



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การโคลนและการศึกษาหน้าที่ของ novel C-type lectin ในกุ้งกุลาดำ

Penaeus monodon

โดย

ดร. ราตรี วงศ์ปัญญา

เมษายน 2555

สัญญาเลขที่ MRG5280048

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การโคลนและการศึกษาหน้าที่ของ novel C-type lectin ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ดร. ราตรี วงศ์ปัญญา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นักวิจัยที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ทิศนาขจร

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

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 มีอัตราการตายของสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม 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

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

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

ชื่อ-สกุล นักวิจัย นางสาวราตรี วงศ์ปัญญา, คร.

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 02-562-5555 ต่อ 2012 มือถือ 089-158-5847 โทรสาร 02-561-4627

e-mail: fscirtw@ku.ac.th

นักวิจัยที่ปรึกษา นางอัญชลี ทักสนาขจร, ศ.ดร.

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-5439

โทรศัพท์ 02-218-5418

e-mail: anchalee.k@chula.ac.th

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กึ่งกลาค้าเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ประเทศไทยสามารถส่งออกกุ้งได้ถึง 200,000-250,000 ตันต่อปี นำรายได้เข้าสู่ประเทศคิดเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท อย่างไรก็ตาม เกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งกลาค้ายังคงประสบปัญหาต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตอย่างต่อเนื่อง ปัญหาสำคัญประการหนึ่งคือ ปัญหาการระบาดของโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัส และแบคทีเรีย (Lightner *et.al.*, 1983; Kroll *et.al.*, 1991; Mohney *et al.*, 1994; Hasson *et al.*, 1995; Flegel 1997 และ Sung *et al.*, 2001) ทำให้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งกลาค้าลดลงเป็นจำนวนมาก ที่ผ่านมากษัตริย์ราชบัณฑิตยสถานในการแก้ปัญหาการติดเชื้อโรคในกึ่งกลาค้า การใช้สารดังกล่าวส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งกลาค้าเนื่องจากสารดังกล่าวมีการตกค้างในกึ่งกลาค้าและส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ในบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในระดับโมเลกุลของกึ่งกลาค้าจึงมีความสำคัญเพื่อประโยชน์และพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งต่อไป

ดังนั้นการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดำจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อช่วยให้เข้าใจถึงหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อและนำไปสู่การหาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดปัญหาโรคระบาดในกิ้งกูดำ และช่วยให้อาชีพการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดำมีความมั่นคงและยั่งยืน

ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (Humoral immunity) มีโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ เลคติน (lectins) โดยหน้าที่สำคัญของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ามี 2 หน้าที่ คือ หน้าที่การกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการทิ้งไปในระหว่างขบวนการเจริญเติบโต (metamorphosis) และหน้าที่การมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาการป้องกันการติดเชื้อ เลคตินเป็นชื่อเรียกของกลุ่มโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ เลคตินยังมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แอ็กกลูตินิน (agglutinin) เนื่องจากมีความสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์หลายชนิดจับกลุ่มตกตะกอน ในปัจจุบันพบเลคตินหลายร้อยชนิดที่จากแบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ (Goldstein and Poretz 1986) เลคตินเป็น non-self recognition molecules ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Arason *et al.*, 1996) จากการศึกษาถึงบทบาทของเลคตินในพืช พบว่า เลคตินมีบทบาทที่น่าสนใจในการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลป้องกัน (defensive molecules) และมีรายงานว่าเลคตินเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการบุกรุกของไวรัสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกด้วย (Nabatov *et al.*, in press)

C-type lectin เป็นเลคตินชนิด Calcium-dependent (C-type) animal lectin ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพบว่ามีการศึกษาถึงลักษณะและบทบาทของ C-type lectin โดยพบว่า C-type lectin ในแมลงและสัตว์พวกครัสเตเชียน มีส่วนเกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่และบทบาทของ C-type lectin ในกิ้งกูดำมีอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจการศึกษาถึงสมบัติและหน้าที่ของยีนรวมถึงโปรตีน C-type lectin ในกิ้งกูดำ เพื่อให้มีข้อมูลในการทำความเข้าใจกระบวนการและหน้าที่ของยีนนี้ต่อกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคของกิ้งกูดำได้มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาและศึกษาลักษณะสมบัติของยีน novel C-type lectin ในกิ้งกูดำ โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA ในเนื้อเยื่อต่างๆ
3. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีน novel C-type lectin และการทำบริสุทธิ์ของโปรตีน เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Full-length cDNA) ของยีน novel c-type lectin

