



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนฟีโนลออกซิเดสแอกติเวติงแฟคเตอร์ในกุ้งกุลาดำ

โดย  
ดร. ปิติ อ่ำพ่ายพ

เมษายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนฟีโนลออกซิเดสแอกติเวติงแฟคเตอร์ในกุ้งกุลาดำ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. ปิติ อ่ำพ่าย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## 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](mailto: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](mailto: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* นอกจากนี้เมื่อลดการแสดงออกของแต่ละยีนพบว่ากุ้งมีอัตราการตายมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ *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 นอกจากนี้โปรตีน *PmMasSPH1* เป็นโมเลกุลที่มีหน้าที่หลากหลายในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

คำหลัก : กุ้งกุลาคำ, โพรฟีนอลออกซิเดส แอกติเวติงแฟกเตอร์

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททุนวิจัยแบบมุ่งเป้า “การเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำเศรษฐกิจ” ในโครงการวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนฟีนอลออกซิเดสแอกติเวติงแฟคเตอร์ในกุ้งกุลาดำ” จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2551 ตามสัญญาเลขที่ DBG5180011 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ. ดร. อัญชลี ทัศนากจร หัวหน้าศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและอีโนมิกส์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิตและนักวิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## Executive summary

### ชื่อโครงการ

- (ภาษาไทย) การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนฟีนอลออกซิเดสแอคติเวติงแฟกเตอร์ในกุ้งกุลาดำ
- (ภาษาอังกฤษ) Functional analysis of prophenoloxidase-activating factors from black tiger shrimp *Penaeus monodon*

### ชื่อหัวหน้าโครงการ

- (ไทย) ดร. ปิติ อัมพารยัพ (อังกฤษ) Dr. Piti Amparyup
- (ตำแหน่ง) นักวิจัย 2 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- ที่ทำงาน ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและอีโนมิกส์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
- โทรศัพท์ 02-2185414 โทรสาร 02-2185414
- โทรศัพท์มือถือ 0847590907
- อีเมล: [piti.amp@biotec.or.th](mailto:piti.amp@biotec.or.th) : [amparyup@yahoo.com](mailto:amparyup@yahoo.com)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะค้นหาและทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ prophenoloxidase (proPO) ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญระบบหนึ่งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยสนใจศึกษายีน 2 กลุ่ม คือ ยีนในกลุ่มของ proPO-activating factors (PPAFs) และ proPOs ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในระบบ proPO จากการค้นหาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของยีนกลุ่ม PPAF พบว่ามี 6 ยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องได้แก่ *PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3* ทั้ง 6 ยีนมี clip domain อยู่ที่ปลาย N และมี serine proteinase domain (*PmPPAE1*, *PmClipSP1* และ *PmClipSP2*) หรือ serine proteinase homologue domain (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3*) อยู่ที่ปลาย C ซึ่งเป็นลักษณะของยีน PPAF ที่พบได้ทั้งในแมลงและกุ้ง crayfish เมื่อตรวจสอบการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่าง ๆ พบว่า ทั้ง 6 ยีนมีการแสดงออกมากในเซลล์เม็ดเลือด และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่ายีน *PmPPAE1* และ *PmMasSPH1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมง และยีน *PmClipSP1*, *PmClipSP2* และ *PmMasSPH2* มีการแสดงออกน้อยลงที่ 6-48 ชั่วโมง ในขณะที่การแสดงออกของยีน *PmMasSPH3* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ขณะที่ยีนกลุ่ม proPO พบ 2 ยีน คือ proPOPm1 ซึ่งเป็นยีนที่มีรายงานแล้ว และยีน proPOPm2 ซึ่งเป็นยีน proPO ชนิดใหม่ที่พบในกุ้งกุลาดำ จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า ทั้งสองยีนมีความเหมือนกันประมาณ 80% และมี ORF, MW และ pI ที่แตกต่างกัน ทั้งสองยีนมีการแสดงออกเฉพาะในเม็ดเลือด

เมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* ต่อระบบ proPO ในกิ้งกูดดำโดยใช้เทคนิค RNA interference จากการทดลองพบว่า dsRNA สามารถลดการแสดงออกของยีนทั้งสามได้ และ dsRNA ของแต่ละยีนมีความจำเพาะต่อยีนนั้น ๆ กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmproPO1* หรือ *PmproPO2* หรือ *PmPPAE1* มี PO activity ลดลง 75%, 73% หรือ 36.7% ตามลำดับ สรุปได้ว่า ทั้งสามยีนเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO นอกจากนั้นเมื่อทำ co-silencing ด้วย dsRNA ของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* พร้อมกัน พบว่า สามารถลด PO activity ได้ถึง 88% ซึ่งแสดงว่า proPO ทั้งสองอาจจะมีการทำงานร่วมกันในระบบ proPO ของกิ้งกูดดำ เมื่อทำการทดสอบความสำคัญของ *PmproPO1*, *PmproPO2* และ *PmPPAE1* ต่อความอยู่รอดของกุ้งเมื่อถูกกระตุ้นด้วย *V. harveyi* 639 พบว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* หรือ *PmproPO2* หรือ *PmPPAE1* ทำให้กุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงถึง 100% ภายในวันที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายประมาณ 50-60% และยังพบว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* พร้อมกัน และ *PmPPAE1* ตรวจพบว่ามียาจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 6 และ 4 เท่า ตามลำดับ

นอกจากนั้นจากการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน *PmMasSPH1* โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ทางด้านปลาย N ประกอบด้วย glycine-rich repeats และ clip domain (Gly-Clip domain) และทางด้านปลาย C ประกอบด้วย serine proteinase domain (SP domain) และศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพ พบว่าส่วนทางด้านปลาย N ประกอบด้วย Gly-Clip domain มีฤทธิ์ antimicrobial activity ในขณะที่ทางด้านปลาย C คือ SP domain ซึ่งไม่มี proteinase activity แต่มีหน้าที่ทางชีวภาพ ได้แก่ cell adhesion activity, bacterial binding activity และ bacterial clearance

ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการศึกษายีนในกลุ่ม PPAF และ proPO พบว่ายีน *PmproPO1*, *PmproPO2* และ *PmPPAE1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญของกิ้งกูดดำ และยีน *PmMasSPH1* เป็นยีนที่มีความสำคัญในจับและยับยั้งเชื้อในระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดดำ

## 1. รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ระบบภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียน เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีมาแต่กำเนิดเรียกว่า innate immunity ประกอบด้วย humoral และ cellular responses โดยระบบภูมิคุ้มกันหลักจะอยู่ในส่วนของเลือด เช่น การกลืนทำลาย การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม การแข็งตัวของเลือด การสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ และการเกิดกระบวนการ melanization โดยการกระตุ้นของระบบ prophenoloxidase (proPO) เป็นต้น ระบบ proPO เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญระบบหนึ่งในสัตว์ไม่

มีกระดุกสันหลัง กระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยเอนไซม์ Phenoloxidase (PO) ซึ่งสามารถเปลี่ยนสารประกอบ phenol ให้เป็น o-quinones ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญต่อกระบวนการเกิด cuticle sclerotization และ melanin synthesis โดย o-quinones สามารถต่อต้านเชื้อรา (anti-fungal function) และต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial function) ในขณะที่ melanin เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผล และปฏิกิริยา encapsulation ระบบ proPO สามารถถูกกระตุ้นจากส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย และเชื้อรา เช่น lipopolysaccharides (LPS) และ peptidoglycans (PG) จากแบคทีเรีย และ  $\beta$ -1,3-glucans จากเชื้อรา สามารถกระตุ้นระบบ proPO โดยมีโปรตีน Pattern Recognition Proteins (PRPs) มาจับกับส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย และเชื้อรา และกระตุ้นการทำงานของ serine proteinase (SP) cascade โดย SP ที่อยู่ในระบบ proPO สามารถเรียกว่า proPO-activating factors (PPAFs) ส่วน SP ตัวสุดท้ายที่ชื่อว่า proPO-activating enzyme (PPAE) จะทำหน้าที่เปลี่ยน proPO (inactive form) ให้เป็น PO (active form)

ปัจจุบันได้มีรายงานการพบโปรตีน PPAF ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ proPO ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น beetle, *Holotrichia diomphalia* (Lee และคณะ 1998, Known และคณะ 2000), tobacco horn worm, *Manduca sexta* (Jiang และคณะ 1998, 2003), หนอน silkworm, *Bombyx mori* (Satoh และคณะ 1999), crustacean *Pacifastacus leniusculus* (Aspán และ Söderhäll, 1991; Wang และคณะ 2001) ลักษณะของ primary structure ของยีน PPAF จะประกอบด้วย 2 domain ที่สำคัญคือมี serine proteinase domain อยู่ที่ปลาย C ซึ่งจะทำให้มีหน้าที่เป็นเอนไซม์ serine proteinase และมี clip-domain อยู่ที่ปลาย N ซึ่งอาจจะมีส่วนช่วยในการเกิด protein-protein interaction นอกจากนี้มีรายงานว่า clip-domain มีความสามารถยับยั้งจุลชีพชนิดแกรมบวกได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการพบยีน PPAF ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ proPO ในกิ้ง จากการศึกษาจีโนมกิ้งกูดดำโดย ศ.ดร. อัญชลี ทศนาขจร และคณะ ได้ทำการสร้างห้องสมุด EST ในเนื้อเยื่อหลายชนิดที่มีความสำคัญต่อกิ้งกูดดำและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 40,000 โคลน พบยีนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการ proPO จำนวนมากเช่นยีน PPAF, masquerade-like serine proteinase homologue และ proPO เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน PPAF และ proPO มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยจะทำให้เราเข้าใจถึงกระบวนการควบคุมระบบ proPO ซึ่งจะนำไปสู่การควบคุมหรือป้องกันการเกิดโรคระบาดในกิ้งกูดดำให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการค้นหายีน PPAF และ proPO เพิ่มเติมและการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน ในเชิงลึกจะทำให้เราเข้าใจกลไกและหน้าที่ของโปรตีนนี้มากยิ่งขึ้น โดยผู้วิจัยสนใจศึกษาหน้าที่ของยีนทั้งระดับ *in vitro* และ *in vivo* โดยใช้เทคนิค RNA interference และตรวจสอบผลกระทบของการ knockdown ของยีนต่อ phenoloxidase activity และ mortality ต่อตัวกิ้ง และใช้เทคนิค recombinant protein expression มาผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เพื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนให้มากยิ่งขึ้น โดยข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะทำให้สามารถเข้าใจ

กระบวนการ และหน้าที่ของยีน PPAF ต่อความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ที่มีต่อกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคของกุ้งกุลาดำได้มากยิ่งขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PPAF และ proPO ในกุ้งกุลาดำ
- 1.2.2 ศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi*
- 1.2.3 ศึกษาหน้าที่ของยีน PPAF และ proPO ด้วยเทคนิค RNA interference
- 1.2.4 สร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน แยกบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติทางชีวภาพ

## 1.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 1.3.1 การค้นหายีน PPAF และ proPO ในกุ้งกุลาดำ

#### 1.3.1.1 การค้นหายีนจากฐานข้อมูลจีโนมกุ้งกุลาดำ

ทำการสืบค้นฐานข้อมูล EST ของกุ้งกุลาดำ ([www.pmonodon.biotech.or.th](http://www.pmonodon.biotech.or.th)) เพื่อค้นหายีน PPAF และ proPO และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหา open reading frame (ORF) โดยใช้โปรแกรม Genetyx และออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำ RACE-PCR

#### 1.3.1.2 การค้นหายีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ degenerate

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน PPAF ในแมลงและ crayfish ที่มีรายงานไว้ใน GenBank เพื่อหาบริเวณ conserve sequence ของยีน PPAF และทำการออกแบบไพรเมอร์ degenerate เพื่อนำมาเพิ่มจำนวนยีนใน cDNA ที่เตรียมจากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่คาดหวังไว้ จึงทำการโคลนชั้นยีนเพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม blastx คัดเลือกโคลนที่คล้ายกับ PPAF มาออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์โดย RACE-PCR

#### 1.3.1.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (full-length cDNA) โดยวิธี RACE-PCR

นำ mRNA ปริมาณ 2 µg ที่แยกได้จากเม็ดเลือด มาสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) นำ cDNA ที่ได้มาทำ 5' RACE-PCR และ 3' RACE-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน PPAF และ proPO และโคลนชั้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าเวกเตอร์ pGEM®-T easy หลังจากที่ได้แต่ละโคลนรีคอมบิแนนท์แล้ว นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 1.3.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน

#### 1.3.2.1 การสกัด total RNA และ mRNA จากเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ

นำตัวอย่างกิ่งกลาดำมาคลึงและแยกเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกิ่ง และสกัด total RNA โดยใช้ Trizol Reagent ทำลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่โดยใช้เอนไซม์ RNase-free DNaseI (Promega, USA) และแยก mRNA โดยใช้ QuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ mRNA ด้วยเทคนิค spectrophotometer และ agarose gel electrophoresis

#### 1.3.2.2 การสังเคราะห์ first-strand cDNA

นำ total RNA ที่ได้มาใช้ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation Medison, Wisconsin, USA) ซึ่งประกอบด้วย 2 µg total RNA, ไพรเมอร์ oligo(dT) และเอนไซม์ reverse transcriptase บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ first-strand cDNA ด้วยเทคนิค spectrophotometer และ agarose gel electrophoresis

#### 1.3.2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

สร้าง first-strand cDNA และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis วัดปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) ค่าการแสดงออกวัดเป็น relative expression เทียบกับยีน EF-1α ที่ปรับค่า (normalized) ให้เป็น 100 คำนวณนัยสำคัญของการเปลี่ยนแปลงค่าการแสดงออกของยีนด้วย One Way Analysis of Variance (ANOVA) และ post hoc test (Duncan's new multiple range test)

### 1.3.3 ศึกษาหน้าที่ของยีน PPAF และ proPO ด้วยเทคนิค RNA interference

#### 1.3.3.1 การเตรียม PCR products

ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเตรียม double-stranded RNA (dsRNA) โดยในการทดลองนี้เราได้เลือกยีน prophenoloxidase ทั้งสองยีน (*PmproPO1* และ *PmproPO2*) และยีน PPAF (*PmPPAE1* และ *PmClipSP1*) มาศึกษาหน้าที่ของยีนโดยใช้เทคนิค RNAi ขั้นตอนแรกทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละยีน เพื่อนำมาสร้าง single-stranded RNA (ssRNA) ทั้ง 2 สาย คือ สาย sense RNA และ antisense RNA โดยไพรเมอร์แต่ละคู่จะมีไพรเมอร์สายหนึ่งที่ปลาย 5' มีส่วนของลำดับเบส T7 promoter ในการสร้าง dsRNA ของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* จะใช้ไพรเมอร์ PO1i-T7-F และ PO1i-R หรือ PO2i-T7-F และ PO2i-R (ตารางที่ 1) เพื่อสร้างสาย sense RNA และใช้ไพรเมอร์ PO1i-F และ PO1i-T7-R หรือ PO2i-F และ PO2i-T7-R เพื่อสร้างสาย antisense RNA ตามลำดับ ในขณะที่ยีน *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* ใช้ไพรเมอร์ *PmPPAE1i-T7-F* และ *PmPPAE1i-R* หรือ *PmClipSP1i-T7-F* และ *PmClipSP1i-R* เพื่อสร้างสาย sense RNA และใช้ไพรเมอร์ *PmPPAE1i-F* และ *PPAE1i-T7-R* หรือ *PmClipSP1i-F* และ *PmClipSP1i-T7-R* เพื่อสร้าง

สาย antisense RNA ในการทดลองครั้งนี้เราใช้ dsRNA GFP (Green Fluorescent Protein) เป็นตัวควบคุม สร้างโดยใช้ไพรเมอร์ GFPiT7-F และ GFPi-R เพื่อสร้างสาย sense RNA และใช้ไพรเมอร์ GFPi-F และ GFPiT7-R เพื่อสร้างสาย antisense RNA และนำไพรเมอร์ที่กล่าวข้างต้นมาเพิ่มปริมาณขึ้นด้วยเทคนิค PCR นำ PCR product ที่ได้มาแยกบริสุทธิ์ออกจาก agarose gel และวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และ spectrophotometry

**ตารางที่ 1** ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

| ไพรเมอร์               | ลำดับนิวคลีโอไทด์                                     |
|------------------------|-------------------------------------------------------|
| PO1iT7-F               | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCACCCTGAGAGCTCCCACTT 3'    |
| PO1i-R                 | 5'GAGATCTGCAGTGTAACGT3'                               |
| PO2iT7-F               | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTCTTCCTCGGCCGCTCCT 3'    |
| PO2i-R                 | 5'CCACGGGGATACCGCTGCCA3'                              |
| PO1i-F                 | 5'CACCCTGAGAGCTCCCACTT3'                              |
| PO1iT7-R               | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCTGCAGTGTAACGT 3'    |
| PO2i-F                 | 5'CGTCTTCCTCGGCCGCTCCT3'                              |
| PO2iT7-R               | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCACGGGGATACCGCTGCCA3'     |
| <i>PmPPAE1i</i> T7-F   | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTCTGCTTCATTGAGGGAGTG3'   |
| <i>PmPPAE1</i> -R      | 5'GTAGTAGATGGTGCCCCAGCCT3'                            |
| <i>PmPPAE1</i> -F      | 5'CGTCTGCTTCATTGAGGGAGTG3'                            |
| PPAE1iT7-R             | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTAGTAGATGGTGCCCCAGCCT3'   |
| <i>PmClipSP1</i> -F    | 5' CGTGTTGCGTGGCGTGGTTAG 3'                           |
| <i>PmClipSP1</i> -R    | 5' GCCTGTTGAGTCTGATGAGTGC3'                           |
| <i>PmClipSP1i</i> T7-F | 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTGGTTGCGTGGCGTGGTTAG 3' |
| <i>PmClipSP1i</i> T7-R | 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCCTGTTGAGTCTGATGAGTGC 3' |
| GFPiT7-F               | 5'TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'          |
| GFPi-R                 | 5'TTACTTGTACAGCTCGTCCA3'                              |
| GFPi-F                 | 5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3'                              |
| GFPiT7-R               | 5'TAATACGACTCACTATAGTTACTTGTACAGCTCGTCCA3'            |

### 1.3.3.2 การเตรียม dsRNA

นำ PCR product ของแต่ละยีนมาสร้างสาย sense RNA และ antisense RNA โดยใช้ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega, USA) เพื่อสังเคราะห์ RNA ในหลอดทดลอง และนำมาทำให้เป็น dsRNA โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70°C และให้สาย RNA จับกันเป็น dsRNA ที่อุณหภูมิประมาณ 25°C และวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และ spectrophotometry ก่อนที่จะนำมาฉีดเข้าสู่ตัวกุ้ง

### 1.3.3.3 การฉีด dsRNA ในกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำมาปรับสภาพในบ่อเลี้ยงที่ความเค็ม 20 ppt เป็นเวลา 7 วันก่อนทำการทดลอง คัดเลือกกุ้งที่มีขนาดประมาณ 2 g และฉีด dsRNA เข้าตัวกุ้งประมาณ 2 µg dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1

g ใช้เข้มข้น 0.5 ml โดยฉีด dsRNA เข้าในข้อปล้องที่ 3 ของตัวกึ่ง ในกลุ่มควบคุม จะฉีดด้วย GFP dsRNA และ 150 mM NaCl เลี้ยงกึ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการฉีด dsRNA ที่มี lipopolysaccharide (LPS) และ  $\beta$ -glucan ผสมอยู่ซ้ำ หลังจากนั้น เลี้ยงกึ่งอีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 1.3.3.4 การเก็บเลือดกึ่ง และการสกัด total RNA

เก็บเลือดกึ่งในกลุ่มที่ฉีด dsRNA และกลุ่มควบคุมหลังจากเลี้ยงมาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัด total RNA ด้วย TRI reagent (1 ml) ต่อ 100  $\mu$ l ของเลือด ผสมให้เข้ากันแล้วเติม chloroform (200  $\mu$ l) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนที่มี RNA ออกมาใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำ 0.5 ml isopropanol เพื่อให้ RNA ตกตะกอนออกมา นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol (1 ml) รอให้ตะกอนแห้งประมาณ 5 นาที แล้วจึงละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase

#### 1.3.3.5 การตรวจวัดประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

หลังจากสกัด total RNA แล้ว ทำการสร้าง first strand cDNA และตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ฉีดด้วย dsRNA และ buffer ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* และไพรเมอร์ของยีน *EF1- $\alpha$*  ซึ่งเป็นยีนควบคุม โดยทำ PCR reaction (25  $\mu$ l) ที่ประกอบด้วย 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1% (v/v) Tween 20, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu$ M dNTP, 0.2  $\mu$ M specific primer, cDNA (1  $\mu$ l) และ 1 unit Taq DNA polymerase เพิ่มปริมาณยีนโดยทำการ denature ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการ PCR โดยเริ่มที่ denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ทำทั้งสิ้น 30 รอบ แล้วทำ extension ในขั้นสุดท้ายที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น จึงนำ PCR product ไปวิเคราะห์ใน agarose gel electrophoresis

#### 1.3.3.6 การศึกษาความสำคัญของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* ต่อระบบ proPO โดยตรวจสอบ phenoloxidase (PO) activity หลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน

เก็บเลือดจากกึ่งที่ได้ถูก knockdown ด้วยการฉีด dsRNA ของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* หรือ *PmClipSP1* และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน GFP มาตรวจสอบ PO activity โดยในขั้นแรก ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ Bradford protein assay kit (Bio-Rad) และทำการตรวจสอบ PO activity โดยการเติมสับสเตรต L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) โดยใช้ total hemolymph protein (2  $\mu$ g) ที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% (v/v) กรดอะซิติก แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ในกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนเลือดกึ่ง

#### 1.3.3.7 การศึกษาอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi*

เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (tryptic soy broth) ที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ใช้ bacterial suspension ( $2 \times 10^5$  colony forming unit, CFU) ในการตรวจสอบอัตราการตายของกุ้งที่อยู่ในช่วง LD<sub>50</sub> โดยฉีดกุ้งขนาดประมาณ 10 g (อัตราส่วน 2 µg dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) และแบ่งกุ้งออกเป็นกลุ่มๆ ละ 10 ตัว กลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนฉีดด้วย dsRNA ของ *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* หรือ *PmClipSP1* กลุ่มควบคุมฉีดด้วย dsRNA ของ GFP และ 150 mM NaCl solution และเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการฉีด dsRNA หรือ NaCl solution ที่ผสมกับเชื้อ *V. harveyi* เข้า หลังจากเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง จึงจดบันทึกอัตราการตายของกุ้งเป็นเวลา 5 วัน

#### 1.3.3.8 การตรวจสอบจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi

ฉีดกุ้งขนาดประมาณ 10 g (อัตราส่วน 2 µg dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) หลังจาก 24 ชั่วโมง ทำการฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับฉีดกระตุ้นด้วย *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) หลังจากนั้น 6 ชั่วโมง เก็บเลือดมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดย plate count method โดยแบ่งกุ้งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 3 - 4 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่มที่ 1 กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน กลุ่มที่ 2 กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE1* dsRNA กลุ่มที่ 3 กุ้งที่ฉีดด้วย *PmClipSP1* dsRNA และกลุ่มที่ 4 กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA)

## 1.4 ผลการศึกษา

### 1.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาการแสดงออกของยีน PPAF และ proPO ในกุ้งกุลาดำ

งานวิจัยนี้ได้แยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมระบบ proPO มาศึกษาซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกคือ ยีน proPO-activating factors (PPAFs) ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่สำคัญต่อการกระตุ้นระบบ proPO ด้วยการทำงานแบบ proteinase cascade กลุ่มที่สองคือ ยีน proPO เป็นเอนไซม์หลักของระบบ จากการทดลอง พบยีน PPAF จำนวน 6 ยีน และยีน proPO ชนิดใหม่จำนวน 1 ยีน จากนั้นได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของยีนด้วยเทคนิค RACE-PCR

#### ยีน *proPO-activating factor (PPAF)*

จากการหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ด้วยเทคนิค RACE-PCR ของยีน PPAF จำนวน 6 ยีน ซึ่งประกอบด้วยยีน *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3* ซึ่งได้จากโครงการจีโนมกุ้ง และยีน *PmPPAE1* ซึ่งได้จากการทำ RT-PCR ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน PPAF ทั้ง 6 ยีนพบว่า ยีนทั้งหมดมี clip-domain อยู่ที่ปลาย N และมี serine proteinase (SP)-like domain อยู่ที่ปลาย C ซึ่งเป็นลักษณะของยีน PPAF ที่พบทั้งในแมลงและกุ้ง crayfish

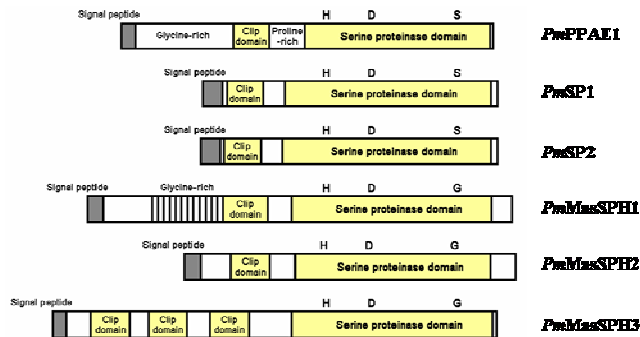
เมื่อวิเคราะห์โดเมนที่ปลาย N พบว่ามี 6 ยีน (*PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1* และ *PmMasSPH2*) ที่มี clip-domain อยู่ยีนละ 1 โดเมน ส่วนยีน *PmMasSPH3* มี clip-domain อยู่ 3 โดเมน ในขณะที่ปลาย C ของยีน *PmPPAE1*, *PmClipSP1* และ *PmClipSP2* มี serine proteinase-like domain เป็น catalytic serine proteinase domain และยีน *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3* มี SP-like domain เป็น non-catalytic SP domain เพราะที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน serine ซึ่งเป็น catalytic residue เปลี่ยนเป็น glycine (รูปที่ 1)

#### Phylogenetic tree analysis

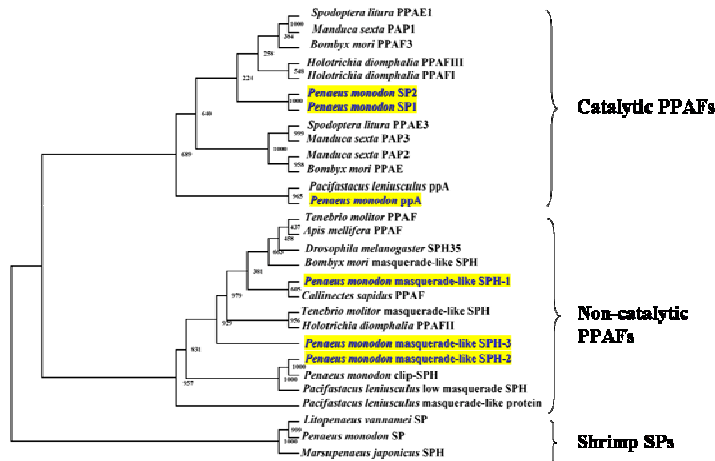
จากการสร้าง phylogenetic tree ของยีน PPAF และ SPs พบว่า สามารถแบ่งยีนออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ประกอบด้วย (1) catalytic PPAFs (2) non-catalytic PPAFs และ (3) shrimp SPs โดยยีน *PmPPAE1* (*P. monodon* ppA) มีความใกล้ชิดกับยีน PPA ที่พบใน crayfish (*Pacifastacus leniusculus* ppA) ส่วนยีน *PmClipSP1* (*P. monodon* SP1) และ *PmClipSP2* (*P. monodon* SP2) มีความใกล้ชิดกับยีน catalytic PPAE ที่พบในแมลง ในขณะที่ยีน *PmMasSPH-1* (*P. monodon* masquerade-like SPH-1), *PmMasSPH2* (*P. monodon* masquerade-like SPH-2) และ *PmMasSPH-3* (*P. monodon* masquerade-like SPH-3) มีความใกล้ชิดกับกลุ่มของยีน non-catalytic PPAF (รูปที่ 2)

ตารางที่ 2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของยีน PPAF ที่พบในกุ้งกุลาดำ

| Gene             | Full-length<br>cDNA (bp) | ORF<br>(bp) | Mature<br>protein (aa) | Closest species                 | Gene                   | Similarity<br>(%) | E-value              |
|------------------|--------------------------|-------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------|----------------------|
| <i>PmPPAE1</i>   | 1529                     | 1392        | 445                    | <i>Pacifastacus leniusculus</i> | ppA                    | 70                | $8 \times 10^{-138}$ |
| <i>PmClipSP1</i> | 1509                     | 1101        | 341                    | <i>Anopheles gambiae</i>        | Serine protease 14D    | 56                | $3 \times 10^{-60}$  |
| <i>PmClipSP2</i> | 1347                     | 1110        | 342                    | <i>Manduca sexta</i>            | Hemolymph proteinase-5 | 59                | $3 \times 10^{-52}$  |
| <i>PmMasSPH1</i> | 1572                     | 1572        | 504                    | <i>Callinectes sapidus</i>      | PPAF                   | 68                | $1 \times 10^{-107}$ |
| <i>PmMasSPH2</i> | 1689                     | 1233        | 390                    | <i>Pacifastacus leniusculus</i> | Mas-like protein       | 68                | $8 \times 10^{-111}$ |
| <i>PmMasSPH3</i> | 2714                     | 1656        | 534                    | <i>Lonomia obliqua</i>          | PPAF1                  | 68                | $1 \times 10^{-107}$ |



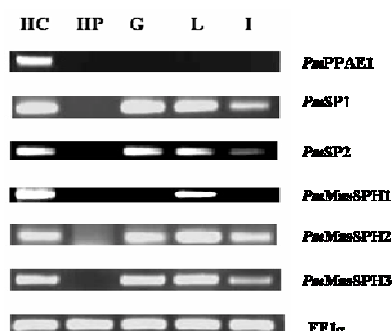
รูปที่ 1 โครงสร้างโดเมนที่พบในยีน *PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3* จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ ซึ่งประกอบด้วย clip domain และ SP-like domain ตัวอักษร H, D, S และ G แสดงกรดอะมิโน histidine, aspartic acid, serine และ glycine ที่บริเวณ catalytic site ของ SP-like domain



รูปที่ 2 Phylogenetic tree ของยีน PPAFs และ SPs ที่พบในแมลงและครัสเตเชียน ประกอบด้วยยีน PPAF ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (*PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3*), ของกุ้ง crayfish *Pacifastacus leniusculus* (PPA: AJ007668), ของปู *Callinectes sapidus* (CsPPAF: AY555734), ของแมลง *Tenebrio molito* (*TmPPAF*: AJ400904; *TmMLSP*: AB084067); ของแมลง *Drosophila melanogaster* (*DmSPH35*: AAF52904); ของผึ้ง *Apis mellifera* (*AmPPAF*: XM\_623147); ของแมลง *Holotrichia diomphalia* (*HdPPAFI*: AB013088; *HdPPAFII*: AJ400903; และ *HdPPAFIII*: AB079666); ของหนอนไหม *Bombyx mori* (*BmPPAF3*: AY061936; *BmMLSP*: AF513368; *BmPPAE*: AB009670); ของแมลง *Spodoptera litura* (*SPPAE1*: AY677081; *SPPAE3*: AY677082); ของแมลง *Manduca sexta* (*MsPAP2*: AY077643; *MsPAP3*: AY188445; *MsPAP1*: AY789465); ยีน serine proteinase ของกุ้งกุลาดำ (*PmSP*: AY372186) และกุ้งขาว (*LvSP*: AAQ92356) และยีน serine proteinase homologue ของกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* (*MjSPH*: AB161692)

### การตรวจสอบการแสดงออกของยีน PPAF ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR

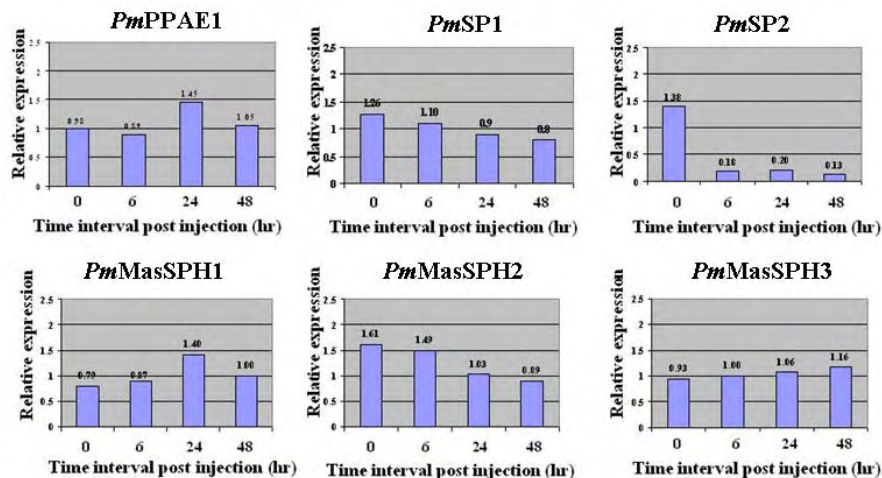
จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน PPAF ใน เม็ดเลือด, hepatopancreas, gill, lymphoid และ intestine ของกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค RT-PCR และใช้ EF-1 $\alpha$  เป็น internal control (รูปที่ 3) พบว่ายีนทั้ง 6 มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา ยกเว้นใน hepatopancreas แสดงให้เห็นว่ายีน PPAF ทั้ง 6 ยีนไม่ใช่ SP ที่แสดงออกใน hepatopancreas ที่เคยมีรายงานไว้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *PmPPAE1* และ *PmMasSPH1* มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และ lymphoid ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 3 การแสดงออกของยีน *PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3* ของกุ้งกุลาดำ ในเนื้อเยื่อ hemocyte (HC), hepatopancreas (HP), gill (G), lymphoid (L) และ intestine (I) และยีน EF-1 $\alpha$  เป็น internal control

### การตรวจสอบการแสดงออกของยีน PPAF ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน PPAF ทั้ง 6 ยีนในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 0, 6, 24, 48 ชั่วโมงด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน *PmPPAE1* และ *PmMasSPH1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อ และยีน *PmClipSP1*, *PmClipSP2* และ *PmMasSPH2* มีการแสดงออกน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ที่เวลา 6 - 48 ชั่วโมง ในขณะที่ยีน *PmMasSPH3* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อ (รูปที่ 4) ซึ่งให้เห็นว่า ยีน *PmPPAE1* และ *PmMasSPH1* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 4. ระดับของการแสดงออกของยีน *PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3* ในเม็ดเลือดของกิ้งก่าดำที่ชั่วโม่งต่าง ๆ (0, 6, 24 และ 48) หลังกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และใช้ยีน EF-1 $\alpha$  เป็น internal control

#### ยีน *prophenoloxidase (proPO)*

จากการค้นหายีน *proPO* ในกิ้งก่าดำ พบยีน *proPO* จำนวน 2 ยีน ยีนแรกเป็นยีนที่มีรายงาน โดย Sritunyalucksana และคณะ (1999) โดยในงานวิจัยนี้ให้ชื่อว่า *PmproPO1* และยีนที่สองเป็นยีน *proPO* ชนิดใหม่ให้ชื่อว่า *PmproPO2* และได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของยีน *PmproPO2* ด้วยเทคนิค RACE-PCR ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีน *PmproPO2* มีความยาวของยีนที่สมบูรณ์ทั้งหมด 2513 bp ประกอบด้วย open reading frame (ORF) ยาว 2072 bp ซึ่งแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 689 ตัว ในส่วน 5'-UTR และ 3'-UTR มีความยาว 113 bp และ 330 bp ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 ไม่พบ signal peptide เมื่อคำนวณ molecular mass ของโปรตีน *PmproPO2* พบว่า มี molecular mass 74.16 kDa และมีค่า pI 6.78 จากการหา N-glycosylation site (NXT และ NXS) พบว่า ยีน *PmproPO2* มี putative N-glycosylation site 5 ตำแหน่งที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 119 (NET), 172 (NET), 275 (NNS), 357 (NIS) และ 432 (NLS) ซึ่งแสดงว่ายีน *PmproPO2* น่าจะเป็น glycoprotein

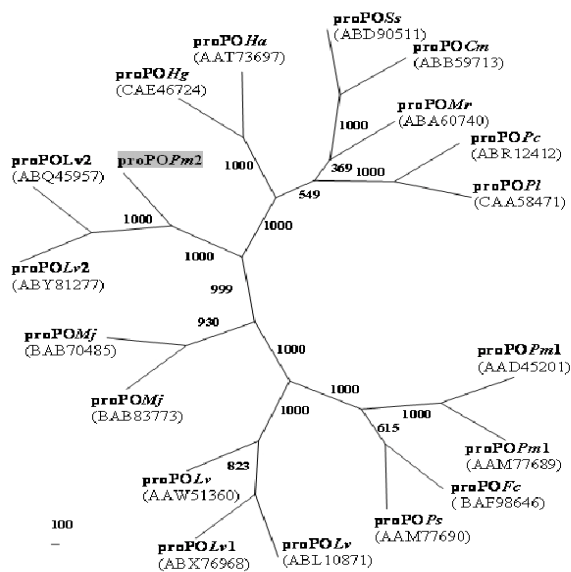
จากการวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิของกลุ่มโปรตีน *proPO* จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *PmproPO2* (รูปที่ 5) พบ putative cleavage site สำหรับกระตุ้นยีน *proPO* ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ Arg45 และ Lys46 และพบ thiol-ester motif (GCGWPQHM) ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ Gly584 ถึง Met591 และพบ putative copper-binding site 2 ตำแหน่ง คือ copper-binding site A (มี 3 conserved histidine residue ที่ตำแหน่ง 209, 213 และ 235) และ copper-binding site B (มี 3 conserved histidine residue ที่ตำแหน่ง 369, 373 และ 386)



พบว่า ยีนทั้งสองมีความยาวของ ORF, ขนาดของ MW, ค่า pI, ตำแหน่งของ putative cleavage site สำหรับกระตุ้น proPO และ putative N-glycosylation ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3 อย่างไรก็ตาม พบว่าทั้งสองยีนมี thiol-ester motif (GCGWPQHM) ที่เหมือนกันและมี conserved histidine residue จำนวน 6 ตำแหน่งภายใน copper-binding site A และ copper-binding site B ที่เหมือนกัน จากการสร้าง phylogenetic tree ของยีน proPO ของสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชียน (รูปที่ 6) พบว่า ยีน *PmproPO2* มีความใกล้เคียงกับยีน proPOLv2 ของกุ้งขาว *L. vannamei* มากกว่ายีน proPO1 ของทั้งกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว แสดงให้เห็นว่า ยีน proPOPm2 ที่พบเป็นยีนใหม่ที่พบในกุ้งกุลาดำ

ตารางที่ 3 ข้อมูลของยีน proPOPm1 และ proPOPm2 ที่พบในกุ้งกุลาดำ

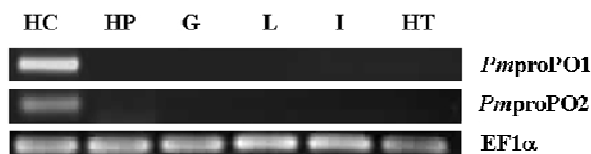
| Name of gene                          | <i>PmproPO1</i>                                                                                                  | <i>PmproPO2</i>                                                                                                  |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Full-length cDNA                      | 3,002 bp                                                                                                         | 2,513 bp                                                                                                         |
| ORF                                   | 2,067 bp                                                                                                         | 2,072 bp                                                                                                         |
| Protein                               | 688 aa                                                                                                           | 682 aa                                                                                                           |
| MW                                    | 73.8 kDa                                                                                                         | 74.16 kDa                                                                                                        |
| pI                                    | 5.98                                                                                                             | 6.78                                                                                                             |
| putative cleavage site for activation | Arg44/Val45                                                                                                      | Arg45/Lys46                                                                                                      |
| putative N-glycosylation              | มี 4 ตำแหน่ง [117 (NET), 170 (NQT), 571 (NTS) และ 622 (NTT)]                                                     | มี 5 ตำแหน่ง [119 (NET), 172 (NET), 275 (NNS), 357 (NIS) และ 432 (NLS)]                                          |
| Thiol ester motif                     | GCGWPQHM                                                                                                         | GCGWPQHM                                                                                                         |
| copper-binding site                   | copper-binding site A (3 conserved histidine residues)<br>copper-binding site B (3 conserved histidine residues) | copper-binding site A (3 conserved histidine residues)<br>copper-binding site B (3 conserved histidine residues) |



