

Abstract

Project Code : DBG5180011
Project Title : Functional analysis of prophenoloxidase-activating factors from black tiger shrimp *Penaeus monodon*
Investigator : Dr. Piti Amparyup
E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th
Project Period : 1 May 2008 – 30 April 2010

Prophenoloxidase (proPO) system is one of the major invertebrate immune responses against invading foreign microorganisms. The activation of proPO to active PO mediated by a cascade of clip domain serine proteinases (clip-SPs). In this study, the full-length cDNAs of a novel proPO gene (*PmproPO2*), three clip-SPs (*PmPPAE1*, *PmClipSP1* and *PmClipSP2*) and three clip-SPHs (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* and *PmMasSPH3*) were characterized from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Tissue distribution analyses revealed that these genes are primarily expressed in the hemocyte. RNA interference-mediated suppression of two proPO genes (*PmproPO1* and *PmproPO2*) and two clip-SPs (*PmPPAE1* and *PmClipSP1*) was performed to investigate the involvement in the proPO system. Injection of double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to each gene into the shrimp resulted in a specific reduction of each transcript and a significant decrease of PO activity (36 to 75%), except for a *PmClipSP1*. Moreover, the silencing of each gene significantly increased mortality in *Vibrio harveyi* infection which was accompanied by the increase of the number of bacteria in hemolymph. To further characterize the function of the *PmMasSPH1* protein (the N-terminal region and the C-terminal domain) were separately expressed in *Escherichia coli*. N-terminal region exhibited *in vitro* antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. The C-terminal domain mediates hemocyte adhesion and displays binding activity to the *V. harveyi* and lipopolysaccharide. The results indicated that two proPO genes (*PmproPO1* and *PmproPO2*) and a clip-SP (*PmPPAE1*) function in the proPO system and are important molecules in shrimp immune system. Moreover, the *PmMasSPH1* protein is a multifunctional immune molecule in shrimp defense.

Keywords : *Penaeus monodon*, prophenoloxidase activating factor

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG5180011
ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนฟีนอลออกซิเดสแอกติเวติงแฟกเตอร์ในกุ้ง
กุลาคำ
Investigator : ดร. ปิติ อัมพาศัย
E-mail Address : piti.amp@biotec.or.th
ระยะเวลาโครงการ : 1 พฤษภาคม 2551 – 30 เมษายน 2553

ระบบโพรฟีนอลออกซิเดสเป็นระบบภูมิคุ้มกันหลักที่สำคัญระบบหนึ่งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยการกระตุ้นเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดสให้เป็นฟีนอลออกซิเดสที่สามารถทำงานได้โดยกลุ่มของเอนไซม์ clip domain serine proteinase (clip-SP) ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกและศึกษาลักษณะสมบัติลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของยีน โพรฟีนอลออกซิเดสชนิดใหม่ชื่อ *PmproPO2* ยีน clip-SP จำนวน 3 ยีน (*PmPPAE1*, *PmClipSP1* และ *PmClipSP2*) และยีน clip-SPH จำนวน 3 ยีน (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3*) จากกุ้งกุลาคำ เมื่อศึกษาการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ พบว่ายีนทั้งหมดมีการแสดงออกมากในเม็ดเลือดและได้ยับยั้งการแสดงออกของยีนโพรฟีนอลออกซิเดสจำนวน 2 ยีน (*PmproPO1* และ *PmproPO2*) และยีน clip-SP จำนวน 2 ยีน (*PmPPAE1* และ *PmClipSP1*) โดยใช้เทคนิค RNA interference เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดส เมื่อฉีด dsRNA ของแต่ละยีนเข้าสู่ตัวกุ้ง ผลพบว่ามีผลเฉพาะในการลดการแสดงออกของแต่ละยีน และลดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสได้อย่างมีนัยสำคัญ (36 - 75%) ยกเว้นยีน *PmClipSP1* นอกจากนั้นเมื่อลดการแสดงออกของแต่ละยีนพบว่ากุ้งมีอัตราการตายมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อในเลือด เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *PmMasSPH1* ได้แยกยีนเป็นสองส่วนคือด้านปลาย N และปลาย C เพื่อแสดงออกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน *Escherichia coli* ผลพบว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์ปลาย N มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในหลอดทดลองได้ และปลาย C มีคุณสมบัติ hemocyte adhesion และสามารถจับได้กับ *V. harveyi* และ lipopolysaccharide ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่ายีนโพรฟีนอลออกซิเดส (*PmproPO1* และ *PmproPO2*) และยีน clip-SP (*PmPPAE1*) มีหน้าที่ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และเป็นโมเลกุลที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง นอกจากนั้นโปรตีน *PmMasSPH1* เป็นโมเลกุลที่มีหน้าที่หลากหลายในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

คำหลัก : กุ้งกุลาคำ, โพรฟีนอลออกซิเดส แอกติเวติงแฟกเตอร์