ใช้กึ่งกลาดำจากฟาร์ม อายุประมาณ 3 เดือน โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยที่ 16 กรัม/ตัว นำมาเลี้ยงในตู้เลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt เป็นเวลาอย่างน้อย 1 วันก่อนทำการทดลอง จากนั้นคัดเลือกกุ้งโดยใช้ 10% โซเดียมซิเตรตเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) นำเม็ดเลือดกุ้งที่ได้มาสกัด total RNA โดยใช้ TRI reagent ทำลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ RNase-free DNase I ตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้โดยการวิเคราะห์ด้วย agarose-formaldehyde gel electrophoresis และหาปริมาณ total RNA โดยวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนจากการทำห้องสมุด cDNA ของกึ่งกลาดำมาทำการรวมกลุ่ม (assembly) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน novel c-type lectin จากนั้นนำ total RNA ที่เตรียมได้จากเม็ดเลือดมาสร้าง first-strand cDNA และโคลนขึ้นดีเอ็นเอเข้า pGEM-T easy vector และนำมา transform เข้า *Escherichia coli* JM109 โดยวิธี heat shock และนำ recombinant clones ที่ได้มาตรวจสอบหาชิ้น insert โดยการ digestion ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และวิเคราะห์ชิ้น insert ใน agarose gel electrophoresis นำรีคอมบิแนนท์โคลนไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) และ SMART (<http://www.smart.emblheidelberg.de/>) เทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ClustalW multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) วิเคราะห์ Signal peptide โดยใช้ SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) หา Conserved cysteine residues โดย ExPASy PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) และทำ Homology model โดยใช้ SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)

2. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR

สกัด total RNA จากเหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้ เม็ดเลือดและตับ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณและนำมาสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกแบบไว้ วิเคราะห์ PCR product ใน agarose gel electrophoresis วัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD ตรวจสอบค่าการแสดงออกเทียบกับยีน elongation factor 1 alpha (EF1- α)

3. ศึกษาผลการ knockdown ยีน C-type lectin ต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

แบ่งตัวอย่างกุ้งเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดกุ้งด้วย C-type lectin dsRNA กลุ่มที่ 2 ฉีดด้วย GFP dsRNA (ตัวควบคุม) โดยใช้ dsRNA ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม และกลุ่มที่ 3 ฉีดด้วยโซเดียมคลอไรด์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม จากนั้นเก็บเม็ดเลือดของกุ้งเพื่อตรวจสอบแสดงออกของยีน C-type lectin ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยสกัด Total RNA ด้วย NucleoSpin1 RNAII (MACHEREY-NAGEL) แล้วนำ Total RNA ที่ได้มาสร้าง First-strand cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, USA) ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน Elongation factor 1 alpha (EF1- α) จากนั้นทำการทดลองเหมือนครั้งแรกโดยแบ่งกุ้งเป็น 3 กลุ่มที่ฉีดด้วย dsRNA ข้างต้น หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงทำการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (2×10^5 CFU) ในกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม แล้วตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายหลังฉีดเชื้อเวลา 1-7 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง

4. ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาสมบัติของโปรตีน

ทำการโคลนยีน C-type lectin เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดสำหรับผลิตโปรตีน (expression vector) 2 ชนิด คือ pET28b และ pET32a จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 โดยวิธี heat shock คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนโดยวิธี colony PCR และวิเคราะห์ขนาดของชิ้น DNA insert โดยวิธี agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์โคลนและนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาถ่ายเข้าสู่เซลล์ *E. coli* Rosetta (DE3) โดยวิธี heat shock ทำการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (คานามัยซินและแอมพิซิลินตามลำดับ) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย Isopropyl- β -D-thio-galactoside (IPTG) ความเข้มข้น 1 mM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เก็บและปั่นตกตะกอนเซลล์ แล้วตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย SDS-PAGE และ Western blot analysis แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ HisTrap affinity column ในเครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC) และวิเคราะห์โปรตีนใน SDS-PAGE