รูปที่ 6 Phylogenetic tree ของยีน proPOs ที่พบในครัสเตเชียนประกอบด้วยยีน proPO ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (proPOPm1: AAM77689 และ proPOPm1: AAD45201), กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (proPOLv1: ABX76968; proPOLv: ABL10871; proPOLv: AAW51360; proPOLv2: ABQ45957 และ proPOLv2: ABY81277), กุ้ง kuruma *Marsupenaeus japonicus* (proPOMj: BAB70485 และ proPOMj: BAB83773), กุ้งจีน *Fenneropenaeus chinensis* (proPOFc: BAF98646), กุ้ง *P. semisulcatus* (proPOPs: AAM77690), กุ้ง giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (proPOMr: ABA60740), กุ้ง European lobster *Homarus gammarus* (proPOHg: CAE46724), กุ้ง American lobster *Homarus americanus* (proPOHa: AAT73697), กุ้ง signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (proPOPl: CAA58471), กุ้ง red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (proPOPc: ABR12412), ปู Dungeness crab *Cancer magister* (proPOCm: ABB59713) และ ปู mud crab *Scylla serrata* (proPOsS: ABD90511)

### การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PmproPO1* กับ *PmproPO2* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งเช่น เม็ดเลือด, hepatopancreas, gill, lymphoid, intestine และ heart ของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ EF-1 $\alpha$  ซึ่งเป็น housekeeping gene เป็น control (รูปที่ 7) พบว่า ยีนทั้งสองมีการแสดงออกมากใน hemocyte แต่ไม่มีการแสดงออกใน hepatopancreas และเนื้อเยื่ออื่น ๆ



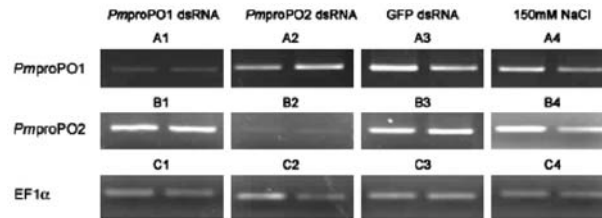
รูปที่ 7 การแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* ของกุ้งกุลาดำในเนื้อเยื่อ hemocyte (HC), hepatopancreas (HP), gill (G), lymphoid (L), intestine (I) และ heart (HT) และยีน EF-1 $\alpha$  เป็น internal control

### 1.4.2 การศึกษาหน้าที่ของยีน PPAF และ proPO ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

#### การตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi

ทำการศึกษาน้ำที่ของยีน 4 ยีน ซึ่งประกอบด้วย *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* ด้วยเทคนิค RNAi โดยฉีด dsRNA ของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1*, *PmClipSP1* หรือ GFP (กลุ่มควบคุม) เข้าสู่ตัวกุ้งด้วยปริมาณ 2  $\mu$ g dsRNA ค่อน้ำหนักกุ้ง 1 g หลังจาก 24 ชั่วโมง ทำการฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับกระตุ้นด้วย LPS และ laminarin ( $\beta$ -glucan) ทำการเลี้ยงกุ้งต่ออีก 48 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเลือดมาสกัด RNA และสร้าง cDNA วิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi

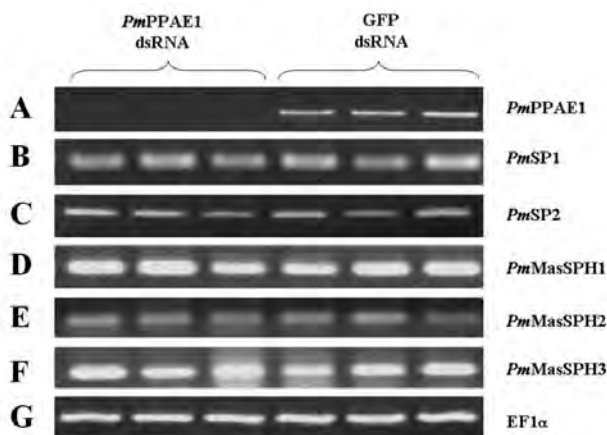
ผลจากการตรวจสอบเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *PmproPO1* (ไพรเมอร์ *PmPO1-F* และ *PmPO1-R*), *PmproPO2* (ไพรเมอร์ *PmPO2-F* และ *PmPO2-R*), *PmPPAE1* (ไพรเมอร์ *PmPPArt-F* และ *PmPPArt-R*) หรือ *PmClipSP1* (ไพรเมอร์ *PmClipSP1-F* และ *PmClipSP1-R*) พบว่า dsRNA ของแต่ละยีน (*PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* หรือ *PmClipSP1*) สามารถลดการแสดงออกของแต่ละยีน *PmproPO1* (รูปที่ 8A1), *PmproPO2* (รูปที่ 8B2), *PmPPAE1* (รูปที่ 9A) หรือ *PmClipSP1* (รูปที่ 10A) ได้ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ฉีดด้วย dsRNA GFP (รูปที่ 8A3 และ B3; รูปที่ 9A) หรือ NaCl (รูปที่ 8A4 และ B4) นอกจากนั้น ยังพบว่า dsRNA ของทั้งสี่ยีนสามารถยับยั้งการแสดงออกได้นานอย่างน้อย 5 วันหลังจากทำการ knockdown



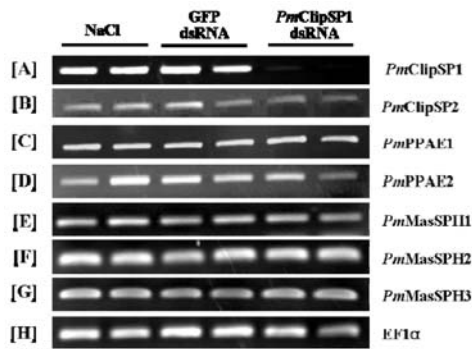
**รูปที่ 8** ระดับการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* ในเมล็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi รูป A1 - A4 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *PmproPO1* ในเมล็ดเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA (A1), *PmproPO2* dsRNA (A2), GFP dsRNA (A3) หรือ NaCl solution (A4) B1 - B4 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *PmproPO2* ในเมล็ดเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA (B1), *PmproPO2* dsRNA (B2), GFP dsRNA (B3) หรือ NaCl solution (B4) C1 - C4 แสดงระดับการแสดงออกของยีน EF1 $\alpha$  (housekeeping gene หรือ internal control gene) ในเมล็ดเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA (C1), *PmproPO2* dsRNA (C2), GFP dsRNA (C3) หรือ NaCl solution (C4)

### การตรวจสอบความจำเพาะของการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi

เมื่อทำการตรวจสอบผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสี่ยีนต่อการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกัน หรือยีนที่มีโครงสร้างคล้ายกัน พบว่า dsRNA ของ *PmproPO1* หรือ *PmproPO2* ไม่มีผลในการไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO2* mRNA (รูปที่ 8A2) หรือ *PmproPO1* mRNA (รูปที่ 8B1) ตามลำดับ ในส่วนของยีน *PmPPAE1* หรือ *PmClipSP1* พบว่า dsRNA ของยีน *PmPPAE1* หรือ *PmClipSP1* ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม clip domain serine proteinase (รูปที่ 10) ที่พบในกุ้งกุลาดำทั้ง 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยยีน *PmPPAE2* (FJ620685), *PmClipSP1* (FJ620688), *PmClipSP2* (FJ620687), *PmMasSPH1* (DQ455050), *PmMasSPH2* (FJ620686) และ *PmMasSPH3* (FJ620689) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถยับยั้งการแสดงออกของทั้งสี่ยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะ ซึ่งสามารถนำมาศึกษาหน้าที่ของยีนนั้นได้ในขั้นตอนต่อไป



**รูปที่ 9** ระดับการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* (A) ในเมล็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกฉีดด้วย dsRNA ของ *PmPPAE1* และ GFP (กลุ่มควบคุม) B, C, D, E, F แสดงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม clip domain SP ที่พบในกุ้งกุลาดำประกอบด้วยยีน *PmClipSP1* (B), *PmClipSP2* (C), *PmMasSPH1* (D), *PmMasSPH2* (E) และ *PmMasSPH3* (F) G แสดงระดับการแสดงออกของยีน EF1 $\alpha$  (housekeeping gene หรือ internal control gene) ในเมล็ดเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *PmPPAE1* และ GFP (กลุ่มควบคุม)



รูปที่ 10 การแสดงออกของยีน *PmClipSP1* (A) ในเมล็ดเลือดของ กุ้งกุลาดำที่ถูกฉีดด้วย *PmClipSP1* dsRNA หรือ GFP dsRNA (กลุ่มควบคุม) หรือ NaCl solution (กลุ่มควบคุม) รูป B, C, D, E, F, G แสดงระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม clip domain serine proteinase ที่พบในกุ้งกุลาดำประกอบด้วยยีน *PmClipSP2* (B), *PmPPAE1* (C), *PmPPAE2* (D), *PmMasSPH1* (E), *PmMasSPH2* (F) และ *PmMasSPH3* (G) (H) แสดงระดับ การแสดงออกของยีน EF-1 $\alpha$  (internal control gene)

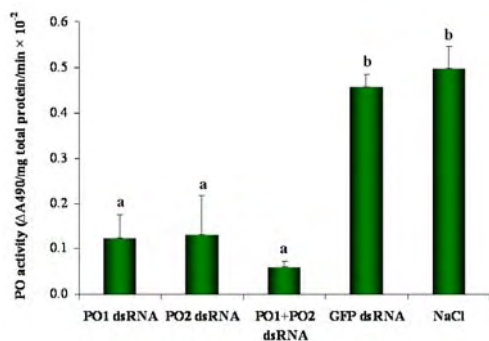
การศึกษาความสำคัญของยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* ต่อ ระบบ proPO โดยตรวจสอบ phenoloxidase (PO) activity หลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน

#### ***PO activity* ในเลือดกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *PmproPO1* และ *PmproPO2* dsRNA**

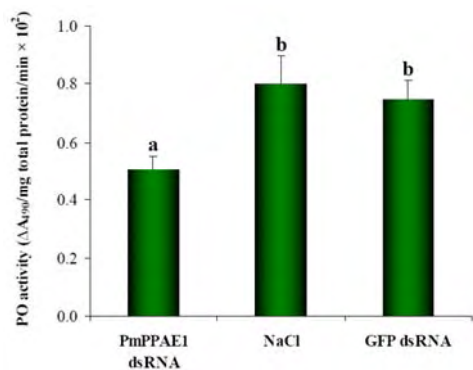
ผลจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* และตรวจสอบ phenoloxidase (PO) activity ของกุ้งที่ถูก knockdown เพื่อศึกษาว่า ยีนมีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO จากผลการทดลองพบว่า กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmproPO1* หรือ *PmproPO2* จะมี PO activity ลดลง 75% และ 73% ตามลำดับ (รูปที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กุ้งที่ฉีดด้วย NaCl) ในขณะที่ PO activity ของกลุ่มที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งที่ฉีดด้วย NaCl ( $p < 0.05$ , ANOVA, Duncan's test) เมื่อทำการ co-silencing ด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน พบว่า สามารถลด PO activity ได้ถึง 88% อย่างไรก็ตาม พบว่า ผลต่อ PO activity จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน เดียวหรือพร้อมกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากผลสามารถสรุปได้ว่าทั้ง *PmproPO1* และ *PmproPO2* มีหน้าที่ในระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำ

#### ***PO activity* ในเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* dsRNA**

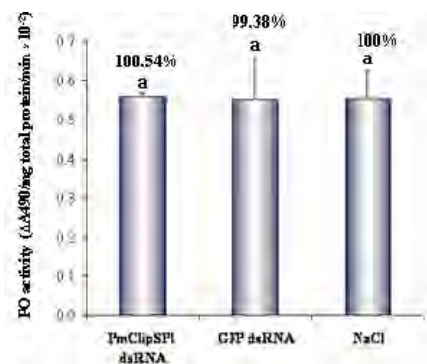
ผลจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* และตรวจสอบ PO activity ของกุ้งที่ถูก knockdown เพื่อศึกษาว่ายีน *PmPPAE1* มีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO โดยเมื่อทำการตรวจสอบ PO activity ในกุ้งที่ถูก knockdown ด้วยยีน *PmPPAE1* พบว่าสามารถลด PO activity ได้ ~36.7% ในขณะที่กุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmClipSP1* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ PO activity (รูปที่ 12 และ 13) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กุ้งที่ฉีดด้วย NaCl) ในขณะที่ PO activity ของกลุ่มที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งที่ฉีดด้วย NaCl ( $p < 0.05$ , ANOVA, Duncan's test) สรุปได้ว่า ยีน *PmPPAE1* มีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำ



**รูปที่ 11** Phenoloxidase (PO) activity ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* ด้วยเทคนิค RNAi โดยกลุ่มที่ 1 (PO1 dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA กลุ่มที่ 2 (PO2 dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO2* dsRNA กลุ่มที่ 3 (PO1+PO2 dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน กลุ่มที่ 4 (GFP dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) และกลุ่มที่ 5 (NaCl) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)



**รูปที่ 12** Phenoloxidase (PO) activity ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* ด้วยเทคนิค RNAi โดยกลุ่มที่ 1 (PO1 dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA กลุ่มที่ 2 (PO2 dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO2* dsRNA กลุ่มที่ 3 (PO1+PO2 dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน กลุ่มที่ 4 (GFP dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) และกลุ่มที่ 5 (NaCl) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

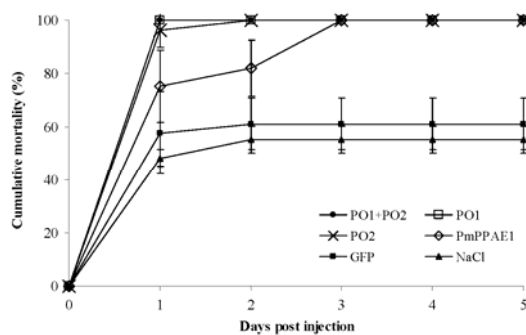


**รูปที่ 13** Phenoloxidase (PO) activity ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmClipSP1* ด้วยเทคนิค RNAi ในการทดลองได้แบ่งกุ้งออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง และในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่มที่ 1 (*PmClipSP1* dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmClipSP1* dsRNA กลุ่มที่ 2 (GFP dsRNA) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) และกลุ่มที่ 3 (NaCl) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

### Cumulative mortality assay

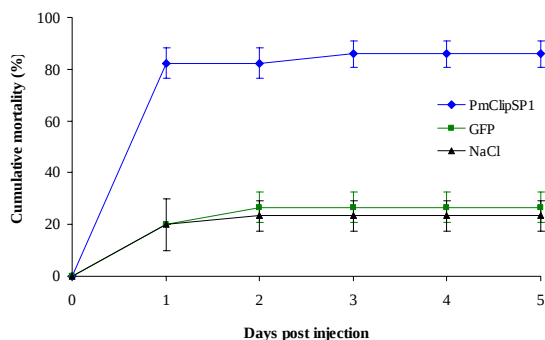
ทดสอบความสำคัญของยีนทั้งสี่ต่อความอยู่รอดของกุ้ง หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *V. harvey* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ของกุ้งกุลาดำ ในการทดลองแรกซึ่งประกอบด้วยยีน *PmproPO1*, *PmproPO2* และ *PmPPAE1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO โดยได้ฉีดกุ้งด้วยอัตราส่วน 2 μg dsRNA ต่อกุ้งหนัก 1 g โดยได้แบ่งกุ้งออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวอย่าง และในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง แบ่งเป็น 6 กลุ่ม กลุ่ม (1) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA กลุ่ม (2) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO2* dsRNA กลุ่ม (3) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน กลุ่ม (4) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE1* กลุ่ม (5)

กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) และกลุ่ม (6) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control) ผลจากการทดลองพบว่า กุ้งกลุ่ม (1) ที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และกลุ่ม (3) ที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นถึง 100% ภายใน 1 วันหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ กุ้งกลุ่ม (2) ที่ฉีดด้วย *PmproPO2* dsRNA มีอัตราการตายเพิ่มขึ้น 96.3% และตายเพิ่มขึ้นเป็น 100% ภายในวันที่หนึ่งและวันที่สองตามลำดับ กุ้งกลุ่ม (4) ที่ฉีดด้วย *PmPPAE1* มีอัตราการตาย 100% ภายใน 3 วันหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ ในขณะที่กุ้งกลุ่มควบคุม กลุ่ม (5) ที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) มีอัตราการตาย 61.1% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม กลุ่ม (6) ที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (55.2%) (รูปที่ 14)



**รูปที่ 14** อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนและกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) โดยฉีดกุ้งขนาดประมาณ 10 g (อัตราส่วน 2  $\mu$ g dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) โดยแบ่งกุ้งเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่ม 1 (—●—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA กลุ่ม 2 (—□—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO2* dsRNA กลุ่ม 3 (—×—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน กลุ่ม 4 (—◇—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE1* dsRNA กลุ่ม 5 (—■—) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) กลุ่ม 6 (—▲—) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

ในส่วนของยีน *PmClipSP1* ได้ทดสอบความสำคัญของยีนทั้งสองต่อความอยู่รอดของกุ้งหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* 639 โดยได้ฉีดกุ้งด้วยอัตราส่วน 2  $\mu$ g dsRNA ต่อกุ้งหนัก 1 g โดยได้แบ่งกุ้งออกเป็นกลุ่ม ๆ ละประมาณ 9-10 ตัวอย่าง และในแต่ละกลุ่มทำการทดลอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่ม (1) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmClipSP1* dsRNA กลุ่ม (2) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) และกลุ่ม (3) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control) ผลพบว่า กุ้งกลุ่ม (1) ที่ฉีดด้วย *PmClipSP1* dsRNA มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเป็น 86% ภายใน 3 วัน (รูปที่ 15) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม โดยกุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (กลุ่ม 2) มีอัตราการตาย 26.67% และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (กลุ่ม 3) มีอัตราการตาย 23.33%

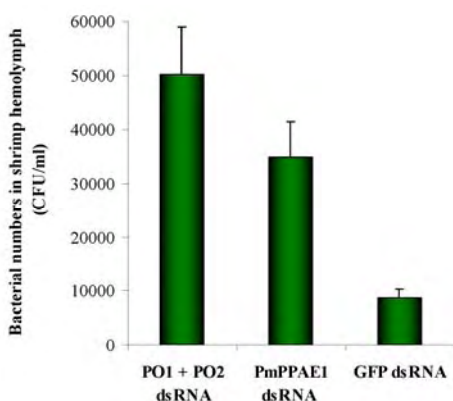


**รูปที่ 15** อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนและกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) โดยฉีดกุ้งขนาดประมาณ 10 g (อัตราส่วน 2  $\mu$ g dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) โดยแบ่งกุ้งเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่ม 1 (—●—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA กลุ่ม 2 (—□—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO2* dsRNA กลุ่ม 3 (—×—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน กลุ่ม 4 (—◇—) กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE1* dsRNA กลุ่ม 5 (—■—) กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA) กลุ่ม 6 (—▲—) กุ้งที่ฉีดด้วย 150 mM NaCl (control)

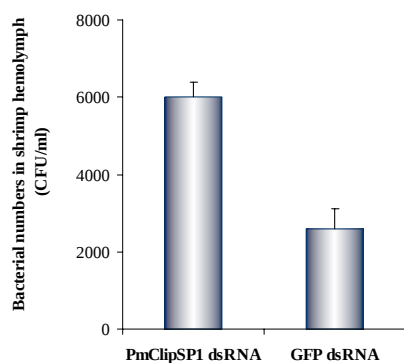
## การตรวจสอบจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi

ผลจากการทดลองทำ cumulative mortality assay ของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนและฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ในกุ้งกุลาดำ และพบว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนมีอัตราการตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม เราจึงทำการศึกษว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสี่ยีน *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* มีผลทำให้เชื้อ *V. harveyi* สามารถเพิ่มจำนวนได้ในกุ้ง โดยทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนและฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ จากนั้นทำการเก็บเลือดมาตรวจสอบจำนวนเชื้อโดย plate count method พบว่า กุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* โดยการฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน และฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* เมื่อติดเชื้อมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* พบว่า กุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนมีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 6 เท่า (รูปที่ 16) เมื่อเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ในขณะที่กุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmPPAE1* หรือ *PmClipSP1* โดยการฉีดด้วย *PmPPAE1* หรือ *PmClipSP1* dsRNA และฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* พบว่า มีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 4 เท่า (รูปที่ 16) และ 2.4 เท่า (รูปที่ 17) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนมีจำนวนเชื้อ *V. harveyi* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (GFP dsRNA)

จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ยีน *PmproPO1*, *PmproPO2* และ *PmPPAE1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในขณะที่ยีน *PmClipSP1* ไม่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง 4 ยีนเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ในกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 16 จำนวนของเชื้อ *V. harveyi* 639 (CFU/mL) ในเลือดของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* (*PO1+PO2* dsRNA) และ *PmPPAE1* (*PmPPAE1* dsRNA) ฉีดกุ้งขนาดประมาณ 10 g (อัตราส่วน 2 µg dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) หลังจาก 24 ชั่วโมง ทำการฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับฉีดกระตุ้นด้วย *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) จากนั้น 6 ชั่วโมง เก็บเลือดมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดย plate count method โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 3 - 4 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กลุ่มที่ 1 คือ กุ้งที่ฉีดด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกัน กลุ่มที่ 2 คือ กุ้งที่ฉีดด้วย *PmPPAE1* dsRNA และกลุ่มที่ 3 คือ กุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA)



รูปที่ 17 จำนวนของเชื้อ *V. harveyi* 639 (CFU/ml) ในเลือดของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmClipSP1* (*PmClipSP1* dsRNA) ถัดกุ้งขนาดประมาณ 3 g (อัตราส่วน 2  $\mu$ g dsRNA ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) หลังจาก 24 ชั่วโมง ฉีดซ้ำด้วย dsRNA ปริมาณเท่าเดิมพร้อมกับฉีดกระตุ้นด้วย *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) จากนั้น 6 ชั่วโมง เก็บเลือดมานับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* โดย *plate count method* โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวอย่าง และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง กุ้งกลุ่มควบคุมฉีดด้วย GFP dsRNA (control dsRNA)

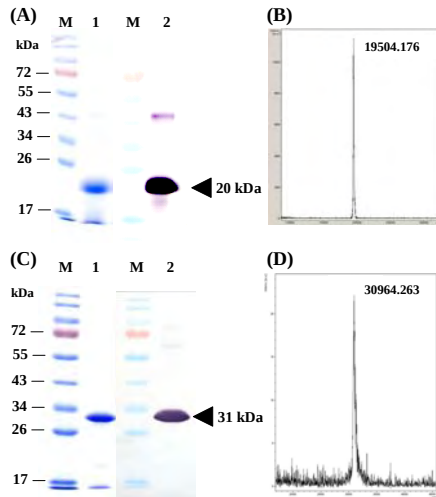
### 1.4.3 การสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน *PmMasSPH1*

เนื่องจากยีน *PmMasSPH1* ประกอบด้วยสองส่วนที่น่าจะมีความสำคัญทางชีวภาพคือ ทางด้านปลาย N ประกอบด้วย glycine-rich repeats และ clip domain (Gly-Clip domain) และทางด้านปลาย C ประกอบด้วย serine proteinase domain (SP domain) ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อมาศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพ ผลจากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพบว่ามี การแสดงออกในส่วนที่เป็น inclusion body และทำให้ละลายโดยใช้ 8M urea และแยกบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity column หลังจากนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blotting โดยใช้ anti-His antibody พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 20 kDa สำหรับ Gly-Clip domain และ 31 kDa สำหรับ SP domain (รูปที่ 18) นอกจากนั้นเมื่อตรวจสอบ molecular weight โดยใช้ MALDI-TOF mass spectrometry พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีขนาด 20,115.40 Da และ 31,060.39 Da (รูปที่ 18) ซึ่งใกล้เคียงกับที่ได้คำนวณไว้คือ 19,504.176 Da และ 30,964.263 Da ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Gly-Clip domain และ SP domain ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตและแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนได้เพียงพอที่จะใช้ศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพต่อไปได้ เนื่องจากยีน *PmMasSPH1* เป็นยีนในกลุ่มของ serine proteinase homologue ซึ่งมีรายงานถึงหน้าที่ชีวภาพหลายแบบ เช่น มี proteinase activity มีหน้าที่เป็น cell adhesion molecule มีความสามารถจับกับผนังเซลล์ของจุลชีพได้ และมี antimicrobial activity ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงได้ทำการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

#### *Serine proteinase activity assay*

เนื่องจากยีน *PmMasSPH1* มี serine proteinase domain อยู่ที่บริเวณปลาย C อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์พบว่ากรดอะมิโนที่เป็น active site คือ Ser ของโปรตีนสั่วไป มีการเปลี่ยนเป็น Gly ในยีน *PmMasSPH1* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *PmMasSPH1* ไม่น่าจะมี proteinase activity ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ทำการตรวจสอบ proteinase activity ของโปรตีน rSP domain โดยใช้ substrate ของโปรตีน 3 ชนิดคือ trypsin, chymotrypsin และ elastase พบว่าโปรตีน rSP domain ไม่มี proteinase

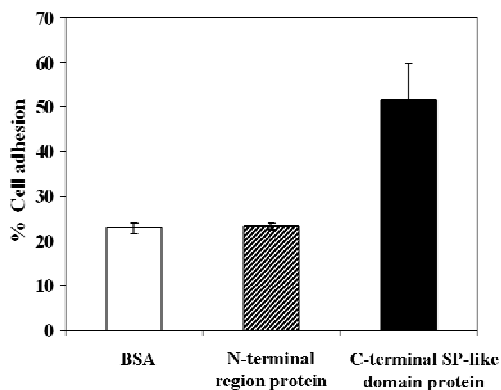
activity กับทั้ง 3 substrate ที่ใช้ศึกษา จากผลแสดงให้เห็นว่า *PmMasSPH1* ไม่มี proteinase activity เนื่องจากบริเวณ active site ของ SP domain มีการเปลี่ยนเป็น Gly



**รูปที่ 18** รีคอมบิแนนท์โปรตีน Gly-Clip domain (A และ B) และ SP domain (C และ D) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (A และ C, แถว 1), Western blotting (A และ C, แถว 2) และ MALDI-TOF mass spectrometry (B และ D) ตามลำดับ แถว M แสดง pre-stained protein standard marker

#### Cell adhesion assay

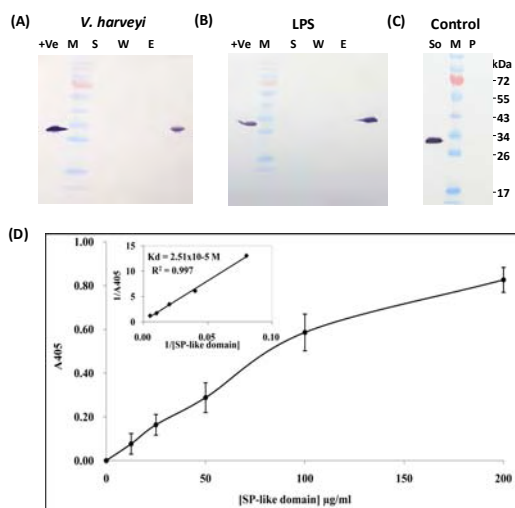
จากการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน *PmMasSPH1* ถึงคุณสมบัติในการเป็น cell adhesion molecule ผลพบว่าโปรตีน rSP domain สามารถยึดติดเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งได้มากถึง 51% (รูปที่ 19) ซึ่งมากกว่าในกลุ่มควบคุมที่ใช้โปรตีน BSA มีค่า 25% อย่างไรก็ตามพบว่า rGly-Clip domain ไม่สามารถยึดติดเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในส่วนของ SP domain ของโปรตีน *PmMasSPH1* มี adhesion activity ทำหน้าที่เป็น cell adhesion molecule ในการยึดติดกับเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งได้



**รูปที่ 19** Cell adhesion activity ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Gly-Clip domain (N-terminal region protein) และ SP domain (C-terminal SP-like domain protein) โปรตีนควบคุมในการทดลองคือ BSA

### Binding activity

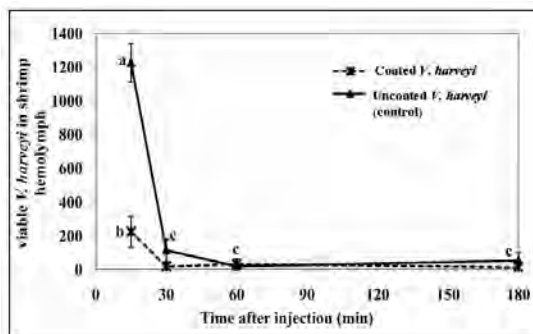
จากการตรวจ binding ability ของโปรตีน rSP domain ต่อการจับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบคือ LPS พบว่าโปรตีน rSP domain สามารถจับกับทั้งเซลล์ *V. harveyi* และส่วน LPS ได้ และเมื่อทำ quantitative binding โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่า โปรตีน rSP domain สามารถจับกับ LPS ตามปริมาณของโปรตีนต่อ LPS (concentration dependent manner) (รูปที่ 20, A, B, C) และเมื่อทำ Scatchard plot analysis พบว่ามีค่า apparent dissociation constant ( $K_d$ ) ของ โปรตีน rSP domain ต่อ LPS เท่ากับ  $2.51 \times 10^{-5}$  M (รูปที่ 20, D) จากผลสรุปได้ว่าในส่วน SP domain ของโปรตีน PmMasSPH1 สามารถจับแบคทีเรียแกรมลบ *V. harveyi* ผ่านทาง LPS



**รูปที่ 20** Binding activity ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน SP domain ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *V. harveyi* [Vh] (A) และ LPS (B) กลุ่มควบคุม (C) คือรีคอมบิแนนท์โปรตีนอย่างเดียวที่ไม่มีทั้ง Vh (A) และ LPS (B) แถว E (elution) แสดงส่วนของ SP domain ที่จับได้กับ Vh (A) และ LPS (B) แถว S (supernatant) และ W (wash) คือสิ่งที่ไม่จับกับ Vh และ LPS แถว +Ve แสดง รีคอมบิแนนท์โปรตีน SP domain แถว So และ P แสดงส่วน soluble protein และ precipitated protein ตามลำดับ รูป D แสดง quantitative binding ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน SP domain (0–200  $\mu\text{g/ml}$ ) ต่อ LPS ด้วยเทคนิค ELISA

### Opsonic activity

จากการตรวจสอบ opsonic activity ของ PmMasSPH1 ในความสามารถของโปรตีนในการกำจัดหรือ clearance ของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในเลือดของกุ้ง โดยนำเชื้อ *V. harveyi* ( $1 \times 10^5$  cells) มาบ่มกับโปรตีน rSP domain และ rGly-Clip domain และฉีดเข้าสู่ตัวกุ้ง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็น *V. harveyi* อย่างเดียว ผลพบว่าโปรตีน PmMasSPH1 สามารถทำให้เกิดการ clearance ในกุ้งได้อย่างรวดเร็วภายใน 30 นาที (รูปที่ 21) แสดงให้เห็นว่า โปรตีน PmMasSPH1 มีฤทธิ์ของ opsonic activity



รูปที่ 21 Opsonic activity รีคอมบิแนนท์โปรตีน

PmMasSPH (Gly-Clip domain และ SP domain)

ในการกำจัดเชื้อ *V. harveyi* ในเลือดของกุ้ง

หลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 15, 30, 60 และ 180 นาที

กลุ่มควบคุมคือกุ้งที่ฉีดเชื้ออย่างเดียว

### Antimicrobial activity assay

เนื่องจากมีรายงานถึงหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีนในส่วนของ Clip domain แล่ glycine-rich region ในการมีฤทธิ์ของ antimicrobial activity ดังนั้นในการทดลองนี้เราได้นำ rGly-Clip domain มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวกับเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ พบว่า rGly-Clip domain มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก และ *S. aureus* *A. Viridians* และ *B. megaterium* ที่มีค่า MICs เท่ากับ 0.89, 3.23 และ 60  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบที่ได้ทำการทดลอง (ตารางที่ 4) จากผลแสดงให้เห็นว่า rGly-Clip domain มีฤทธิ์ antimicrobial activity

| Microorganisms                | MIC ( $\mu\text{M}$ ) | Microorganisms                 | MIC ( $\mu\text{M}$ ) |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|
| <b>Gram-positive bacteria</b> |                       | <b>Gram-negative bacteria</b>  |                       |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 0.89                  | <i>Escherichia coli</i> 363    | NA                    |
| <i>Aerococcus viridans</i>    | 3.23                  | <i>Enterobacter cloacae</i>    | NA                    |
| <i>Bacillus megaterium</i>    | 60                    | <i>Erwinia carotovora</i>      | NA                    |
| <i>Micrococcus luteus</i>     | NA                    | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | NA                    |
|                               |                       | <i>Salmonella thyphimurium</i> | NA                    |
|                               |                       | <i>Vibrio harveyi</i>          | NA                    |

ตาราง 4 antimicrobial activity ของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน Gly-Clip domain

Minimum inhibition concentration (MIC) ค่าที่รายงานคือช่วงความเข้มข้นสูงสุดของโปรตีนที่ยังมีการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการยับยั้ง 100%

NA คือปริมาณของ Gly-Clip domain ที่ 80  $\mu\text{M}$  ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ยีนกลุ่ม PPAF และกลุ่ม proPO เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ แต่ในปัจจุบันมีข้อมูลการศึกษาและหน้าที่ของยีนโดยเฉพาะกลุ่มยีน PPAF อยู่ค่อนข้างน้อยในกุ้งกุลาดำ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาทั้งกลุ่มยีนให้มากยิ่งขึ้น เพื่อที่จะนำไปสู่ความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำให้มากยิ่งขึ้น

ผลจากการศึกษาและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ของยีนกลุ่ม PPAF พบว่า มีจำนวน 6 ยีน ซึ่งประกอบด้วยยีน *PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3* และจากการวิเคราะห์พบว่า ทั้ง 6 ยีนมี clip-domain อยู่ที่ปลาย N และมี serine proteinase domain (ยีน *PmPPAE1*, *PmClipSP1* และ *PmClipSP2*) หรือ serine proteinase homologue domain (ยีน *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3*) อยู่ที่ปลาย C ซึ่งเป็นลักษณะของยีน PPAF ที่พบได้ทั้งในแมลงและกุ้ง crayfish เมื่อตรวจสอบการแสดงออกในเนื้อเยื่อพบว่า ยีนทั้ง 6 มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และไม่แสดงออกใน hepatopancreas เมื่อศึกษาการตอบสนองของยีนในเม็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* พบว่า ยีน *PmPPAE1* และ *PmMasSPH1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ชั่วโมงที่ 24 และยีน *PmClipSP1*, *PmClipSP2* และ *PmMasSPH2* มีการแสดงออกน้อยลงที่เวลา 6-48 ชั่วโมง ในขณะที่ยีน *PmMasSPH3* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

สำหรับการค้นหาในยีนในกลุ่ม proPO พบยีน proPO จำนวน 2 ยีน ได้แก่ *proPOPm1* เป็นยีนที่มีรายงานแล้ว และยีน *proPOPm2* ซึ่งเป็นยีน proPO ชนิดใหม่ที่พบในกุ้งกุลาดำ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า ทั้งสองยีนมีความเหมือนกันประมาณ 80% และมี ORF MW และ pI ที่แตกต่างกัน เมื่อศึกษาการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่าง ๆ พบว่า ทั้งสองยีนมีการแสดงออกเฉพาะในเม็ดเลือด และไม่แสดงออกใน hepatopancreases ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีนทั้งสองน่าจะเป็นยีนที่สร้างจากเม็ดเลือด การศึกษาครั้งนี้ทำให้เราพบยีนใหม่ที่ยังไม่มีรายงาน ซึ่งยีนที่พบน่าจะมี ความสำคัญต่อระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำ

ผลจากการศึกษาหน้าที่ของยีนทั้งสาม *PmproPO1*, *PmproPO2*, *PmPPAE1* และ *PmClipSP1* ด้วยเทคนิค RNAi และทำการตรวจสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะในการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วย dsRNA พบว่า สามารถลดการแสดงออกของยีนทั้งสามยีนได้ และพบว่า dsRNA ของแต่ละยีนมีความจำเพาะไม่มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกัน นอกจากนั้น เราพบว่า ปริมาณ dsRNA (~2 µg dsRNA ค่อน้ำหนักกุ้ง 1 g) ที่ใช้ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสี่ได้เกือบสมบูรณ์ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานการยับยั้งการแสดงออกของยีน proPO ในกุ้ง crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) ที่พบว่าสามารถลดการแสดงออกของยีนได้ประมาณ 57% (Liu และคณะ 2007) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่า

สามารถลดการแสดงออกของยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเพียงพอที่จะทำการศึกษาหน้าที่ของยีนทั้งสี่ได้

เมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของยีนทั้งสี่ต่อความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO พบว่ากุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmproPO1* หรือ *PmproPO2* หรือ *PmPPAE1* มี PO activity ลดลง 75%, 73% หรือ 36.7% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กุ้งที่ฉีดด้วย NaCl) จึงสรุปได้ว่า ทั้งสามยีนเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO นอกจากนี้ เมื่อทำ co-silencing ด้วย *PmproPO1* dsRNA และ *PmproPO2* dsRNA พร้อมกันพบว่า สามารถลด PO activity ได้ 88% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า proPO ทั้งสองอาจจะมีการทำงานร่วมกันในระบบ proPO ของกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามกุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *PmClipSP1* มี PO activity ไม่แตกต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (GFP dsRNA และ NaCl) แสดงว่ายีน *PmClipSP1* เป็นยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO จากรายงานการศึกษายีนในกลุ่ม Clip domain serine proteinase ของยุง *A. gambiae* โดยใช้เทคนิค RNAi พบยีน CLIPB14, CLIPB4 และ CLIPB8 มีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO (Volz และคณะ 2005; Paskewitz และคณะ 2006; Volz และคณะ 2006) นอกจากนี้ในกุ้ง crayfish ได้มีรายงานการยับยั้งการแสดงออกของยีน proPO และยีน pacifastin พบว่า ทั้งสองยีนมีความเกี่ยวข้องกับระบบ proPO (Liu และคณะ 2007)

ระบบ proPO เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลัง ในการต่อสู้กับเชื้อโรค (Cerenius และ Söderhäll K, 2004) อย่างไรก็ตาม ในแมลงบางชนิด เช่น *Drosophila* (Leclerc และคณะ 2006) และ *Anopheles gambiae* (Schmitzer และคณะ 2007) รายงานว่าระบบ proPO ไม่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของแมลงหลังติดเชื้อโรค ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการทดสอบความสำคัญของยีนทั้งสามยีน คือ *PmproPO1*, *PmproPO2* และ *PmPPAE1* ต่อความอยู่รอดของกุ้งหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ของกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* หรือ *PmproPO2* หรือ *PmPPAE1* ทำให้กุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น 100% ภายในวันที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายประมาณ 50 - 60% เมื่อทำการตรวจสอบจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสาม พบว่า กุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ *PmproPO2* พร้อมกัน และ *PmPPAE1* มีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 6 และ 4 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มกุ้งที่ฉีดด้วย GFP dsRNA ผลจากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษายีน proPO ในกุ้ง crayfish ซึ่งเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกและตรวจสอบจำนวนเชื้อแบคทีเรียใน hemolymph พบว่า มีจำนวนเชื้อมากขึ้นประมาณ 2.3 เท่า

ในส่วนของยีน *PmClipSP1* เราพบว่า ยีนนี้ไม่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO แต่เมื่อยีนนี้ถูก knockdown และกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* กุ้งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น และมีจำนวนเชื้อมากขึ้นในเลือด ทั้งนี้เนื่องมาจากยีนในกลุ่ม Clip domain serine proteinase มีหน้าที่สำคัญหลายอย่างรวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ในระบบ proPO (Cerenius and Söderhäll, 2004) เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างเพปไทด์ต้านจุลชีพในแมลง (Jang et al., 2008; Jiang and Kanost, 2000) และการแข็งตัวของเลือดใน horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* (Muta and Iwanaga, 1996) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PmClipSP1* ไม่พบความแตกต่างของการแข็งตัวของเลือดระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม (data not shown) ผลการทดลองอาจจะสรุปได้ว่า *PmClipSP1* ไม่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดในกุ้ง โดยทั่วไป กลไกการแข็งตัวของเลือดใน horseshoe crab จะเป็นแบบ hemocyte-derived clotting cascade ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นของ serine proteinases ในขณะที่สัตว์จำพวกครัสเตเชียน *Pacifastacus leniusculus* จะมีกลไกเป็นแบบ transglutaminase-dependent clotting reaction (Jiravanichpaisal et al., 2006) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่ทราบหน้าที่ของยีน *PmClipSP1* ว่าทำงานอยู่ในระบบใด แต่ทราบว่ายีนนี้เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านเชื้อโรค (antibacterial mechanism) ในกุ้ง

นอกจากนั้นจากการศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน *PmMasSPH1* โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ทางด้านปลาย N ประกอบด้วย glycine-rich repeats และ clip domain (Gly-Clip domain) และทางด้านปลาย C ประกอบด้วย serine proteinase domain (SP domain) และศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพ พบว่าส่วนทางด้านปลาย N ประกอบด้วย Gly-Clip domain มีฤทธิ์ antimicrobial activity ในขณะที่ทางด้านปลาย C คือ SP domain ไม่มี proteinase activity แต่มีหน้าที่ cell adhesion activity, bacterial binding activity และ bacterial clearance

จากผลการทดลองทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ โดยการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้งกุลาดำและศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วยยีนกลุ่ม PPAF (*PmPPAE1*, *PmClipSP1*, *PmClipSP2*, *PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* และ *PmMasSPH3*) และยีน proPO จำนวน 2 ยีน ได้แก่ *proPOPm1* เป็นยีนที่มีรายงานแล้ว และยีน *proPOPm2* ซึ่งเป็นยีนชนิดใหม่ เมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของยีนทั้ง 4 ต่อระบบ proPO และระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยใช้เทคนิค RNA interference โดยการตรวจสอบ PO activity ศึกษาอัตราการตายของกุ้ง และการนับจำนวนเชื้อ *V. harveyi* ในเลือดของกุ้งที่ถูก knockdown สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ยีนทั้ง 3 ได้แก่ *PmproPO1*, *PmproPO2* และ *PmPPAE1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ proPO และระบบนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็น pathogenic bacteria ของกุ้งกุลาดำ และยีน *PmClipSP1* เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านเชื้อโรคในกุ้ง นอกจากนี้ยีน *PmMasSPH1* มีหน้าที่ทางชีวภาพได้หลายแบบประกอบด้วย antimicrobial activity, cell adhesion, bacterial binding activity และ bacterial clearance

ถึงแม้ว่าการศึกษานี้เราจะทราบว่ายีนทั้งสามเกี่ยวข้องกับระบบ proPO ในกุ้ง เนื่องจาก ระบบ proPO เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีการควบคุมซับซ้อน การศึกษายีนในระบบ proPO ในระดับ โมเลกุลก็มีความจำเป็นอย่างมาก ในการเข้าใจกลไกการกระตุ้นระบบ proPO ซึ่งมีประโยชน์ต่อการพัฒนากุ้งให้มีความต้านทานโรค

### เอกสารอ้างอิง

- Aspán A, and Söderhäll K. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activating by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem* 1991;21: 363-73.
- Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:116–26.
- Jiang H, Wang Y, and Kanost MR. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 12220– 5.
- Jiang H, Wang Y, Yu X-Q, and Kanost MR Prophenoloxidaseactivating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*: a bacteria inducible serine proteinase containing two clip domains. *J Biol Chem* 2003;78: 3552– 61.
- Leclerc V, Pelte N, El Chamy L, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, Reichhart JM. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *Embo Reports* 2006; 7:231–5.
- Liu H, Jiravanichpaisal P, Cerenius L, Lee BL, Söderhäll I, Söderhäll K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 2007;282:33593–8.
- Paskewitz SM, Andreev O, Shi L. Gene silencing of serine proteases affects melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 2006;36:701–11.
- Satoh D, Horii A, Ochiai M, and Ashida M. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem* 1999;274: 7441-53.
- Schnitger AKD, Kafatos FC, Osta MA. The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections. *J Biol Chem* 2007; 282: 21884– 21888.

