัส WSSV พบว่ายีน SWDPm1 และ SWDPm2 มีการแสดงออกมากขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และมีการแสดงออกลดลงทั้ง 3 ยีนที่ 24 ชั่วโมง และเข้าสู่สภาวะปกติที่ 48 ชั่วโมง จากผลแสดงว่ายีน SWDPm1 และ SWDPm2 เป็นยีนที่สำคัญต่อการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส WSSV การแสดงออกนี้มีความคล้ายกับรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีน SLPI-like protein (หรือ double-WAP domain) ของกุ้งญี่ปุ่น *kuruma Marsupenaeus japonicus* ที่พบว่าการแสดงออกของยีนมากขึ้นหลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัส WSSV (Chen et al., 2008) จากผลสามารถสรุปได้ว่าความแตกต่างของการแสดงออกต่อการตอบสนองของเชื้อโรค แสดงให้เห็นว่าแต่ละยีน SWDPm มีความสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของโปรตีน Crus-likePm และ SWDPm2 (เป็นยีน SWDPm ที่พบมากที่สุด จำนวน 32 EST จาก 50 EST) โดยการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์ และนำมาทดสอบสมบัติทางชีวภาพคือสมบัติการต้านจุลชีพ (antimicrobial activity) และ สมบัติการยับยั้งโปรตีนเนส (proteinase inhibitor) ผลจากการทดลองพบว่า โปรตีน Crus-likePm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ในขณะที่โปรตีน SWDPm2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน Crus-likePm และ SWDPm2 เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

จากรายงานการศึกษาสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน Crustin (หรือ Carcinin) ที่แยกบริสุทธิ์จากปู *Carcinus maenas* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Relf et al., 1999) ต่อมา Imjongjirak (2008) ได้ศึกษาโปรตีนรีคอมบิแนนท์ CrusSp ของปูทะเล *Scylla paramamosain* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Imjongjirak et al., 2008) ส่วนการศึกษา Crustin ในกุ้งพบว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์ crustinPm1 ของกุ้งกุลาดำ มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Supungul et al., 2008) ในขณะที่โปรตีนรีคอมบิแนนท์ Crustin-like Fc ของกุ้งจีน *Fenneropenaeus chinensis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Zhang et