5. รวบรวมผลการทดลอง วิเคราะห์ผล และสรุปผล

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ รวมถึงผลการทำ knockdown ต่ออัตราการตายของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย และผลการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระบบแบคทีเรียด้วยพลาสมิด 2 ชนิด สรุปผลการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน C-type lectin พบว่า open reading frame (ORF) ของยีนประกอบด้วย 657 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 218 ตัว และเมื่อวิเคราะห์ signal peptide ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 พบ signal peptide อยู่ทางด้านปลายอะมิโนของโปรตีนมีความยาว 24 กรดอะมิโน จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ScanProsite เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ พบว่า C-type lectin มี carbohydrate recognition domain (CRD) จำนวน 1 โดเมน (E-value = $1.18e^{-12}$) และพบ conserved cysteine จำนวน 4 ตำแหน่ง คือ Cys⁵⁸, Cys¹²⁶, Cys¹⁴¹ และ Cys¹⁴⁹ ที่คาดว่าสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ภายในโครงสร้างได้ แต่ไม่พบบริเวณจับกับน้ำตาล เช่น EPN (Glu-Pro-Asn) หรือ QPD (Gln-Pro-Asp) ที่สามารถจับกับน้ำตาล Mannose หรือ Galactose ตามลำดับได้อย่างจำเพาะ และจากผลการทำนายขนาดของโปรตีนที่ไม่มี signal peptide พบว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 21,561.75 Da และมีค่า pI เท่ากับ 4.60

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน C-type lectin ในอวัยวะต่างๆ ของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้การแสดงออกของยีน elongation factor-1 alpha เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า ยีน C-type lectin มีการแสดงออกใน ต่อมเหงือก หัวใจ ลำไส้และเม็ดเลือด โดยไม่พบการแสดงออกของยีนในเหงือกและตับ และเมื่อศึกษาอัตราการตายของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* เมื่อมีการลดการแสดงออกของยีน C-type lectin ด้วยเทคนิค RNA interference พบว่ากุ้งที่ถูกลดการแสดงออกของยีน C-type lectin มีอัตราการตายของสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม นั้นอาจกล่าวได้ว่า C-type lectin มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

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 แต่ปริมาณโปรตีนที่ได้มีปริมาณน้อยและอยู่ในรูปตะกอน จึงไม่เพียงพอต่อการนำไปทำบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติได้ นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าที่คาดไว้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบบของแบคทีเรียที่ยังไม่เหมาะสม หรืออาจมีการตัดของเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดทำให้ได้โปรตีนขนาดเล็กลง และเมื่อนำมาผลิตในระบบยีสต์ก็พบว่ายังไม่สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินออกมาได้ ดังนั้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินจึงยังคงมีความพยายามต่อไป เช่น คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่อาจเหมาะสมในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเลคตินได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C-type lectin ในกุ้งกุลาดำ โครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่ได้จากการจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ การแสดงออกของยีนใน อวัยวะต่างๆ รวมถึงผลของการลดการแสดงออกของยีนในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ผลที่ได้จากการศึกษา ครั้งนี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการเพิ่มความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ซึ่งอาจ นำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาและส่งเสริมอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ยั่งยืนต่อไป

ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

วารสาร Fish & Shellfish Immunology ซึ่งมี impact factor (2010) 3.044

ชื่อเรื่อง Molecular cloning and characterization of a C-type lectin in the black tiger shrimp
Penaeus monodon

สารบัญ

	หน้า
บทนำ และวัตถุประสงค์	1
บททวนเอกสาร	2
วิธีการวิจัย	4
ผลการวิจัย	14
อภิปรายผลการวิจัย	29
สรุปผลการวิจัย	30
เอกสารอ้างอิง	31

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน C-type lectin (ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ อักษรตัวหนา คือ Stop codon)	7
ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน C-type lectin เพื่อนำยีนเข้าสู่เซลล์ยีสต์ (ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ อักษรตัวหนา คือ stop codon)	10