- Sritunyalucksana K, Cerenius L, Söderhäll K. (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Developmental and Comparative Immunology 23:179-186.
- Volz J, Müller H-M, Zdanowicz A, Kafatos FC, Osta MA. A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. Cell Microbiol 2006;8:1392–405.
- Volz J, Osta MA, Kafatos FC, Müller H-M. The roles of two clip domain serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. J Biol Chem 2005;280:40161–8.
- Wang R, Lee SY, Cerenius L, and Söderhäll K. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Eur J Biochem 2001; 268: 895– 902.

#### ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Amparyup, P.**, Charoensapsri, W., and Tassanakajon, A. (2009). Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 33: 247-256.
2. Charoensapsri, W., **Amparyup, P.**, Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. (2009). Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection Dev Comp Immunol 33: 811-820.
3. Jitvaropas, R., **Amparyup, P.**, Gross, PS., and Tassanakajon, A. (2009). Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Comp Biochem Physiol B 153: 236-243.
4. **Amparyup P**, Wiriyaekaradecha K, Charoensapsri W, Tassanakajon A. A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. Dev Comp Immunol 2010, 34; 168-176.

#### การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ

1. Jitvaropas, R., **Amparyup, P.**, Gross, P., Tassanakajon, A. (2008). A masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon* is a pattern recognition protein. World Aquaculture 2008, 19-23 May 2008, Busan, Korea.
2. **Amparyup, P.**, Charoensapsri, W., Hirono, I., Aoki, H., Tassanakajon, A. (2008). Functional characterization and gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme (PPAE) in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress: Fisheries for Global Welfare and Environmental Conservation, 20-25 Oct 2008, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, p. 183.
3. Jitvaropas, R., Tassanakajon, A., **Amparyup, P.**, Gross, P. (2008). Essential function of masquerade-like serine proteinase homologue in shrimp innate immune responses and implication of its role by RNA interference. The 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress: Fisheries for Global Welfare and Environmental Conservation, 20-25 Oct 2008, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, p. 184.

4. **Amparyup, P.,** Charoensapsri, W., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2009). The role of clip-domain serine proteinases in the prophenoloxidase-activating system in shrimp. 1<sup>th</sup> Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, 28 June-3 July 2009. Prague, Czech Republic, p. 14. (Oral presentation).
5. **Amparyup, P.,** Charoensapsri, W., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. (2009). A prophenoloxidase-activating enzyme 2 is essential for the immune defense against bacterial infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. The 10<sup>th</sup> International Symposium on Genetics in Aquaculture: Role of Aquaculture Genetics in Addressing Global Food Crisis, 22-26 June 2009. Bangkok, Thailand, p. 107

#### การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับชาติ

1. Wiriyaekaradecha, K., **Amparyup, P.,** Charoensapsri, W., and Tassanakajon, A. (2008). Characterization of a clip-domain serine proteinase from shrimp *Penaeus monodon*. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for Global Care. 14–17 October 2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand, p. 164.
2. **Amparyup, P.,** Charoensapsri, W., Tassanakajon, A. (2008). A novel prophenoloxidase from shrimp *Penaeus monodon*: Characterization and gene silencing. The 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, Oct 31-Nov 2, Bangkok, Thailand, pp. 97-98.
3. Charoensapsri, W., **Amparyup, P.,** Tassanakajon, A. (2008). Gene silencing of prophenoloxidase-activating enzyme in shrimp *Penaeus monodon* increase susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. The 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, Oct 31-Nov 2, 2008, Bangkok, Thailand, p. 110.



## Two prophenoloxidasases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*

Piti Amparyup<sup>a,b</sup>, Walaiporn Charoensapsri<sup>a</sup>, Anchalee Tassanakajon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Shrimp Molecular Biology and Genomics Laboratory, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>b</sup> National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 August 2008

Received in revised form 8 September 2008

Accepted 9 September 2008

Available online 1 October 2008

#### Keywords:

Shrimp

Prophenoloxidase

proPO system

Innate immunity

RNA interference

### ABSTRACT

Phenoloxidase (PO) plays an important role in arthropod melanization. Previously, a prophenoloxidase (*PmproPO1*) gene was cloned and characterized from the hemocytes of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In the present study, we report a novel proPO gene (*PmproPO2*) belonging to the proPO family identified from the *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotec.or.th>). The full-length sequence of *PmproPO2* consists of 2513 bp encoding a predicted 689 amino acid residues with a calculated molecular mass and pI of 79.21 kDa and 6.69, respectively. It is predicted to possess all the expected features of proPO members, including two putative tyrosinase copper-binding motifs with six histidine residues and a thiol ester-like motif, sharing 67% amino acid sequence identity with *PmproPO1*. Tissue distribution analyses revealed that the two proPO genes are primarily expressed in the hemocyte. Gene silencing of either *PmproPO1* or *PmproPO2* or both by RNA interference (RNAi) resulted in a significant decrease in the respective endogenous proPO mRNA level in hemocytes and a reduction of total PO enzyme activity by 75, 73 and 88%, respectively. Experimental infection of *P. monodon* with the pathogenic bacterium, *Vibrio harveyi*, revealed that *PmproPO* silenced shrimps were more susceptible to bacterial infection than the control GFP injected shrimps, and suggesting that the two proPOs are important components in the shrimp immune defense.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The prophenoloxidase-activating system (proPO-activating system) is an important non-self recognition system in arthropods [1]. The proPO cascade is activated upon recognition of microbial cell wall components, such as peptidoglycan (PGN),  $\beta$ -1,3-glucan or lipopolysaccharide (LPS), and leads to the limited proteolysis of proPO to the active PO which catalyzes the formation of melanin [1,2]. Active PO can catalyze oxidation of phenol to quinone, which can convert to form the melanin around invading pathogens. During proPO activation (melanization cascade), highly reactive and toxic quinone intermediates are produced. Thus, it is of no surprise that PO activity is tightly regulated by specific proteinases and proteinase inhibitors to prevent excessive production of these toxic substances [1,3,4]. PO is also important for cuticle sclerotization and wound healing process [3,5,6].

The invertebrate proPO gene was first purified and cloned from the freshwater signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* [7,8]. Subsequently, several proPO genes have been identified and cloned from a variety of arthropod species [9–30]. In most crustaceans, only one gene has been reported, whereas one or more proPO genes have been found in insect species [1]. However, the specific role(s) of several different proPOs in the defense mechanism has not yet been elucidated.

In several arthropods, it has been shown both *in vitro* and *in vivo* that the proPO-activating system affects pathogen survival [4,32]. More recently, dsRNA knockdown of a proPO gene in the crayfish, *P. leniusculus*, was reported to reduce the PO activity in hemolymph leading to increase mortality after infection with the pathogenic bacterium, *Aeromonas hydrophila*, suggesting a potentially important role for proPO in crayfish immunity [33].

In this study, a second and different proPO gene transcript was found to be present in the black tiger shrimp *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotec.or.th>) [34], and is a novel proPO gene which shows 67% amino acid sequence identity to other proPO gene already reported in *P. monodon* [13], and also found in this EST database. The two proPOs were further characterized for

\* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5414.

E-mail address: [anchalee.k@chula.ac.th](mailto:anchalee.k@chula.ac.th) (A. Tassanakajon).

**Table 1**

Primer sequences used for amplification of proPO genes.

| Primer          | Sequence (5'–3')                                  | Purpose |
|-----------------|---------------------------------------------------|---------|
| PO2-R1          | 5'CCCAGTTTGACGGGACACTTAACCATTC3'                  | 5'-RACE |
| PO2-R2          | 5'AAGACTGCATCACAGAAAACGGACCCCA3'                  | 5'-RACE |
| PO2-F1          | 5'CCGGTCAATCTCTCGGCCAGAGTGCA3'                    | 3'-RACE |
| PO2-F2          | 5'CGCAGACTATGCACGCCTCGATAACGCT3'                  | 3'-RACE |
| PO1RT-F         | 5'GGTCTTCCCCTCCGCTTCG3'                           | RT-PCR  |
| PO1RT-R         | 5'GCGCAGGTCTTTGGCAGC3'                            | RT-PCR  |
| PO2RT-F         | 5'GCCAAGGGGAACGGGTGATG3'                          | RT-PCR  |
| PO2RT-R         | 5'TCCCTCATGGCGGTGAGGT3'                           | RT-PCR  |
| PO1i-F          | 5'CACCCTGAGAGCTCCCACTT3'                          | RNAi    |
| PO1i-R          | 5'GAGATCCTGCAGTGAACGT3'                           | RNAi    |
| PO1i7-F         | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCACCCTGAGAGCTCCCACTT3' | RNAi    |
| PO1i7-R         | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCTGCAGTGAACGT3'  | RNAi    |
| PO2i-F          | 5'CGTCTTCTCGGCCGCTCCT3'                           | RNAi    |
| PO2i-R          | 5'CCACGGGGATACCGTGCCA3'                           | RNAi    |
| PO2i7-F         | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTCTTCTCGGCCGCTCCT3'  | RNAi    |
| PO2i7-R         | 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCACGGGGATACCGTGCCA3'  | RNAi    |
| GFP-F           | 5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3'                          | RNAi    |
| GFP-R           | 5'TTACTTGTACAGCTCGTCCA3'                          | RNAi    |
| GFPT7-F         | 5'TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3'       | RNAi    |
| GFPT7-R         | 5'TAATACGACTCACTATAGGTTACTGTACAGCTCGTCCA3'        | RNAi    |
| EF1 $\alpha$ -F | 5'GGTGTCTGGACAAGCTGAAGGC3'                        | RT-PCR  |
| EF1 $\alpha$ -R | 5'CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG3'                     | RT-PCR  |

their gene expression profiles and potential role in the shrimp immune defense. Gene silencing of each and both of the two *PmproPOs* was performed using double-stranded RNA (dsRNA) mediated RNA interference (RNAi), with the efficiency of gene knockdown determined at the transcript level by semi-quantitative RT-PCR. The proPO-silenced shrimps were then assayed for total PO enzymic activity and susceptibility to challenge by injection with the pathogenic bacterium, *V. harveyi*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

Juvenile shrimps were purchased from a commercially cultured *P. monodon* shrimp farm in Thailand and reared in laboratory tanks with sea water (20 ppt) for 7 days before processing to allow acclimatization. Shrimp tissues (gills, lymphoid organ, hepatopancreas, intestine and heart) were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. Hemocytes were isolated from hemolymph by centrifugation at 800 g for 10 min at 4 °C. A hemocyte pellet was resuspended in 200  $\mu$ l of TRI REAGENT<sup>®</sup> (Molecular Research Center, USA).

### 2.2. Total RNA and cDNA synthesis

The samples were homogenized in TRI REAGENT<sup>®</sup> and total RNA was extracted according to the manufacturer's instruction. Total RNA was incubated with RNase-free DNase I (Promega, USA) to remove contaminating genomic DNA before being reverse transcribed into cDNA using oligo (dT)<sub>15</sub> primers with the ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase System kit (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol. The synthesized cDNA was stored at –80 °C.

### 2.3. Rapid amplification of cDNA End (RACE)-PCR

Nucleotide sequences encoding the prophenoloxidase (proPO) were retrieved from the *P. monodon* EST database deposited at <http://pmonodon.biotec.or.th> [34]. After clustering analysis, two clusters were found; one is identical to known proPO of *P. monodon* (*PmproPO1*), and another is a contig composing of nine ESTs that

showed a high nucleotide sequence similarity (*e*-value of  $1 \times 10^{-90}$ ) with the already annotated and known proPO (*PmproPO1*) of *P. monodon* (AF099741) in the NCBI GenBank database. From this contig sequence (named *PmproPO2*), four internal gene-specific primers (GSPs), PO2-R1 and PO2-R2 for 5'-RACE and PO2-F1, PO2-F2 for 3'-RACE (Table 1) were designed for rapid amplification of cDNA ends (RACE) to determine the full-length cDNA sequence. Total RNA isolated from the hemocytes of *P. monodon* (2  $\mu$ g) was used to prepare 5'- and 3'-RACE cDNAs using the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed using the Advantage 2 PCR kit (Clontech, USA) and touchdown PCR as described in Amparyup et al. [35]. After agarose gel electrophoresis, RACE-PCR products were recovered from the gel and cloned into pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega, USA). Three recombinant plasmids were sequenced in both directions. Internal sequencing primers were subsequently designed and used for sequencing along the entire length of the insert (Macrogen Inc., Korea).

### 2.4. Tissue distribution analysis

The mRNA expression of *PmproPO1* and *PmproPO2* in different tissues was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. Gene-specific primers for *PmproPO1* (PO1RT-F and PO1RT-R) and *PmproPO2* (PO2RT-F and PO2RT-R) were designed from *P. monodon* proPO (AF099741) which had the same nucleotide sequences as *PmproPO1* obtained from this study, and from *PmproPO2* the novel new homolog (Table 1). Elongation factor1- $\alpha$  gene (EF1- $\alpha$ ) was used as internal control to monitor the amount of RNA/cDNA PCR template and amplification efficiency between samples. Total RNA from the tissues of hemocytes, gills, hepatopancreas, intestines and heart was extracted from *P. monodon*. The RT-PCR reaction (25  $\mu$ l final volume) was performed first at 94 °C for 3 min for denaturation, followed by 25 cycles of amplification (denaturing for 30 s at 94 °C, annealing for 30 s at 55 °C and extension for 30 s at 72 °C). The final extension was performed at 72 °C for 5 min. Eight microlitres of the RT-PCR product was electrophoretically resolved through a 1.8% (w/v) agarose gel and visualized by UV-transillumination after ethidium bromide staining.

### 2.5. Preparation of double-stranded RNA (dsRNA)

To prepare double-stranded RNAs (dsRNAs) specifically targeted to *PmproPO1* and *PmproPO2*, DNA fragments of *PmproPO1* (280 bp) and *PmproPO2* (279 bp) genes were amplified by PCR using specific primers (PO1i-F and PO1i-R for *PmproPO1* and PO2i-F and PO2i-R for *PmproPO2*), designed by Primer Premier 5 program (Table 1). *In vitro* transcription using T7 RNA polymerase was performed to produce sense and anti-sense RNA strands. The sense and anti-sense DNA templates containing the T7 promoter sequence at the 5'-end on each different strand were generated by PCR using oligonucleotide primers containing the T7 promoter RNA polymerase recognition sequence at the 5'-end (PO1iT7-F and PO1iT7-R for *PmproPO1* and PO2iT7-F and PO2iT7-R for *PmproPO2*) (Table 1). For a negative dsRNA control, DNA template amplification was performed on the green fluorescent protein (GFP) gene of pEGFP-1 vector (Clontech, USA) using GFPT7-F and GFP-R (Table 1) for the sense strand template, the other with GFP-F and GFPT7-R (Table 1) for the anti-sense strand template. The T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega, USA) was used to synthesize RNA by *in vitro* transcription according to the manufacturer's protocol. The quality of double-stranded RNAs was verified by agarose gel electrophoresis and quantified by using UV spectrophotometer.

### 2.6. Injection of dsRNA into shrimp

The dsRNAs were injected into juvenile shrimps ( $2 \pm 0.2$  g, fresh weight) by using 0.5-ml insulin syringes with 29-gauge needle. Approximately 5 µg of *PmproPO1*, *PmproPO2* or control GFP dsRNAs dissolved in 25 µl of injection buffer (150 mM NaCl) was intramuscularly injected into the third abdominal segment of each shrimp. Control shrimps were injected with injection buffer only. The injection of dsRNA was repeated together with 20 µg of the lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* 0111:B5 (Sigma) and laminarin ( $\beta$ -1,3-glucan chain with some  $\beta$ -1,6-linked glucose units) (Sigma) at 24 h after the first dsRNA injection. Thereafter, injected shrimps were reared for 48 h after the second dsRNA injection.

### 2.7. Measurement of *PmproPO1* and *PmproPO2* transcripts after dsRNA injection

Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed to monitor the expression of *PmproPO1* and *PmproPO2* transcript levels in the RNA interference experimental and control groups. The hemolymph was withdrawn from two individual shrimps at 48 h after the second injection of either dsRNAs or buffer and total RNA was extracted from the isolated hemocytes using NucleoSpin® RNAII (MACHEREY-NAGEL) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from total RNA using the ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA) and oligo(dT)<sub>15</sub> primer, as described by the manufacturer's instructions. RT-PCR was carried out to monitor the effect of dsRNA or buffer injections on the level of transcripts by using gene-specific primers. A pair of EF1- $\alpha$  gene primers was used as an internal control to monitor equal loading of cDNA for analysis of transcript levels. One microlitre of the first strand cDNA was subjected to PCR in a 25 µl reaction volume containing 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM of each dNTP, 0.2 µM of each specific primers and 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, USA). The thermal cycling conditions were: 94 °C for 1 min, followed by 25 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and 72 °C for 5 min. The PCR product was analyzed by agarose gel electrophoresis.

### 2.8. Assay of hemolymph phenoloxidase (PO) activity

Hemolymph was withdrawn without the use of any anti-coagulant from the ventral sinus of experimental shrimps at 48 h after the second dsRNA injection. Protein concentration was measured using a Bradford protein assay kit (Bio-Rad). Hemolymph PO activity was detected using L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) dissolved in water according to Liu et al. [33]. Briefly, 2 mg of total hemolymph proteins in 435 µl of Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) were mixed with 65 µl of freshly prepared L-dopa (3 mg/ml in water) (Fluka). After incubation at room temperature for 30 min, 500 µl of 10% (v/v) acetic acid was added to the mixtures and PO activity was measured by monitoring the absorbance at 490 nm. PO activity was recorded as  $\Delta A_{490}$  per mg total protein/min. Control samples were prepared using distilled water instead of shrimp hemolymph.

### 2.9. Cumulative mortality assay

Pathogenic Gram-negative bacteria, *V. harveyi* 639 was picked with a sterile loop, streaked out on a sterile TSA (tryptic soy agar) plate and grown for 18 h at 30 °C. A single colony was picked and resuspended in TSB (tryptic soy broth) medium overnight at 30 °C. The bacterial concentration was established by estimating the optical density (OD) at 600 nm using spectrophotometer. A bacterial suspension ( $2 \times 10^5$  colony forming units, CFUs) was chosen as the injection dose for mortality assays based on prior LD<sub>50</sub> test results (data not shown). Unfortunately, as small sizes (~2 g) of the specific pathogen-free (SPF) shrimp are not available, larger sizes of SPF shrimps (~10 g) were used in mortality experiment with higher amount of dsRNA (20 µg). SPF *P. monodon* were individually injected with 20 µg of dsRNAs of *PmproPO1* and *PmproPO2* in 30 µl volume. Injection of GFP dsRNA was included as a sequence-independent dsRNA control. Control shrimp were injected with the same volume of saline solution (150 mM NaCl) at an equivalent dilution. Twenty-four hours after the first dsRNA injection, shrimps were injected with 25 µl of saline solution containing 20 µg of dsRNA and *V. harveyi* ( $2 \times 10^5$  CFUs). Cumulative mortality rate was recorded from after 3 h post-*V. harveyi* challenge for 5 days. The experiment was performed in triplicate with 10 healthy shrimps each. Statistical analysis of the mortality test was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test.

### 2.10. Sequence and phylogenetic analysis

Similarity searches of DNA and deduced amino acid sequence were performed using the BLASTX program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Putative signal peptide was predicted by SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The deduced amino acid sequences were analyzed with the Genetyx program and the protein domain features were predicted by the Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Multiple-sequence alignment was performed using the CLUSTAL W program and phylogenetic analysis performed by neighbor-joining distance analysis with sequence divergence calculations being based on the Kimura two parameter method using Prodist. Bootstrapped neighbor-joining trees were constructed using Neighbor and Consense with bootstrap analysis performed using Seqboot (1000 replicates). All phylogenetic programs are routine in PHYLIP [36]. Phylogenetic trees are illustrated using TREEVIEW (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.html>).

|                              |                                                                         |     |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>PmproPO2</i>              | -----MEKNQKNLLYLFELPYDLISLPRSGGKIHFDELDASRPVVTTLRG                      | 47  |
| <i>LvproPO2</i>              | -----MDKSRKNLLYLFELPHDPISLPRGGGKIHFDELDLSRPPVATRLG                      | 47  |
| <i>LvproPO1</i>              | -----MANDQQRLLYLFELPQEQIQTTPRGGSVQFKLENDSS-PPSVATRVG                    | 46  |
| <i>PmproPO1</i>              | -----MANDQQRLLYLFELPQEDIQAPRGGSVLFKLESDEA-PPSVATRVG                     | 46  |
| <i>MjproPO</i>               | -----MNI EQQLLYLFELPQEPLNRPKGSVLFVLENDT-PLLVTTTIA                       | 46  |
| <i>PlproPO</i>               | MQVTQKLLRRDTEMAQAQQLLYLFERPYDIPINAPRADGSFLYAVAG-ATVATRFG----            | 55  |
| <i>HgproPO</i>               | -----MSEAQS-LLSLFEKPYSDVTTFRANESMAFELEERPVVPRVG----                     | 42  |
| <i>SsproPO</i>               | -----MDSEQQVLDMLQRPFR-LPTQRESHPIVFEVGTTRVG-----                         | 36  |
| <i>PmproPO2</i>              | SGIPVETTLVPD <b>R</b> GDILSKLGTATSVPLGSPFSFFIKTHRQAAKELCDFFMETKNAEDL    | 107 |
| <i>LvproPO2</i>              | GGVPVETTPVPDREDALPQNLTAAASVPIGSPFSFFIKSHRQAAKDLCDVFMRTKGAEDL            | 107 |
| <i>LvproPO1</i>              | L-SPSVSVVPVKDVALQDLGTATSI PMGSASFSSFLASHRRRAARDLCNVFMKTNGAEDL           | 105 |
| <i>PmproPO1</i>              | V-SPSVNLVPVKDVTQLDGTATSV PKGSASFSSFIASHRKAARDLCDFFMKTSGAEDL             | 105 |
| <i>MjproPO</i>               | G-SPSIKLQVPERNDVALQDLGTATSIPIGSASFSSFLASHRRRAAKDLCDVFMKTSGAKDL          | 105 |
| <i>PlproPO</i>               | -VAPTSTVTVPARPDADRRLLGRAPSVPRGAVSFFIRSHREAARDLCVLMKTQNSTDL              | 114 |
| <i>HgproPO</i>               | -AGP--TITLPRRPDADPSKLGTATVPRGSASFSSVSTHRRRAAKDLCDAFMKTGTGVQDL           | 99  |
| <i>SsproPO</i>               | -----GSEPPQRLTRARSIPRGTVFSIFVKSHRLAAKELCDYFMEASSVQEL                    | 84  |
| <i>PmproPO2</i>              | LQVAARVHGHV <b>NET</b> LFVYALSFVMLRKKELQNSRLPSIIEVFPKFIHQEQLMKAQLEVN    | 167 |
| <i>LvproPO2</i>              | LQVAARVHGVNETLFIYALSFVILRKKELRNRLPSIIEVFPKGLIPQEQLMKAQLEVN              | 167 |
| <i>LvproPO1</i>              | MQVAARVHGVNETLFIYALSFVILRKKELHSVRLPTMVEVFP SRFPVQEALSRAQLQVN            | 165 |
| <i>PmproPO1</i>              | MQVAARVHGVNETLFIYALSFVILRKKELRSVRLPTMVEVFP SRFPVQEALSRAQLQIN            | 165 |
| <i>MjproPO</i>               | MEVAARVHGHVNESLFIYALSFVILRKKELQSVRLPSFVEVFP SRFPVQETLAKAQIRIN           | 165 |
| <i>PlproPO</i>               | MQLAASVRRHVNETLFIYALSFVILRKKELRGVRLPPILEVFPKFIIPMEDLTSMQVEVN            | 174 |
| <i>HgproPO</i>               | VQFAARVKDVNESLFIYSLSFVILHKKELRNRLPSLVEVFPQKFPVVEHLIKSQQEAV              | 159 |
| <i>SsproPO</i>               | RQRVEEVRLVNEKLFIFALSFVILVRKPEMRHLRLPSIVEIFPCMFVPVTTVSEMEQEAR            | 144 |
| <b>Copper-A binding site</b> |                                                                         |     |
| <i>PmproPO2</i>              | RADP <b>NET</b> TPIVVEHGPESGTHLKPEHPLAYWREDYGIHAHHWHWHLLYPI DMNANNRK    | 227 |
| <i>LvproPO2</i>              | RTDPNQSEPVVVEHGLEFSGTHLKPEHRLAYWREDYGINAHHWHWHLLYPI DMGVNDRK            | 227 |
| <i>LvproPO1</i>              | RMDPNQSEAVII EHGPEFSGSPVKPEHRVSYWREDYGINVHHWHWHLLYPI PPGMGVDRDRK        | 225 |
| <i>PmproPO1</i>              | RMDPNQTEPVIIEHGPEFSGTHLKPEHRISYWREDYGINVHHWHWHLLYPI PAMGFDRDRK          | 225 |
| <i>MjproPO</i>               | RMDPNQREPVIIEHGPEFSGTHLKPEHRLSYWREDYGLSVHHWHWHLLYPI PVMGVDRDRK          | 225 |
| <i>PlproPO</i>               | RTPTATTPLVIEYGPFAFANTNQAEHRVSYWREDYGINSHHWHWHLLYPI EMNVRNDRK            | 234 |
| <i>HgproPO</i>               | RRDNEETPIVIEHGPDFSNTIKPEHRVAYWREDYGMNVHHWHWHLLYPI EMNLRNDRK             | 219 |
| <i>SsproPO</i>               | KSTPDQ-EIVVTEYGPESSTHLKPEHRVAYWREDYGINSHHWHWHLLYPI PVDLGVMDRDRK         | 203 |
| <i>PmproPO2</i>              | GKLSYYMHQKIPRYD MERLCLGLPRVQKLQNWKA PIKNGYFPKLT <b>NNS</b> GRVWGSQRQD   | 287 |
| <i>LvproPO2</i>              | GELFFYYMHQMVARYD MERLSLGLPRVQKLENWRAP IEDGYFPKLT VNNSGRAWGSQRQD         | 287 |
| <i>LvproPO1</i>              | GELFFYYMHQIIARYD MERLSLGLPRVQKLDNWRVPIEDGYFPKLT VNNSGRAWGSQRQD          | 285 |
| <i>PmproPO1</i>              | GELFFYYMHQVIARYD IERLCLGLPKVEKLDNWRIP IEDGYFPKMTVSI SGRNWGSQRQD         | 285 |
| <i>MjproPO</i>               | GELFFYYMHQLIARYD LERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFPKLT ISNTGRAWGTQRQD          | 285 |
| <i>PlproPO</i>               | GELFFYYMHQMVARYD WERLSVNLNRVEKLENWRVPI PDGYFSKLTANNSGRPWGTRQD           | 294 |
| <i>HgproPO</i>               | GEIFFYYMHQMIARYD MERLSVGLRRVEKLENWRIPV PDGYFSKLT VNNSGRAWGTQRQD         | 279 |
| <i>SsproPO</i>               | GELFFYYMHQMLARYD MDRLSVGLNRVQKLSNWRIP I PDGYFPKLT INNAGQTWGSQRQD        | 263 |
| <i>PmproPO2</i>              | TTMQDFQRNDFNLDFFDLTHLEIWRSRIFHAIHQGF MIDRQGERVMLSDDVTS-GKRGID           | 346 |
| <i>LvproPO2</i>              | TVMQDFLRNDFGLDFTDVTDL EIWRSRLFDAI HQGF MIDRAGKRVVLSDDVTS-GKRGID         | 346 |
| <i>LvproPO1</i>              | TLPKDFRRTEIG-DPVDITDLEIWRARLLGAIHQGYMVDNRGDKVPLRDDVTS-GKRGID            | 343 |
| <i>PmproPO1</i>              | TLPKDLRRREL G-EFVDITDMEIWRSRLLDAI HQGF MIDRNGDKVPLRDDVTS-GKRGID         | 343 |
| <i>MjproPO</i>               | TLPKDFRRREIG-EFVDITDLEIWRSRLLDAI HQGF MVDKGNKVP IRRDDVTS-GQRGID         | 343 |
| <i>PlproPO</i>               | TFIKDFRRNDAGLDFIDISDMEIWRSRLLMDAI HQGYMLNRNGERVPLSDNVTT-GKRGID          | 353 |
| <i>HgproPO</i>               | TFLKDFRRNDFGLQPLDITELEVRSRLDAI HQGYMKNPNGDTIPLSDDVTS-GKRGID             | 338 |
| <i>SsproPO</i>               | SLVQDYRREDFGLLFFDVSELEQWHSRIMDAI HQGYLVHDGNTQRLTDNVKPEKRGID             | 323 |
| <b>Copper-B binding site</b> |                                                                         |     |
| <i>PmproPO2</i>              | ILGDAL EADS <b>NLS</b> VNFPYQGLHNMGHVLI AFSDHDPDFAHKEDMAVVGDTSTAMRDPVVF | 406 |
| <i>LvproPO2</i>              | ILGDAL EADSNLSVNFPYQGLHNMGHVLI AFSDHDPDFAHKEEMAVVGDTSTAMRDPVVF          | 406 |
| <i>LvproPO1</i>              | ILADAL EADADHSVNFPYQGLHNI GHDLAFSDHDPD NAHKEEMGVVGLGTSLRDPVVF           | 403 |
| <i>PmproPO1</i>              | ILSEAL EADAELSVNFPYQGLHNRGHDLAFSDHDPD NAHKEEMGVVGLGTSLRDPVVF            | 403 |
| <i>MjproPO</i>               | ILAEAL EADEDLINYPFYGLHNF GHDLAFSDHDPD NAHKEEMGVMDGTATAMRDPVVF           | 403 |
| <i>PlproPO</i>               | ILGDAL EADAQLSPNYLFYQGLHNTGHVLLAFCHDNDNSHREEIGVMGDSATLRDPVVF            | 413 |
| <i>HgproPO</i>               | ILGDTL EADADLSPHYQFYGLHNMHSHVLISFSHDNDNAHKEELGVMDGPATSMRDPVVF           | 398 |
| <i>SsproPO</i>               | LLGDTL EADSSISLNSLFYQGLHNMGHVVISAIHDPDYAHRENLGVMSDTATAMRDPVVF           | 383 |
| <i>PmproPO2</i>              | RWHKFVDDTFQ EYKLMQRPYTEEL <b>NLS</b> GVKIERAGVVRNNEANILHTGWNTRLFEASRG   | 466 |
| <i>LvproPO2</i>              | RWHKFVDDTFQ EYKLMQRPYTEQLNLGAVKIERAGVVRNNEADVLTGWNTRLFEASRG             | 466 |
| <i>LvproPO1</i>              | RLHKLVDLDFQ EYKLTQPPYKEELFLPGVRIERAGVVRDDEADVLTGWNTRFEASRG              | 463 |
| <i>PmproPO1</i>              | RLHKLVDLDFQ EYKLTQPPYTEELFLPGVRIERAGVVRGNEADVLTGWNTRFEASRG              | 463 |
| <i>MjproPO</i>               | RWHKFVDDTFQ EYKLMQRPYTEELNFSGVKIEKVGVRNNEADILHTGWNKRGEASRG              | 463 |
| <i>PlproPO</i>               | RWHKFVDDIFQ EYKLTQPPYTMEDLSLPGVVLKVGVRNDQNLTLTGWSTREFEASRG              | 473 |
| <i>HgproPO</i>               | RLHKFVDDVFQ AYKLTQRPYTMEDLSMPGVVVNVSVTSKREINKLTGWNSTREFEASRG            | 458 |
| <i>SsproPO</i>               | RWHKYIDDFQ EYKVIQPPYTEELSLSSVEVSVAVESQGQKNQLITGWSTREFEASRG              | 443 |

**Fig. 1.** Multiple amino acid sequence alignment of *Penaeus monodon* proPO2 (*PmproPO2*: FJ025814) with that of other crustacean proPOs: *P. monodon* proPO1 (*Pm proPO1*: AF099741); *Litopenaeus vannamei* proPO1 (*LvproPO1*: ABX76968), *L. vannamei* proPO2 (*LvproPO2*: ABQ45957); *Marsupenaeus japonicus* (*MjproPO*: AB073223); *Pacifastacus leniusculus* (*PlproPO*: X83494); *Homarus gammarus* (*HgproPO*: AJ581662) and *Scylla serrata* (*SsproPO*: DQ435606). Identical amino acid residues are grey shaded. The filled

|                               |                                                               |     |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----|
| <i>PmproPO2</i>               | LDENG-RSVMVRLTHLDHEPFNYHLQVNSG--KGIKDVTVRVFLAPKFNARSQEMTFME   | 523 |
| <i>LvproPO2</i>               | LDENG-RPVMVRLTHLDHEPFNYHLQVNSG--RGVKEVTVRVFLAPKLNARGQEMSFME   | 523 |
| <i>LvproPO1</i>               | IDENG-RPVILRLTHLDHKPFYDHIQINNDL--REPKEVTVRIYLAPKFNARGQEMNFME  | 520 |
| <i>PmproPO1</i>               | LDENG-KPVILRLTHLDNKPFYDHIQINNDL--REPKEVTVRIYLAPKFGDREKEMDFME  | 520 |
| <i>MjproPO</i>                | LDENG-RPVVLVELKHLDEHPNYHLQLNNRG--RTAKEVTVRVFLAPKFNARGLKMFME   | 520 |
| <i>PlproPO</i>                | LDENSPNPVTA--HYPSRPTLHLPSDNDKQHRKPKSVTVRIYMAPKHNERGLEMGFME    | 530 |
| <i>HgproPO</i>                | IDENSPNPVILRLTHLDVFPNYHIEVTNTE--PKPKVTVRIFLAPKHNGSGAEMPME     | 516 |
| <i>SsproPO</i>                | LDENADKPMVRLTHLNHHPFVYSIKLQAANSGLPKVTVRIFMAPKLNERNVEMSFME     | 503 |
| <i>PmproPO2</i>               | QRILWAEMDKFTVSLKPGSN--HVVRSSRDSSITNTEELTFRDLENF--NIDPASPATTP  | 579 |
| <i>LvproPO2</i>               | QRILWAEMDKFTVSLKPGSN--HVVRSSKSSITNTEELTFRDLENA--NIDPASPEATG   | 579 |
| <i>LvproPO1</i>               | QRILWCELDKFTVHLKPGTN--HVVRSSKSSITNTEELTFKDLNS--GPGNSS-EQSA    | 575 |
| <i>PmproPO1</i>               | QRILWAEMDKFTVLLKPGQEHVTRSSKSSITNTEELTFKDLNS--GPGNTS-EQDA      | 577 |
| <i>MjproPO</i>                | QRILWAEMDKFTVSLKPGGN--HVVRTSKSSITNTEELTFRDLENS--GTDPASPEATA   | 576 |
| <i>PlproPO</i>                | QRLLWAEMDKFTQDLKPGQN--QIVRASNLSSITNPSGYTFRSLEAVN--PANPGPPANAE | 587 |
| <i>HgproPO</i>                | QRILWTEMDKFNHTLNPGKN--QIVRSSKSSITNPTDITFRDLDSK--PMTSETEA-TE   | 571 |
| <i>SsproPO</i>                | QRLLWAEMDRFTHDLKPGLN--HILRSSTSSITNSNEFTFRDLEERPNDNPGAPENTL    | 561 |
| <b>Thiol ester-like motif</b> |                                                               |     |
| <i>PmproPO2</i>               | FNFCGCGWPQHMLLPRGRPEGMAFQLFFMPTDYAQDKVVQE-ATRCANGVSFCGIQDAK   | 638 |
| <i>LvproPO2</i>               | FNFCGCGWPQHMLLPRGRPEGMPFQLFFMPTDYAQDKVTQP-AARGCANGVSFCGIQDAK  | 638 |
| <i>LvproPO1</i>               | FNFCGCGWPQHMLLPRGRPEGMAFQLFFMPTDYAKDKVSNPGGVRRANGVSFCGMQDAK   | 635 |
| <i>PmproPO1</i>               | FNFCGCGWPQHMLLPRGRPEGMVFLFFMPTDYAQDKVSNPGGVRRANGVSFCGMQDAK    | 637 |
| <i>MjproPO</i>                | FNFCGCGWPQHMLLPRGRPEGMAFQLFFMPTDYAIDKVTQP-AARSCPNVSFCGIQDAK   | 635 |
| <i>PlproPO</i>                | TNFCGCGWPEHLLPRGKPEGMTYQLFFMPTDLEKDQVDQAGPRRCANAVSFCGILDSK    | 647 |
| <i>HgproPO</i>                | FDFCGCGWPQHMLLPRGKPEGMAFQLFYMITDFEKDKVEQAQGARSCANAVSFCGVLDK   | 631 |
| <i>SsproPO</i>                | FNFCGCGWPQHMLLPRGKQEGMPFELFVMVTDWNQDKVAQPDGACSCSAASFCGILDAL   | 621 |
| <i>PmproPO2</i>               | YPDTRAMGFPFDRRPVNVLLGQSVNTAADYARLDNAYIHDSIKFLAEKLN-----       | 689 |
| <i>LvproPO2</i>               | YPDTRPMGFPFDRRPPTLLDQPVNTAADYARLENAFIHEISIKFLAERLNRD-----     | 691 |
| <i>LvproPO1</i>               | YPDARPMGFPFDRRPAPTLLQGLPVNTTADYARLGNAMHDVTIKFLGDKLN-----      | 686 |
| <i>PmproPO1</i>               | YPDARPMGFPFDRRPAPLLQGLPVNTTADYARLGNAMHDITIKFLGEKLN-----       | 688 |
| <i>MjproPO</i>                | YPDTRPMGFPFDRRPVPMILNRPVEDAADYARLDNAYIHDSIKFLADELKLN-----     | 688 |
| <i>PlproPO</i>                | FDPKRPMPGFPFDRRPVRLQDAEVTSAADYARLSNMTVQDITITFLTTASRSRHDGPI    | 705 |
| <i>HgproPO</i>                | FPSDRPMGFPFDRRPVVLVDAGVLTADYARLDNIMQDVTITFLADKLK-----         | 683 |
| <i>SsproPO</i>                | YPDARPMGFPFDRRPVPMMLNRPVGRASDLTRLNIAQDITITFTNAQITQ-----       | 673 |

Fig. 1. (Continued).

