

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4680199

ชื่อโครงการ : การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนของตัวตอบรับ 5-HT ในกิ้งกูดดำ

ชื่อนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ : ดร. เฉลิมพร องค์กรโสภณ (mbcov@mahidol.ac.th)

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ที่ปรึกษาโครงการ : ศ. สกล พันธุ์ยิ้ม

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาโครงการ : 1 สิงหาคม 2546 – 31 กรกฎาคม 2547

ซีโรโดนิน (5-HT) เป็นสารสื่อประสาทซึ่งมีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยาหลายอย่างทั้งในสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง ในสัตว์จำพวกครึ่งตะเขียน ซีโรโดนินมีบทบาทในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์ จากปมประสาทส่วนสมองและส่วนอก และมีผลทำให้มีการพัฒนาการของรังไข่และเกิดการตกไข่ ซีโรโดนินสามารถออกฤทธิ์ทางสรีรวิทยาได้หลายอย่าง โดยการจับกับตัวตอบรับซีโรโดนินชนิดต่างๆ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้ว จัดอยู่ในกลุ่มตัวตอบรับ G-protein ในการทดลองนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลน cDNA สายสมบูรณ์ที่ถอดรหัสได้ตัวตอบรับซีโรโดนินจากรังไข่ของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำ และสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อรูปที่สามด้านในของตัวตอบรับซีโรโดนิน เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนและบทบาทหน้าที่ของตัวตอบรับเหล่านี้ในกิ้งกูดดำ ในขั้นแรก RNA ที่ถูกสกัดจากรังไข่ของกึ่งแม่พันธุ์ที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีพัฒนาการอยู่ในระยะที่ 3 จะถูกนำมาสร้างสาย cDNA สายแรกด้วยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ Oligo (dT) primer และเอนไซม์ ImpromII™ reverse transcriptase แล้วทำการสร้างและเพิ่มจำนวนขึ้น cDNA สายคู่ด้วยกระบวนการ PCR amplification โดยใช้ primer ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อตัวตอบรับซีโรโดนินของกิ้งกูดดำ เพื่อโคลน cDNA สายสมบูรณ์ นอกจากนี้ดีเอ็นเอของรูปที่สามด้านในของตัวตอบรับ 5-HT (329 คู่เบส) ได้ถูกโคลนเข้าไปในเอนไซม์ pGEX-5X1 เพื่อสร้างโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียและสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีในหนู จากการศึกษา พบว่า cDNA สายสมบูรณ์ ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 2291 ตัว ซึ่งมีรหัสซ้ำ GGC จำนวน 10 รหัสซ้ำในบริเวณ loop ที่ 3 ที่อยู่ภายในเซลล์ ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ ถอดรหัสโปรตีนตัวตอบรับ (5-HT_{1Pom}) ได้กรดอะมิโนจำนวน 591 ตัว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GENBANK พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของตัวตอบรับซีโรโดนินในกิ้งกูดดำมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของตัวตอบรับซีโรโดนินชนิดที่ 1 ของสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลังมากถึง 76% มีบริเวณ transmembrane 7 สาย ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของตัวตอบรับในกลุ่ม G-protein มี loop ที่ 3 ที่อยู่ภายในเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และมีส่วนปลายคาร์บอกซิสั้น นอกจากนี้ ยังมีกรดอะมิโนอนุรักษ์ซึ่งพบเฉพาะในตัวตอบรับซีโรโดนินชนิดที่ 1 ผลของ western blot พบว่าแอนติบอดีตัวนี้สามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาด 50 กิโลดาลตันของรังไข่ของกิ้งกูดดำโดยที่ระดับการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อมีพัฒนาการตั้งแต่ช่วงที่หนึ่งถึงช่วงที่สี่แล้วลดลงหลังจากกึ่งวางไข่ การศึกษาโดยใช้ immunohistochemistry ยังสามารถระบุตำแหน่งการแสดงออกของตัวตอบรับซีโรโดนินบนผนังเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ไข่ที่มีพัฒนาการเจริญเติบโตในช่วงที่สี่ และพบรอบๆเยื่อหุ้ม cortical rod จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นไปได้ว่า ตัวตอบรับซีโรโดนินที่โคลนได้ในกิ้งกูดดำ จัดอยู่ในกลุ่มตัวตอบรับซีโรโดนินชนิดที่ 1 และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมพัฒนาการของรังไข่และการตกไข่ การศึกษานี้จึงมีความสำคัญในการทำให้