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C-type lectin หรือ PMlectin1	15
ภาพ 2 แบบจำลองโครงสร้างโปรตีนของ C-type lectin หรือ PMlectin1	16
ภาพ 3 ระดับการแสดงออกของยีน C-type lectin ของกุ้งกุลาดำในเนื้อเยื่อต่างๆ	17
ภาพ 4 ผลการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง ssRNA	17
ภาพ 5 ผลการ knockdown ยีน C-type lectin ในเมดลีสของกุ้งกุลาดำ	18
ภาพ 6 กราฟแสดงอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> หลังจากฉีด dsRNA ของ GFP และ C-type lectin	19
ภาพ 7 อีเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้นแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ EcoRI	20
ภาพ 8 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b หลังการชักนำด้วย IPTG ที่เวลาต่างๆ	21
ภาพ 9 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b ด้วยเทคนิค Western Blotting	22
ภาพ 10 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b ในส่วนสารละลายและตะกอนเซลล์	22
ภาพ 11 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b หลังจากทำบริสุทธิ์	23
ภาพ 12 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET32a	25
ภาพ 13 Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน Pmlectin1 ด้วย FPLC	25
ภาพ 14 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET-32a ด้วยเทคนิค western blotting	26

ภาพ 15 การตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-lectin

ด้วยเทคนิค colony PCR

26

ภาพ 16 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZa-lectin1

ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

27

ภาพ 17 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่ได้รับ pPICZa-lectin

ด้วยเทคนิค colony PCR

28

บทนำ

C-type (Ca^{2+} -dependent) lectins เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับน้ำตาลอย่างจำเพาะ โดยมีโดเมนตั้งแต่หนึ่งโดเมนที่ทำหน้าที่จดจำน้ำตาล (Drickamer *et al.*, 1993) ในหนึ่งโดเมนจะมีบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนุกรมสำหรับการจับกับแคลเซียมและน้ำตาล และภายในโครงสร้างจะมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์จำนวน 2-3 คู่ (Zelensky and Gready, 2005) โดยมีรายงานว่าในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง C-type lectins เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน อาทิเช่น cell adhesion การกระตุ้น prophenoloxidase การกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) (Koizumi *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009) ในระยะที่ผ่านมาการศึกษาเพื่อค้นหาและโคลนยีน C-type lectins จากสัตว์จำพวกอาร์โทรพอดหลายชนิด เช่น แมลง ปู หอย และกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การศึกษายีน C-type lectins ของกุ้งที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ ได้แก่ กระบวนการต้านไวรัส การต้านแบคทีเรียและจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ความรู้เรื่องกลไกที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของโปรตีนเลคตินยังมีอยู่น้อยมาก โดยเฉพาะในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย

เมื่อประมาณสิบปีที่ผ่านมา การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศไทยประสบปัญหาอย่างหนักจากการระบาดของไวรัสและแบคทีเรีย ทำให้ส่งผลต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงและการส่งออกซึ่งคิดเป็นมูลค่าความเสียหายหลายสิบล้านบาท (Chen *et al.*, 1991, Luo *et al.*, 2007) ดังนั้นความรู้ความเข้าใจเรื่องยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ อย่างเช่นยีน C-type lectins อาจจะช่วยทำให้ทราบกลไกของกระบวนการเกิดโรคและหาวิธีการป้องกันและการจัดการอย่างยั่งยืนเพื่อให้กุ้งมีสุขภาพที่ดีและปลอดโรคต่อไป

จุดประสงค์การทดลอง

1. เพื่อค้นหาและศึกษาลักษณะสมบัติของยีน novel C-type lectin ในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA ในเนื้อเยื่อต่างๆ
3. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin และทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin

ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ต้องการโคลนและหาฮินดอลอดสายของ C-type lectin จากเมื่อดัดกุ้งกุลาดำ และตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค RT-PCR นอกจากนี้ยังต้องการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรียและทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

บทบทวนเอกสาร

กึ่งกลางค้ำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ประเทศไทยสามารถส่งออกกุ้งได้ถึง 200,000-250,000 ตันต่อปี นำรายได้เข้าสู่ประเทศคิดเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท อย่างไรก็ตาม เกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งกลางค้ำยังคงประสบปัญหาต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตอย่างต่อเนื่อง ปัญหาสำคัญประการหนึ่งก็คือ ปัญหาการระบาดของโรคติดเชื้อต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัสและแบคทีเรีย (Lightner *et al.*, 1983; Kroll *et al.*, 1991; Mohny *et al.*, 1994; Hasson *et al.*, 1995; Flegel 1997 และ Sung *et al.*, 2001) ทำให้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งกลางค้ำลดน้อยลงเป็นจำนวนมาก ที่ผ่านมามีเกษตรกรใช้ยาปฏิชีวนะในการแก้ปัญหาการติดเชื้อโรคในกึ่งกลางค้ำ การใช้สารดังกล่าวส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งกลางค้ำเนื่องจากสารดังกล่าวมีการตกค้างในกึ่งกลางค้ำและส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ในบริเวณบ่อเลี้ยงกึ่ง ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในระดับโมเลกุลของกึ่งกลางค้ำจึงมีความสำคัญเพื่อประโยชน์และพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งต่อไป ดังนั้นการค้นคว้าและศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกลางค้ำจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อช่วยให้เข้าใจถึงหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อและนำไปสู่การหาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดปัญหาโรคระบาดในกึ่งกลางค้ำ และช่วยให้อาชีพการเพาะเลี้ยงกึ่งกลางค้ำมีความมั่นคงและยั่งยืน

ระบบภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียน เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีมาแต่กำเนิดเรียกว่า Innate immunity ประกอบด้วย humoral immune และ cellular immune โดยระบบภูมิคุ้มกันหลักจะอยู่ในส่วนของเม็ดเลือด เช่น การกลืนทำลาย (phagocytosis) การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) การแข็งตัวของเลือด (clotting) การสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial substances) และการเกิดขบวนการสร้างเมลานิน (melanisation) โดยการกระตุ้นของระบบ prophenoloxidase activating system (proPO system) เป็นต้น

ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (Humoral immunity) มีโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ เลคติน (lectins) โดยหน้าที่สำคัญของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ามี 2 หน้าที่ คือ หน้าที่การกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการทิ้งไปในระหว่างขบวนการเจริญเติบโต (metamorphosis) และหน้าที่การมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาการป้องกันการติดเชื้อ เลคตินเป็นชื่อเรียกของกลุ่มโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ เลคตินยังมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แอ็กกลูตินิน (agglutinin) เนื่องจากมีความสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์หลายชนิดจับกลุ่มตกตะกอน ในปัจจุบันพบเลคตินหลายร้อยชนิดที่จากแบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ (Goldstein and Poretz 1986) เลคตินเป็น non-self recognition molecules ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Arason *et al.*, 1996) จากการศึกษาถึงบทบาทของเลคตินในพืช พบว่า เลคตินมีบทบาทที่น่าสนใจในการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลป้องกัน (defensive molecules) และมีรายงาน

ว่าเลคตินเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการบุกรุกของไวรัสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกด้วย (Nabatov และคณะ in press)

C-type lectin เป็นเลคตินชนิด Calcium-dependent (C-type) animal lectin ซึ่งเลคตินเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีหน้าที่หลายประการ เลคตินเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะและมีแหล่งจับมากกว่า 1 ตำแหน่ง และสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้ เลคตินพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ต่างๆ จากการศึกษพบว่าเลคตินมีส่วนเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของสัตว์เพราะมีความจดจำที่จำเพาะกับน้ำตาลบนผิวของแบคทีเรีย (Weis *et al.*, 1998) ทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มหรือกระตุ้นการกลืนกินแบคทีเรียโดยเม็ดเลือด การศึกษาเลคตินในกุ้ง penaeid หลายชนิด พบว่าเลคตินหลายชนิดแม้มีโครงสร้างแตกต่างกัน แต่บทบาททางชีวภาพในการจับจำเพาะต่อน้ำตาลจะเหมือนกัน นอกเหนือจากบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเองแล้ว เลคตินในครัสเตเชียนยังช่วยขนส่งน้ำตาลเชิงซ้อน และเกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ของกุ้งเพศเมียที่เกิดจากการสะสมของโกลโคโปรตีนอย่างรวดเร็วในไข่ในกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus merguensis* de Man) ซึ่งรวมเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่าย (ประภาพร และคณะ 2544) C-type lectin ในหนูมีส่วนเกี่ยวข้องในการกำจัดเซลล์ที่เกิด apoptosis (Dalton *et al.*, 2003) และมีรายงานว่า โปรตีนนี้ช่วยในการกำจัดไกลโคโปรตีนบางชนิดออกจากกระแสเลือดในคน (Coombs *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า Asialoglycoprotein receptoor ซึ่งเป็น C-type lectin ชนิดหนึ่งมีส่วนช่วยในกระบวนการ endocytosis และ degradation ของโปรตีนหลายชนิดในพลาสมา (Baricevic *et al.*, 2002) ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพบว่ามี การศึกษาถึงลักษณะและบทบาทของ C-type lectin โดยในปี 2008 Zhu *et al.* พบว่ายีน C-type lectin ในหอยแครงมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อมีหอยถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์จำพวกกุ้ง ซึ่งพบว่ายีน C-type lectin ในเม็ดเลือดของกุ้งจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) มีการแสดงออกสูงขึ้นหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียหรือไวรัส (Liu *et al.*, 2007) และพบว่า C-type lectin ในกุ้งจีนมีความสามารถในการจับกับแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดี และสามารถทำให้แบคทีเรียตกตะกอนได้อีกด้วย (Sun *et al.*, 2008) การศึกษาเลคตินในกุ้งกุลาดำโดย Ratanapo และคณะในปี 1990 พบว่า monodin ซึ่งเป็นเลคตินชนิดหนึ่ง ที่สกัดได้จากเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเป็นไกลโคโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อ N-acetylneuraminic acid และสามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ได้ (Ratanapo *et al.*, 1992) แต่ยังไม่มีการรายงานการโคลนยีนของ monodin หรือยีนเลคตินอื่นๆในกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสและแบคทีเรียด้วยเทคนิค cDNA microarray พบว่ายีนเลคตินมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Wongpanya *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามบทบาทของ C-type lectin ที่พบในกุ้งกุลาดำยังไม่ทราบแน่ชัดเพราะขาดข้อมูลในด้านชีวโมเลกุลและหน้าที่ของเลคตินในกุ้ง โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะโคลนและศึกษาลักษณะสมบัติของยีน C-type lectin และใช้เป็น molecular probe ในการตรวจหาการแสดงออกเชิงปริมาณของ mRNA ในเนื้อเยื่อ