Table 2

Characteristics of the *P. monodon* *PmproPO1* and *PmproPO2* cDNA transcripts and predicted protein products.

|                                     | <i>PmproPO1</i>                                                                                                  | <i>PmproPO2</i>                                                                                                  |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Accession no.                       | AF099741                                                                                                         | FJ025814                                                                                                         |
| Completed coding sequence           | 2067 bp                                                                                                          | 2070 bp                                                                                                          |
| Predicted protein                   | 688 aa                                                                                                           | 689 aa                                                                                                           |
| Molecular weight                    | 78.67 kDa                                                                                                        | 79.21 kDa                                                                                                        |
| Isoelectric point (pI)              | 5.8                                                                                                              | 6.69                                                                                                             |
| Predicted proteolytic cleavage site | Between Arg44 and Val45                                                                                          | Between Arg45 and Leu46                                                                                          |
| Putative N-glycosylation            | Four sites [117 (NET), 170 (NQT), 571 (NTS) and 662 (NTT)]                                                       | Five sites [119 (NET), 172 (NET), 275 (NNS), 357 (NIS) and 432 (NLS)]                                            |
| Thiol ester-like motif              | GCGWPQHML                                                                                                        | GCGWPQHML                                                                                                        |
| Copper-binding site                 | Copper-binding site A (3 conserved histidine residues)<br>Copper-binding site B (3 conserved histidine residues) | Copper-binding site A (3 conserved histidine residues)<br>Copper-binding site B (3 conserved histidine residues) |

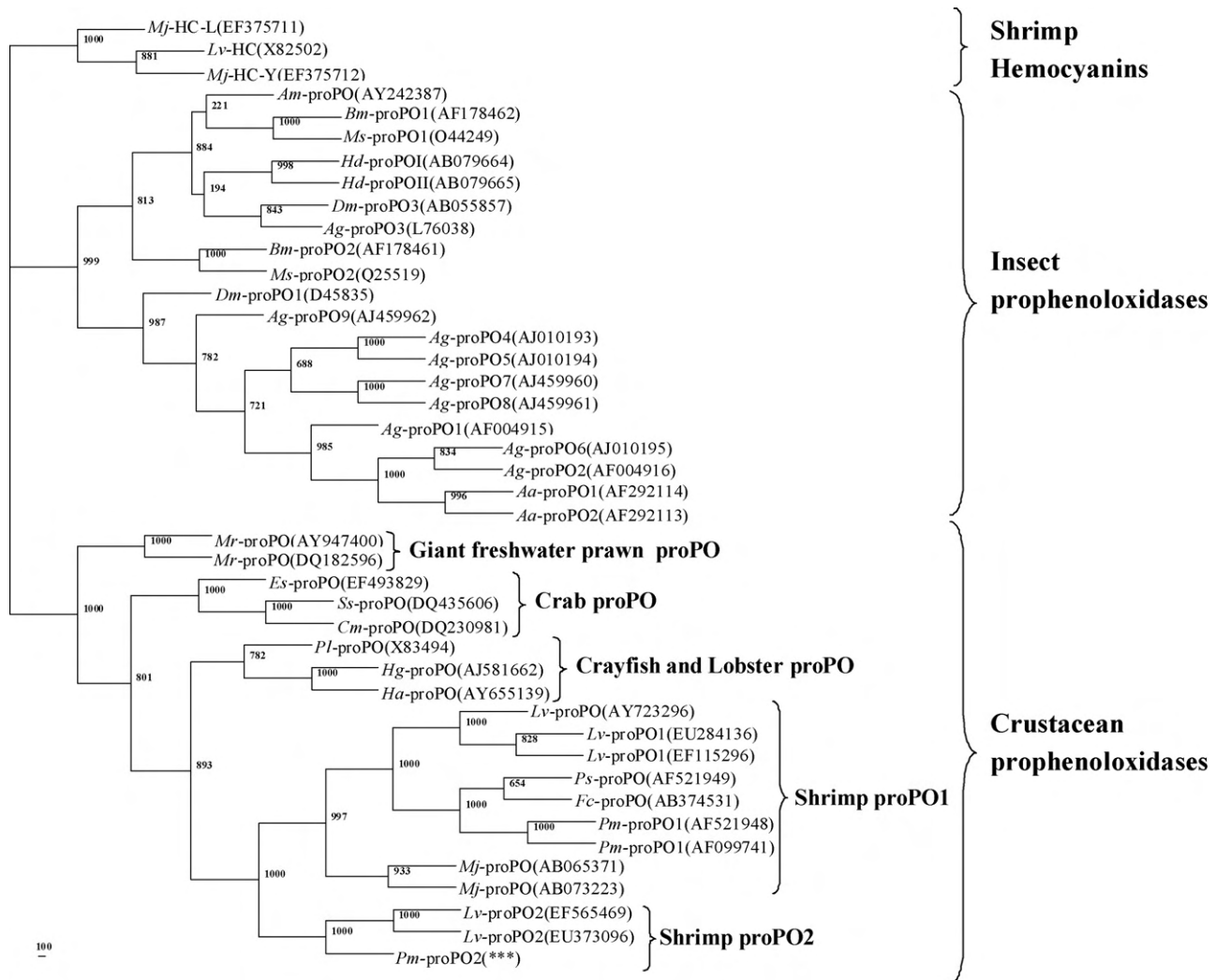
### 3. Results

#### 3.1. *proPO* genes in *Penaeus monodon*

From the *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotech.or.th>) [34], we identified two distinct homologous genes (*PmproPO1* and *PmproPO2*) which showed high amino acid sequence similarity to crustacean *proPO* sequences. Sequence comparison revealed that *PmproPO1* is the same sequence and thus most likely the same gene as that previously reported by Sritunyalucksana et al. [13], whilst *PmproPO2* is a novel *proPO*

gene. To obtain the full-length sequence of *PmproPO2*, 5' and 3' RACE were performed. The full-length cDNA of *PmproPO2* contained 2513 bp with a predicted 2070 bp open reading frame encoding 689 amino acids. The cDNA contained a 5' untranslated (UTR) region of 113 bp and a 3' untranslated region of 330 bp, including a stop codon (TAA) and a poly (A) tail. No putative signal peptide was found at the N-terminus as analyzed by The SignalP software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The predicted molecular mass and pI for the mature protein were 79.21 kDa and 6.69, respectively (Table 2). The cDNA sequence has been submitted to the NCBI database (GenBank Accession FJ025814).

triangle represents the predicted cleavage site of the *PmproPO2* sequence. The two copper-binding sites (A and B) and the thiol ester-like motif are boxed. Black highlights indicate conserved histidine residues of two copper-binding sites (A and B). Putative N-linked glycosylation sites (NXS/T) of the *PmproPO2* are in bold and italicized. The RGD like motif of *PmproPO2* is in bold.



**Fig. 2.** Phylogenetic relationships of arthropod proPOs (crustaceans and insects) and shrimp hemocyanins (as out group) on the basis of the amino acid sequence using neighbor-joining distance analysis with K2P correction. Bootstrap values from 1000 replicates are indicated at the nodes. Crustacean proPOs: *P. monodon* (*Pm*-proPO2: FJ025814 and *Pm*-proPO1: AF521948 and AF099741); *P. semisulcatus* (*Ps*-proPO: AF521949); *Litopenaeus vannamei* (*Lv*-proPO1: EU284136, EF115296 and AY723296; *Lv*-proPO2: EF565469 and EU373096); *Marsupenaeus japonicus* (*Mj*-proPO: AB073223 and AB065371); *Fenneropenaeus chinensis* (*Fc*-proPO: AB374531); *Homarus americanus* (*Ha*-proPO: AY655139); *H. gammarus* (*Hg*-proPO: AJ581662); *Pacifastacus leniusculus* (*Pl*-proPO: X83494); *Scylla serrata* (*Ss*-proPO: DQ435606); *Eriocheir sinensis* (*Es*-proPO: EF493829); *Cancer magister* (*Cm*-proPO: DQ230981) and *Macrobrachium rosenbergii* (*Mr*-proPO: DQ182596 and AY947400). Insect proPOs: *Holotrichia diomphalia* (*Hd*-proPOI: AB079664 and *Hd*-proPOII: AB079665); *Bombyx mori* (*Bm*-proPO1: AF178462 and *Bm*-proPO2: AF178461); *Manduca sexta* (*Ms*-proPO1: O44249 and *Ms*-proPO2: Q25519); *Apis mellifera* (*Am*-proPO: AY242387); *Drosophila melanogaster* (*Dm*-proPO1: D45835 and *Dm*-proPO3: AB055857); *Aedes aegypti* (*Aa*-proPO1: AF292114 and *Aa*-proPO2: AF292113) and *Anopheles gambiae* (*Ag*-proPO1-9: AF004915, AF004916, L76038, AJ010193, AJ010194, AJ010195, AJ459960, AJ459961 and AJ459962, respectively). Shrimp hemocyanins: *L. vannamei* (*Lv*-HC: X82502) and *M. japonicus* (*Mj*-HC-L: EF375711 and *Mj*-HC-Y: EF375712).

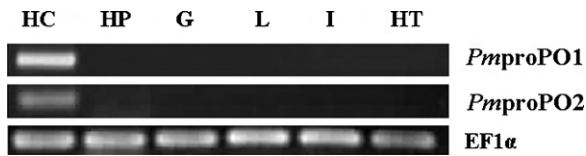
The proteolytic cleavage site of *Pm*proPO2 was predicted to be between Arg45 and Leu46 based on sequence comparison with the putative cleavage site of *Pm*proPO1 [13]. Cleavage at this site generates a putative active *Pm*proPO2 enzyme of 74.0 kDa. The highly conserved thiol ester motif (GCGWPQHM) was also present in *Pm*proPO2 at Gly584 to Met591. Six histidine residues, which are likely to be involved in copper-binding were present at conserved sites within the two annotated copper-binding sites, namely copper A (H209, H213 and H235) and copper B (H369, H373 and H409) (Fig. 1).

BLASTX analysis of *Pm*proPO2 showed a relevant sequence identity and similarity with proPO2 (84 and 91%) of *Litopenaeus vannamei* (EF565469 and EU373096), proPO (71 and 84%) of *Marsupenaeus japonicus* (BAB70485), proPO1 (67 and 81–82%) of *L. vannamei* (EU284136, EF115296 and AY723296), proPO (68 and 81%) of *Fenneropenaeus chinensis* (AB374531), proPO (68 and 80%) of *P. semisulcatus* (AF521949), proPO1 (67–68 and 81%) of *P.*

*monodon* (AF521948 and AF099741), proPO (64 and 80%) of *M. japonicus* (AB065371) and proPO (58 and 73%) of *Pacifastacus leniusculus* (X83494), respectively.

Amino acid sequence alignment revealed that *Pm*proPO2 exhibited 67% sequence identity with the already reported *P. monodon* proPO (AF099741). All of the copper-binding regions are highly conserved between them (67% and 72% identity for copper A and B, respectively) and the histidine residues and thiol ester motif are completely conserved (Fig. 1). However, some different characteristics between *Pm*proPO1 and *Pm*proPO2 were observed including putative proteolytic cleavage site and number of putative *N*-glycosylation sites as shown in Table 2. In addition, a potential adhesive motif RGD localized in the N-terminal part of *Pm*proPO2, which is similar to that found in *Anopheles gambiae* proPO6 [14], was observed (Fig. 1).

The evolutionary relationship between members of arthropod prophenoloxidases, constructed by the neighbor-joining distance



**Fig. 3.** Tissue distribution analysis of *PmproPO1* and *PmproPO2* of *Penaeus monodon* by RT-PCR approach: hemocytes (Hc); hepatopancreas (Hp); gill (G); lymphoid (L); intestine (I); heart (HT). EF1- $\alpha$  was used as a control housekeeping gene to indicate and standardize the amount of cDNA template in each RT-PCR reaction. A representative experiment of two independent experiments is shown.

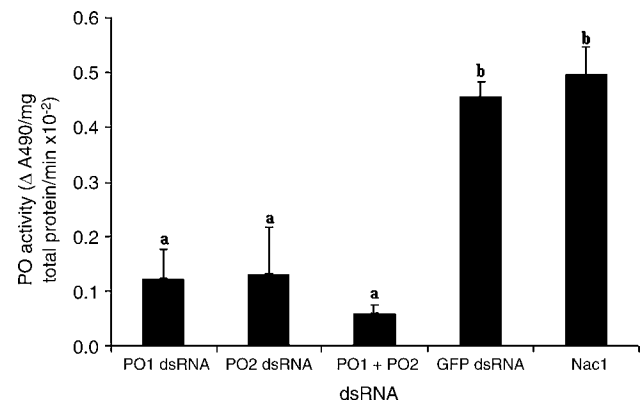
method using shrimp hemocyanins as the out group, is shown in Fig. 2. The phylogenetic analysis of the 40 proPO sequences resulted in a tree that forms three different groups composed of the (1) crustacean proPOs, (2) the insect proPOs, and (3) the shrimp hemocyanins (Fig. 2). The crustacean proPOs group can be further separated into four distinct and well-supported clades: (a) penaeid shrimp proPOs, (b) lobster and crayfish proPOs, (c) crab proPOs and (d) prawn proPOs. Finally, the shrimp proPOs clade was subdivided into two distinct groups that separate proPO2 from proPO1. *PmproPO2* belongs to the shrimp proPO subgroup and is more closely related to proPO2 of *L. vanamei* than proPO1 of *P. monodon* and *L. vanamei*. This strongly supports a common evolutionary lineage of shrimp proPOs leading to the two proPOs (proPO1 and proPO2).

### 3.2. Expression analysis of *PmproPO1* and *PmproPO2* mRNA in different tissues

RNA was extracted from hemocyte, hepatopancreas, gill, lymphoid organ, intestine, and the heart of normal shrimps and the levels of *PmproPO1* and *PmproPO2* transcripts were assessed using semi-quantitative RT-PCR. The amplification reaction yielded a single amplicon of either 443 or 226 bp of gene-specific cDNA fragments for *PmproPO1* and *PmproPO2*, respectively. The result showed that both *PmproPO1* and *PmproPO2* mRNAs were mainly expressed in hemocyte (Fig. 3).

### 3.3. Specific-gene silencing of the two proPO transcripts by RNA interference

Gene silencing mediated by RNAi was performed to elucidate any potential role of *PmproPO1* and *PmproPO2* in the shrimp immune system. Shrimps ( $2 \pm 0.2$  g, fresh weight) were intramuscularly injected twice with either *PmproPO1* or *PmproPO2* dsRNAs for

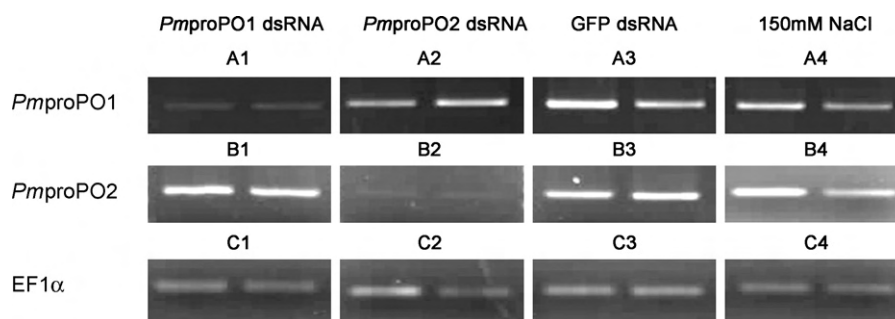


**Fig. 5.** Hemolymph phenoloxidase (PO) activity in proPO silenced shrimp. Hemolymph was collected at 48 h after the second dsRNA injection (*PmproPO1* and *PmproPO2* dsRNAs). Shrimps injected with GFP dsRNA and saline buffer (150 mM NaCl) were used as control groups. The PO activity was measured using L-dopa and defined as  $\Delta A_{490}$  per mg protein. Experiments have been repeated three times and the data represent means of triplicates. Bars indicate mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 2$  or 3).

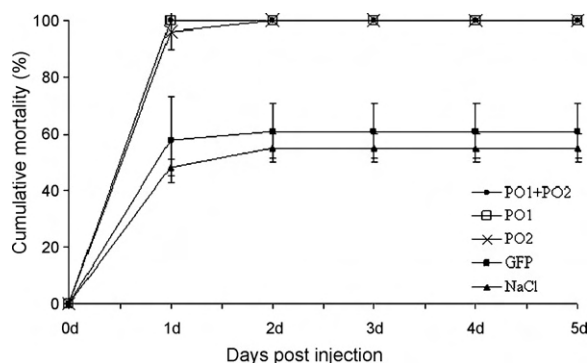
the experimental groups and with GFP dsRNA or NaCl for the control groups. Gene-specific primer pairs for *PmproPO1* (PO1RT-F and PO1RT-R) and *PmproPO2* (PO2RT-F and PO2RT-R) were used to examine the expression levels of both genes in the knockdown shrimps. The reduction of the transcripts was determined at 48 h after the second injection. Fig. 4 summarizes representative results of the *PmproPO1* and *PmproPO2* gene knockdown at 48 h post-dsRNA injection, which shows a specific reduction in the transcription level of *PmproPO1* (but not *PmproPO2*) mRNA by *PmproPO1* dsRNA (Fig. 4A1), and in *PmproPO2* mRNA (but not *PmproPO1*) by *PmproPO2* dsRNA (Fig. 4B2). Moreover, injection of the control GFP dsRNA (Fig. 4A3 and B3) or NaCl (Fig. 4A4 and B4) did not affect the mRNA levels of either *PmproPO1* or *PmproPO2*. The gene silencing is thus apparently sequence-specific. Although the mRNA levels of *PmproPO1* and *PmproPO2* were not completely eliminated, the levels of *PmproPO1* and *PmproPO2* transcripts were significantly reduced and the suppression of mRNA lasted until the last day of examination (day 5) (data not shown).

### 3.4. The effect of proPO silencing on PO activity

To determine whether the knockdown of two *PmproPO* genes would result in a reduction of PO activity, hemolymph was withdrawn from the proPO silenced shrimps and subjected to total



**Fig. 4.** Specific-gene silencing of *PmproPO1* and *PmproPO2* transcripts in *P. monodon* hemocyte. Shrimps ( $2 \pm 0.2$  g, fresh weight) were injected twice with 5  $\mu\text{g}$  of *PmproPO1*, *PmproPO2* or GFP dsRNAs or 25  $\mu\text{l}$  of NaCl solution. Total RNA was extracted from hemocytes at 48 h after the second injection and subjected to analysis using semi-quantitative RT-PCR. EF-1 $\alpha$  was used as a control housekeeping gene to standardize the amount of cDNA template in each of the various reactions. Each lane represents cDNA from an individual shrimp. A1–A4 represent the expression level of *PmproPO1* after injection of *PmproPO1*, *PmproPO2* or GFP dsRNA or NaCl solution, respectively. B1–B4 represent the expression level of *PmproPO2* after injection of *PmproPO1*, *PmproPO2* or GFP dsRNA or NaCl solution, respectively. C1–C4 represent the expression level of EF-1 $\alpha$  after injection of *PmproPO1*, *PmproPO2* or GFP dsRNA or NaCl solution, respectively. The figure is representative of two independent repeats.



**Fig. 6.** Cumulative mortality of proPO silenced shrimp challenged with *Vibrio harveyi*. Shrimp were injected with *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFU) following the second injection of dsRNA. Control groups were shrimps injected with GFP dsRNA and saline buffer (150 mM NaCl). Shrimp mortality was recorded twice each day for 5 days. Percent mortality in each experimental group (9–10 shrimps/group) is presented as the means of triplicate independent experiments. Bars indicate mean  $\pm$  standard deviation.

PO enzymic activity assay. The result showed that knockdown of *PmproPO1* and *PmproPO2* significantly reduced the total PO activity by 75% and 73%, respectively, as compared with NaCl-injected group, whilst co-silencing of *PmproPO1* and *PmproPO2* dsRNAs reduced the PO activity by 88%. On the contrary, no significant change of PO activity was observed in GFP dsRNA injected shrimps ( $p < 0.05$ , ANOVA, Duncan's test). Clearly the total PO activity is not linearly related to the knockdown in *PmproPO1* and *PmproPO2* and may suggest post-transcriptional/translational interactions such as cooperation between the two gene products (Fig. 5).

### 3.5. Cumulative mortality assay

The *PmproPO* silenced shrimps were challenged with the viable pathogenic bacterium, *V. harveyi* 639, to test the effect on the ability of shrimps to mount an immune response and survive. Fig. 6 shows the cumulative mortality for shrimps in each treatment group. The *PmproPO1* silenced shrimp had a cumulative mortality of 100% within 24 h (day 1), whereas the mortality of *PmproPO2* silenced shrimp was 96.3% and reached 100% by day 2, as compared to 61.1% and 55.2% mortality in the control groups injected with GFP dsRNA and saline, respectively. In addition, shrimps that were co-injected with *PmproPO1* and *PmproPO2* dsRNAs also showed a high mortality rate of 100% in day 1 post-injection. The significantly increase in mortality observed with *PmproPO* silenced shrimps was supported by statistical values using ANOVA, Duncan's test to compare the treatments to those of the controls (GFP dsRNA and NaCl).

## 4. Discussion

In this study, we report the existence of a second prophenoloxidase (proPO) homologous gene which is expressed in the hemocytes of the black tiger shrimp, *P. monodon*. The first proPO gene *PmproPO1* was previously reported in 1999 [13], whilst here, a second proPO gene homologue (*PmproPO2*) was identified and characterized. To date, only one type of proPO genes has been reported in most crustaceans including crayfish *P. leniusculus* [8], penaeid shrimps *P. monodon* [13], and *F. chinensis* [31], lobsters *Homarus gammarus* [25], giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [26,27] and crabs *Cancer magister* [28], *Scylla serrata* [29] and *Eriocheir sinensis* [30]. The exception is the two species of penaeid shrimps, *L. vannamei* (proPO1; AY723296

[24,37], EF115296 [38] and proPO2; EU373096 and EF565469) and *M. japonicus* (BAB70485 and BAB83773), in which two distinct types of proPO genes have been reported, but the role of these proPOs in proPO-activating system has not yet elucidated. With *P. monodon* now becoming the third out of three reported penaeid shrimps to have two distinct proPO genes, it remains plausible that these two proPO genes are common and ancestral to penaeid shrimps, but the dataset and phylogenetics are far from complete enough for any degree of certainty.

In those insect species for which data are available, the presence of different proPO genes has been reported. For example, there are two proPO encoding genes in the tobacco hornworm *Manduca sexta* [10,11], the silkworm *Bombyx mori* [18–20] and the beetle *Holotrichia diomphalia* [39], whilst three genes are reported in *Drosophila melanogaster* [9,22] and *Pimpla hypochondriaca* [40] and, surprisingly, nine and ten genes in *A. gambiae* [12,14,41,42] and *Aedes aegypti* [43], respectively. Currently, the role of each gene, or why so many different proPO genes exist, remains unknown, and it may be that the each proPOs have different physiological functions or cooperative functions [1,11,14]. Expression analysis of proPO genes in *A. gambiae* indicated that genes are differentially expressed in different developmental stages (embryo to adult) [14] with some proPOs being apparently inducible after blood-feeding [12,14,21]. These may hence reflect life history dependent differential vulnerabilities to different pathogens and infection routes, but again awaits confirmed resolution.

In this study, we elucidated the role of the two proPOs, *PmproPO1* and *PmproPO2* that are specifically expressed in the hemocytes of *P. monodon* by suppression of their expression by RNAi. To date, gene knockdown using dsRNA has been shown to be a powerful tool for the investigation of gene function in crustacean [33]. Two dsRNA constructs (*PmproPO1* and *PmproPO2*), each targeting a specific part of the respective *PmproPO* mRNA, were prepared. The targeted region, which covered the 5' UTR and N-terminal region of the predicted coding sequence (CDS) of *PmproPO1* and *PmproPO2*, share only 34% nucleotide sequence identity with each other. It appeared that both *PmproPO1* and *PmproPO2* dsRNAs efficiently and specifically reduced endogenous expression of their respective transcripts, but not each others, in the shrimp hemolymph after injection. However, a complete silencing of these genes could not be achieved in the dsRNA-treated group. Our findings are similar to those obtained by Liu et al. [33], who reported the knockdown of proPO gene in the crayfish *P. leniusculus* reduced the proPO transcript to about 57%. Such variances in efficiency, as well as incomplete knockdown, are common in dsRNA and likely due to the sequence specific complexities of dsRNA recognition and processing mechanisms.

The effect of proPO gene knockdown on PO activity was investigated. Although PO has long been considered to be the key enzyme in the proPO-activating system in shrimps, there is no direct evidence verifying its role in this system. Our data clearly showed a reduction of PO activity in the proPO silenced shrimps suggesting that both *PmproPOs* are essential components of the biochemical pathway required for the proPO-activating system in shrimps. This is the first report on the *in vivo* functional characterization of either of the two proPOs in shrimps.

Crustacean proPO sequences are homologous with arthropod hemocyanins, and a PO-like activity in hemocyanins, the copper-containing proteins that function as arthropod oxygen transporters, has also been detected in the hemolymph of crustaceans [44–46]. Crustacean hemocyanin, synthesized in the hepatopancreas and localized in the plasma, typically represents up to 95% of the total amount of hemolymph protein [48], and it has been suggested that hemocyanins are multifunctional proteins involved in immunity [1,44]. Certainly, hemocyanin is functionally con-

verted into a PO-like enzyme by some reagents or endogenous molecules in several arthropod species [44,45,47–50]. Considering all of the available data, it seems likely that hemocyanin is independently involved in the proPO-activating system [32]. In the present investigation, we have shown that knockdown of two proPO genes by co-silencing in *P. monodon* had the strongest effect on the total PO activity in the hemolymph with more than a 88% reduction in PO activity being observed after LPS/PGN and laminarin (a  $\beta$ -glucan) activation. This strongly suggests that the two *PmproPOs* are the key enzymes contributing to the PO activity in *P. monodon* hemolymph. However, it is unclear if the remaining hemolymph PO activity (12%), after partial co-silencing of both *PmproPOs* is due to the activity of hemocyanin, or other proPO isoforms, or simply the incomplete knockdown of *PmproPO1* and *PmproPO2* allowing a low level of *de novo* translation and enzyme synthesis.

The prophenoloxidase-activating system is an important defense mechanism in invertebrates against diverse pathogens [1]. However, some controversy on the importance of the proPO system in the defense against microbial infection has been reported [32]. In the insects, it has been reported that the proPO reaction is not important for survival of microbial infections in *Drosophila* [51] and *A. gambiae* [52]. *Drosophila* with a mutant (null) proPO-activating enzyme (PAE1) gene and *A. gambiae* with a silenced non-catalytic serine protease (CLIPA8) gene both showed depletion of PO activity, but could survive microbial challenge, suggesting that melanization is not essential for defense against microbial infection [51,52]. However, in contrast, the knockdown of the *Drosophila* melanization proteases (MP1 and MP2) strongly supported that melanization is crucial for the innate immune system against fungal infections [53]. Furthermore, it has been shown in the crayfish, *P. leniusculus*, that knockdown of the proPO transcript by dsRNA increased susceptibility to *A. hydrophila* infection, suggesting the important role of phenoloxidase in defense against bacterial invasion.

In this study, we provide further evidence to support that the proPO-activating system plays an essential role in the *P. monodon* shrimp defense against the pathogenic bacterium, *V. harveyi*. It is noteworthy that partial silencing of either the *PmproPO1* or *PmproPO2* gene resulted in a strong PO activity reduction (73–75%) and a very high mortality after *V. harveyi* challenge, despite the appearance that only one type of proPO mRNA was suppressed (as shown by RT-PCR). It is possible if not likely that the two POs might cooperatively function in the proPO-activating system and probably acts as heteromer. In *M. sexta* [11] and *B. mori* [19,20], two different proPOs, encoded by separate subunit genes, exist predominantly as a heterodimer in the plasma, and their transcriptional expression are coordinately regulated [11,54]. Two proPO (A1 and A3) isoforms in *D. melanogaster* [9] were shown to be a homodimer with different substrate kinetics [55]. In two crustaceans (lobster and crayfish), proPO was reported to form native homo-hexamers, similar to hemocyanin only that exists as hetero-hexamers made up with different subunits [44]. Clearly further study is required to determine the structure of the *P. monodon* proPOs and whether they exist as a heteromer of two subunit types in hemolymph. Nevertheless, in this study it is clearly shown that both *PmproPO1* and *PmproPO2* are likely important components in the shrimp defense against the pathogenic bacterium *V. harveyi*.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund (TRF) awarded to Piti Amparyup, and the Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC). A

student fellowship granted to Walaiporn Charoensapsri by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, Thailand Research Fund, is acknowledged.

## References

- [1] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:116–26.
- [2] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 1998;10:23–8.
- [3] Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:128–50.
- [4] Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 2006;211:213–36.
- [5] Kanost MR, Jiang H, Yu X-Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev* 2004;198:97–105.
- [6] Sritunyalucksana K, Söderhäll K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 2000;191:53–69.
- [7] Aspán A, Söderhäll K. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activating by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem* 1991;21:363–73.
- [8] Aspán A, Huang T-S, Cerenius L, Söderhäll K. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:939–43.
- [9] Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, Ohnishi E. Nucleotide sequence of the cDNA encoding pro-phenoloxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7769–73.
- [10] Hall M, Scott T, Sugumaran M, Söderhäll K, Law JH. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7764–8.
- [11] Jiang H, Wang Y, Ma C, Kanost MR. Subunit composition of pro-phenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO-P1. *Insect Biochem Mol Biol* 1997;27:835–50.
- [12] Lee WJ, Ahmed A, Torre AD, Kobayashi A, Ashida M, Brey PT. Molecular cloning and chromosomal localization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 1998;7:41–50.
- [13] Sritunyalucksana K, Cerenius L, Söderhäll K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 1999;23:179–86.
- [14] Müller HM, Dimopoulos G, Blass C, Kafatos FC. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. *J Biol Chem* 1999;274:11727–35.
- [15] Lee HS, Cho MY, Lee KM, Kwon TH, Homma K, Natori S, et al. The prophenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor*, larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. *FEBS Lett* 1999;444:255–9.
- [16] Cui L, Luckhart S, Rosenberg R. Molecular characterization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Insect Mol Biol* 2000;9:127–37.
- [17] Taft AS, Chen CC, Li J, Christensen BM. Molecular cloning of two prophenoloxidase genes from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 2001;10:97–103.
- [18] Kawabata T, Yasuhara Y, Ochai M, Matsuura S, Ashida M. Molecular cloning of insect pro-phenoloxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7774–8.
- [19] Asano T, Ashida M. Cuticular prophenoloxidase of the silk worm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 2001;276:11100–12.
- [20] Asano T, Ashida M. Transmembrane transported pro-phenoloxidase in the cuticle of the silk worm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 2001;276:11113–25.
- [21] Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002;298:159–65.
- [22] Asada N, Yokoyama G, Kawamoto N, Norioka S, Hatta T. Prophenol oxidase A3 in *Drosophila melanogaster*: activation and the PCR based cDNA sequence. *Biochem Genet* 2003;41:151–63.
- [23] Huang LH, Christensen BM, Chen CC. Molecular cloning of a second prophenoloxidase cDNA from the mosquito *Armigeres subalbatus*: prophenoloxidase expression in blood-fed and microfilariae-inoculated mosquitoes. *Insect Mol Biol* 2001;10:87–96.
- [24] Lai CY, Cheng W, Kuo CM. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 2005;18:417–30.
- [25] Hauton C, Hammond JA, Smith VJ. Real-time PCR quantification of the in vitro effects of crustacean immunostimulants on gene expression in lobster (*Homarus gammarus*) granular haemocytes. *Dev Comp Immunol* 2005;29:33–42.
- [26] Lu KY, Huang YT, Lee HH, Sung HH. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:274–84.
- [27] Liu CH, Tseng SY, Lai CY, Cheng W, Kuo CM. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase cDNA from haemocytes of the giant freshwater

- prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its transcription in relation with the moult stage. *Fish Shellfish Immunol* 2006;21:60–9.
- [28] Terwilliger NB, Ryan MC. Functional phylogenetic analyses of phenoloxidases from brachyuran (*Cancer magister*) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans. *Biol Bull* 2006;210:38–50.
- [29] Ko CF, Chiou T-T, Vaseeharan B, Lu J-K, Chen J-C. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. *Dev Comp Immunol* 2007;31:12–22.
- [30] Gai Y, Zhao J, Song L, Li C, Zheng P, Qiu L, et al. A prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: gene cloning, expression and activity analysis. *Fish Shellfish Immunol* 2008;24:156–67.
- [31] Gao H, Li F, Dong B, Zhang Q, Xiang J. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (ProPO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*. *Mol Biol Rep* 2008. doi:10.1007/s11033-008-9292-6.
- [32] Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* 2008;29:263–71.
- [33] Liu H, Jiravanichpaisal P, Cerenius L, Lee BL, Söderhäll I, Söderhäll K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 2007;282:33593–8.
- [34] Tassanakajon A, Klinbunga S, Paunglarp N, Rimphanitchayakit V, Udomkit A, Jitrapakdee S, et al. *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 2006;384:104–12.
- [35] Amparyup P, Jitvaropas R, Pulsook N, Tassanakajon A. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:535–46.
- [36] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) version 3.5c. [Distributed by the author] Seattle: Department of Genetics, University of Washington; 1993.
- [37] Wang YC, Chang PS, Chen HY. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:414–8.
- [38] Ai HS, Huang YC, Li SD, Weng SP, Yu XQ, He JG. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 2008;25:28–39.
- [39] Kim MS, Baek MJ, Lee MH, Park JW, Lee SY, Söderhäll K, et al. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *J Biol Chem* 2002;277:39999–40004.
- [40] Parkinson N, Smith I, Weaver R, Edwards JP. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem Mol Biol* 2001;31:57–63.
- [41] Jiang H, Wang Y, Korochkina SE, Benes H, Kanost MR. Molecular cloning of cDNAs for two pro-phenol oxidase subunits from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 1997;27:693–9.
- [42] Ahmed A, Martin D, Manetti AG, Han SJ, Lee WJ, Mathiopoulos KD, et al. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14795–800.
- [43] Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, et al. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* 2007;316:1738–43.
- [44] Lee SY, Lee BL, Söderhäll K. Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:490–6.
- [45] García-Carreño FL, Cota K, Navarrete Del Toro MA. Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J Agric Food Chem* 2008.
- [46] Sellos D, Lemoine S, Van Wormhoudt A. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Lett* 1997;407:153–8.
- [47] Decker H, Rimke T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J Biol Chem* 1998;273:25889–92.
- [48] Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 2001;276:27166–70.
- [49] Pless DD, Aguilar MB, Falcón A, Lozano-Alvarez E, Heimer de la Cotera EP. Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Arch Biochem Biophys* 2003;409:402–10.
- [50] Adachi K, Hirata T, Nishioka T, Sakaguchi M. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 2003;134:135–41.
- [51] Leclerc V, Pelte N, El Chamy L, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, et al. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep* 2006;7:231–5.
- [52] Schnitger AKD, Kafatos FC, Osta MA. The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections. *J Biol Chem* 2007;282:21884–8.
- [53] Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *J Biol Chem* 2006;281:28097–104.
- [54] Yasuhara Y, Koizumi Y, Katagiri C, Ashida M. Reexamination of properties of prophenoloxidase isolated from larval hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Arch Biochem Biophys* 1995;320:14–23.
- [55] Asada N, Sezaki H. Properties of phenoloxidases generated from prophenoloxidase with 2-propanol and the natural activator in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet* 1999;37:149–58.



# Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection

Walaiporn Charoensapsri<sup>a</sup>, Piti Amparyup<sup>a,b</sup>, Ikuo Hirono<sup>c</sup>, Takashi Aoki<sup>c</sup>, Anchalee Tassanakajon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Shrimp Molecular Biology and Genomics Laboratory, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>b</sup> National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road., Klong1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

<sup>c</sup> Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 December 2008

Received in revised form 15 January 2009

Accepted 21 January 2009

Available online 12 February 2009

### Keywords:

Shrimp

*Penaeus monodon*

Prophenoloxidase activating enzyme

Clip domain serine proteinase

proPO system

## ABSTRACT

The prophenoloxidase (proPO) activating system is an important innate immune response against microbial infections in invertebrates. The major enzyme, phenoloxidase (PO), is synthesized as an inactive precursor and its activation to an active enzyme is mediated by a cascade of clip domain serine proteinases (clip-SPs). In this study, a cDNA encoding a proPO activating enzyme (PPAE) from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, designated as *PmPPAE1*, was cloned and characterized. The full-length cDNA contains an open reading frame (ORF) of 1392 bp encoding a predicted protein of 463 amino acids including an 18 amino acid signal peptide. The *PmPPAE1* protein exhibits a characteristic sequence structure of clip-SPs consisting of the clip domain at the N-terminus and a SP domain at the C-terminus. Sequence analysis showed that *PmPPAE1* exhibited the highest amino acid sequence similarity (70%) to a PPAE of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *PmPPAE1* mRNA is abundantly expressed in hemocytes, and this is regulated after systemic *Vibrio harveyi* infection supporting that it is an immune-responsive gene. RNA interference-mediated suppression of *PmPPAE1*, performed by injection of double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to the *PmPPAE1* gene into shrimp, resulted in a significant reduction of *PmPPAE1* but not other clip-SP and related gene transcript levels of *P. monodon*, suggesting gene-specific knockdown. RNAi-mediated silencing of *PmPPAE1* gene significantly decreased the total PO activity (36.7%) in shrimp and additionally increased the mortality of *V. harveyi* infected shrimp, the latter of which correlated with an increase in the number of viable bacteria in the hemolymph. These results indicate that *PmPPAE1* functions in the proPO system and is an important component in the shrimp immune system.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Invertebrates utilize two broad but interacting categories of defense responses against invading pathogens that are the cellular and the humoral responses. The cellular response includes encapsulation, phagocytosis and nodule formation, whilst the humoral response includes the synthesis of a broad spectrum of potent antimicrobial proteins, the clotting system and the prophenoloxidase activating system (proPO system) [1–3].

The proPO system is one of the major immune responses in invertebrates [1]. Upon injury or infection, non-self molecules, such as lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan and  $\beta$ -1,3-glucan, are recognized by non-self recognition proteins leading to activation of the proPO cascade. The inactive proPO zymogen is converted to the active phenoloxidase (PO), by a clip domain serine

proteinase (clip-SP) designated as a proPO activating enzyme (PPAE) [1,4]. Subsequently, PO catalyzes the production of quinones, which can crosslink neighboring molecules to form melanin at the injury site or around invading microorganisms. Quinones may also be involved in the production of cytotoxic molecules such as superoxides and hydroxyl radicals that could help to kill the invading microorganisms [1,4,5].

The proPO cascade involves several proteolytic steps which are catalyzed by multiple clip-SPs [6–10]. The PPAE, the terminal clip-SP that carries out the proteolysis of the proPO, has been characterized from several insects and a crustacean, including, within insects, *Bombyx mori* [6], *Manduca sexta* [10], *Holotrichia diomphalia* [7] and *Tenebrio molitor* [9], and, within a crustacean, the crayfish *Pacifastacus leniusculus* [8]. They consist of one or more clip domain(s) at the N-terminus and a SP domain at the C-terminus. The SP domain is responsible for signal amplification by cleaving and activating the downstream SPs or proteins. The clip domain, usually composed of between 37 and 55 amino acid residues, is interlinked by three strictly conserved disulfide bonds

\* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5414.

E-mail address: [anchalee.k@chula.ac.th](mailto:anchalee.k@chula.ac.th) (A. Tassanakajon).

[11] and connected to the SP domain by a disulfide linkage. Clip-SPs can be divided into catalytic and non-catalytic groups according to their proteolytic activity. The non-catalytic group members, the serine proteinase homologues (SPHs), do not exhibit any proteolytic activity owing to replacement of the serine residue at the active site by glycine. The overall structure of the SP domain of the non-catalytic group is similar to those of SPs [11,12]. In penaeid shrimp, several clip- (or pseudoclip-) SPs and clip- (or pseudoclip-) SPHs have been cloned and characterized [13–17]. However, shrimp clip-SPs that are involved in the proPO system have yet to be clarified.