เกิดความรู้ความเข้าใจถึงกลไกทางสรีรวิทยาของสารสื่อประสาทซีโรโตนินและตัวตอบรับซีโรโตนินของกุ่มกุลาดำ
ในช่วงที่มีพัฒนาการของรังไข่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาแม่พันธุ์กุ่มที่ให้ผลผลิตสูงต่อไป

คำหลัก: ตัวตอบรับ 5-HT, รังไข่, กุ่มกุลาดำ, RT-PCR

Abstract

Project Code: MRG4680199

Project Title: Molecular Cloning and Functional Expression of a 5-HT Receptor from *Penaeus monodon*

Investigators:

Project Head: Chalernporn Ongvarrasopone, Ph.D.

Project Mentor: Sakol Panyim, Ph.D. Prof. Emeritus

Institute of Molecular Biology and Genetics,

Mahidol University (Salaya Campus), Nakhon Pathom, Thailand

E-mail Address: mbcov@mahidol.ac.th.

Project Period: 1 August 2003-31 July 2004

Abstract—Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a neurotransmitter that plays an important role in many physiological functions in both vertebrates and invertebrates. In crustacean, serotonin has been proposed to stimulate the release of gonad stimulating hormone from brain and thoracic ganglion and resulting in an ovarian maturation and spawning. It mediates a widespread physiological function by interacting with multiple serotonin (5-HT) receptor subtypes which most of them are G-protein coupled receptors. Therefore, the purposes of this study are to clone the full-length cDNA of 5-HT receptor from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and to produce polyclonal antibodies against the intracellular loop (i3) of 5-HT receptor. Total RNA was extracted from an ovary of a wild broodstock black tiger shrimp undergoing stage 3 of ovarian maturation. The first stranded cDNA was synthesized by reverse transcription using an oligo-dT primer and Improm-IITM reverse transcriptase. The full-length cDNA was obtained by using 5-HT receptor gene specific primers. In order to produce polyclonal antibodies against the intracellular loop (i3) of 5-HT receptor, the DNA fragment of i3-5-HT receptor (329bp) was cloned into an expression vector (pGEX-5X1). The i3-5-HT receptor protein was expressed in *E.coli* DH5 α , purified, and injected into mice in order to raise polyclonal antibodies. The results showed that the full-length nucleotide sequences of 5-HT receptor contained 2291 nucleotides. A ten GGC tandem repeat was observed in the i3 loop. The sequences encoded a protein (5-HT_{1Pcm} receptor) of 591 amino acids. Deduced amino acid sequences showed high amino acid sequence identities (up to 76%) with invertebrate and vertebrate 5-HT₁ receptors. This 5-HT_{1Pcm} receptor contained seven transmembrane domains, a large i3 loop, a short carboxyl tail and several conserved amino acids characteristic of 5-HT₁ receptor family. The receptor expressed at relatively high levels in ovary and at variable levels in all tissues examined. Polyclonal antibody against the i3 loop of the 5-HT_{1Pcm} receptor reacted specifically to an ovarian membrane protein of molecular weight approximately 50 kDa. The expression of 5-HT_{1Pcm} receptor protein progressively increased in ovary undergoing stage 1, 2, 3 and 4 of ovarian maturation and was reduced during spent phase. Immunohistochemistry demonstrated the expression of 5-HT_{1Pcm} receptor protein on the membrane of mature oocytes stage 4 and surrounding the cortical rod membrane supporting its role in regulation of ovarian maturation and spawning.

Keywords: 5-HT receptor, ovary, black tiger shrimp, RT-PCR