ต่างๆ ของกุ้งกุลาดำ และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนและทำบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน เพื่อให้มีข้อมูลในการทำความเข้าใจกระบวนการและหน้าที่ของยีนนี้ต่อกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคของกุ้งกุลาดำได้มากยิ่งขึ้น และนำความรู้ที่ได้ไปรวบรวมเพื่อนำไปสู่การผลิตกุ้งกุลาดำหรือกุ้ง penaeid ชนิดอื่นให้มีความทนทานต่อโรคและช่วยเพิ่มผลผลิตให้เกษตรกรในการเพาะเลี้ยงกุ้งต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัด Total RNA การสังเคราะห์ cDNA และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้กุ้งกุลาดำจากฟาร์ม ที่มีอายุประมาณ 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 16 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงในตู้เลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt เป็นเวลาอย่างน้อย 1 วันก่อนทำการทดลอง จากนั้นคัดเลือกกุ้งโดยใช้ 10% โซเดียมซิเตรดเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) แล้วปั่นเก็บเม็ดเลือดกุ้ง และตัดเก็บเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ หัวอก ต่อมเหงือก หัวใจ ลำไส้ เม็ดเลือด และตับ (gill lymphoid heart intestine hemocytes และ hepatopancreas) เพื่อนำมาสกัด total RNA โดยใช้ TRI reagent (Molecular Research Center, Inc) จากนั้นทำลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ RNase-free DNase I และตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้โดยการวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis และหาปริมาณ total RNA โดยวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำ total RNA ที่ได้มาสร้าง first-strand cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จ Improm-II Reverse Transcription System (Promega) ใช้ cDNA ของเม็ดเลือดเป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full-length cDNA) ของยีน C-type lectin โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน C-type lectin จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งกุลาดำมาทำการรวมกลุ่ม (assembly) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน novel c-type lectin จากนั้นนำ total RNA ที่เตรียมได้จากเม็ดเลือด มาสร้าง first-strand cDNA และโคลนยีนดีเอ็นเอเข้า pGEM-T easy vector และนำมา transform เข้า *Escherichia coli* JM109 โดยวิธี heat shock และนำ recombinant clones ที่ได้มาตรวจสอบหาชิ้น insert โดยการ digestion ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และวิเคราะห์ชิ้น insert ใน agarose gel electrophoresis แล้วนำรีคอมบิแนนท์โคลนไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย nucleotide sequencing โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทคนิคชีวสารสนเทศ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน novel c-type lectin โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) และ SMART (<http://www.smart.emblheidelberg.de/>) ทำนายการจัดเรียงตัวกรดอะมิโนของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Expert Protein Analysis System (<http://au.expasy.org/>) ทำการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน (multiple sequence alignments) โดยใช้โปรแกรม ClustalW multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) แล้วทำการวิเคราะห์ signal peptide ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) และวิเคราะห์กรดอะมิโนที่คงที่ (conserved

cysteine residues) โดยใช้โปรแกรม ExPASy PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) และทำ Homology model โดยใช้โปรแกรม SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)