Previously, we cloned and functionally characterized two proPO cDNAs from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and suggested that both proPOs are likely to be important components in the shrimp immune defense [18]. In the present study, a putative PPAE (*PmPPAE1*) was cloned from the hemocytes of *P. monodon* and its tissue distribution and expression in response to challenge by a pathogenic *Vibrio harveyi* was investigated. The potential participation of the gene product in the proPO system and shrimp immunity was also elucidated by dsRNA-mediated RNA interference (RNAi). The results suggest that *PmPPAE1* is an important molecule in the proPO system and is essential for shrimp survival to a systemic infection of *V. harveyi*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

Black tiger shrimp, *P. monodon*, were purchased from a local shrimp farm in Thailand and reared in laboratory tanks with sea

water (20 ppt) for seven days before processing. For bacterial challenge experiments, the shrimp of challenged and control samples were intramuscularly injected into the third abdominal segment with *V. harveyi* ( $10^6$  CFU) in 25  $\mu$ l of saline (150 mM NaCl), or with the same volume of saline solution only, respectively. Hemolymph was collected from the ventral sinus between 0 and 48 h after challenge in an anticoagulant solution (10% (w/v) trisodium citrate dihydrate). Hemocytes were isolated by centrifugation at  $800 \times g$  for 10 min at 4 °C and the hemocyte pellet was resuspended in 200  $\mu$ l of TRI REAGENT<sup>®</sup> (Molecular Research Center, USA).

### 2.2. Total RNA and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from various dissected tissues using the TRI REAGENT<sup>®</sup> and then treated with RNase-free DNase I (Promega, USA). Messenger RNA (mRNA) was purified from the total RNA using a QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia, USA). First-strand cDNAs were reverse transcribed from poly-A tailed mRNA using 1.5  $\mu$ g of DNA-free RNA sample and 0.5  $\mu$ g of oligo (dT)<sub>15</sub> primer and the ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase System kit (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol.

### 2.3. Cloning and sequencing of *PmPPAE1* cDNA fragment

Degenerate primers were designed from the conserved region of the serine proteinase (SP) domain of PPAEs using the available sequences of crayfish and insect PPAE genes in the database. Primers PPAE-SP-F and PPAE-SP-R (Table 1), designed from the

**Table 1**  
Primer sequences.

| Primer              | Sequence (5'–3')                                               | Purpose             |
|---------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|
| PPAE-SP-F           | 5'CGATACGTCYTACSGCSGCNCAYTG 3'                                 | RT-PCR              |
| PPAE-SP-R           | 5' TGCAATGTGCGGCCRCRCRGARTCNCC 3'                              | RT-PCR              |
| <i>PmPPA1</i> -F    | 5' ACATCGCCATCATCAAGCTGCAAGGAAG 3'                             | 3'-RACE             |
| <i>PmPPA1</i> -R    | 5' GCTTGTCGATGATGTTCTGTCTAGGC 3'                               | 5'-RACE             |
| <i>PmPPAE1</i> -F   | 5' TGGGGCGAAGGCGAGGACACAAGGCGCAG 3'                            | RT-PCR              |
| <i>PmPPAE1</i> -R   | 5' CTCCTTCTCAAGCTCACCACTTCTATCT 3'                             | RT-PCR              |
| <i>PmPPArt</i> -F   | 5' GTCCTACGACACGACCACCTAC 3'                                   | RT-PCR              |
| <i>PmPPArt</i> -R   | 5' CTGTCACCCCTGGCAGCAATCCT 3'                                  | RT-PCR              |
| realPPA-F           | 5' AAGAAGAGGGAGGCCAGCAAC 3'                                    | Real time PCR       |
| realPPA-R           | 5' TTACTCCTCCTCCCTGTCCAAG 3'                                   | Real time PCR       |
| NcolppA-F           | 5' CATGCCATGGCCATCATCATCATCATCGC<br>ATCGTGGGCGGAAAGGACGCCGA 3' | Recombinant protein |
| NotIppA-R           | 5' ATAAGAATGCGGCCCTTAGACTGCATTATTT<br>TAATCCAGTC 3'            | Recombinant protein |
| PPAi-F              | 5' CGTCTGCTTCATTGAGGGAGTG 3'                                   | RNAi                |
| PPAi-R              | 5' GTAGTAGATGGTGCCCCAGCCT 3'                                   | RNAi                |
| T7PPAi-F            | 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTCT GCTTCATTGAGGGAGTG 3'         | RNAi                |
| T7PPAi-R            | 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTAGTA GATGGTGCCCCAGCCT 3'         | RNAi                |
| GFP-F               | 5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'                                      | RNAi                |
| GFP-R               | 5' TTACTTGACAGCTCGTCCA 3'                                      | RNAi                |
| GFPT7-F             | 5' TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAA GGGCGAGGA 3'                 | RNAi                |
| GFPT7-R             | 5' TAATACGACTCACTATAGGTTACTTGACAG CTCGTCCA 3'                  | RNAi                |
| <i>PmPPAE2</i> rt-F | 5' GCGGCGGTACAGCTCCTTGTTT 3'                                   | RT-PCR              |
| <i>PmPPAE2</i> rt-R | 5' ACTCTCGGGGCGACGCTTGTTG 3'                                   | RT-PCR              |
| <i>PmSP1</i> rt-F   | 5' TGAGAGCACAATAGTGGAGGGGTA 3'                                 | RT-PCR              |
| <i>PmSP1</i> rt-R   | 5' TGGAGGCGAGGCACACAGGCAAC 3'                                  | RT-PCR              |
| <i>PmSP2</i> rt-F   | 5' GGCGTTGGTCTTCACTGCTCTC 3'                                   | RT-PCR              |
| <i>PmSP2</i> rt-R   | 5' CAGAACTGCCTTCCAAGGATAG 3'                                   | RT-PCR              |
| <i>PmSPH1</i> rt-F  | 5' TACGTACTCATTGATATCAGGTTTGG 3'                               | RT-PCR              |
| <i>PmSPH1</i> rt-R  | 5' GCCTCGTTATCCTTGAATCCAGTGA 3'                                | RT-PCR              |
| <i>PmSPH2</i> rt-F  | 5' CCGTGAACGACGATGTCCTTA 3'                                    | RT-PCR              |
| <i>PmSPH2</i> rt-R  | 5' GCCACACTCTCCGCTGCTCCG 3'                                    | RT-PCR              |
| <i>PmSPH3</i> rt-F  | 5' GCTCTGGTGCTGCCGCTGTTG 3'                                    | RT-PCR              |
| <i>PmSPH3</i> rt-R  | 5' CACCGTCCAGCAGGTAATA 3'                                      | RT-PCR              |
| EF1 $\alpha$ -F     | 5' GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC 3'                                    | RT-PCR              |
| EF1 $\alpha$ -R     | 5' CGTTCGGTGATCATGTCTTGATG 3'                                  | RT-PCR              |

conserved amino acid sequences TAAHC and GDSGGP, respectively, were used for PCR amplification. Hemocyte cDNA samples were used as templates in a 25 µl PCR reaction containing the primer pair PPAE-SP-F and PPAE-SP-R (0.2 µM each), dNTP (100 µM), PCR buffer (1X) and Taq DNA polymerase (1.0 U). The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR product was analyzed by TBE-1.5% agarose gel electrophoresis and the PCR product of the expected molecular size (500 bp) was recovered from the gel and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, USA). The recombinant plasmids were extracted by plasmid DNA extraction kit (Qiagen, USA) and commercially sequenced (Macrogen Inc., Korea) on both strands to obtain the complete consensus sequence.

#### 2.4. Rapid amplification of cDNA end (RACE)-PCR

Based on the obtained partial cDNA sequences, specific primers of *PmPPAE1* (Table 1) were designed for 3' and 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE). Both 3' and 5' RACE reactions were performed with a SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA), according to the manufacturer's instructions. The PCR reaction was performed using *PmPPA1-F* and *PmPPA1-R* (Table 1), otherwise as described by Amparyup et al. [16]. The RACE products were purified, cloned, and sequenced as described above. Three clones were selected randomly to verify the complete cDNA sequence data. The amplification of a single fragment of a full-length *PmPPAE1* cDNA was carried out by PCR using the primer pair *PmPPAE1-F* and *PmPPAE1-R* (Table 1) and *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA). Amplification was composed of 94 °C for 3 min followed by 25 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 3 min. The final extension was carried out at 72 °C for 10 min. The PCR product was cloned and sequenced in both directions by a commercial service (Macrogen Inc., Korea).

#### 2.5. Sequence analysis

DNA and deduced amino acid sequences were analyzed using the BLAST programs in the GenBank database. The potential cleavage site of the signal peptide was predicted using the SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Multiple sequence alignments of nucleotide and deduced amino acids were performed using Clustal W2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).

#### 2.6. Tissue specific expression of *PmPPAE1*

The mRNA expression of *PmPPAE1* in various shrimp tissues was determined by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from the tissues of hemocyte, gill, lymphoid organ, intestine, hepatopancreas and heart of *P. monodon*. The *PmPPAE1* specific primers, *PmPPArt-F* and *PmPPArt-R* (Table 1), were designed from the full-length *PmPPAE1* cDNA sequence. The elongation factor1- $\alpha$  gene (EF1- $\alpha$ ) was amplified as a partial gene fragment of 150 bp using the primer pair EF1 $\alpha$ -F and EF1 $\alpha$ -R (Table 1) as an internal control. One microliter of the first-strand cDNA synthesized from 1.5 µg of total RNA was subjected to PCR in a 25 µl reaction volume containing 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM of each dNTP, 0.2 µM of each specific primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, USA). The template DNA was denatured at 94 °C for 1 min followed by 30 cycles of denaturing at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. The final extension was performed at 72 °C for 5 min. Ten microliter of the amplification product was analyzed by electrophoretic resolution

through a TBE-1.8% agarose gel followed by ethidium bromide staining and UV-transillumination.

#### 2.7. Real-time PCR analyses

Real-time PCR of *PmPPAE1* mRNA was performed using gene-specific primers (realPPA-F and realPPA-R) (Table 1). The shrimp elongation factor 1- $\alpha$  gene fragment was amplified as above and used as the normalization control. The amplification reaction and thermal profile were performed as described by Amparyup et al. [16]. Real-time PCR reaction was carried out in an iCycler-iQ<sup>TM</sup> system (Bio-Rad Laboratories, USA) using SYBR Green I dye detection. Each sample had three replicates in each plate. For the relative quantification analyses, the amount of target transcript was related to the internal standard, EF1- $\alpha$ , in the same sample of *V. harveyi* injected shrimp hemocytes. The Ct values of *V. harveyi* injected samples at each time point were thus normalized with the saline-injected samples and a mathematical model was used to determine the relative expression ratio [19].

#### 2.8. Recombinant protein expression, purification and antibody production

The SP domain of *PmPPAE1* was amplified with the primer pair NcolPPA-F and NotIIPA-R (Table 1) using *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA). The purified PCR product was cloned into the prokaryotic expression vector pET28b and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS cells. The transformed *E. coli* was grown in culture, and recombinant protein expression was induced with IPTG (1 mM). The recombinant SP-domain (rSP-domain) of *PmPPAE1* was analyzed by reducing SDS-PAGE resolution, with a 15% (w/v) acrylamide resolving gel, and subsequent coomassie brilliant blue staining. The rSP-domain protein was found to be located principally in inclusion bodies. The pellet containing the inclusion bodies was then subjected to purification by Ni-NTA affinity chromatography column according to the manufacturer's suggestions for insoluble proteins (Qiagen, USA). The purified rSP-domain of *PmPPAE1* was used to generate rabbit polyclonal antibodies by a commercial service at Biomedical Technology Research Unit, Chiang Mai University, Thailand.

#### 2.9. Western blot analysis

Hemolymph was collected from the ventral sinus in an anticoagulant solution (0.45 M NaCl, 0.1 M glucose, 26 mM citric acid, 30 mM trisodium citrate, 10 mM EDTA, pH 4.6) and centrifuged at 800 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was used as a cell-free plasma solution. The hemocyte pellet was washed twice and homogenized in 150 mM NaCl containing 2 mM EDTA. The homogenate was then centrifuged at 25,000 × g for 20 min at 4 °C to obtain the hemocyte lysate supernatant (HLS). For Western blot analysis, approximately 20 µg of shrimp HLS protein and 100 µg of cell-free plasma protein were loaded on a reducing SDS-PAGE gel (15% (w/v) acrylamide resolving gel), and after electrophoresis was electro-blotted onto a PVDF membrane (Amersham Biosciences). Membranes were then blocked in 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-Buffered Saline (TBS; 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) and 0.05% (v/v) Tween 20. *PmPPAE1* protein was detected with rabbit polyclonal anti-rSP-domain of *PmPPAE1* antisera (1:1000 dilution) as the primary antibody and, after incubation and washing, with anti-rabbit alkaline phosphatase conjugated antibodies (1:20,000 dilution) as a secondary antibody (Promega, USA). After secondary antibody incubation and washing, the alkaline phosphatase antibody-protein band complex was detected with 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate/Nitroblue Tetrazolium (BCIP/NBT) as the chromogenic substrate.

## 2.10. Synthesis of dsRNA

Double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to the *PmPPAE1* sequence was generated by *in vitro* transcription. DNA templates for dsRNA preparation of *PmPPAE1* were performed using the gene-specific primers PPAi-F and PPAi-R (Table 1). The primers for the dsRNA synthesis consist of the same primer sequences but flanked at the 5' end by a T7 promoter sequence. Two separate PCR reactions were set up, one with T7PPAi-F and PPAi-R (Table 1) for the sense strand template, the other with PPAi-F and T7PPAi-R (Table 1) for the anti-sense strand template. For an exogenous gene, a 740-bp fragment of the green fluorescent protein (GFP) was amplified with the pEGFP-1 vector as template using GFPT7-F and GFP-R (Table 1) for the sense strand template, and GFP-F and GFPT7-R (Table 1) for the anti-sense strand template. One microgram of each template was used in an *in vitro* transcription using the T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express Large Scale RNA Production Systems (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of sense and anti-sense single stranded RNA were annealed to produce dsRNA and the remaining DNA template in the solution was digested with RNase-free DNase I. The quality and amount of dsRNAs was verified by TBE-1.5% agarose gel electrophoresis with UV visualization following ethidium bromide staining, and UV spectrophotometry, respectively.

## 2.11. In vivo gene silencing

Specific pathogen-free (SPF) *P. monodon* were obtained from the Shrimp Genetic Improvement Center, BIOTEC, Thailand. These SPF shrimp were specifically free of white spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus (YHV), Taura Syndrome Virus (TSV), infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) and *V. harveyi* bacteria as determined by PCR diagnosis.

SPF shrimp (~2 g, fresh weight) was intramuscularly injected with 5 µg of either *PmPPAE1* (2.5 µg dsRNA per 1 g shrimp) or GFP dsRNA dissolved in 25 µl of 150 mM NaCl, using a 0.5-ml insulin syringe with a 29-gauge needle, to assess the sequence-specific knockdown effect of dsRNA. Injection of 150 mM NaCl alone was done as an additional control for handling and injection induced mortality. The injection of dsRNA (5 µg) or saline was repeated together with 20 µg of the lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* 0111:B4 (Sigma) and laminarin (β-1,3-glucan chain with some β-1,6-linked glucose units) (Sigma) at 24 h after the first injection. Total RNA was collected and extracted from the hemolymph of shrimp from all three groups at 48 h after the second dsRNA/saline injection. From this total RNA preparation, the *PmPPAE1* transcript level was determined by semi-quantitative RT-PCR analysis.

## 2.12. Semi-quantitative RT-PCR analysis

First-strand cDNA was synthesized from total RNA (180 ng) using the ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Promega, USA) and oligo(dT)<sub>15</sub> primer as described by the manufacturer. The level of *PmPPAE1* gene transcript in each RNA sample was examined by semi-quantitative RT-PCR using the PPAi-F and PPAi-R primer pair (Table 1). Elongation factor1-α gene fragment amplification again served as the internal control for cDNA template normalization. One microliter of the first-strand cDNA synthesized from total RNA was subjected to PCR in a 25 µl reaction volume containing 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM of each dNTP, 0.2 µM of each specific primers and 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, USA). The thermal cycling conditions were: 94 °C for 1 min, followed by 25 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and 72 °C for 10 min. The PCR product was analyzed by TBE-1.8% agarose gel electrophoresis as above.

## 2.13. Assay of hemolymph phenoloxidase activity

Total PO enzymic activity was assayed 48 h after the second dsRNA injection. Hemolymph was withdrawn without the use of anti-coagulant from the shrimp ventral sinus. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) dissolved in water was used to detect PO activity in the hemolymph extracts according to Amparyup et al. [18]. Briefly, 2 mg of total hemolymph proteins in 435 µl of Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) were mixed with 65 µl of freshly prepared L-dopa (3 mg/ml in water) (Fluka). After incubation at room temperature for 30 min, 500 µl of 10% (v/v) acetic acid was added to each mixture and the PO activity was measured as the increased absorbance at 490 nm with time. PO activity was recorded as ΔA<sub>490</sub>/mg total protein/min against control samples that used distilled water instead of shrimp hemolymph. Protein concentration was measured using a Bradford assay kit (Bio-Rad).

## 2.14. Cumulative mortality assay

*V. harveyi* isolate 639, a known pathogenic isolate of *P. monodon* shrimp, was revived from a glycerol stock previously stored at -80 °C using TSA (tryptic soy agar). The plate was incubated for 18 h at 30 °C. A single colony was picked and resuspended in 4 ml of TSB (tryptic soy broth) medium overnight at 30 °C, and 40 µl was subsequently inoculated into 8 ml TSB and cultured at 30 °C. The bacterial concentration was established by estimating the optical density (OD) at 600 nm. Four different concentrations; 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> colony forming units (CFUs)/ml were assessed as a preliminary experiment, conducted to determine the appropriate dose for mortality assay experiments (data not shown), with the result that 2 × 10<sup>5</sup> CFUs/ml was the dose that could kill 40–50% of the shrimp within 48 h, and so was chosen.

SPF shrimp, each of ~10 g in size, were each intramuscularly injected with 20 µg of *PmPPAE1* dsRNA (2 µg dsRNA per 1 g shrimp) or 150 mM NaCl in 25 µl volume. Injection of GFP dsRNA (20 µg) was included as a sequence-independent dsRNA control. Twenty-four hours after the first dsRNA injection, shrimp were again injected intramuscularly with 25 µl of saline solution containing 20 µg of dsRNA and 2 × 10<sup>5</sup> CFUs of *V. harveyi*. Controls, injected with saline or GFP dsRNA in saline, were included to evaluate the effects of saline injection and handling, and that plus non-specific dsRNA injections, respectively. The cumulative mortality was recorded twice a day for 5 days post *V. harveyi* challenge. The experiment was performed in triplicate groups, with each group consisting of 8–12 healthy shrimp. Statistical analysis of the mortality test was performed using a one-way ANOVA test.

## 2.15. Viable bacterial counts in the hemolymph of *PmPPAE1*-silenced shrimp after systemic *V. harveyi* challenge

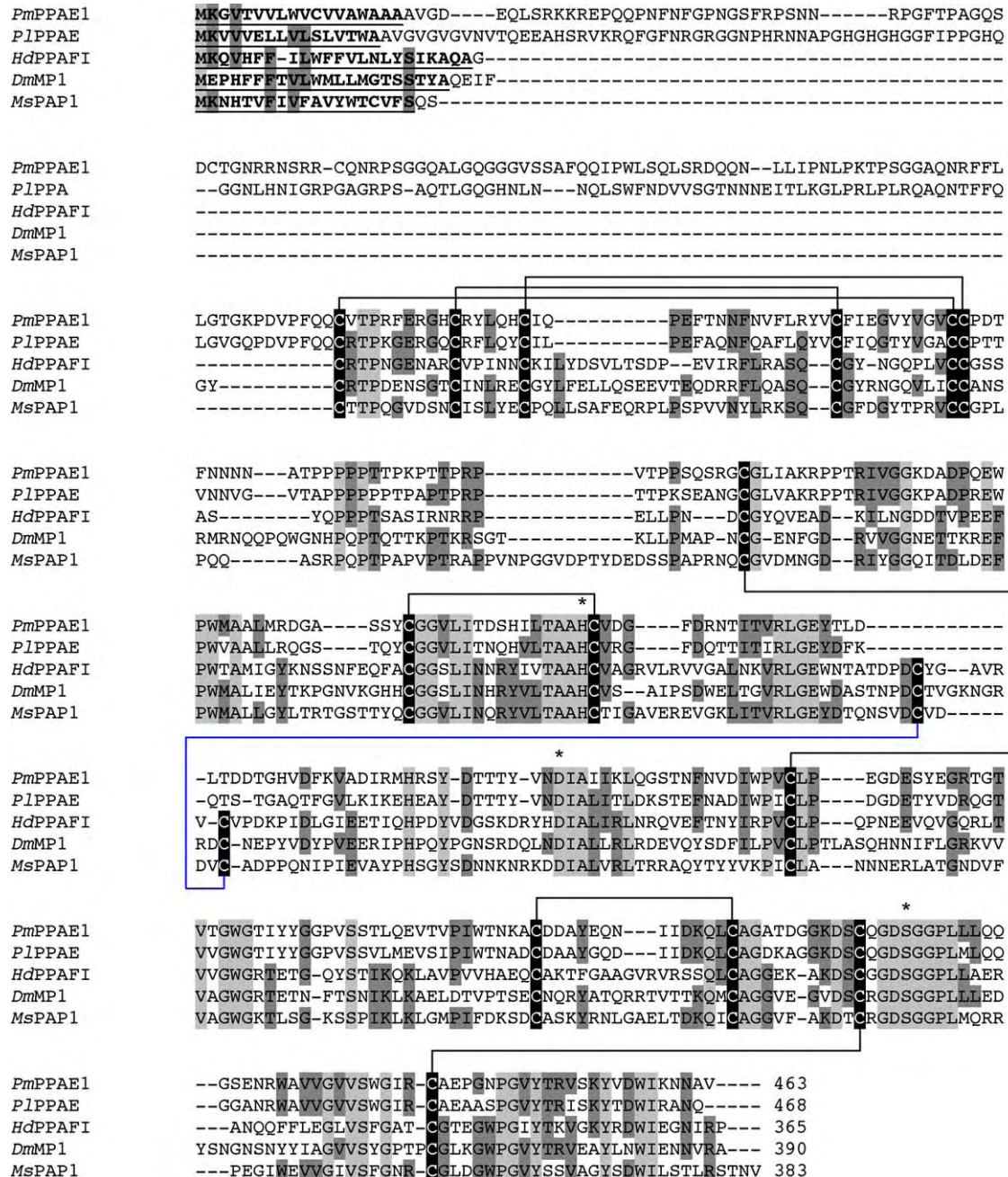
The bacteria count was performed as described by Liu et al. [20]. SPF shrimp, each ~10 g in size, were injected with 20 µg of either *PmPPAE1* dsRNA, or for controls, the same amount of GFP dsRNA. Experimental tests were conducted in triplicate with three shrimp per replicate. Twenty-four hours after the first dsRNA injection, shrimp were reinjected intramuscularly but with 20 µg of dsRNA and 2 × 10<sup>5</sup> CFUs of *V. harveyi*. Hemolymph from each shrimp were collected 6 h after *V. harveyi* injection and the number of bacterial cells in hemolymph was determined by a modified total plate count by serial dilution of each hemolymph sample and then plating by 10 µl spotting onto LB-agar plate (10 µl/dot) and incubating at 30 °C overnight followed by counting of bacterial CFUs.

### 3. Results

#### 3.1. Cloning and characterization of PmPPAE1

Using degenerate primers corresponding to the conserved regions of the serine proteinase (SP) domain of PPAEs, several SPs and serine proteinase homologues (SPHs) were obtained from the hemocyte of *P. monodon* including two putative PPAEs (*PmPPAE1*; accession nos. FJ595215 and *PmPPAE2*; FJ620685) and a masquerade-like SPH (named *PmMasSPH2*; FJ620686). Interestingly, a putative PPAE (*PmPPAE1*; FJ595215) exhibited the highest sequence similarity score (77%) with the freshwater crayfish, *P.*

*leniusculus*, PPAE (AJ007668). The partial cDNA of *PmPPAE1* encoded most of the SP catalytic domain (155 predicted aa.). A full-length sequence of the putative *P. monodon PmPPAE1* cDNA (1515 bp) was then obtained by RACE-PCR and found to contain 55-nucleotides of 5'-untranslated region (UTR), a 1392-nucleotide open reading frame, and a 68-nucleotide 3'-UTR. The ORF encoded a predicted polypeptide of 463 amino acid residues. The putative signal peptide consists of 18 amino acids followed by the mature peptide of 445 amino acids (Fig. 1). The calculated molecular mass of the mature peptide is 50.54 kDa with a predicted isoelectric point (pI) of 7.46. Two putative N-glycosylation sites, NGS (aa. position 42) and NAT (aa. position 192) sites, were found in the



**Fig. 1.** Multiple amino acid sequence alignment of *Penaeus monodon* PPAE1 (*PmPPAE1*; FJ595215) with that of other arthropod PPAEs: the crustacean *Pacifastacus leniusculus* (PIPPAE: AJ007668); the insects *Holotrichia diomphalia* PPAE (*HdPPAFI*: AB013088); *Manduca sexta* PPAE (*MsPAP1*: AF059728) and *Drosophila melanogaster* Melanization Protease-1 (*DmMP1*: NM\_141193). The signal peptide is in bold and underlined. Identical amino acid residues are grey shaded. Dark gray indicates conservation in three or more species. Black highlights indicate conserved cysteine residues. The putative disulfide linkages are shown by solid lines. The amino acid residues corresponding to the catalytic triad of serine proteinases are marked by black stars.

N-terminal region suggesting that it is a likely glycoprotein. Using the SMART program analysis, the six conserved cysteines of the clip domain and the three conserved catalytic sites (H271, D320 and S413) of trypsin-like SP domain were annotated as being present in the mature peptide of *PmPPAE1*.

Searching for sequence similarities of known proteins by BlastX revealed that the amino acid sequence of the *P. monodon* *PmPPAE1* is highly similar to *P. leniusculus* PPAAE (70% similarity; AJ007668), the lepidopteran insects *Manduca sexta* hemocyte protease-1 (62% similarity; AAB94557) and *Bombyx mori* hemocyte protease (61% similarity; NM\_001046950). It also shows 59% similarity to the horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, proclotting enzyme (AAA30094).

Pair-wise alignments between the complete sequence of shrimp *PmPPAE1* and that of crayfish PPAAE revealed that the predicted amino acid residues representing a clip domain (six cysteine residues) and a SP domain (H271, D320 and S413) were located at the N- and C- terminus, respectively (Fig. 1), indicating that this protein likely belongs to the family of clip domain SPs. Interestingly, two additional domains, a glycine-rich and proline-rich region, in the pro-region of *PmPPAE1* (13.2% of glycine and 31.8% of proline) are similar to the glycine (18.5%) and proline (31.8%) rich domains of the crayfish PPAAE, respectively. Therefore, this *PmPPAE1* was identified as a crustacean PPAAE.

### 3.2. Expression of *PmPPAE1* transcript in different tissues of *P. monodon*

The *PmPPAE1* mRNA expression in various tissues of *P. monodon* was investigated by RT-PCR (Fig. 2(A)). The *PmPPAE1* mRNA was abundantly expressed in hemocytes, but it was not detected in all other tissues examined, that are the hepatopancreas, gill, lymphoid organ, intestine and heart. EF1- $\alpha$  was used as the internal PCR and cDNA template control and was positively amplified from all tissues with no apparent large differences (if any) in the amount of

PCR products, suggesting equal cDNA template levels and thus the specificity of transcript expression of *PmPPAE1* to hemocytes.

### 3.3. The temporal expression of *PmPPAE1* mRNA in hemocyte after bacterial challenge

The temporal mRNA expression of the *PmPPAE1* after challenge with the Gram-negative bacteria *V. harveyi* 639 was measured by real-time quantitative RT-PCR (Fig. 2(B)). The pooled cDNAs of three individual shrimp at each time point were prepared from the total RNA of hemocytes of the challenged and control shrimp. Amplification of the partial fragment of EF1- $\alpha$  mRNA was used as the template reference gene. Bacterial injection affected the transcript abundance of the *PmPPAE1* gene. The transcript of *PmPPAE1* was decreased almost linearly over the first 6 h by 0.71- and 0.36- fold at 3 and 6 h, respectively, and then decreased further, but at a slower rate, up to a minimum 0.13-fold decreased expression level at 24 h after injection. Interestingly, by 48 h the transcript expression levels increased back to some 1.36-fold higher than at zero post infection.

### 3.4. Recombinant expression and Western blotting

The C-terminal SP domain of *PmPPAE1* was recombinantly expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells. The predicted molecular mass of the recombinant protein (rSP-domain) is 26.59 kDa whilst that determined by SDS-PAGE, was ~27 kDa (Fig. 3(A)), which is consistent with the calculated value. Using the purified rSP-domain protein as immunogen, rabbit polyclonal anti-rSP-domain antisera was generated commercially by standard immunization and bleeding of rabbits. Western blot analysis indicated that the polyclonal rabbit antisera reacted specifically with the rSP-domain protein (Fig. 3(B)).

To detect endogenous *PmPPAE1* expression in hemocytes of healthy shrimp, hemolymph was collected with anticoagulant containing EDTA. Twenty micrograms of the inactive crude HLS was subjected to reducing SDS-PAGE (12% (w/v) acrylamide resolving gel) and then transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Western blot analysis showed that one protein band, which corresponded to *PmPPAE1* with a predicted molecular weight of 50 kDa, was detected in hemocytes but not in the cell-free plasma (Fig. 3(C) and (D)).

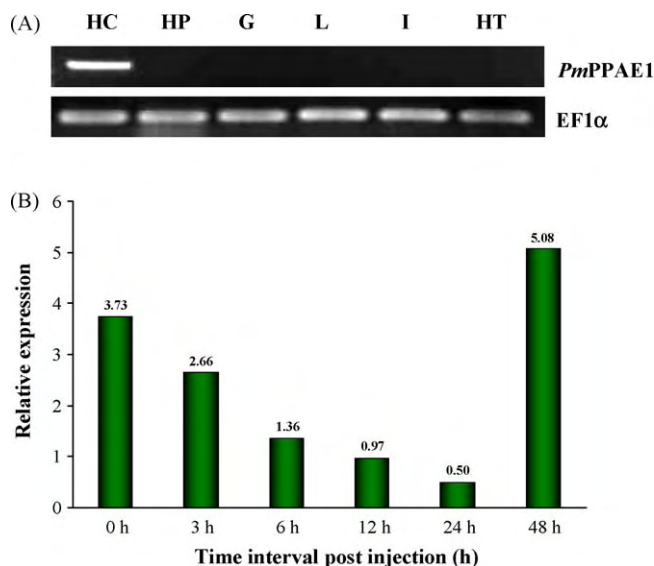
### 3.5. Gene silencing of *PmPPAE1*

To determine the efficiency of dsRNA mediated knockdown of *PmPPAE1* transcript levels, shrimp (~2 g) were injected with 5  $\mu$ g of dsRNA specific for the *PmPPAE1* gene and the level of *PmPPAE1* expression was determined 2 days after dsRNA injection. The RT-PCR analysis showed that the transcript level of *PmPPAE1* was decreased in *PmPPAE1* knockdown shrimp, whereas injection of GFP dsRNA had no discernable effect on the *PmPPAE1* transcript levels (Fig. 4).

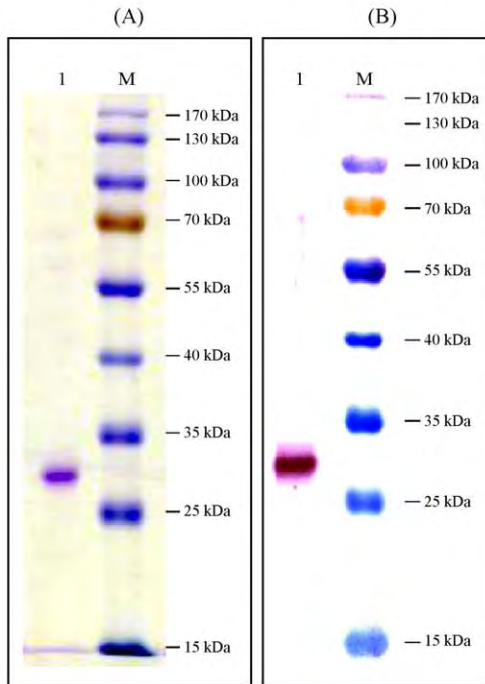
The specificity of gene knockdown was further verified by RT-PCR using gene-specific primers for the other known clip-SPs of *P. monodon*. The RT-PCR results demonstrated that injection of *PmPPAE1*-dsRNA did not detectably suppress transcription of the other clip-SPs (*PmPPAE2*; FJ620685, *PmClipSP1*; FJ620688 and *PmClipSP2*; FJ620687) and clip-SPHs (*PmMasSPH1*; DQ455050, *PmMasSPH2*; FJ620686 and *PmMasSPH3*; FJ620689) (Fig. 4), which supports the likely specificity of *PmPPAE1* RNAi knockdown.

### 3.6. Total phenoloxidase enzymic activity in the hemolymph

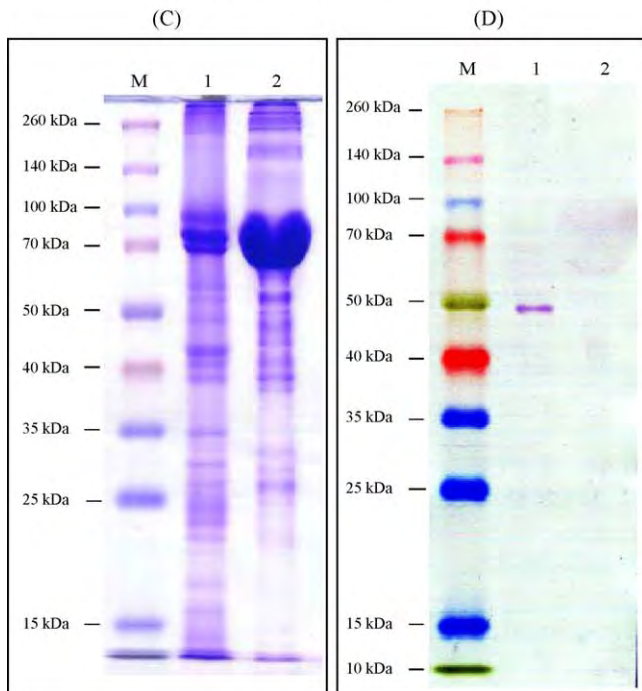
To determine whether suppression of the *PmPPAE1* gene transcript levels by RNAi knockdown would result in a reduction of



**Fig. 2.** (A) Tissue distribution analysis of the *PmPPAE1* transcript of *Penaeus monodon* by RT-PCR analysis: Hemocyte (HC), hepatopancreas (HP), gill (G), lymphoid organ (L), intestine (I) and heart (HT). EF1- $\alpha$  was used as a control housekeeping gene to indicate and standardize the amount of cDNA template in each RT-PCR reaction. Shown is a representative experiment from two independent repeats. (B) Relative expression analysis of *PmPPAE1* transcripts in the hemocytes of *Vibrio harveyi*-injected shrimp by SYBR Green real-time PCR at the indicated times post-injection. Relative expression levels of mRNA were calculated according to Pfaffl [19], using EF1- $\alpha$  as the internal reference gene.

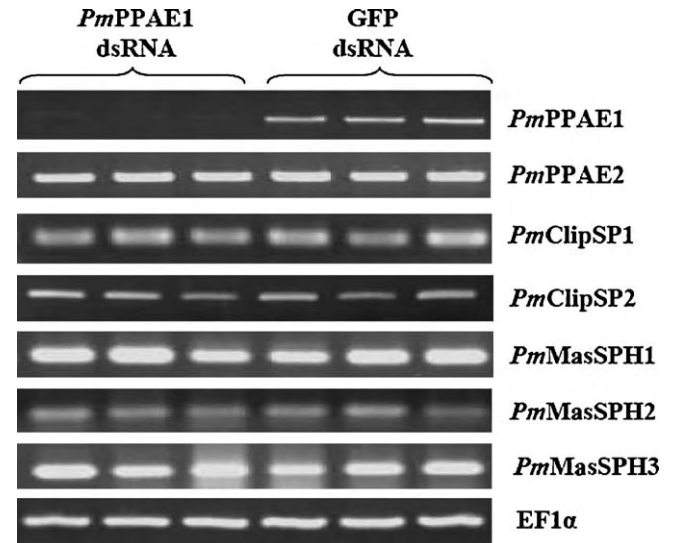
Purified rSP-domain of *PmPPAE1*

## Hemocyte and plasma proteins



**Fig. 3.** SDS-PAGE and Western blot analysis of purified recombinant SP-domain (rSP-domain) of *PmPPAE1* (A and B), hemocyte and cell-free plasma proteins (C and D). Purified recombinant protein (1  $\mu$ g), hemocyte proteins (20  $\mu$ g) and cell-free plasma proteins (100  $\mu$ g) were separated on reducing SDS-PAGE (12% (w/v) acrylamide resolving gel), and the proteins were stained with Coomassie blue (left) or transferred to a PVDF membrane for Western blot analysis (right) probing with rabbit anti-rSP-domain polyclonal antibody. Lanes 1A and 1B, rSP-domain; lanes 1C and 1D, hemocyte proteins; lane 2C and 2D, cell-free plasma proteins; lane M, protein marker.

the total PO activity, hemolymph was collected from the knock-down shrimp and subjected to a total PO enzymic activity assay. The result showed a significant reduction ( $\sim 36.7\%$ ) in the total PO activity in the RNAi-mediated *PmPPAE1* knockdown shrimp,

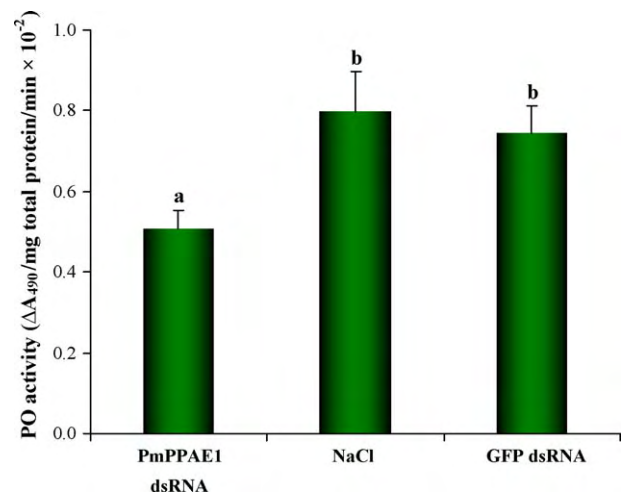


**Fig. 4.** Gene-specific silencing of *PmPPAE1* transcript levels in *Penaeus monodon* hemocyte. Shrimp ( $\sim 2$  g, fresh weight) were injected twice with 5  $\mu$ g of *PmPPAE1* or GFP dsRNAs as outlined in Section 2. Total RNA was extracted from hemocytes 48 h after the second injection and was subjected to analysis using semi-quantitative RT-PCR. Each lane represents cDNA from an individual shrimp. The effect of *PmPPAE1* dsRNA injection on the expression levels of *PmPPAE1* and the other known other clip-SPs (*PmPPAE2*; FJ620685, *PmClipSP1*; FJ620688 and *PmClipSP2*; FJ620687) and clip-SPHs (*PmMasSPH1*; DQ455050, *PmMasSPH2*; FJ620686 and *PmMasSPH3*; FJ620689) of *P. monodon* was further examined by RT-PCR using gene-specific primers (Table 1). *EF1α* was used as a control housekeeping gene to standardize the amount of cDNA template in each reaction.

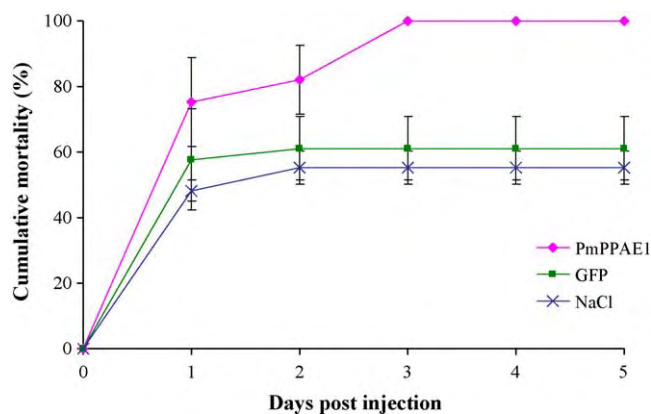
whereas the GFP injected shrimp showed no significantly decreased total PO activity when compared to the NaCl control (Fig. 5).

