

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5280048

ชื่อโครงการ : การโคลนและการศึกษาหน้าที่ของ novel C-type lectin ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

ชื่อนักวิจัย : นางสาวราตรี วงศ์ปัญญา, ดร.
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 02-5625555 ต่อ 2012 มือถือ 089-1585847 โทรสาร 02-5614627

E-mail Address : fscirtw@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (มีนาคม 2552 – มีนาคม 2554)

บทคัดย่อ:

เลคตินชนิดซี (C-type lectin) เป็นโปรตีนในกลุ่มเลคติน ซึ่งสามารถจับกับน้ำตาลที่จำเพาะและมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน C-type lectin ในกุ้งกุลาดำ พบว่า open reading frame (ORF) ของยีนประกอบด้วย 657 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 218 ตัว พบ signal peptide อยู่ทางด้านปลายอะมิโนมีความยาว 24 กรดอะมิโน จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ScanProsite เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ พบว่า C-type lectin มี carbohydrate recognition domain (CRD) จำนวน 1 โดเมน ($E\text{-value} = 1.18e^{-12}$) และพบ conserved cysteine จำนวน 4 ตำแหน่ง คือ Cys⁵⁸, Cys¹²⁶, Cys¹⁴¹ และ Cys¹⁴⁹ ที่คาดว่าสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ภายในโครงสร้างได้ แต่ไม่พบบริเวณจับกับ ยีน C-type lectin มีการแสดงออกในต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้และเม็ดเลือด และเมื่อศึกษาอัตราการตายของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* เมื่อมีการลดการแสดงออกของยีน C-type lectin ด้วยเทคนิค RNA interference พบว่ากุ้งที่ถูกลดการแสดงออกของยีน C-type lectin มีอัตราการตายที่สูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม การผลิตรีคอมบิแนนท์ C-type lectin ในระบบแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) โดยใช้เวกเตอร์ 2 ชนิด คือ pET28b และ pET32a ซึ่งทั้ง 2 ระบบเวกเตอร์ พบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีขนาด 24 กิโลดาลตัน และ 39 กิโลดาลตัน ตามที่คาดไว้ ตามลำดับ แต่ปริมาณโปรตีนที่ได้มีจำนวนน้อยและอยู่ในรูปตะกอน จึงไม่เพียงพอต่อการนำไปทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติได้ และเมื่อนำมาผลิตในระบบยีสต์ก็พบว่ายังไม่สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินได้ ดังนั้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินจึงยังคงมีความพยายามต่อไป เช่น คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่อาจเหมาะสมในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคติน ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการเพิ่มความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาและส่งเสริมอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ยั่งยืนต่อไป

คำหลัก : เลคติน กุ้งกุลาดำ ระบบภูมิคุ้มกัน RNAi

Abstract

Project Code : MRG5280048

Project Title : Molecular cloning and functional characterization of a novel C-type lectin gene in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

Investigator : Miss Ratre Wongpanya, Ph.D

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

50 Phaholyothin Rd., Ladyoa, Jatujak, Bangkok, 10900

Tel. 02-562-5555 ext. 2012, 089-158-5847

Fax 02-561-4627

E-mail Address : fscirtw@ku.ac.th

Project Period : 2 years (March 2009 – March 2011)

Abstract:

C-type lectins are Ca^{2+} dependent carbohydrate-recognition proteins that play crucial roles in invertebrate innate immunity. The aims of this study are to clone, express and characterize a novel C-type lectin of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. A 657-bp open reading frame was found to encode a putative protein comprising 218 amino acids and a signal peptide of 24 amino acids. The deduced amino acid sequence contains a single carbohydrate recognition domain (CRD) and possesses four conserved cysteine residues (Cys⁵⁸, Cys¹²⁶, Cys¹⁴¹, Cys¹⁴⁹) involved in the formation of disulphide bridges, however, no specific sugar domain was found. Expression analysis showed that the C-type lectin was expressed in lymphoid organ, heart, intestine and hemocytes. For RNAi experiment, mortality rate of C-type lectin-knockdown shrimps was higher after *Vibrio harveyi* injection than that of control. The C-type lectin without signal sequence was then cloned in to expression vectors, pET-28b and pET-32a, for a recombinant production in *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). The result showed the recombinant proteins with molecular mass of 24 and 38 kDa, respectively by SDS-PAGE. However, the proteins were expressed as inclusion bodies in a small amount in both vector systems. Therefore, the production in yeast, *Pichia pastoris*, was further carried out. Nevertheless, the latter system could not produce the recombinant protein. Consequently, other appropriate expression system needs to be adopted for the protein production. Information from this investigation might provide basic knowledge to understand the function of C-type lectin in shrimp innate immunity and would be helpful for sustainable shrimp aquaculture and disease control.

Keywords : C-type lectins, *Penaeus monodon*, nonself recognition, shrimp immunity, RNA interference