## 3.7. Mortality assay and bacterial clearance

To test whether *PmPPAE1* is necessary for shrimp to survive *V. harveyi* infection, shrimp ( $\sim 10$  g) were pre-injected with *PmPPAE1* dsRNA ( $\sim 20$   $\mu$ g), followed by a subsequent injection with a normally sub-lethal dose of the Gram-negative pathogenic bacterium, *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFUs). Mortality was then

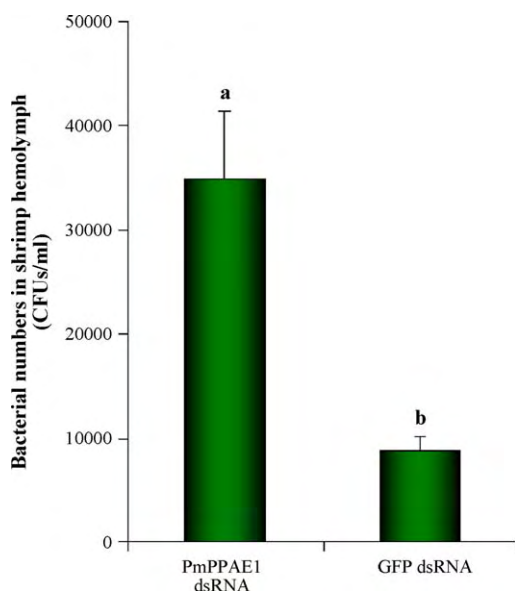


**Fig. 5.** Total hemolymph phenoloxidase (PO) activity in *PmPPAE1* silenced shrimp. Hemolymph was collected 48 h after the second dsRNA injection. Shrimp injected with either GFP dsRNA in saline (150 mM NaCl), or with only saline, were used as control groups. The total PO enzymic activity was measured using L-dopa and was defined as  $\Delta A_{490}/\text{mg protein}/\text{min}$ . Experiments were repeated three times and the data is shown as the mean  $\pm$  standard deviation. Means with the same lower case letters (above each bar) are not significantly different at the  $p < 0.05$  level.



**Fig. 6.** Cumulative mortality of *PmPPAE1* silenced shrimp challenged with *Vibrio harveyi*. Shrimp were injected with *V. harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFUs) following the second injection of dsRNA as outlined in Section 2. Control groups were injected with either GFP dsRNA in saline (150 mM NaCl), or just saline. Shrimp mortality was recorded twice each day for 5 days. The cumulative mortality (%) in each experimental group (8–10 shrimp/group) is presented as the mean  $\pm$  standard deviation, and is derived from triplicate independent experiments.

scored 3 h after infection and twice a day thereafter (Fig. 6). Shrimp injected with *PmPPAE1* dsRNA attained 100% cumulative mortality within 72 h post infection, whereas shrimp injected with GFP dsRNA attained a total cumulative mortality of ~60%, which was not significantly different from that of the control (saline injected shrimp). The high mortality rate of the *PmPPAE1* knockdown shrimp were accompanied by a high viable bacterial count in the hemolymph after 6 h with some four-fold higher amounts in the *PmPPAE1* knockdown shrimp compared with the controls (Fig. 7). These results suggest that *PmPPAE1* is likely to participate in the proPO system and plays an important role in protecting shrimp from *V. harveyi* infection, or at least severe systemic infections, by enhancing bacterial clearance.



**Fig. 7.** Bacterial numbers in *PmPPAE1* knockdown shrimp. Shrimp were injected with *PmPPAE1* or GFP (control) dsRNA, as outlined in Section 2, and then injected with a systemic *Vibrio harveyi* 639 ( $2 \times 10^5$  CFUs). The bacterial colony forming units (CFUs), by a modified total plate count method, in the shrimp hemolymph were determined as CFUs/ml of hemolymph at 6 h after the bacterial challenge. The data represent the mean  $\pm$  standard deviation and are derived from three independent repeats. Means with the same lower case letters (above each bar) are not significantly different at the  $p < 0.05$  level.

#### 4. Discussion

Invertebrate clip domain serine proteinases (clip-SPs) are one of the essential components of extracellular signaling cascades in various biological processes, especially in embryonic development and innate immune responses [11,12,21,22]. In the present study, we identified and characterized a clip-SP from the black tiger shrimp, *P. monodon*, that showed the highest sequence similarity to the crayfish, *P. leniusculus* PPAAE. Previously, the crayfish PPAAE has been shown to be the terminal enzyme of the proPO cascade that converted the inactive proPO to the active PO [8,23]. High sequence identity (60%) and similarity (70%) of the *P. monodon* clip-SP with crayfish PPAAE, suggests its possible role as a PPAAE in the melanization cascade of *P. monodon* shrimp. Thus, it was named *PmPPAE1*.

Based on the predicted amino acid sequence of *PmPPAE1*, the protein is composed of two domains, an N-terminal clip domain and a C-terminal SP domain, which together are the characteristics of the clip-SPs [11]. The predicted mature *PmPPAE1* enzyme contains a conserved catalytic triad (H271, D320 and S413 of the trypsin-like SP family) which is present in all trypsin-like SPs and is crucial for the formation and stabilization of the catalytic site in the three-dimensional structure of the activated enzyme [11].

The tissue distribution of *PmPPAE1* transcripts, as determined by RT-PCR analysis, revealed that *PmPPAE1* was highly expressed in hemocyte but was not expressed in digestive tissues such as the hepatopancreas and intestine. A similar expression profile has been observed for PPAAE mRNA in *P. leniusculus*, where the mRNA was found to be expressed in hemocytes but not in the hepatopancreas [8]. Moreover, the results of Western blot analysis shown here suggest that endogenous *PmPPAE1* was present in hemocytes, but not in the cell-free plasma.

In insects, the proPO activating enzyme gene of *Manduca sexta* is constitutively expressed at high levels in the integument and less abundantly in the fat body of naive larvae [24]. The expression level of three PAP transcripts (PAP-1, -2 and -3) were induced to a higher level by bacterial injection [24–26]. In *Drosophila*, five putative PPAAE genes (CG9733, CG3505, CG3066, CG16705 and CG1102) were up-regulated in flies challenged by bacterial infection [27]. Likewise, a PAP of the lepidopteran insect, *Samia cynthia ricini*, and clip-SPs (Sp14D2 and Sp14A) of the dipteran insect, *Anopheles gambiae*, were reported to be up-regulated upon stimulation with  $\beta$ -1,3-glucan or bacterial challenge [28,29]. Interestingly, in the present study, *V. harveyi* injection resulted in a biphasic response with an initial marked decrease of *PmPPAE1* transcript levels in *P. monodon* at 3–24 h after systemic bacterial challenge, followed by significant increase at 48 h after infection. In contrast, none of the crayfish PPAAE transcript levels were reported to be affected upon *Aeromonas hydrophila* challenge [20]. In crustaceans, expression levels of several SPs and serine proteinase homologues (SPHs) have been investigated. The SP transcript levels of the related shrimp, *Litopenaeus vannamei*, were not found to be stimulated by injection of *V. alginolyticus* [13] or LPS [30]. However, the transcripts of the mud crab, *Scylla serrata* SP, the shrimp *Marsupenaeus japonicus* SPH, and *P. monodon* SPHs (c-SPH and *PmMasSPH1*) increased significantly post systemic challenge with zymosan [31], peptidoglycan [14],  $\beta$ -glucan [15] and *V. harveyi* [16] challenges, respectively. It is possible that this discrepancy is due to the differences within and between the microorganisms, especially pathogenicity, or to the number of newly synthesized hemocytes or the specificity and complexity of activating- and interacting-immune signaling pathways.

Double-stranded RNA-mediated RNAi was used to determine whether *PmPPAE1* is involved in the proPO system. The results showed that knockdown of the *PmPPAE1* transcript impaired total hemolymph PO activity and that this also led to an increased level

of viable *V. harveyi* in the plasma and, presumably, their proliferation within the hemolymph, resulting in a higher susceptibility to pathogenic *V. harveyi* infection. Similarly, some the CLIPB14, CLIPB4 and CLIPB8 clip-SPs from *A. gambiae* have been shown by RNA interference to function in the proPO cascade (melanization) of malaria parasites [32–34], and are therefore good candidate clip-SPs in the proPO activating cascade. In *Drosophila*, the clip-SPs, melanization protease1 (MP1) and MP2 (serine protease 7), have been identified and shown to be the proteinases involved in the melanization cascade [35,36]. Active MP1 is required for stimulation of melanization in response to both bacterial and fungal infections, whereas MP2 is mainly involved during fungal infection. However, whether they are the terminal clip-SP (PPAE) that directly cleaves proPO still remains to be elucidated.

In a previous report, we have shown the likely important role of two proPOs (*PmproPO1* and *PmproPO2*) in the *P. monodon* shrimp immune defense against systemic *V. harveyi* infections [18]. In contrast to some reports in *Drosophila* [37], and in *A. gambiae* [38], that have questioned the importance of phenoloxidase in the defence against microbial infections, in this study it was demonstrated that *PmPPAE1* is an essential molecule in the innate defense against systemic *V. harveyi* infections. Knockdown of the *PmPPAE1* gene strongly increased the shrimp mortality following the *V. harveyi* infection, whilst the number of proliferation-competent (i.e. total plate count enumerable) bacteria in the plasma increased some four-fold compared to the levels in the hemolymph of the control group, suggesting either growth and or failure to clear. Interestingly, in the proPO silenced shrimp (that is pre-injected with two *PmproPO* dsRNAs), the number of bacteria in hemolymph increased about six-fold at 6 h post-injection (data not shown), suggesting that both *PmproPOs* and *PmPPAE1* function in the proPO system to clear the bacteria from circulation after infection. These results are consistent with those reported in the crayfish where proPO gene knockdown resulted in an increased bacterial count of about 2.3-fold in proPO-silenced crayfish [20]. The data suggested that the genes that are involved in the proPO system of crustaceans (shrimp and crayfish) play a role in the control of systemic bacterial infections.

Our data, including the previous report on *PmproPOs* [18], reveal the important role of two *PmproPOs* and *PmPPAE1* in the immune defense system of *P. monodon* shrimp. However, melanization is a complex biochemical process and very little is known about the genetic control of this defense mechanism in shrimp. Continued effort to identify and characterize the genes involved, directly or indirectly, in the proPO system is essential for an understanding of shrimp immunity.

## Acknowledgements

This work is supported by a grant from Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), and a fellowship from Thailand Research Fund to Piti Amparyup. A student fellowship granted to Walaiporn Charoensapsri by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, Thailand Research Fund, is acknowledged. Visiting Fellowship under the JSPS core-University Program is also acknowledged.

## References

- [1] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:116–26.
- [2] Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:128–50.
- [3] Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 2006;211:213–36.
- [4] Sritunyalucksana K, Söderhäll K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 2000;191:53–69.
- [5] Kanost MR, Jiang H, Yu X-Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev* 2004;198:97–105.
- [6] Satoh D, Horii A, Ochiai M, Ashida M. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, characterization and cDNA cloning. *J Biol Chem* 1999;274:7441–53.
- [7] Kwon TH, Kim MS, Choi HW, Joo CH, Cho MY, Lee BL. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 2000;267:6188–96.
- [8] Wang R, Lee SY, Cerenius L, Söderhäll K. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem* 2001;268:895–902.
- [9] Lee KY, Zhang R, Kim MS, Park JW, Park HY, Kawabata S-I, et al. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by  $Ca^{2+}$  in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *Eur J Biochem* 2002;269:4375–83.
- [10] Yu X-Q, Jiang H, Wang Y, Kanost MR. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:197–208.
- [11] Jiang H, Kanost MR. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 2000;30:95–105.
- [12] Ross J, Jiang H, Kanost MR, Wang Y. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* 2003;304:117–31.
- [13] Jiménez-Vega F, Vargas-Albores F, Söderhäll K. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 2005;18:101–8.
- [14] Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, Takahashi Y, Aoki T. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Fish Shellfish Immunol* 2005;18:39–48.
- [15] Lin C-Y, Hu K-Y, Ho S-H, Song Y-L. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule. *Dev Comp Immunol* 2006;30:1132–44.
- [16] Amparyup P, Jitvaropas R, Pulsok N, Tassanakajon A. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:535–46.
- [17] Sriphajit T, Flegel TW, Senapin S. Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. *Dev Comp Immunol* 2007;31:1145–58.
- [18] Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 2009;33:247–56.
- [19] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2004–7.
- [20] Liu H, Jiravanichpaisal P, Cerenius L, Lee BL, Söderhäll I, Söderhäll K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 2007;282:33593–8.
- [21] Gorman MJ, Paskewitz SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol* 2001;31:257–62.
- [22] Jang I-H, Nam H-J, Lee W-J. CLIP-domain serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *MBB Rep* 2008;41:102–7.
- [23] Aspán A, Söderhäll K. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem* 1991;21:363–73.
- [24] Jiang H, Wang Y, Kanost MR. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12220–5.
- [25] Jiang H, Wang Y, Yu X-Q, Kanost MR. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 (PAP-2) from hemolymph of *Manduca sexta*: a bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J Biol Chem* 2003;278:3552–61.
- [26] Jiang H, Wang Y, Yu X-Q, Zhu Y, Kanost MR. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:1049–60.
- [27] De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12590–5.
- [28] Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. *Insect Biochem Mol Biol* 2000;30:35–46.
- [29] Bao Y, Yamano Y, Morishima I.  $\beta$ -1,3-Glucan inducible expression of prophenoloxidase-activating proteinase from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Comp Biochem Physiol B* 2007;147:45–8.
- [30] Okumura T. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:68–76.
- [31] Vaseeharan B, Lin Y-C, Ko C-F, Chen J-C. Cloning and characterisation of a serine proteinase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol* 2006;21:20–31.
- [32] Volz J, Osta MA, Kafatos FC, Müller H-M. The roles of two clip domain serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem* 2005;280:40161–8.

- [33] Paskewitz SM, Andreev O, Shi L. Gene silencing of serine proteases affects melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 2006;36:701–11.
- [34] Volz J, Müller H-M, Zdanowicz A, Kafatos FC, Osta MA. A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cell Microbiol* 2006;8:1392–405.
- [35] Castillejo-López C, Häcker U. The serine protease Sp7 is expressed in blood cells and regulates the melanization reaction in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1075–82.
- [36] Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *J Biol Chem* 2006;281:28097–104.
- [37] Leclerc V, Pelte N, El Chamy L, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, et al. Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *EMBO Rep* 2006;7:231–5.
- [38] Schnitger AKD, Kafatos FC, Osta MA. The melanization reaction is not required for survival of *Anopheles gambiae* mosquitoes after bacterial infections. *J Biol Chem* 2007;282:21884–8.



## Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*

Rungrat Jitvaropas<sup>a</sup>, Piti Amparyup<sup>a,b</sup>, Paul S. Gross<sup>c</sup>, Anchalee Tassanakajon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Shrimp Molecular Biology and Genomics Laboratory, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>b</sup> National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2008

Received in revised form 7 March 2009

Accepted 8 March 2009

Available online 26 March 2009

#### Keywords:

Clip domain

Innate immunity

*Penaeus monodon*

Masquerade-like serine proteinase homologue

Bacterial binding

Cell adhesion

Antimicrobial activity

### ABSTRACT

A cDNA encoding a masquerade-like serine proteinase homologue (*PmMasSPH*) from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, has been cloned and characterized. The transcript of *PmMasSPH* is induced in response to *Vibrio harveyi* infection. To further characterize the function(s) of the protein, (i) the N-terminal region comprising the glycine-rich repeats and the clip domain, and (ii) the C-terminal SP-like domain of the *PmMasSPH* were separately cloned into the pET-28b(+) expression vector and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3). The two recombinant proteins were then assayed for various biological functions; proteinase activity, hemocyte adhesion, bacterial binding, bacterial clearance and antimicrobial activity. The C-terminal SP-like domain lacks proteolytic activity but mediates hemocyte adhesion and displays binding activity to the shrimp pathogenic bacterium, *V. harveyi* and specific binding to the bacterial cell wall component, lipopolysaccharide (LPS). The N-terminal region exhibited *in vitro* antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. In addition, the *in vivo* study revealed the opsonic activity of the *PmMasSPH* protein as shown by a higher bacterial clearance rate of *V. harveyi* coated with the recombinant proteins as compared with *V. harveyi* only. The results suggest that the *PmMasSPH* protein is a multifunctional immune molecule in shrimp defense.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Like other crustaceans, shrimp have a non-specific innate immunity which is composed of diverse processes and molecules to defend themselves against invading pathogens. The immune system of crustaceans consists of both cellular and humoral defenses including encapsulation, phagocytosis, a prophenoloxidase (proPO)-activating system for melanization, a clotting process and specific and general antimicrobial actions (Smith and Chisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992). The initiation of several immune responses in arthropods is triggered by the recognition and binding of pattern recognition proteins (PRPs) to the invading microorganism surface molecules such as lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan of bacterial cell walls, and  $\beta$ -1,3-glucan of fungal cell walls (Lee and Söderhäll, 2002). PRPs (LPS-,  $\beta$ -1,3-glucan, peptidoglycan-binding proteins, lectins and hemolins) have been identified from a variety of invertebrates and their biological functions characterized as being involved in hemocyte degranulation (Barracco et al., 1991; Perazzolo and Barracco, 1997), bacterial clearance (Jomori and Natori, 1992; Lee and Söderhäll, 2001), nodule formation (Eleftherianos et al., 2007),

antimicrobial defense (Sun et al., 2008) and activation of the proPO-activating system (Vargas-Albores et al., 1996; Lee et al., 2000; Ma and Kanost, 2000; Sritunyalucksana et al., 2002; Romo-Figueroa et al., 2004; Cheng et al., 2005; Du et al., 2007).

Arthropod clip-domain serine proteinases (clip-SPs) and clip-domain serine proteinase homologues (clip-SPHs) have been shown to be involved in various biological functions including immunity (Jiang and Kanost, 2000; Charoensapsri et al., 2009). The clip-SPHs possess structural features similar to clip-SPs which consist of the clip domain at the amino terminus and a serine proteinase-like (SP-like) domain that has a glycine instead of the critical serine at the carboxyl terminus. A crayfish masquerade (mas)-like SPH, however, contains a somewhat different amino terminus consisting of seven repeats of clip domains and glycine-rich regions (Huang et al., 2000). A mas-like SPH in *Drosophila* has been shown to be involved in embryonic muscle development (Murugasu-Oei et al., 1995). In arthropods, the clip-SPHs participate in an antimicrobial action in the horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* (Kawabata et al., 1996), as an immune molecule in the mosquito *Anopheles gambiae* (Dimopoulos et al., 1997), in the regulation of the proPO-activating system in some coleopteran and lepidopteran insects (Kwon et al., 2000; Lee et al., 2002; Yu et al., 2003), in pattern recognition, opsonization and cell adhesion activity in crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Lee and Söderhäll, 2001). Recent studies on shrimp

\* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5414.

E-mail address: [anchalee.k@chula.ac.th](mailto:anchalee.k@chula.ac.th) (A. Tassanakajon).

clip- (or pseudoclip-) SPHs have been carried out in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Rattanachai et al., 2005) and the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, where at least four genes (c-SPH, Lin et al., 2006; PmMasSPH, Amparyup et al., 2007; and SPH509 and SPH516, Sriphajit et al., 2007) have been identified. The recombinant c-SPH displays cell adhesion activity (Lin et al., 2006), whilst, SPH516 specifically interacts with the metal ion-binding (MIB) domain of the yellow head virus, suggesting that it might play an important role in viral responses (Sriphajit et al., 2007).

In crayfish *P. leniusculus*, it has been reported that the C-terminal SP-like domain of two masquerade-like SPH proteins exhibits cell adhesion activity *in vitro* (Huang et al., 2000; Lee and Söderhäll, 2001). Moreover, the N-terminal clip domain of a proPO-activating enzyme exhibits antibacterial activity towards Gram-positive bacteria (Wang et al., 2001). In *P. monodon*, a masquerade-like SPH (PmMasSPH) was previously cloned and its transcript expression levels found to be up-regulated upon bacterial challenge with *Vibrio harveyi* (Amparyup et al., 2007). Here, to further investigate the biological function(s) of the PmMasSPH, recombinant proteins encoding (i) the N-terminal glycine-rich repeat and clip domain, and (ii) the C-terminal SP-like domain of the PmMasSPH were cloned and expressed in an *E. coli*

expression system. The purified recombinant proteins were then characterized by screening for various biological functions; serine proteinase activity, cell adhesion activity, bacterial binding, bacterial clearance and antimicrobial activity.

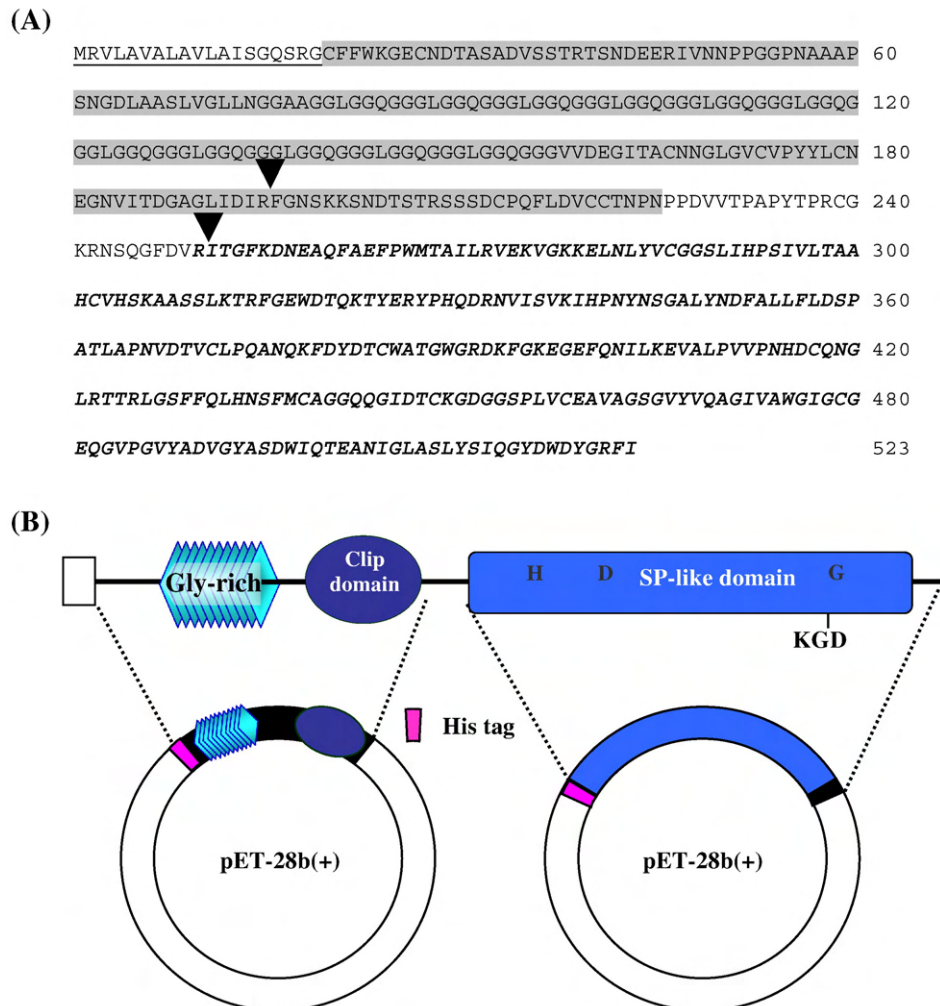
## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal handling

Juvenile black tiger shrimp (20–25 g of body mass) were purchased from commercial farms in Thailand and acclimatized in an aquarium under laboratory conditions (air-pumped circulating artificial seawater of 15 ppt salinity) for at least three days before use in any experiment.

### 2.2. Cloning of the N-terminal glycine-rich repeat and clip domain and the C-terminal serine proteinase-like (SP-like) domain of the PmMasSPH

The N-terminal region comprising the glycine-rich repeats and the clip domain and the C-terminal SP-like domain of the PmMasSPH were separately amplified by PCR (see Fig. 1) using upstream and downstream primers containing the indicated 5' flanking restriction sequence and an



**Fig. 1.** The cloning of two recombinant proteins encoding the N-terminal region comprising the repeated glycine rich and the clip domain and the C-terminal SP-like domain of the PmMasSPH from *Penaeus monodon*. (A) A deduced amino acid sequence of a PmMasSPH. The putative signal cleavage site is underlined. The two putative activation sites are indicated by arrowhead. The shaded and bold italicized amino acid sequences are the N-terminal region and the C-terminal SP-like domain, respectively that were separately cloned into pET-28b(+) vector with His-tag fusion. (B) Schematic drawing of structural domains of the PmMasSPH. The open box represents a putative signal peptide. The repeated glycine-rich motif, clip domain and SP-like domain are in stacked diamond, elliptical shape and bold box, respectively. The replacement catalytic triad is marked as the H, D, G letters and KGD indicates the integrin binding motif.

in-frame six histidine encoding tag (SP6HF\_NcoI: 5' CAT GCC ATG GGC CAT CAT CAT CAT CAT CGC ATC ACT GGA TTC AAG GAT 3', SPR\_HindIII: 5' CCC AAG CTT TTA AAT AAA TCT TCC GTA GTC CCA 3', ClipF\_NcoI: 5' CAT GCC ATG GGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT ATG TGC TTC TTT TGG AAG GGA GAA TGC A 3' and ClipR\_NotI: 5' ATA AGA ATG CCG CCG CTT AGT TCG GAT TGG TGC AGC AGA CGT CG 3'). Primers were designed from the previously reported PmMasSPH sequence (GenBank accession no. DQ455050) (Amparyup et al., 2007). Polymerase chain reaction (PCR) was performed using Advantage 2 polymerase mix (Clontech) with an initial 94 °C for 3 min stage followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. The amplicons were purified from 1.2% (w/v) TBE agarose gels using NucleoSpin® Extract II Kits (MACHEREY-NAGEL) and ligated into pGEM-Teasy cloning vector (Promega). The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* (K12) strain XL-1 Blue and selected with ampicillin (50 µg/mL) for propagation of the recombinant plasmid. DNA sequencing was used to confirm the correct and in-frame sequence of each clone.

### 2.3. Overexpression and purification of the recombinant N-terminal glycine-rich repeat and clip domain protein and the recombinant C-terminal SP-like domain protein of the PmMasSPH

The constructed plasmids carrying the correct insert were then directionally sub-cloned, following NcoI-HindIII or NcoI-NotI excision, into the multiple cloning site of *E. coli* expression vector, pET-28b(+) (Novagen), and transformed into *E. coli* strain Rosetta (DE3). The selected clones were inoculated in Luria-Bertani (LB) medium containing kanamycin (30 µg/mL) and chloramphenicol (34 µg/mL). Protein expression was induced by the addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (1 mM IPTG) for the last 4 h of culture. The induced cells were then harvested by centrifugation, resuspended in 20 mM phosphate buffer pH 7.4, and disrupted by sonication. The recombinant proteins, expressed as inclusion bodies, were solubilized and purified under denaturing conditions in 8 M urea using nickel affinity chromatography (GE Healthcare). The purified recombinant proteins were subsequently refolded by three steps of dialysis against a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 4 M urea, then gradually reduced the urea concentration to 2 M urea in the second step and finally without urea. Each dialysis step was performed for at least 10 h at 4 °C. The purified recombinant C-terminal SP-like domain was used for preparation of a specific polyclonal antibody by the commercial service at Biomedical Technology Research Unit, Chiang Mai University, Thailand.

### 2.4. Protein content determination

The protein content was measured according to Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (Fluka; supplied with the Bradford reagent) as the standard.

### 2.5. SDS-PAGE and Western blot analysis

The purified recombinant N-terminal region and C-terminal SP-like domain proteins were run onto SDS-PAGE gel and then electrottransferred to a nitrocellulose membrane in a buffer containing 48 mM Tris-HCl pH 9.2, 39 mM glycine and 20% methanol. The membrane was blocked by immersion in 5% skimmed milk in phosphate buffer saline pH 7.4 containing 0.05% Tween20 (PBS-Tween buffer) at room temperature overnight, washed in PBS-Tween buffer, then incubated with the mouse anti-His antiserum (GE Healthcare) (1:3000 dilution) at 37 °C for an hour. After washing in the same buffer, bound primary antibody was amplified by incubation with alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:5000 dilution, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) and after washing (as above) the bound antibody was detected by color development using NBT/BCIP as substrate (Fermentas).

### 2.6. MALDI-TOF mass spectrometry

The molecular mass of the purified recombinant N-terminal region and C-terminal SP-like domain proteins was analyzed by matrix assisted laser desorption-ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry by the commercial service of the Proteomic Service Center, Bioservice Unit (BIOTEC, Thailand).

### 2.7. Immunodetection of the PmMasSPH protein in shrimp hemocytes

*P. monodon* hemocyte lysate supernatant (HLS) was prepared in AC-1 anticoagulant (0.45 M NaCl, 0.1 M glucose, 30 mM sodium citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, pH 4.6) followed by centrifugation, and the cells were washed and homogenized in 150 mM NaCl containing 2 mM EDTA (HLS1). Otherwise, 10% trisodium citrate was used as an anticoagulant to collect the blood, and HLS2 was prepared in 150 mM NaCl without EDTA and activated by laminarin (β-1,3-glucan chain with some β-1,6-linked glucose units) (Sigma) for an hour. The proteins in HLSs were subjected to 12% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to membrane. The rabbit anti-SP-like antibody (1:500 dilution) was used for immunoblotting, followed by incubation with goat anti-rabbit IgG antibody linked alkaline phosphatase (1:10,000 dilution), and detected using NBT/BCIP substrates.

### 2.8. Proteinase activity assay

The proteinase activity assay was determined according to the method of Amparyup et al., 2008a. The proteinase activity of the recombinant C-terminal SP-like domain protein was assayed using the chromogenic *p*-nitroanilide substrates, 293.6 µM *N*-benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilide (Sigma), 147.3 µM *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (Sigma) and 443.1 µM *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (Sigma) as substrates for trypsin, chymotrypsin and elastase, respectively. The proteinase enzymes (trypsin, chymotrypsin and elastase) were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 and used as positive controls in each assay. An aliquot of 60 µL of the recombinant C-terminal SP-like domain protein (0.404 µM and 4.04 µM) or positive control enzymes (0.005 µM trypsin, 0.003 µM chymotrypsin and 0.039 µM elastase, respectively) was pre-incubated with 10 µL chromogenic peptide in a 96 well plate. After incubation at 30 °C for 10 min, the reaction was stopped by the addition of 20 µL of 50% (v/v) acetic acid and the increase in *p*-nitroaniline production was recorded by measuring the absorbance at 405 nm. Assays were carried out in duplicate.

### 2.9. Cell adhesion assay

The cell adhesion assay was carried out as described by Johansson and Söderhäll (1988) with a slight modification. The sterile glass coverslips (22×22 mm, Chance Proper, Ltd.) were laid in 6-well flat bottom plates, coated with 200 µL of 10 µg/mL the purified recombinant N-terminal region protein or C-terminal SP-like domain protein or at 20 °C for 1 h and subsequently blocked with BSA to remove residual non-specific protein binding sites on the coverslip. Coverslips coated with BSA only were used as the control. Hemocyte suspensions from subadult *P. monodon* (approximately 20 g) were prepared in 0.45 M NaCl and comprised of ~90% living cells as determined by standard trypan blue exclusion assays. The density of hemocyte suspension was assessed in a hemocytometer using a light microscope, adjusted to 2×10<sup>4</sup> cells/mL, and 180 µL of suspension was overlaid onto each coated coverslip together with 20 µL of 100 mM CaCl<sub>2</sub>, and incubated at 20 °C for 1 h. The unbound hemocytes were then washed off by three washes with Penaeid Shrimp Solution (PSS; 0.45 M NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.6) and fixed in 3.7% (w/v) formaldehyde. The number of attached cells was counted at 200× magnification under an inverted microscope, covering at least 10% of the

area initially covered by the cell suspension. Cell adhesion activity (%) was calculated in comparison with the number of initial hemocytes (3600 cells). The assays were performed in triplicate from each individual shrimp.

## 2.10. Assay of binding activity to bacteria and LPS

The recombinant C-terminal SP-like domain protein was investigated for binding to the Gram-negative bacteria *V. harveyi* 1526 using a method described by Lee and Söderhäll (2001) with modification. Briefly, the cultured bacteria in mid-logarithmic phase growth ( $OD_{600}$  of 0.6) were fixed in 3.7% (w/v) formaldehyde by gently shaking at 37 °C for an hour to terminate the enzymatic activity of bacteria. The purified protein (10 µg of the C-terminal SP-like domain protein) was incubated with 100 µL of *V. harveyi* ( $3.2 \times 10^8$  cells) with gentle rocking at 4 °C for 35 min. After centrifugation at 2000 g for 10 min, the supernatant containing unbound protein was removed and the pellet was resuspended and washed five more times with PSS buffer in this manner. Bound proteins were finally eluted from the bacteria by 1× SDS-PAGE sample loading buffer. Bacteria treated with PSS buffer only were used as controls. The resulting supernatant (unbound protein), washed (unbound/weakly bound protein), and eluted (bound protein) fractions were run on 12% (w/v) SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to nitrocellulose and subjected to immunoblotting using the anti-His antibody as described above.

For the LPS binding assay, the LPS from *E. coli* serotype 0111:B4 (Sigma) was used to test the binding activity to the recombinant C-terminal SP-like domain protein. The purified proteins (10 µg) were mixed with 200 µg of LPS in PSS buffer for 1 h at 4 °C and then centrifuged at 16,000 ×g at 4 °C for 15 min. The washing and elution steps were operated as described above. The obtained supernatant, washed fractions and bound proteins were subsequently analyzed by SDS-PAGE and Western blot as described above.

## 2.11. Quantitative binding to immobilized LPS

Binding property of the purified C-terminal SP-like domain protein to immobilized LPS was examined by ELISA using the method as previously described by Gonzalez et al. (2005) with a slight modification. LPS solution was prepared in 100 mM  $Na_2CO_3$ , 20 mM EDTA, pH 9.6 and 50 µL of LPS (3 µg/well) immobilized on the flat bottom 96-well plate and the content was dried up completely at 60 °C for 2 h. Then, the excess LPS were washed with PBS buffer and the non-specific binding was blocked with 5% (w/v) BSA in PBS buffer at room temperature for 1 h. Binding of the serial dilution of the purified recombinant SP-like domain protein (0–200 µg/mL, 100 µL/well) was performed at room temperature for an hour. The wells without recombinant protein incubation were used as control reaction. After washing the excess protein with PBS buffer containing 0.05% Tween 20, the ELISA plate was hybridized with the rabbit anti-SP-like antibody (1:5000: 50 µL/well) at 37 °C for 2 h, followed by incubation with goat anti-rabbit IgG antibody linked alkaline phosphatase (1:10,000 dilution, 50 µL/well) at room temperature for an hour. After washing, the colorimetric reaction was detected by adding 100 µL of *p*-nitrophenylphosphate. After the sufficient yellow color occurred, absorbance at 405 nm of each well was measured by a microtiter plate reader (Beckman Coulter AD200). The results from three experiments were used for statistical analysis. The binding results were analyzed by Scatchard plot analysis, and the maximum binding ( $A_{max}$ ) and dissociation constant ( $K_d$ ) were calculated from the Y-intercept and slope of linear equation as  $1/A = K_d/A_{max}[L] + 1/A_{max}$ , where  $A$  is the absorbance at 405 nm and  $[L]$  is the protein concentration.

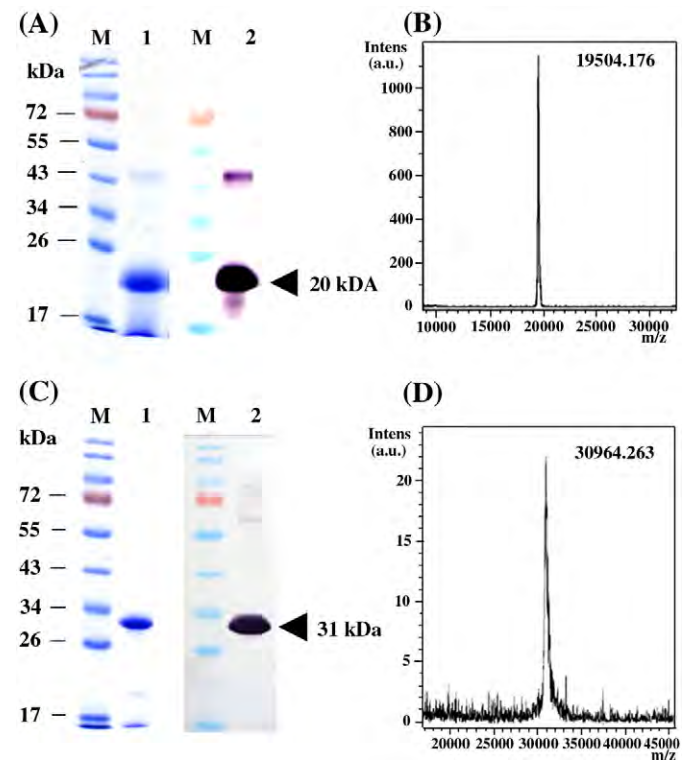
## 2.12. Assay of in vivo bacterial clearance

The bacterial clearance assay was fundamentally performed as previously described (Lee and Söderhäll, 2001) with modifications.

The combination of the recombinant N-terminal region and C-terminal SP-like domain proteins of the *PmMasSPH* (1 µM each) were incubated with *V. harveyi* ( $3.2 \times 10^8$  cells) at 4 °C for 1 h to obtain *V. harveyi* coated with the recombinant proteins. The supernatant was then removed, and the cells were washed twice with PBS. One hundred microliters of  $1 \times 10^5$  cells uncoated *V. harveyi* (control) or coated *V. harveyi* were injected into *V. harveyi*-free shrimp. At 15, 30, 60 and 180 min after injection, one hundred microliters of hemolymph of five treated shrimp per treatment was collected without anticoagulant and immediately plated on thiosulfate–citrate–bile–sucrose (TCBS) agar plates incubating at 30 °C for 9 h. The colony forming units (cfu) were counted and the number of viable *V. harveyi* in shrimp hemolymph was calculated at the various sampling times and expressed as cfu mL<sup>-1</sup> hemolymph. Each experiment was performed in five independent replicates and the effects of time after injection were tested on the following variables using one-way ANOVA followed by Duncan ( $P < 0.05$ ).

## 2.13. Antimicrobial activity assay

Antimicrobial activity of the recombinant N-terminal region protein was tested against the four Gram-positive species (*Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*) and six Gram-negative species (*Escherichia coli* 363, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium* and *V. harveyi*), and the minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as previously reported (Amparyup et al., 2008b). The bacteria cultures in exponential growth phase were diluted to  $OD_{600} = 0.001$ . One hundred microliters diluted cell suspension was incubated with various concentrations of a recombinant protein ranging from 0 to 80 µM in 96-well microtiter plate. After overnight incubation, the turbidity of the cultures was measured at  $OD_{600}$  to estimate the bacterial growth. The



**Fig. 2.** SDS-PAGE and Western blot analysis of the recombinant N-terminal region protein (A) and the recombinant C-terminal SP-like domain protein (C). Lane M, pre-stained protein standard marker (Fermentas); lane 1, the purified recombinant proteins through Ni affinity chromatography on 12% SDS-PAGE and lane 2, Western analysis of the recombinant proteins using anti-His tag antibody. B and D show the mass spectrum of the recombinant N-terminal region and C-terminal SP-like domain proteins with a molecular mass of 19,504.176 Da and 30,964.263 Da, respectively.

MIC value was expressed in the lowest concentration of the recombinant protein that showed 100% visible inhibition of bacterial growth.

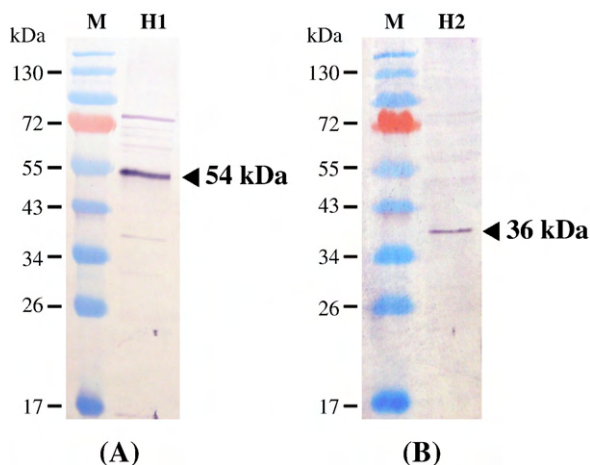
### 3. Results

#### 3.1. Overexpression and purification of the recombinant N-terminal glycine-rich repeat and clip domain and the recombinant C-terminal SP-like domain of the *PmMasSPH*

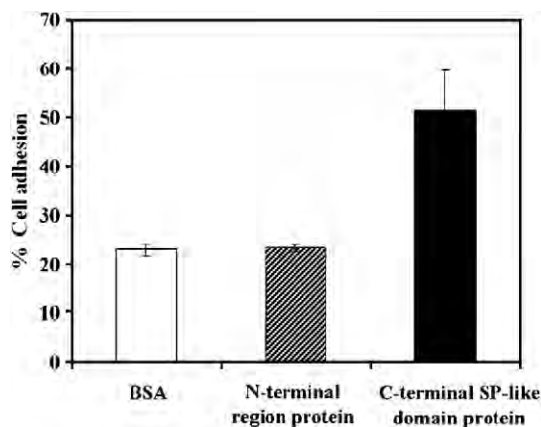
To begin understanding the functions of the *PmMasSPH*, the N-terminal region (the glycine-rich repeats and a clip domain) and the C-terminal region (the SP-like domain) of *PmMasSPH* were recombinantly expressed separately (Fig. 1). After 4 h IPTG induction, high amounts of each of the recombinant proteins of the N-terminal and C-terminal regions were obtained. The recombinant proteins, expressed as inclusion bodies, were solubilized in denaturing solution and efficiently purified with a single-step purification using a Ni-NTA affinity column under denaturing conditions in 8 M urea. After removing the urea in three dialysis steps, the recombinant proteins were refolded and analyzed for the identity and purity on 12% (w/v) SDS-PAGE and confirmed by immunoblotting using anti-His antibody. A major band of the recombinant N-terminal region protein, approximately 20 kDa, and the recombinant C-terminal region protein, approximately 31 kDa, was observed (Fig. 2A and C) which is in good agreement with the calculated molecular mass of the purified recombinant N-terminal region protein (20,115.40 Da) and C-terminal region protein (31,060.39 Da) of the *PmMasSPH* based on their respective deduced amino acid sequences including six histidine residues. Moreover, MALDI-TOF mass spectrometry analysis revealed a single mass spectrum for both recombinant protein preparations with no contaminating other proteins and molecular masses of 19,504.176 Da and 30,964.263 Da, respectively (Fig. 2B and D).

#### 3.2. The presence of the *PmMasSPH* protein in shrimp hemocytes

The purified C-terminal SP-like domain protein was used for the production of a specific polyclonal antibody in rabbits. The anti-SP-like domain antiserum was then used to detect the *PmMasSPH* protein in *P. monodon* hemocyte lysate supernatant (HLS) by immunodetection assay. The HLS prepared in the presence of EDTA showed a major band with size of a 54 kDa whilst that prepared without EDTA and activated with laminarin (a  $\beta$ -glucan) showed a 36 kDa band (Fig. 3A and B) probably representing the processed form of the *PmMasSPH*



**Fig. 3.** Immunoblotting analysis of the *PmMasSPH* protein in *Penaeus monodon* hemocyte lysates detected by using the anti-SP-like domain antiserum. Lane H1: hemocyte lysate prepared in the presence of EDTA; Lane H2: hemocyte lysate prepared without EDTA and activated with laminarin (a  $\beta$ -glucan); and M indicates pre-stained protein standard marker (Fermentas).



**Fig. 4.** Cell adhesion activity of the recombinant C-terminal SP-like domain and N-terminal region proteins to shrimp hemocytes. Cover slips coated with BSA or the C-terminal SP-like domain protein or the N-terminal region protein was used to determine the cell adhesion activity. The results were shown as means with standard error bars. The assays were performed in triplicate with three different hemocytes suspensions from individual shrimp.

protein. Based on the deduced amino acid sequence of the *PmMasSPH*, two putative activation cleavage sites were predicted after arginine within the clip domain (Arg195) and at the beginning of the SP-like domain (Arg250), producing the processed forms of the *PmMasSPH* with size of 35.87 and 29.89 kDa, respectively. The result from immunoblotting suggests that the authentic activation site is likely at the position between Arg195 and Phe196.

#### 3.3. Serine proteinase activity assay

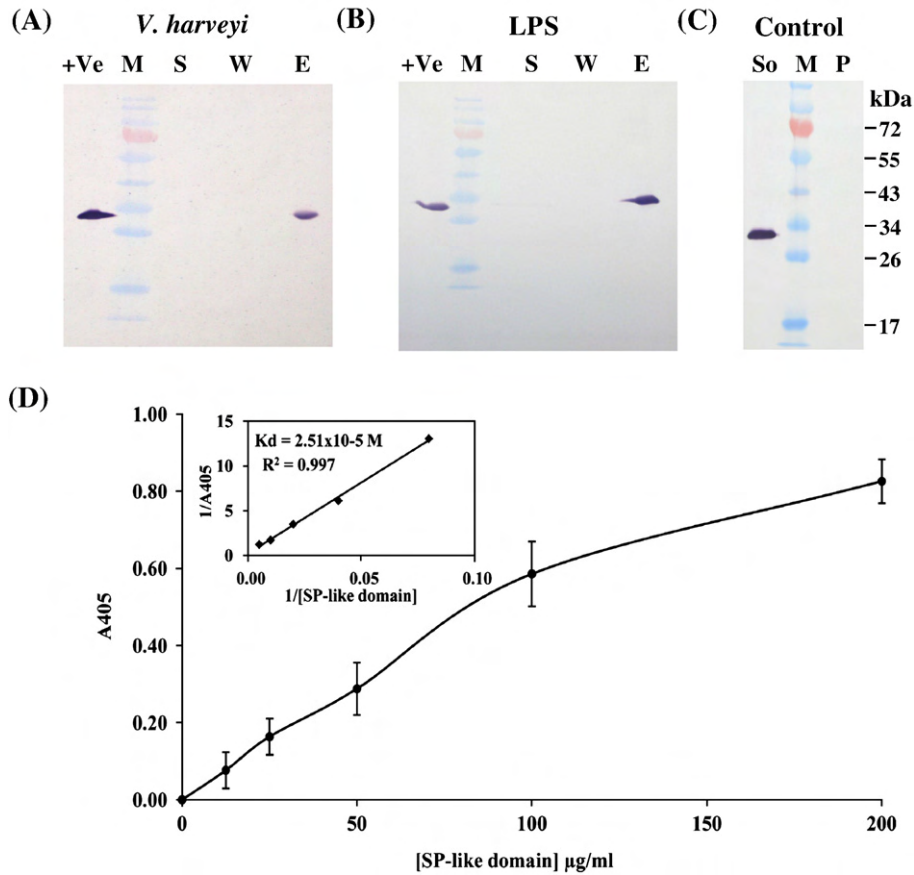
The purified C-terminal SP-like domain protein of the *PmMasSPH* has a serine replaced with glycine in the catalytic triad suggesting that it has lost serine protease enzymatic activity. To confirm this notion, various chromogenic substrates for trypsin, chymotrypsin and elastase were tested. No protease activity was detected in all assays using the recombinant C-terminal SP-like domain protein of the *PmMasSPH*, in contrast to the positive controls (data not shown).

#### 3.4. Cell adhesion assay

Many cell adhesion molecules have been discovered to be involved in invertebrate immunity (Johansson, 1999). The crayfish masquerade-like protein (Huang et al., 2000) and the shrimp clip-SPH (c-SPH) (Lin et al., 2006) have been shown to exhibit cell adhesion activity. To investigate whether *PmMasSPH* could function as a cell adhesion molecule, the recombinant N-terminal region and C-terminal SP-like domain proteins were tested for the ability to promote cell adhesion *in vitro*. The cell adhesion assay revealed that an average of 51% of shrimp hemocytes adhered to the SP-like domain protein-coated coverslips, whereas only 25% of hemocytes adhered to the bovine serum albumin-coated coverslips (Fig. 4). On the contrary, it was found that the recombinant N-terminal region protein did not mediate cell adhesion as shrimp hemocytes adhered to the N-terminal region protein-coated coverslips at the same percentage as the control coated with BSA (Fig. 4). These results suggested that the *PmMasSPH* protein acts as a cell adhesive molecule through the adhesion activity of the C-terminal SP-like domain.

#### 3.5. Binding activity to *V. harveyi* and LPS

The binding ability of the recombinant C-terminal SP-like domain protein to the shrimp pathogenic bacterium, *V. harveyi* and to the bacterial cell wall component, LPS, was investigated. The recombinant C-terminal SP-like domain protein was incubated with the bacteria or



**Fig. 5.** Binding activity of the recombinant C-terminal SP-like domain protein to Gram-negative *V. harveyi* (A), LPS (B) and control with no bacteria or LPS (C). Initially, the recombinant protein was incubated with formaldehyde-fixed bacteria or LPS. After incubation, the supernatants were separated by centrifugation. The pellets were washed with PSS buffer and the bound proteins were eluted with SDS-PAGE sample loading buffer. The supernatants (S), washed (W) and eluted (E) fractions were examined by Western blot analysis under reducing condition using the anti-His antibody. Lane +Ve, recombinant protein; lane M, pre-stained protein standard marker (Fermentas); lane So, soluble protein; lane P, precipitated protein. The quantitative binding of various amounts of the recombinant C-terminal SP-like domain protein (0–200  $\mu\text{g/ml}$ ) to immobilized LPS (D). The specific binding property was determined by ELISA using anti-SP-like antibody. This experiment was performed in three individual repeats and the data was expressed with standard error. The inset indicates a linearly Scatchard plot.

LPS as detailed in [Materials and methods](#). The fractions containing the recombinant C-terminal SP-like domain protein were evaluated by Western blotting using specific anti-SP-like domain antiserum. The results revealed that the recombinant C-terminal SP-like domain protein was found in the eluted fractions whereas no band was detected in the supernatant or the washed fractions (Fig. 5A and B), suggesting that the C-terminal SP-like domain of *PmMasSPH* strongly binds to *V. harveyi* as well as LPS. The control with no bacteria showed a band only in supernatant not in the precipitate fraction (Fig. 5C).

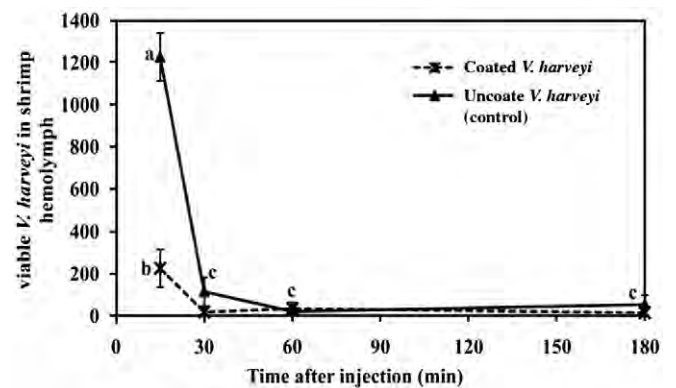
The quantitative binding of the recombinant C-terminal SP-like domain protein to LPS was further examined by an ELISA. The results showed that the recombinant C-terminal SP-like domain protein bound to LPS in a concentration dependent manner (Fig. 5D). From the Scatchard plot analysis, the apparent dissociation constant ( $K_d$ ) for the binding of the recombinant C-terminal SP-like domain protein to LPS was  $2.51 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

### 3.6. *V. harveyi* clearance from circulation

The opsonic activity of *PmMasSPH* protein was tested under *in vivo* conditions in shrimp for their clearance rates compared with that of control bacteria not treated with the protein. *V. harveyi* ( $1 \times 10^5$  cells) coated with the recombinant proteins (the recombinant N-terminal region and C-terminal SP-like domain proteins) were more rapidly cleared from the shrimp hemolymph as compared with uncoated *V. harveyi* (control) suggested that the *PmMasSPH* protein functions as an opsonic protein (Fig. 6).

### 3.7. Antimicrobial activity assay

Remarkably, the N-terminal region of the *PmMasSPH* contains the glycine-rich regions as a glycine-rich antimicrobial peptide in the



**Fig. 6.** Rate of *V. harveyi* clearance from the hemolymph circulation. Shrimp were injected with  $1 \times 10^5$  cells of *V. harveyi* coated the recombinant proteins (N-terminal region and C-terminal SP-like domain proteins) or *V. harveyi* only (control). The hemolymph was collected from individual shrimp after 15, 30, 60 and 180 min, then the number of viable cells was determined by plating on TCBS media. The presence of live bacteria was counted and expressed with standard error. The experiment was repeated five times and the statistical calculations were analyzed by one-way ANOVA and Duncan.

hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana* (Lorenzini et al., 2005). It is, therefore, possible that this type of pattern may be essential or beneficial for antimicrobial activity. Moreover, the clip domain in a proPO-activating enzyme of crayfish has been shown to exhibit *in vitro* antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (Wang et al., 2001). It, therefore, seemed reasonable to test if the glycine-rich domain and the clip domain of *PmMasSPH* possess antimicrobial activities. Thus, the recombinant protein of the N-terminal region comprising the glycine-rich repeats and the clip domain was tested for antimicrobial activity against various strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The recombinant N-terminal region strongly inhibited growth of the Gram-positive *S. aureus* and *A. viridans* with MICs of 0.89 and 3.23  $\mu$ M, respectively, was slightly active against *B. megaterium* with an MIC of 60  $\mu$ M, but had no detectable activity against *M. luteus* and Gram-negative bacteria (Table 1).

#### 4. Discussion

Serine proteinases (SPs) and serine proteinase homologues (SPHs) appear to be abundant in both vertebrates and invertebrates and are involved in a diverse variety of biological functions (Jiang and Kanost, 2000; Lee and Söderhäll, 2001; Yu et al., 2003). It is thus not surprising that several cDNAs encoding SPs and SPHs have been identified from hemocyte cDNA libraries of the black tiger shrimp *P. monodon*. Among these cDNAs, a full-length sequence of a cDNA encoding a masquerade (mas)-like serine proteinase homologue, *PmMasSPH*, has been obtained and characterized (Amparyup et al., 2007). Upon *V. harveyi* infection, the transcript of the *PmMasSPH* increased significantly indicating its potential important role in shrimp immune responses.

In the present study, the potential functions of the *PmMasSPH* were investigated by separately screening for various activities of the N-terminal region comprising the glycine-rich repeats and the clip domain and the C-terminal SP-like domain. Although, it would be better to express the whole *PmMasSPH* protein, its activation by the proteolytic cleavage can be problematic (Lee and Söderhäll, 2001; Lee et al., 2002; Kim et al., 2002). Immunodetection using the anti-SP-like domain antiserum revealed the presence of the *PmMasSPH* protein in hemocyte lysate supernatant of the shrimp *P. monodon* and the protein was cleaved to a processed form upon activation with laminarin (a  $\beta$ -glucan). Recently, *Manduca sexta* SPH precursors were expressed in insect cells and used in search for their activating proteinases. It was found that the proteolytic cleavage of the recombinant proprotein was incomplete (Lu and Jiang, 2008) probably due to the lack of information on the processing enzymes.

Functional characterization of the recombinant C-terminal SP-like domain protein of the *PmMasSPH* revealed a likely cell adhesion activity

and ability to bind strongly to the shrimp pathogenic bacterium, *V. harveyi* as well as to the microbial cell wall component, LPS. The crayfish and shrimp myeloperoxidase homologue and peroxinectin contain the integrin binding (KGD/RGD) motif that enable them to directly bind the integrin receptor on blood cells (Johansson and Söderhäll, 1989; Sritunyalucksana et al., 2001). Indeed, the *PmMasSPH* also contains a KGD motif at the C-terminal SP-like domain that may participate in cell adhesion activity. Nevertheless, a shrimp clip domain SPH (c-SPH) (Lin et al., 2006) and a crayfish mas-like protein (Huang et al., 2000) which also exhibited cell adhesion activity did not contain the KGD motif and the mechanism(s) by which they bind to blood cells remains unknown.

The specific binding of the crayfish mas-like protein to Gram-negative bacteria and yeast suggested its role as a pattern recognition molecule (Lee and Söderhäll, 2001). After proteolytic activation, the crayfish mas-like protein reveals cell adhesion and opsonic activity but does not have antimicrobial activity (Lee and Söderhäll, 2001). A shrimp c-SPH has also been shown to have cell adhesion activity but in this case no antimicrobial and opsonic activities (Lin et al., 2006). Recently, the C-terminal part of a SPH (SPH516) from *P. monodon* was shown to interact with a metal ion-binding domain (MIB) of yellow head virus (Sriphajit et al., 2007). SPH516 as well as SPH509 previously described contain an identical predicted amino acid sequence to the *PmMasSPH* except for one and two less repeats of the septapeptide (LGGQGGG), respectively, in the N-terminal glycine-rich region. It is most likely that they are allelic variants of the same protein. Moreover, the *PmMasSPH* exhibited the opsonic activity as demonstrated by a more rapid clearance and removal from the hemolymph of *V. harveyi* coated the recombinant proteins than uncoated control bacteria. In penaeid shrimp, the rapid clearance of viable bacteria from the hemolymph has been observed, and these live bacteria moved and accumulated in hepatopancreas, gills and lymphoid organ (Burgents et al., 2005). The live bacteria were rapidly cleared from hemolymph by the cellular immune responses including phagocytosis and encapsulation (Koizumi et al., 1997; Lee and Söderhäll, 2001).

In addition, the recombinant N-terminal region protein of the *PmMasSPH* comprising the repeated glycine-rich and the clip domain possesses anti-Gram-positive bacterial activity. Similarly, it has been shown that the recombinant clip domain of a proPO-activating enzyme of the crayfish exhibited antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (Wang et al., 2001). Human azurocidin, which is a SPH, exhibits antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and the yeast *Candida albicans* (Campanelli et al., 1990) but no antimicrobial activity was observed in the crayfish mas-like protein (Lee and Söderhäll, 2001) and the shrimp c-SPH (Lin et al., 2006).

In insect, SPHs participate in the activation of the proPO cascade and function as cofactors (Kwon et al., 2000; Yu et al., 2003). However, in silkworm and crayfish, a proPO-activating enzyme can convert proPO to active PO without the need of the SPH cofactor (Satoh et al., 1999; Wang et al., 2001). In our study, it was found that the addition of the recombinant C-terminal SP-like domain protein of the *PmMasSPH* or the combination of the two recombinant proteins to the hemocyte lysate did not strongly enhance the PO activity (data not shown). An alternative *in vivo* approach i.e. gene silencing by RNA interference would provide an efficient way to examine the participation of a particular protein in the proPO-activating system (Liu et al., 2007; Amparyup et al., 2009; Charoensapsri et al., 2009). Therefore, the gene knockdown of the *PmMasSPH* will be subjected to further investigation.

#### Acknowledgements

This work is supported by a grant from the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and a fellowship from Thailand Research Fund to Piti Amparyup. Student support to R. Jitvaropas from the Royal Golden Jubilee Ph.D Program, Thailand Research Fund is gratefully acknowledged.

**Table 1**  
Antimicrobial activity of the recombinant N-terminal region protein of the *PmMasSPH*.

| Microorganisms                 | MIC ( $\mu$ M) |
|--------------------------------|----------------|
| Gram-positive bacteria         |                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 0.89           |
| <i>Aerococcus viridans</i>     | 3.23           |
| <i>Bacillus megaterium</i>     | 60             |
| <i>Micrococcus luteus</i>      | NA             |
| Gram-negative bacteria         |                |
| <i>Escherichia coli</i> 363    | NA             |
| <i>Enterobacter cloacae</i>    | NA             |
| <i>Erwinia carotovora</i>      | NA             |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | NA             |
| <i>Salmonella thyphimurium</i> | NA             |
| <i>Vibrio harveyi</i>          | NA             |

MIC are expressed as the interval *a*–*b*, where *a* is the highest concentration tested at which microorganisms are growing and *b* is the lowest concentration that causes 100% growth inhibition.

NA: not active at 80  $\mu$ M.

## References

- Amparyup, P., Jitvaropas, R., Pulsook, N., Tassanakajon, A., 2007. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 22, 535–546.
- Amparyup, P., Donpudsa, S., Tassanakajon, A., 2008a. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. Dev. Comp. Immunol. 32, 1497–1509.
- Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A., 2008b. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Mol. Immunol. 45, 1085–1093.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2009. Two prophenoloxidasases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 33, 247–256.
- Barracco, M.A., Duvic, B., Söderhäll, K., 1991. The  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a  $\beta$ -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. Cell Tissue Res. 266, 491–497.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Burgents, J.E., Burnetta, L.E., Stabbb, E.V., Burnetta, K.G., 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 29, 681–691.
- Campanelli, D., Detmers, P.A., Nathan, C.F., Gabay, J.E., 1990. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. J. Clin. Invest. 85, 904–915.
- Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A., 2009. Gene silencing of a prophenoloxidas activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. Dev. Comp. Immunol. 33, 811–820.
- Cheng, W., Liu, C.H., Tsai, C.H., Chen, J.C., 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 18, 297–310.
- Dimopoulos, G., Richman, A., Muller, H.M., Kafatos, F.C., 1997. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 11508–11513.
- Du, X.J., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2007. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). Mol. Immunol. 44, 1085–1094.
- Eleftherianos, I., Gokcen, F., Felfoldi, G., Millichap, P.J., Trenczek, T.E., French-Constant, R.H., Reynolds, S.E., 2007. The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. Cell. Microbiol. 9, 1137–1147.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M., Gueguen, Y., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 1089–1097.
- Huang, T.S., Wang, H., Lee, S.Y., Johansson, M.W., Söderhäll, K., Cerenius, L., 2000. A cell adhesion protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, a serine proteinase homologue similar to *Drosophila masquerade*. J. Biol. Chem. 275, 9996–10001.
- Jiang, H., Kanost, M.R., 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 95–105.
- Johansson, M.W., 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. Dev. Comp. Immunol. 23, 303–315.
- Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. J. Cell Biol. 106, 1795–1803.
- Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1989. A peptide containing the cell adhesion sequence RGD can mediate degranulation and cell adhesion of crayfish granular haemocytes *in vitro*. Insect Biochem. 19, 573–579.
- Jomori, T., Natori, S., 1992. Function of the lipopolysaccharide-binding protein of *Periplaneta americana* as an opsonin. FEBS Lett. 296, 283–286.
- Kawabata, S., Tokunaga, F., Kugi, Y., Motoyama, S., Miura, Y., Hirata, M., Iwanaga, S., 1996. Limulus factor D, a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity. FEBS Lett. 398, 146–150.
- Kim, M.S., Baek, M.J., Lee, M.H., Park, J.W., Lee, S.Y., Söderhäll, K., Lee, B.L., 2002. A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidas activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. J. Biol. Chem. 277, 39999–40004.
- Koizumi, N., Morozumi, A., Imamura, M., Tanaka, E., Iwahana, H., Sato, R., 1997. Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Eur. J. Biochem. 248, 217–224.
- Kwon, T.H., Kim, M.S., Choi, H.W., Joo, C.H., Cho, M.Y., Lee, B.L., 2000. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidas activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. Eur. J. Biochem. 267, 6188–6196.
- Lee, K.Y., Zhang, R., Kim, M.S., Park, J.W., Park, H.Y., Kawabata, S., Lee, B.L., 2002. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidas activation by  $\text{Ca}^{2+}$  in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. Eur. J. Biochem. 269, 4375–4383.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2001. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Immunol. 166, 7319–7326.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. Fish Shellfish Immunol. 12, 421–437.
- Lee, S.Y., Wang, R., Söderhäll, K., 2000. A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. J. Biol. Chem. 275, 1337–1343.
- Lin, C.Y., Hu, K.Y., Ho, S.H., Song, Y.L., 2006. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule. Dev. Comp. Immunol. 30, 1132–1144.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2007. Phenoloxidas is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem. 282, 33593–33598.
- Lorenzini, D.M., da Silva, P.J., Fogaca, A.C., Bulet, P., Daffre, S., 2005. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. Dev. Comp. Immunol. 27, 781–791.
- Lu, Z., Jiang, H., 2008. Expression of *Manduca sexta* serine proteinase homolog precursors in insect cells and their proteolytic activation. Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 89–98.
- Ma, C., Kanost, M.R., 2000. A  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidas cascade. J. Biol. Chem. 275, 7505–7514.
- Murugasu-Oei, B., Rodrigues, V., Yang, X., Chia, W., 1995. Masquerade: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo. Genes Dev. 9, 139–154.
- Perazzolo, L.M., Barracco, M.A., 1997. The prophenoloxidas activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunol. 21, 385–395.
- Rattanachai, A., Hirono, I., Ohira, T., Takahashi, Y., Aoki, T., 2005. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Fish Shellfish Immunol. 18, 39–48.
- Romo-Figueroa, M.G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R.R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciajara, I., Söderhäll, K., Yepiz-Plascencia, G., 2004. Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. Dev. Comp. Immunol. 28, 713–726.
- Satoh, D., Horii, A., Ochiai, M., Ashida, M., 1999. Prophenoloxidas-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cDNA cloning. J. Biol. Chem. 274, 7441–7453.
- Smith, V.J., Chisholm, J.R.S., 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. Fish Shellfish Immunol. 2, 1–31.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Fish. Dis. 2, 3–23.
- Sriphajit, T., Flegel, T.W., Senapin, S., 2007. Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. Dev. Comp. Immunol. 31, 1145–1158.
- Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M.W., Söderhäll, K., 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 25, 353–363.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 26, 237–245.
- Sun, Y.D., Fu, L.D., Jia, Y.P., Du, X.J., Wang, Q., Wang, Y.H., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. Mol. Immunol. 45, 348–361.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Söderhäll, K., 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidas system by  $\beta$ -1,3-glucan. Dev. Comp. Immunol. 20, 299–306.
- Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L., Söderhäll, K., 2001. Properties of the prophenoloxidas activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Eur. J. Biochem. 268, 895–902.
- Yu, X.Q., Jiang, H., Wang, Y., Kanost, M.R., 2003. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidas activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 197–208.



# A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp

Piti Amparyup<sup>a,b</sup>, Kriangpol Wiriyaekaradecha<sup>a,c</sup>, Walaiporn Charoensapsri<sup>a</sup>, Anchalee Tassanakajon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Bangkok, 10330, Thailand

<sup>b</sup> National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong1, Klong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand

<sup>c</sup> Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 29 July 2009

Received in revised form 6 September 2009

Accepted 7 September 2009

Available online 22 September 2009

### Keywords:

Shrimp immunity

*Penaeus monodon*

Clip domain serine proteinase

*Vibrio harveyi*

RNA interference

Prophenoloxidase

## ABSTRACT

The clip domain serine proteinases (clip-SPs) play critical roles in the signaling processes during embryonic development and in the innate immunity of invertebrates. In the present study, we identified a homolog of the clip-SP, designated as *PmClipSP1*, by searching the *Penaeus monodon* EST database (<http://pmonodon.biotec.or.th>), and using RACE-PCR to obtain the complete gene which contained a 1101 bp open reading frame encoding 366 amino acids with a 25 amino acid signal peptide. The deduced *PmClipSP1* protein sequence, which shares a predicted structural similarity to the clip-SPs of other arthropod species, appears to possess a clip domain at the N-terminus and an enzymatically active serine proteinase domain at the C-terminus. Tissue distribution analyses revealed that, at the transcript level, *PmClipSP1* is mainly expressed in shrimp hemocytes, whilst temporal gene expression analyses showed that the hemocyte *PmClipSP1* transcript levels were upregulated at 3 h and downregulated at 6–48 h following systemic *Vibrio harveyi* infection. RNAi-mediated silencing of the *PmClipSP1* gene, by injection of double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to the *PmClipSP1* gene into shrimp, significantly reduced *PmClipSP1* transcript levels, but neither significantly altered the other clip-SP and clip-SPH transcript levels nor reduced the total phenoloxidase (PO) enzyme activity in shrimp hemocytes, compared to the levels seen in the GFP dsRNA control, suggesting that *PmClipSP1* is not involved in the proPO system. However, suppression of the *PmClipSP1* gene led to a significant increase in the number of viable bacteria in the hemolymph (~2.4-fold) and in the mortality rate (59%) of shrimp systemically infected with *V. harveyi*. These findings suggest that *PmClipSP1* plays a role in the antibacterial defense mechanism of *P. monodon* shrimp.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Invertebrates, including shrimp, lack an acquired immune system and rely on the innate immune system for resisting and killing pathogen invasions [1,2]. The initiation of innate immune reactions is triggered by pattern recognition receptors (PRRs), protein molecules that are capable of recognition of typical structures on the surface of many microorganisms, but not self, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PAMPs include the lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan components of bacterial cell walls, and the  $\beta$ -1,3-glucan component of fungal cell walls [3]. Generally, the recognition of PRRs activates extracellular serine proteinase (SP) cascades that amplify

the signal and trigger downstream molecules, leading to the killing of the pathogens [2,4].

In invertebrates, extracellular SP cascades involving the clip domain SP (clip-SP) family play important roles in signaling cascades in both embryonic development and in defense responses, such as in hemolymph coagulation in the horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus* [5], antimicrobial peptide synthesis in *Drosophila* [6], and the activation of prophenoloxidase (proPO) in insects and crustaceans [6–8].

The clip-SP family is a group of SPs containing the clip and the SP-like domains at the N- and C-terminus, respectively. The clip domain, initially identified in the proclotting enzyme from the horseshoe crab [5], is comprised of approximately 30–60 amino acid residues including 6 cysteine residues which form three internal disulfide bonds [7,9]. The SP-like domain contains an active site, termed the catalytic triad, of His, Asp and Ser amino acid residues. The active site serine residue participates in the formation of a transient acyl-enzyme intermediate between the

\* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5418.  
E-mail address: [anchalee.k@chula.ac.th](mailto:anchalee.k@chula.ac.th) (A. Tassanakajon).

substrate and the proteinase. The clip-SP family can be divided into catalytic and non-catalytic groups according to the proteolytic activity of the SP-like domain. The non-catalytic group members, the SP homologues (SPHs), do not exhibit any enzymatic activity due to mutations within the enzymatic active site [10].

The roles of clip-SPs in immune defenses have been well studied in some arthropods. In the hemolymph clotting system of the horseshoe crab, the two clip-SPs (Factor B and a proclotting enzyme), as well as the other two proteinases (Factors C and G), are involved in a proteolytic cascade [11] that leads to the conversion of a soluble protein coagulogen to an insoluble coagulum gel and subsequent clotting of the hemolymph for immobilizing pathogens [12–15]. In *Drosophila*, the Toll pathway is activated by proteinases, two of which are the clip domain proteinases, namely Snake and Easter [16].

The proPO-activating system is an important invertebrate defense mechanism in which activation of a clip-SP cascade leads to the activation of a terminal clip-SP, a proPO-activating enzyme (PPAE) that carries out proteolytic conversion of inactive proPO into active PO [4]. Subsequently, PO catalyzes the formation of quinone reactive intermediates for melanin synthesis at the injury site or around invading microorganisms [4,17].

Recently, clip-SPs have been isolated and characterized from the penaeid shrimp, *Penaeus monodon* [18–20], *Fenneropenaeus chinensis* [21] and *Marsupenaeus japonicus* [22]. However, very little is known about the role of clip-SPs in shrimp immunity. Recently, a clip-SP, designated as *PmPPAE1*, was identified from the hemocytes of *P. monodon* and shown to both function in the proPO system and to be an important component in the shrimp immune defense [8]. In the present study, we have isolated a novel clip-SP, *PmClipSP1* from the black tiger shrimp, *P. monodon*, and compared its molecular characteristics with *PmPPAE1*. Specifically, in this study we aimed (1) to clone the full-length cDNA of *PmClipSP1* from *P. monodon*, (2) to examine the temporal response of its transcripts in hemocytes to systemic *Vibrio harveyi* challenges and (3) to elucidate the role of the *PmClipSP1* product in the proPO-activating system and in protecting shrimp from *V. harveyi* infection.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

*P. monodon* shrimp, with an average weight of  $15 \pm 1$  g per shrimp, were purchased from a commercial farm in Thailand, and kept in aerated seawater at 20 ppt saline for 7 days before processing. Shrimp hemolymph (approximately 0.5 ml per individual) was collected from the ventral sinus in an anti-coagulant solution (10% (w/v) trisodium citrate dihydrate) and then centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min at 4 °C to collect the hemocyte pellet. The tissues of unchallenged shrimp, including the hepatopancreas, gills, lymphoid organ, intestine and heart were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until required. Challenge experiments were performed by injection of 25  $\mu$ l of 150 mM NaCl with or without a *V. harveyi* ( $10^6$  CFU) suspension into the last abdominal segment of each shrimp. Saline-injected shrimp were used as a control group. The challenged shrimp were reared in laboratory seawater tanks, and the hemolymph of three individual shrimp at various times post-injection (0, 3, 6, 24 and 48 h) was randomly collected for subsequent experiments. The hemocyte cell pellets (see above) were immediately used for RNA extraction.

### 2.2. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from each tissue was isolated with the TRI REAGENT<sup>®</sup>, and the resulting RNA was further treated with

RNase-free DNase I (Promega, USA). First-strand cDNA synthesis was carried out using the ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase System kit (Promega, USA), with the DNase I-treated total RNA (1.5  $\mu$ g) as the template and oligo (dT)<sub>15</sub> as the primer (0.5  $\mu$ g), according to the manufacturer's protocol. The cDNAs were stored at –80 °C until required for RT-PCR analysis.

### 2.3. Rapid amplification of cDNA end (RACE)-PCR

A partial cDNA sequence of a putative clip-SP (*PmClipSP1*) was retrieved from the *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotech.or.th>) [23]. Gene-specific primers (Table 1) were designed from this sequence to amplify the full-length cDNA of *PmClipSP1* by RACE. To this end, mRNA was isolated from the hemocytes of *P. monodon* using a QuickPrep<sup>™</sup> Micro mRNA Purification Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), as described by the manufacturer. Two micrograms of this mRNA were used to prepare 5'- and 3'-RACE cDNAs using the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA), following the manufacturer's instructions. The resulting 5'- or 3'-RACE cDNAs were amplified with a universal primer mix (Clontech, USA) and the gene-specific primers for *PmClipSP1* (5racePmSP1-R or 3racePmSP1-F) (Table 1). PCR amplification and cycle condition were carried out as described by Amparyup et al. [19]. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis, and then the expected sized bands were excised and purified using a Qiagen DNA Purification kit (QIAGEN Sciences, Germantown, MA, USA). The purified DNA fragments were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, USA) and sequenced. Finally, a single-fragment amplification of each full-length cDNA was carried out by PCR using the primer pair 5PmSP1-F and 3PmSP1-R for *PmClipSP1* (Table 1) and *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA). The PCR product was cloned and sequenced in both directions to obtain the complete consensus sequence.

### 2.4. Sequence analysis

The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *PmClipSP1* were analyzed with the GENETYX 7.0.3 program (GENETYX Corporation) and the BLAST programs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). The ClustalW multiple sequence alignment program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) was used to create the multiple sequence alignments. The deduced amino acid sequence and the putative signal peptide were predicted by the simple modular architecture research tool SMART version 4.0 (<http://www.smart.emblheidelberg.de/>), and the SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), respectively. Sequence divergence estimates were calculated using the Kimura two-parameter method. Bootstrapped unrooted neighbor-joining trees were constructed using Neighbor and Consense with bootstrap analysis performed using Seqboot (1000 replicates). All phylogenetic programs are routine in PHYLIP [24]. Phylogenetic trees are illustrated using TREEVIEW (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.html>).

### 2.5. Tissue distribution analysis

The tissue-specific expression of *PmClipSP1* transcripts was determined by RT-PCR. The first-strand cDNA was synthesized from DNase I-treated total RNA (1.5  $\mu$ g) extracted from the hemocyte, gills, lymphoid organs, intestines, hepatopancreas and hearts of *P. monodon*, respectively. Gene-specific primers for *PmClipSP1* (*PmSP1rt-F* and *PmSP1rt-R*) (Table 1) were designed from the full-length *PmClipSP1* cDNA sequences and used to amplify a 190 bp fragment in the RT-PCR. As an internal control, a partial gene fragment (150 bp) of elongation factor1- $\alpha$  gene (EF1-

**Table 1**  
Primer sequences.

| Primer          | Sequence (5'–3')                                      | Purpose                      |
|-----------------|-------------------------------------------------------|------------------------------|
| 3racePmSP1-F    | 5' CTTACTGCTGCCATTGTGTAGACCTG 3'                      | 3'-RACE for <i>PmClipSP1</i> |
| 5racePmSP1-R    | 5' CACGAGTGTGTATGAGGGATGACCGAT 3'                     | 5'-RACE for <i>PmClipSP1</i> |
| 5PmSP1-F        | 5' TTAGAAACCATGTGCTTATTACAGGGA 3'                     | RT-PCR for <i>PmClipSP1</i>  |
| 5PmSP1-R        | 5' CAGGAATGTATCAAAGAGGTAATAGCAT 3'                    | RT-PCR for <i>PmClipSP1</i>  |
| PmSP1rt-F       | 5' TGAGAGCACAAATAGTGGAGGGTA 3'                        | RT-PCR for <i>PmClipSP1</i>  |
| PmSP1rt-R       | 5' TGGAGGCAGGCACAGGCAAC 3'                            | RT-PCR for <i>PmClipSP1</i>  |
| SP1i-F          | 5' CGTGGTTGCGTGGCGTGGTTAG 3'                          | RNAi for <i>PmClipSP1</i>    |
| SP1i-R          | 5' GCCTGTGAGTCTGATGAGTGC 3'                           | RNAi for <i>PmClipSP1</i>    |
| T7SP1i-F        | 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTGGTGGCGTGGCGTGGTTAG 3' | RNAi for <i>PmClipSP1</i>    |
| T7SP1i-R        | 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGTGGTGGCGTGGCGTGGTTAG 3' | RNAi for <i>PmClipSP1</i>    |
| GFP-F           | 5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'                            | RNAi for GFP                 |
| GFP-R           | 5' TTACTTGTACAGCTCGTCCA 3'                            | RNAi for GFP                 |
| GFPT7-F         | 5' TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'         | RNAi for GFP                 |
| GFPT7-R         | 5' TAATACGACTCACTATAGGTTACTTGTACAGCTCGTCCA 3'         | RNAi for GFP                 |
| PmPPArt-F       | 5' GTCCTACGACACGACCACTAC 3'                           | RT-PCR for <i>PmPPAE1</i>    |
| PmPPArt-R       | 5' CTGTCACCTGGCAGCAATCCT 3'                           | RT-PCR for <i>PmPPAE1</i>    |
| PmPPAE2rt-F     | 5' GCGGCGGTACGCTCCTTGTTC 3'                           | RT-PCR for <i>PmPPAE2</i>    |
| PmPPAE2rt-R     | 5' ACTCTCGGGGCGACGCTTGTG 3'                           | RT-PCR for <i>PmPPAE2</i>    |
| PmSP2rt-F       | 5' GCGGTGGTCTTCACTGCTCTC 3'                           | RT-PCR for <i>PmClipSP2</i>  |
| PmSP2rt-R       | 5' CAGAACTGCCTTCCAAGGATAG 3'                          | RT-PCR for <i>PmClipSP2</i>  |
| PmSPH1rt-F      | 5' TACGTACTCATTGATATCAGGTTTGG 3'                      | RT-PCR for <i>PmMasSPH1</i>  |
| PmSPH1rt-R      | 5' GCCTCGTTATCCTTGAATCCAGTGA 3'                       | RT-PCR for <i>PmMasSPH1</i>  |
| PmSPH2rt-F      | 5' CCGTGAACGAGCGATGCTCTTA 3'                          | RT-PCR for <i>PmMasSPH2</i>  |
| PmSPH2rt-R      | 5' GCCACACTCTCCGCTGCTCCG 3'                           | RT-PCR for <i>PmMasSPH2</i>  |
| PmSPH3rt-F      | 5' GCTCTTGGTGTGCGCTGTTG 3'                            | RT-PCR for <i>PmMasSPH3</i>  |
| PmSPH3rt-R      | 5' CACCGTCCACGACAGTAATA 3'                            | RT-PCR for <i>PmMasSPH3</i>  |
| EF1 $\alpha$ -F | 5' GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC 3'                           | RT-PCR for EF1 $\alpha$      |
| EF1 $\alpha$ -R | 5' CGTTCGGTGATCATGTTCTTGATG 3'                        | RT-PCR for EF1 $\alpha$      |

$\alpha$ ) was amplified from the cDNAs with the specific primers: EF1 $\alpha$ -F and EF1 $\alpha$ -R (Table 1). Semi-quantitative RT-PCR was carried out in a 25  $\mu$ l reaction volume containing 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of each specific primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) and one  $\mu$ l of the first-strand cDNA. The PCR was carried out at 94 °C for 1 min, followed by 25 cycles for *PmClipSP1* or 22 cycles for EF1- $\alpha$  of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, plus a final extension step at 72 °C for 10 min. Ten microlitres of the amplification product was separated in a TBE-1.5% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide staining and UV-transillumination.

## 2.6. Gene expression analysis in response to bacterial challenge

RNA isolation and first-strand cDNA synthesis were carried out as described above. The cDNA mix was diluted 1:5 (v/v) and stored at –80 °C for subsequent SYBR Green fluorescent quantitative real-time PCR (RT-PCR) amplification. Real-time RT-PCR was performed in an iCycler-iQ<sup>TM</sup> system (Bio-Rad Laboratories, USA) using gene-specific primers (*PmSP1rt-F* and *PmSP1rt-R*) (Table 1) and SYBR Green I dye detection (Bio-Rad). The amplification reaction and thermal profile were performed as described by Amparyup et al. [19], with amplification of the shrimp EF1- $\alpha$  internal gene fragment (150 bp) as the internal control. Each sample had three replicates in each plate. Dissociation curve analysis of the amplification products was performed at the end of each PCR reaction to confirm that only one PCR product was amplified and detected. The Ct values of *V. harveyi* injected samples at each time point were thus normalized with the saline-injected samples and a mathematical model was used to determine the relative expression ratio [25].

## 2.7. Double-stranded RNA preparation

Large quantities of dsRNA were prepared as previously described [26]. The DNA fragment of 660 bp was amplified by

PCR from the recombinant plasmid containing the *PmClipSP1* gene using the gene-specific primers SP1i-F and SP1i-R for *PmClipSP1* (Table 1). The primers for the dsRNA synthesis consist of the same primer sequences but flanked at the 5' end by a T7 promoter recognition sites (5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGG-3') (Table 1). A DNA fragment (740-bp) corresponding to the green fluorescent protein (GFP) sequence, was amplified as a negative control as described previously [26]. The PCR products were purified (QIAGEN, Germantown, MA, USA) and used to construct the dsRNA with a T7 RNA polymerase (T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express Large Scale RNA Production Systems, Promega, USA), according to the respective manufacturer's protocol. The formation of dsRNAs was monitored by determining the product size of reactants using TBE-1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis based resolution. The synthesized dsRNAs were dissolved in nuclease free water and quantified by spectrophotometry.

## 2.8. RNA interference (RNAi) treatment of shrimp

Shrimp were injected with either *PmClipSP1* or GFP (control) dsRNA as previously described [26]. Briefly, approximately 2  $\mu$ g of dsRNA in 150 mM NaCl per 1 g of a shrimp was injected through the lateral area of the fourth abdominal segment using a 0.5-ml insulin syringe with a 29-gauge needle, to assess the sequence-specific knockdown effect of dsRNA. Injection of 150 mM NaCl alone was done as an additional control for handling and injection induced mortality. At 24 h after the first RNAi treatment, the repeated injection of dsRNA or saline was carried out together with 20  $\mu$ g of each of *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) and laminarin ( $\beta$ -1,3-glucan) (Sigma) to stimulate the immune response. At the end of the experiment (48 h after the second RNAi treatment) shrimp hemolymph was collected for total RNA extraction using NucleoSpin<sup>®</sup> RNAII (MACHEREY-NAGEL) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from total RNA (180 ng) using the ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase

(Promega, USA) and oligo (dT)<sub>15</sub> primer, according to the manufacturers instructions.

### 2.9. Semi-quantitative RT-PCR analysis

The efficiency and specificity of the *PmClipSP1* knockdown was analyzed by semi-quantitative RT-PCR analysis using gene-specific primers for *PmClipSP1* or those for the other clip-SPs (*PmPPAE1*, *PmPPAE2* and *PmClipSP2*), and clip-SPHs (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* and *PmMasSPH3*), respectively (Table 1). A fragment of the EF1- $\alpha$  gene was amplified in a separate tube and served as an internal control for normalization. The PCR reactions and thermal cycling conditions were carried out as described above. After amplification, the RT-PCR products were separated by TBE-1.8% (w/v) agarose gel electrophoresis and visualized as stated above.

### 2.10. Phenoloxidase activity assay in silencing-shrimp hemolymph

The hemolymph, collected 48 h after the second dsRNA injection without the use of anti-coagulant from the ventral sinus of randomly selected shrimp, was subjected to a phenoloxidase (PO) assay as described by Amparyup et al. [26]. Total protein concentration was measured using a Bradford assay kit (Bio-Rad). Briefly, shrimp hemolymph protein (2 mg) in 435  $\mu$ l of Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) was mixed with 65  $\mu$ l of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) (3 mg/ml in water) (Fluka), according to Amparyup et al. [26]. The reaction mixture was incubated at room temperature for 30 min and the reaction was stopped by adding 500  $\mu$ l of 10% (v/v) acetic acid. The remaining PO activity was monitored by spectrophotometry at 490 nm. PO activity was recorded as  $\Delta A_{490}$ /mg total protein/min against control samples that used distilled water instead of shrimp hemolymph. Each experimental group (2–3 shrimp/group), including the *PmClipSP1* dsRNA, GFP dsRNA and saline-injected shrimp was repeated three times. The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA).

### 2.11. Cumulative mortality assay

To conduct cumulative mortality experiments for *PmClipSP1*-knockdown shrimp, three groups of shrimp ( $2 \pm 0.2$  g) were intramuscularly injected with *PmClipSP1* dsRNA (4  $\mu$ g), GFP dsRNA (4  $\mu$ g) or NaCl (150 mM) in 25  $\mu$ l volume. Twenty-four hours after the first dsRNA injection, shrimp were again injected with the same concentration of each dsRNA together with  $2 \times 10^5$  CFUs of *V. harveyi* isolate 639. Injections of GFP dsRNA or NaCl were used as controls. The number of dead shrimp was recorded daily for 5 days post-*V. harveyi* infection. Each experiment was performed in triplicate, with each group consisting of 9–10 healthy shrimp. Statistical analysis of the cumulative mortality was performed using one-way analysis of variance (ANOVA).

### 2.12. Bacterial counts in the *PmClipSP1*-silenced shrimp hemolymph after *V. harveyi* infection

Bacterial counts within the hemolymph were performed as described by Charoensapsri et al. [8]. DsRNA (4  $\mu$ g) of either *PmClipSP1* or GFP dsRNAs was injected into individual juvenile shrimp ( $2 \pm 0.2$  g) into the third abdominal segment. Twenty-four hours after the first dsRNA injection, shrimp were reinjected with dsRNA (4  $\mu$ g) and *V. harveyi* ( $2 \times 10^5$  CFUs). After bacterial challenge for 6 h, the shrimp hemolymph was collected and serially diluted in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4, and from each respective dilution 10  $\mu$ l of hemolymph was plated per LB agar plate which were then incubated at 30 °C over night

followed by counting of the bacterial colonies and evaluating the average replication competent (viable) colony forming units (CFUs).

## 3. Results

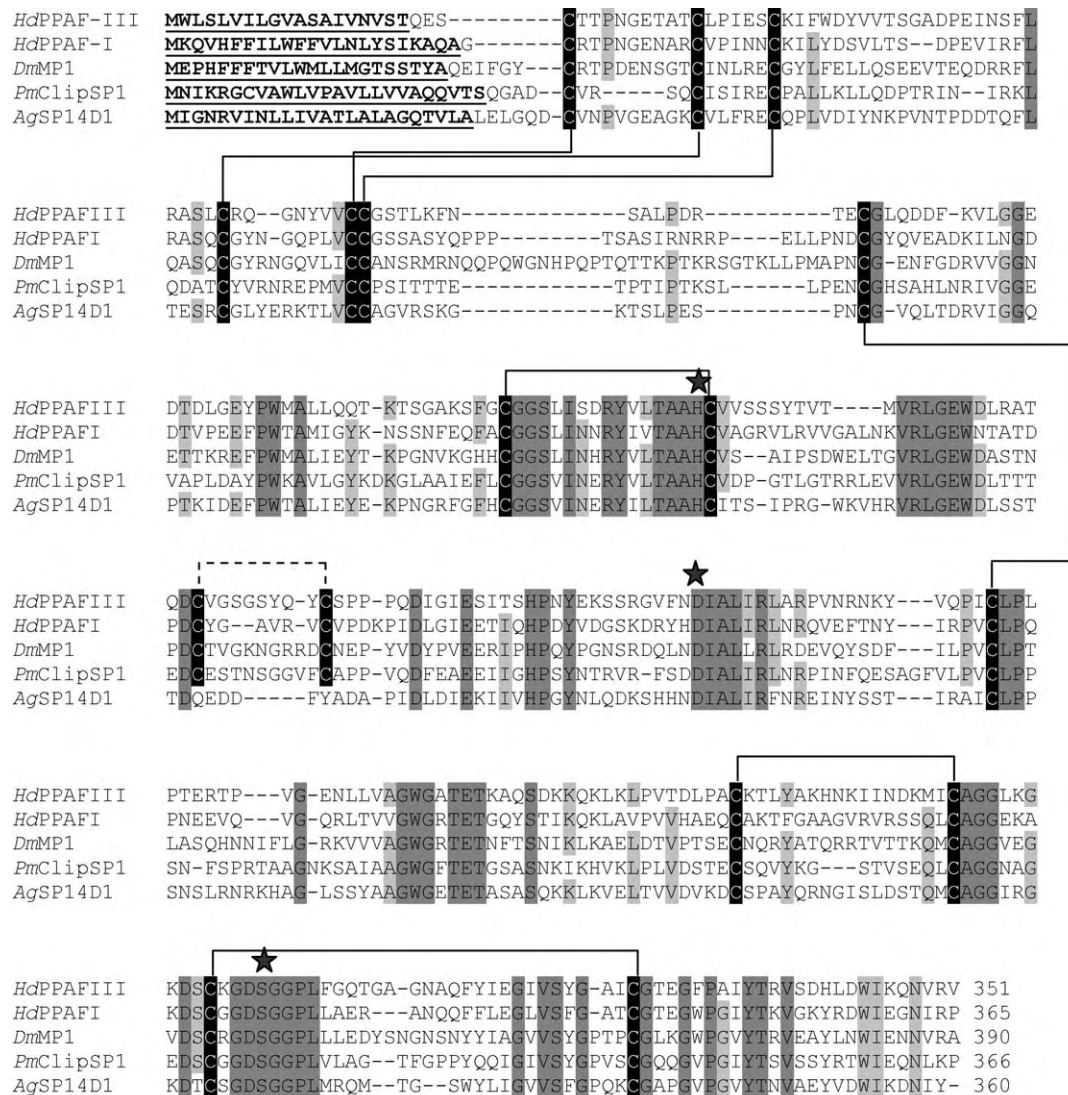
### 3.1. Cloning and characterization of *PmClipSP1*

By searching of the clip domain family of serine proteinases (SPs) within the *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotech.or.th>) [23], three clip-SPs (*PmPPAE1* [8]; FJ620685, *PmClipSP1*; FJ620688 and *PmClipSP2*; FJ620687) and three clip-SP homologues (*PmMasSPH1* [19]; DQ455050, *PmMasSPH2*; FJ620686 and *PmMasSPH3*; FJ620689) were obtained. In this study, a 600 bp fragment of *PmClipSP1* similar to the serine protease 14D (AAB62929) of *Anopheles gambiae* (58% similarity) was characterized. To obtain 3'- full-length sequence of *PmClipSP1*, 5' and 3'- RACE-PCR analyses were carried out using gene-specific primers for *PmClipSP1* (Table 1). The complete sequence of *PmClipSP1* cDNA consisted of a 5' terminal untranslated region (UTR) of 55 bp, a 3' UTR of 353 bp with a canonical polyadenylation signal site and a poly (A) tail, and an open reading frame (ORF) of 1101 bp encoding a predicted polypeptide of 366 amino acids with a 25 amino acid signal peptide. The deduced mature protein sequence of *PmClipSP1* was thus composed of 341 amino acid residues with a theoretical isoelectric point of 5.56 and a predicted molecular weight of 36.48 kDa. However, two putative N-glycosylation sites, NFS (aa position 219) and NKS (aa position 228) sites, were found suggesting that *PmClipSP1* is a likely glycosylated protein and thus of a higher molecular weight. The nucleotide sequence of *PmClipSP1* was deposited in GenBank under accession no. FJ620688.

### 3.2. Sequence alignment and phylogenetic analysis

Sequence analysis of *PmClipSP1* cDNA revealed that it has a fairly high sequence similarity, and is homologous, to a serine proteinase (ABC33918) of *F. chinensis* (58% sequence similarity), the serine protease 14D (ACN38198) from *Anopheles gambiae* (57%), prophenoloxidase activating factor (PPAF) I (BAA34642) from *Holotrichia diomphalia* (54%), the melanization protease 1 (NP\_649450) of *Drosophila melanogaster* (52%) and PAP3 (AAX18637) of *Manduca sexta* (51%). Based on the SMART program analysis, *PmClipSP1* belongs to the superfamily of the trypsin-like serine proteinases, which is the most similar family in sequence architecture to the clip domain serine proteinases of arthropods. Multiple sequence alignment of the deduced *PmClipSP1* amino acid sequence with those of other clip-SPs in arthropods revealed the six conserved clip domain cysteines at the N-terminus as well as, at the C-terminus, the three conserved catalytic sites (H126, D191 and S289) of a typical trypsin-like serine proteinase domain (Fig. 1).

To examine the relationship between *PmClipSP1* and other arthropod clip-SPs, an unrooted neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was drawn based on the predicted SP domain of clip-SPs and clip-SPHs from various arthropod species. Based on this NJ analysis, arthropod clip-SPs and clip-SPHs form two distinct and separate major groups. Although *PmClipSP1* clusters together with some of the shrimp clip-SPs (*PmClipSP2* and *PmPPAE2*) and clip-SPH (*FcSPH*), their functions are unknown, except for that of PPAF-III from *H. diomphalia*, which is a clip-SP that activates PPAF-II by cleavage [27]. Nevertheless, the phylogenetic tree clearly indicates that the *PmClipSP1* was more closely related to clip-SPs than clip-SPHs (Fig. 2).



**Fig. 1.** Multiple predicted amino acid sequence alignment of a clip-SP (*PmClipSP1*; FJ620688) from *Penaeus monodon* with that of other arthropod PPAEs: PPAF-I (*HdPPAFI*: AB013088) and PPAF-III (*HdPPAFIII*: AB079666) from *Holotrichia diomphalia*; serine protease 14D (*AgSP14D1*: FJ653845) from *Anopheles gambiae* and Melanization Protease-1 (*DmMP1*: NM\_141193) from *Drosophila melanogaster*. The signal peptide is shown in bold and underlined. Identical amino acid residues are dark grey shaded. Grey indicates conservation in three or more species. Black highlights indicate conserved cysteine residues. The putative disulfide linkages are shown by solid lines. The amino acid residues corresponding to the catalytic triad of serine proteinases are marked by black stars.

### 3.3. Tissue-specific expression of the *PmClipSP1* gene of *P. monodon*

RT-PCR analysis was employed to determine the tissue-specific transcript expression levels of *PmClipSP1* mRNA, using EF1- $\alpha$  as the internal control gene. *PmClipSP1* transcripts were mainly expressed in shrimp hemocytes, with perhaps a low level of expression in the lymphoid organ although we cannot formally exclude this is due to residual hemocytes in hemolymph within the tissue (Fig. 3A).

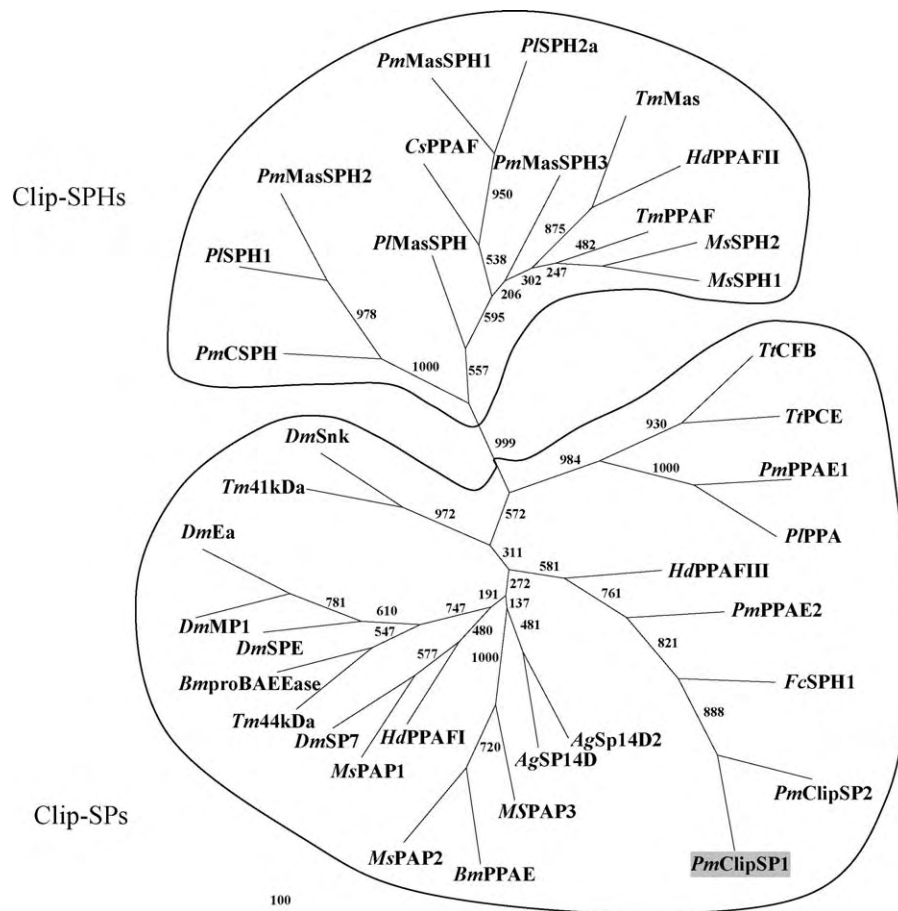
### 3.4. Changes in the *PmClipSP1* transcript level in shrimp hemocytes after a systemic *V. harveyi* challenge

To examine whether *PmClipSP1* is a potential immune responsive gene in shrimp hemocytes, the transcript levels of *PmClipSP1* were determined after systemic *V. harveyi* challenge by real-time quantitative RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from the hemocytes of shrimp at various time points (0, 3, 6, 24 and 48 h) after injection of the pathogenic bacterium *V. harveyi* and

subjected to first-strand cDNA synthesis. Gene expression levels were normalized to that of the housekeeping gene, EF1- $\alpha$ , which was used as the internal control. The *PmClipSP1* transcript level was rapidly increased by  $\sim 1.8$ -fold at 3 h and then decreased at 6 h by about  $\sim 3.9$ -fold (Fig. 3B), and remained at a decreased expression level, relative to that at the start, throughout the experiment such that at 48 h post-challenge, the expression level of the *PmClipSP1* gene was still lower than at zero post-infection by  $\sim 1.8$ -fold.

### 3.5. Gene silencing of *PmClipSP1*

To characterize the potential role of *PmClipSP1* in shrimp innate immunity we sought to use dsRNA gene knockdown using systemically administered dsRNA. To first confirm the methodology does indeed lead to a significant transcript level reduction, RT-PCR was used to determine the gene transcription of the targeted gene after systemic dsRNA treatment. The hemocyte fraction of the hemolymph from each group of shrimp (two individuals per



**Fig. 2.** Bootstrapped unrooted neighbor-joining tree of the serine proteinase domain of clip-SPs and clip-SPHs from arthropods: *Penaeus monodon* clip-SP1 (PmClipSP1; ACP19562), clip-SP2 (PmClipSP2; ACP19561), PPAE1 (PmPPAE1; ACP19558), PPAE2 (PmPPAE2; ACP19559), Mas-like SPH1 (PmMasSPH1; ABE03741), Mas-like SPH2 (PmMasSPH2; ACP19560), Mas-like SPH3 (PmMasSPH3; ACP19563), Mas-like protein (PmCSPH; AY600627); *Fenneropenaeus chinensis* SPH (FcSPH1; DQ318859); *Pacifastacus leniusculus* PPA (PIPPA; CAB63112), Mas-like protein (PIMas; Y11145), SPH1 (PISPH1; AY861652), SPH2a (PISPH2a; EU552456); *Callinectes sapidus* PPAF (CsPPAF; AY555734); *Anopheles gambiae* serine protease 14D (AgSP14D; FJ653845), serine protease 14D2 (AgSP14D2; AF117749); *Drosophila melanogaster* melanization protease 1 (DmMP1; NM\_141193), Spatzle-processing enzyme (DmSPE; NM\_142911), snake (DmSnk; NM\_079614), easter (DmEa; NM\_079638), serine protease 7 (DmSP7; NM\_141477); *Bombyx mori* PPAE (BmPPAE; NM\_001043367), SP zymogen (BmproBAEEase; NM\_001043379); *Holotrichia diomphalia* PPAF-I (HdPPAFI; AB013088), PPAF-II (HdPPAFII; AJ400903), PPAF-III (HdPPAFIII; AB079666); *Manduca sexta* PAP1 (MsPAP1; AY789465), PAP2 (MsPAP2; AY077643), PAP3 (MsPAP3; AY188445), SPH1 (MsSPH1; AF518767), SPH2 (MsSPH2; AF518768); *Tenebrio molitor* PPAF (TmPPAF; AJ400904), Mas-like SPH (TmMasSPH; AB084067), 41 kDa zymogen (Tm41kDa; AB363979), 44 kDa zymogen (Tm44kDa; AB363980); *Tachyplesus tridentatus* proclotting enzyme (TrPCE; M58366) and coagulation factor B (TrCFB; D14701). Bootstrap values indicate the percentage of times that the particular node occurred in 1000 trees generated by bootstrapping the original deduced protein sequences.

group), composed of PmClipSP1 dsRNA-, GFP dsRNA-, and NaCl-injected shrimp, were randomly collected and subjected to RT-PCR analysis. There was no increased shrimp mortality rate during the post-injection period of 7 days resulting from the injection of either PmClipSP1 or the control GFP dsRNAs or from injection of NaCl alone into the shrimp. The results revealed that the transcript levels of PmClipSP1 were significantly decreased in shrimp at 48 h after injection of PmClipSP1 dsRNA, whereas there was no difference in GFP dsRNA injected shrimp and NaCl injected shrimp (Fig. 4).

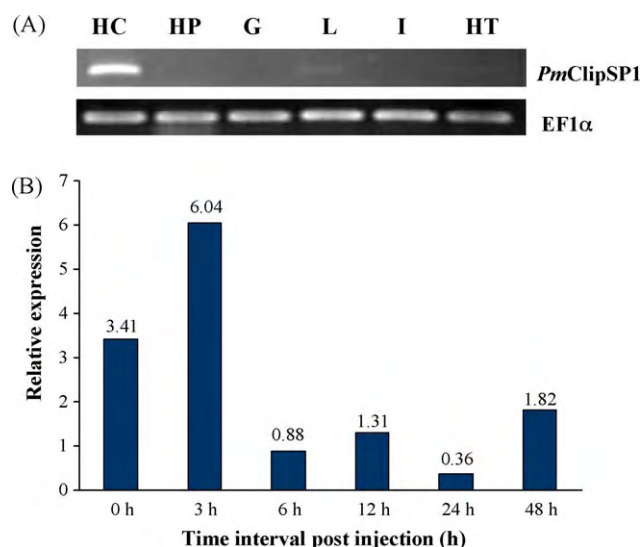
The specificity of the PmClipSP1 gene knockdown was determined by examining the transcript levels of the other clip-SPs (PmPPAE1, PmPPAE2 and PmClipSP2) and clip-SPHs (PmMasSPH1, PmMasSPH2 and PmMasSPH3) in the same *P. monodon* samples using RT-PCR and specific primers for each gene. The results clearly showed that the PmClipSP1 knockdown did not inhibit the gene transcription levels of the other clip-SP genes (Fig. 4), which indicated that the PmClipSP1 gene is specifically silenced by its corresponding dsRNA. Thus, at least under these experimental conditions, a successful specific down-regulation of PmClipSP1 gene transcripts was obtained by this systemic administered dsRNA.

### 3.6. Total proPO activity in PmClipSP1-silenced shrimp

To study the effect of PmClipSP1 RNAi-mediated deficiency on the proPO-activating system, the total PO activity in the PmClipSP1-knockdown shrimp was determined. At 48 h after the second dsRNA injection, shrimp hemocytes were collected, and the PO activity was determined. The experiments were repeated three times, and no significant decrease in the total PO activity ( $p < 0.05$ ) was detected in the PmClipSP1-knockdown shrimp when compared to control groups with either GFP dsRNA or NaCl injected shrimp (data not shown). This suggests that PmClipSP1 was not directly involved in the regulation of the proPO system in shrimp.

### 3.7. Shrimp mortality and viable *V. harveyi* hemolymph levels in PmClipSP1-knockdown shrimp

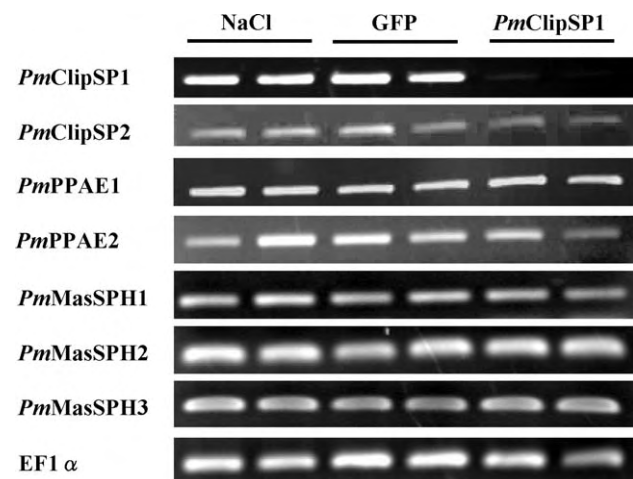
To further assess the potential role of PmClipSP1 in the shrimp defense against bacterial infection, the PmClipSP1-knockdown shrimp were systemically challenged with *V. harveyi*, and the mortality rate was recorded for a period of 5 days after challenge. A mortality of 82–86% was observed in the first 24 h post-bacterial



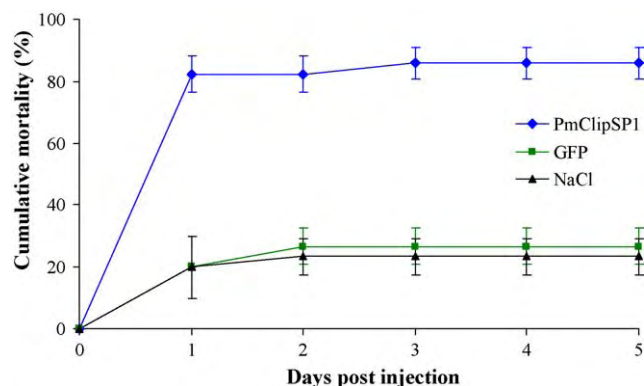
**Fig. 3.** (A) Tissue distribution analysis of the *PmClipSP1* transcripts in *Penaeus monodon* by RT-PCR: hemocyte (HC), hepatopancreas (HP), gill (G), lymphoid organ (L), intestine (I) and heart (HT). *EF1-α* was used as a control housekeeping gene to indicate and standardize the amount of cDNA template in each RT-PCR reaction. Shown is a representative experiment from two independent repeats. (B) Relative expression levels of *PmClipSP1* transcript levels in the shrimp hemocytes post-*V. harveyi* injection, as detected by SYBR green real-time RT-PCR at the indicated times post-injection. Relative expression levels of mRNA were calculated according to Pfaffl [25], using *EF1-α* as an internal reference gene.

infection in the *PmClipSP1*-knockdown shrimp, and the cumulative mortality remained at this level over the remainder of the 5-day assay period (Fig. 5). In contrast, in the GFP dsRNA injected and saline only injected control shrimp, only ~20% and ~27% cumulative mortality was observed at 1 and 2 days post-infection and thereafter remained at this level over the 5-day assay period (Fig. 5). Thus, the mortality was principally induced within the first 2 days and was significantly higher in the *PmClipSP1* dsRNA mediated *PmClipSP1*-knockdown shrimp.

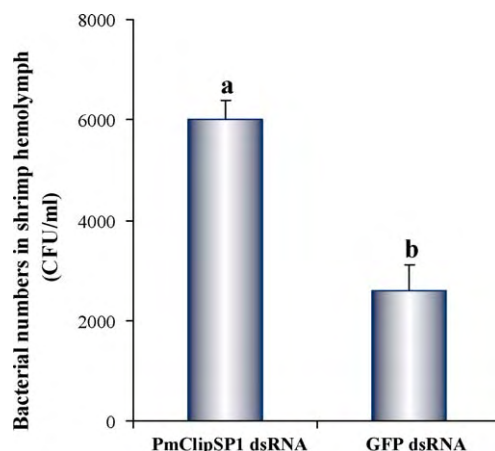
When determining the viable bacterial count in the shrimp hemolymph at 6 h post-infection, it was found that the number of viable bacteria was higher in the *PmClipSP1*-knockdown shrimp



**Fig. 4.** Gene-specific silencing of *PmClipSP1* transcript levels in *P. monodon* hemocytes. The effect of *PmClipSP1*dsRNA injection on the transcript expression levels of *PmClipSP1*, and other shrimp clip-SPs (*PmPPAE1*, *PmPPAE2* and *PmClipSP2*) and clip-SPs (*PmMasSPH1*, *PmMasSPH2* and *PmMasSPH3*) in *PmClipSP1* dsRNA-, GFP dsRNA- or saline-injected shrimp was examined by RT-PCR using gene-specific primers. Each lane represents cDNA from an individual shrimp. *EF1-α* was used as a control housekeeping gene to standardize the amount of cDNA template in each reaction.



**Fig. 5.** The cumulative mortality of *PmClipSP1*-knockdown shrimp challenged with *Vibrio harveyi*. Control groups were injected with either GFP dsRNA in saline, or just saline. Shrimp mortality was recorded for 5 days. The cumulative mortality (%) in each experimental group (9–10 shrimp/group) is presented as the mean  $\pm$  standard deviation, and is derived from triplicate independent experiments.



**Fig. 6.** The number of replication competent *Vibrio harveyi* in the hemolymph of *PmClipSP1*-knockdown shrimp. Shrimp were injected with *PmClipSP1* or GFP (control) dsRNA, as outlined in the methods section, and then injected with a single systemic dose ( $2 \times 10^5$  CFUs) of *V. harveyi* 639. The bacterial colony forming units (CFUs), by a modified total plate count method, in the shrimp hemolymph were determined at 6 h after the bacterial challenge. The data, shown as the mean  $\pm$  standard deviation, and are derived from three independent repeats. Means with the same lower case letters (above each bar) are not significantly different at the  $p < 0.05$  level.

(~2.4-fold) compared with GFP dsRNA control (Fig. 6). Thus, the combined results of the cumulative mortality rate and the viable bacterial clearance experiments suggest an important role for *PmClipSP1* in the *P. monodon* shrimp defense against *V. harveyi* infection.

#### 4. Discussion

Clip domain serine proteinases in arthropods play critical roles in the extracellular signaling cascades during embryonic development and in defense mechanisms, such as in melanization by the prophenoloxidase (proPO) activating system [4,6–8,28], the synthesis of antimicrobial peptides [6,7,12–16] and the hemolymph clotting system [12–15]. Previously, we identified and characterized a clip-SP (named *PmPPAE1*) and a clip-SPH (*PmMasSPH1*) in the shrimp, *P. monodon*, and found that *PmPPAE1* is required for the shrimp proPO system [8] whilst *PmMasSPH1* is a multifunctional immune molecule involved in hemocyte adhesion, bacterial binding, bacterial clearance and antimicrobial activity [29].

Here, we report the cloning and *in vivo* functional characterization of a novel clip-SP (*PmClipSP1*) that was identified from a partial EST sequence obtained from an EST expression library, and the complete sequence obtained using the RACE technique. The predicted ORF of the *PmClipSP1* cDNA was composed of 1101 bp encoding a polypeptide of 366 amino acids with a 25 amino acid signal peptide. There was a stringent similarity between the deduced amino acid sequence of *PmClipSP1* and those of previously known arthropod clip-SPs, characterized by the N-terminal clip domain and the C-terminal proteinase domain, the latter with a conserved catalytic triad, His-126, Asp-191 and Ser-289 (superfamily of the trypsin-like serine proteinase), which is believed to be essential for enzyme activity [7,30].

The deduced amino acid sequence of *PmClipSP1* is homologous to the *F. chinensis* serine proteinase (ABC33918), *Anopheles gambiae* serine protease 14D (ACN38198) and *H. diomphalia* PPAF-I (BAA34642). In addition, phylogenetic analysis showed that *PmClipSP1* falls within the cluster consisting of arthropod clip-SPs, leading to the speculation that *PmClipSP1* is an enzymatic clip-SP that may play a role in innate immunity. In fact, the serine proteinase (ABC33918) of *F. chinensis* mRNA is a non-enzymatic clip-SPH, as revealed by the SMART program analysis, whilst both the *A. gambiae* SP14D [31] and the *H. diomphalia* PPAF-I [32] are enzymatic clip-SPs that are associated with melanization.

In recent years, clip- (or pseudoclip-) SPs and SPHs have been found in several shrimp species, suggesting that they might play an important role in shrimp immune responses [8,18–20,22,29]. However, the *in vivo* molecular characterization and functional studies of these proteins remains poorly investigated in shrimp. Recently, one such gene, *PmPPAE1*, in *P. monodon* was characterized at the *in vivo* level by dsRNA interference, which revealed that *PmPPAE1* is likely to function in the proPO system and is an important component in the shrimp immunity [8]. However, to date this remains the only such gene from many postulated immune active genes in shrimp.

Previously, clip-SPs and clip-SPHs in *P. monodon* were shown to have the highest transcript expression levels in hemocytes, when compared to other tissues (lymphoid organ, gill and intestine) [8,18–20]. In the present study, *PmClipSP1* gene was expressed primarily in hemocytes and only slightly detected in the lymphoid organ (which may reflect residual hemolymph within this organ rather than actual low level tissue-specific expression), and not in the other tissues tested. For the bacterial challenge, real-time RT-PCR showed that *V. harveyi* injection resulted in a biphasic response with up-regulation of *PmClipSP1* transcript levels at 3 h followed by a significant downregulation at 6–48 h after infection. These results raise the possibility that *PmClipSP1* plays a role at least in the early immune response in shrimp hemocytes.

Previously, we demonstrated that *PmPPAE1* transcript levels in *P. monodon* infected with *V. harveyi* also displayed a biphasic response but that this was, in contrast, with an initial marked decrease in transcript expression levels at 3–24 h, followed by a significant increase at 48 h after infection [8]. The distinct induction kinetics of *PmClipSP1* and *PmPPAE1* in response to challenge with the Gram-negative bacteria, *V. harveyi*, suggests that both genes may be implicated in microbial defenses but are not co-regulated. Certainly, the different functional roles of individual clip-SPs in the arthropod defense, and the possible roles of clip-SPs in various immune responses, have been proposed previously [6,7], supporting the notion that *PmClipSP1* likely plays a specific role in shrimp defense that is different from that of *PmPPAE1*.

The family of clip-SPs is generally known to be involved in innate immunity [6,7], and members have been shown to play an essential role in a SP cascade of proPO-activating system, where a

loss of some clip-SP by RNAi suppression leads to a decrease in the total PO activity or in melanization ability [8,31]. In this study, it was found that suppression of the *PmClipSP1* gene transcript levels did not significantly reduce the PO activity of the knockdown shrimp compared to controls (GFP dsRNA or NaCl), suggesting that *PmClipSP1* is not involved in the proPO system. Therefore, *PmClipSP1* is expected to be functionally distinct from *PmPPAE1*.

Although the clip-SPs involvement in the hemolymph clotting system have been well characterized in the horseshoe crab, *T. tridentatus*, the coagulation mechanisms between the horseshoe crab, i.e. the hemocyte-derived clotting cascade and the crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, i.e. the transglutaminase-dependent clotting reaction, are different [33]. However, the silencing of *PmClipSP1* transcript levels did not detectably affect the hemolymph clotting in *P. monodon* shrimp (data not shown).

Surprisingly, *in vivo* functional analysis using RNA interference and systemic bacterial transinfection revealed that *PmClipSP1* is likely to be involved in the defense against the pathogenic Gram-negative bacteria, *V. harveyi*. Thus, following systemic challenge with *V. harveyi*, a significantly higher (2.4-fold) number of viable *V. harveyi* were found in the hemolymph of *PmClipSP1*-knockdown shrimp compared with that in the control (GFP dsRNA and saline only injected) shrimp. The results were also in accordance with the higher cumulative mortality rates observed in the knockdown shrimp following systemic infection with *V. harveyi*. However, the actual function(s) of *PmClipSP1* is still unclear, but our RNAi experiments strongly suggest the involvement of *PmClipSP1* in the antibacterial mechanism.

In *Drosophila*, clip-SPs have been reported to be involved in the Toll signaling pathway, which is activated by a cascade of four serine proteinases [6,34]. Two clip-SPs, Snake and Easter, are downstream components of this cascade and were found to be involved in the spätzle-mediated cleavage and subsequent activation of the Toll pathway for induction of antimicrobial peptide synthesis [6]. In *Tenebrio molitor*, three serine proteinases have been found to be involved in the activation of the Toll pathway [35]. The biochemical evidence for the molecular cross-talk between the *Tenebrio* Toll pathway and the melanization reaction mediated by the clipSP, Spätzle processing enzyme (SPE), has been reported [36]. In shrimp, although Toll-like receptors have been cloned in some species [37,38], their functions in the shrimp innate immunity remain unknown. The involvement of *PmClipSP1* in defense against Gram-negative bacteria points to a possible link with the antimicrobial defense mechanisms of shrimp, which remains to be explored in the future.

In summary, our research demonstrates that *PmClipSP1* of *P. monodon* is unlikely to be directly involved in the proPO-activating system, but that it is important for the shrimp defense mechanism against infection with the pathogenic Gram-negative bacteria, *V. harveyi*.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), and a grant from Thailand Research Fund to Piti Amparyup. A student fellowship granted to Walaiporn Charoensapsri by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, Thailand Research Fund, is acknowledged.

## References

- [1] Söderhäll K. Invertebrate immunity. *Dev Comp Immunol* 1999;23:263–6.
- [2] Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:128–50.
- [3] Lee SY, Söderhäll K. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol* 2002;12:421–37.

- [4] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:116–26.
- [5] Muta T, Hashimoto R, Miyata T, Nishimura H, Toh Y, Iwanaga S. Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes: cDNA cloning, disulfide locations, and subcellular localisation. *J Biol Chem* 1990;265:22426–33.
- [6] Jang IH, Nam HJ, Lee WJ. CLIP-domain serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *BMB Rep* 2008;41:102–7.
- [7] Jiang H, Kanost MR. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 2000;30:95–105.
- [8] Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev Comp Immunol* 2009;33:811–20.
- [9] Ross J, Jiang H, Kanost MR, Wang Y. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* 2003;304:117–31.
- [10] Murugasu-Oei B, Rodrigues V, Yang X, Jang CW. Masquerade: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1995;9:139–54.
- [11] Iwanaga S, Kawabata S, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J Biochem (Tokyo)* 1998;123:1–15.
- [12] Iwanaga S. The limulus clotting reaction. *Curr Opin Immunol* 1993;5:74–82.
- [13] Kawabata SI, Muta T, Iwanaga S. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta GR, editors. *New Directions in Invertebrate Immunology*. Fair Haven: SOS Publications; 1996. p. 255–83.
- [14] Muta T, Iwanaga S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:41–7.
- [15] Takaki Y, Seki N, Kawabata S, Iwanaga S, Muta T. Duplicated binding sites for (1 → 3)-beta-D-glucan in the horseshoe crab coagulation factor G: implications for a molecular basis of the pattern recognition in innate immunity. *J Biol Chem* 2002;277:14281–7.
- [16] Imler JL, Hoffmann JA. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:16–22.
- [17] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 1998;10:23–8.
- [18] Lin CY, Hu KY, Ho SH, Song YL. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule. *Dev Comp Immunol* 2006;30:1132–44.
- [19] Amparyup P, Jitvaropas R, Pulsook N, Tassanakajon A. Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:535–46.
- [20] Sriphajit T, Flegel TW, Senapin S. Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. *Dev Comp Immunol* 2007;31:1145–58.
- [21] Ren Q, Xu ZL, Wang XW, Zhao XF, Wang JX. Clip domain serine protease and its homolog respond to *Vibrio* challenge in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2009;26:787–98.
- [22] Rattanachai A, Hirono I, Ohira T, Takahashi Y, Aoki T. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Fish Shellfish Immunol* 2005;18:39–48.
- [23] Tassanakajon A, Klinbunga S, Paunglarp N, Rimphanitchayakit V, Udomkit A, Jitrapakdee S, et al. *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 2006;384:104–12.
- [24] Felsenstein J. PHYLIP (phylogenetic inference package) version 3.5c. Seattle: Department of Genetics, University of Washington; 1993 [Distributed by the author].
- [25] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2004–7.
- [26] Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 2009;33:247–56.
- [27] Kwon TH, Kim MS, Choi HW, Joo CH, Cho MY, Lee BL. A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 2000;267:6188–96.
- [28] Wang R, Lee SY, Cerenius L, Söderhäll K. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem* 2001;268:895–902.
- [29] Jitvaropas R, Amparyup P, Gross PS, Tassanakajon A. Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol B* 2009;153:236–43.
- [30] Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993;290:205–18.
- [31] Paskewitz SM, Andreev O, Shi L. Gene silencing of serine proteases affects melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 2006;36:701–11.
- [32] Lee SY, Cho MY, Hyun JH, Lee KM, Homma KI, Natori S, et al. Molecular cloning of cDNA for prophenol-oxidase-activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3-b-glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur J Biochem* 1998;257:615–21.
- [33] Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 2006;211:213–36.
- [34] Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D. Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to Gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* 2002;168:1542–6.
- [35] Kim CH, Kim SJ, Kan H, Kwon HM, Roh KB, Jiang R, et al. A Three-step proteolytic cascade mediates the activation of the peptidoglycan-induced toll pathway in an insect. *J Biol Chem* 2008;283:7599–607.
- [36] Kan H, Kim CH, Kwon HM, Park JW, Roh KB, Lee H, et al. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J Biol Chem* 2008;283:25316–23.
- [37] Arts JAJ, Cornelissen FHJ, Cijssouw T, Hermesen T, Savelkoul HFJ, Stet RJM. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:504–13.
- [38] Yang LS, Yin ZX, Liao JX, Huang XD, Guo CJ, Weng SP, et al. A Toll receptor in shrimp. *Mol Immunol* 2007;44:1999–2008.