2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR

นำ cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ มาเจือจาง 5 เท่า เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกแบบไว้ (PmLecF: 5'-TGGCTGCTGTTGGTTACAAG-3' และ PmLecR: 5'-AGAGCTTCACATGGGGTTTG-3') ในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Taq PCR Master Mix (2.5 units Taq DNA Polymerase 1x QIAGEN PCR Buffer, 200 μ M dNTP) ไพรเมอร์แต่ละสาย (PmLecF และ PmLecR) มีความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง Thermocycler โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้: 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ ต่อด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ วิเคราะห์ผลในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบและบันทึกผลที่ได้ด้วยเครื่อง Gel documentation (DNR Bio-Imaging Systems) วัดปริมาณผลผลิตที่ได้เปรียบเทียบกับความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน elongation factor 1 alpha (EF1 α) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (EF1 α -F: 5'-GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC-3' และ EF1 α -R: 5'-CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG-3').

3. การเตรียม Double-stranded RNA (dsRNA)

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเพื่อใช้ในการสร้าง dsRNA ของยีน C-type lectin และ Green fluorescent protein (GFP) ดังนี้

lec-F	5'-TTCGGCGCACAGTGACAGAC-3'
lec-R	5'-ATCCTCTCAGCGTCCGATTTC-3'
T7lecF	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGTCCTGGTGCCCGCCTTG-3'
T7lec-R	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGGTGTCCCCCTCTGGTTCA-3'
GFPT7-F	5'-TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
GFP-R	5'-TACTTGTACAGCTCGTCCA-3'
GFP-F	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
GFPT7-R	5'-TAATACGACTCACTATAGGTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'

ในการทดลองนี้ใช้ dsRNA ของ Green fluorescent protein (GFP) เป็น Negative control เริ่มจากสร้าง dsDNA ของ Sense strand และ Anti-sense strand ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด HiYield™ Gel/ PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience) จากนั้น

นำมาเป็นต้นแบบในการสร้าง ssRNA ด้วย T7 RNA polymerase (T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems, Promega, USA) วิเคราะห์ผลในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย Ethidium bromide ตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator และวัดความเข้มข้นของ ssRNA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำ ssRNA ปริมาณเท่ากันมารวมเพื่อทำให้เกิด dsRNA และใช้ในการทดลองต่อไป

4. การทำ gene knockdown ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ของในกุ้งกุลาดำ

ใช้กุ้งขนาดเล็กน้ำหนักประมาณ 1-2 กรัม แบ่งกลุ่มตัวอย่างกุ้งเป็น 3 ชุด (3 ซ้ำ) เพื่อทดสอบการ knockdown ยีน C-type lectin โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดด้วย C-type lectin-dsRNA กลุ่มที่ 2 ฉีดด้วย GFP-dsRNA (ตัวควบคุม) โดยฉีด dsRNA (ในโซเดียมคลอไรด์) ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม ที่บริเวณช่องท้องของกุ้ง และกลุ่มที่ 3 ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เพื่อเป็นตัวควบคุม โดยฉีดทั้งหมด 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเลือดของกุ้งหลังฉีดครั้งแรก เป็นเวลา 2 วัน และหลังการฉีดครั้งที่ 2 เป็นเวลา 5 วัน นำเม็ดเลือดมาสกัด total RNA โดยใช้ NucleoSpin1 RNAII (MACHEREY-NAGEL) แล้วนำ total RNA ที่ได้มาใช้สร้าง first-strand cDNA ด้วย ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA) จากนั้นนำมาตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน C-type lectin ในกุ้งทั้ง 3 กลุ่มด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ lecF และ lecR เทียบกับระดับการแสดงออกของยีน elongation factor 1 alpha (EF1- α)

5. ศึกษาผลการ knockdown ยีน C-type lectin ต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

แบ่งตัวอย่างกุ้งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว (3 ซ้ำ) โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดด้วย C-type lectin-dsRNA กลุ่มที่ 2 ฉีดด้วย GFP-dsRNA (ตัวควบคุม) โดยใช้ dsRNA ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม และกลุ่มที่ 3 ฉีดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (2×10^5 CFU) ในกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม แล้วตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายหลังฉีดเชื้อเวลา 1-7 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง

6. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ในระบบแบคทีเรีย

6.1 การเพิ่มปริมาณยีน C-type lectin ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณยีน C-type lectin (ตัดส่วน signal peptide) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและมีความเหมาะสมสำหรับโคลนเข้า Expression vector pET-28b หรือ pET-32a (ตารางที่ 1) ปฏิบัติการทำ PCR ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.5 units *Pfu* Taq DNA Polymerase 1x Buffer 200 μ M dNTP ไพรเมอร์แต่ละสายมีความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และใช้ cDNA จากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำเป็นแม่แบบ นำ

ผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator สำหรับผลผลิต PCR ที่ได้ นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด HiYield™ Gel/ PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน C-type lectin (ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งตัดจำเพาะด้วย เอนไซม์ อักษรตัวหนา คือ Stop codon)

ไพรเมอร์	ลำดับ (5' → 3')	ขนาดที่คาดหมาย (bp)
การโคลนเข้า pET-28b		
- FLecpET_NdeI	5'-AGCATATGCAACTACAGAGGAATTGC-3'	605
- RLecpET_EcoRI	5'-ATGAATTCTCTGCATTAGACCATGACTGC-3'	
การโคลนเข้า pET-32a		
- FLec_EcoRI	5'-AGGAATTCCAACACTACAGAGGAATTGC - 3'	609
- RLec_NotI	5'-ATGCGGCCCGCTCTGCATTAGACCATGACTGC - 3'	

6.2 การเชื่อมต่อยีน C-type lectin กับพลาสมิด pGEM®-T easy

นำผลผลิต PCR ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM®-T easy โดยใช้อัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์สำหรับเชื่อมต่อ (1x rapid ligation buffer) เอนไซม์ T4 DNA Ligase ปริมาณ 3 ยูนิต เวกเตอร์ pGEM®-T easy ปริมาณ 50 นาโนกรัม และชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มปริมาณ 30 นาโนกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จะได้พลาสมิด pGEM- C-type lectin จึงนำพลาสมิดที่ได้มาเติมลงใน competent cell (แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109) ที่เตรียมไว้ แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที หลังจากทำการ heat shock จึงเติมอาหาร SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgCl₂ และ 20 mM glucose) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที คูลสารละลายออกจนเหลือปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้ว spread ลงบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร X-gal ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำเชื้อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค colony PCR ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบและบันทึกผลที่ได้ด้วยเครื่อง gel documentation (DNR Bio-Imaging Systems) จากนั้นนำโคลนที่มีชิ้นยีนมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแล้วสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC

Bioscience) นำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *EcoRI* หรือใช้ *EcoRI* และ *NotI* (สำหรับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่จะโคลนเข้า pET28b และ pET32a ตามลำดับ) นำผลที่ได้ไปตรวจสอบในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบและบันทึกผลที่ได้ด้วยเครื่อง Gel documentation

สำหรับพลาสมิดที่มีการตัดอย่างสมบูรณ์ นำมาตรวจสอบในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดไว้ออกมาจากเจล นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด HiYield™ Gel/ PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience) เก็บผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้เพื่อนำไปโคลนเข้า expression vector (pET28b และ pET32a) ต่อไป

6.3 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b-lectin และ pET32a-lectin

นำพลาสมิด pET28b หรือ pET32a มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NdeI* หรือ *EcoRI* และ *NotI* ตามลำดับ ตรวจสอบในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ออกมาจากเจล นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด HiYield™ Gel/ PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience) และนำมาเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 6.2 โดยในปฏิริยามีปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X ligase buffer (Promega) เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต โดยใช้ดีเอ็นเอและพลาสมิดในอัตราส่วน 3:1 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b-lectin และ pET32a-lectin ถ่ายเข้าสู่ competent cell ด้วยวิธี heat shock แล้วเติมอาหาร SOC medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำมาตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือปริมาตรในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้ตะกอนกระจายทั่วและนำไป spread บนอาหารคัดเลือก LB agar โดย pET28b-lectin ใช้ยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน pET32a-lectin ใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยเทคนิค colony PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังได้กล่าวแล้วข้างต้น

6.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b-lectin หรือ pET32a-lectin มาส่งผ่านเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) ด้วยวิธี heat-shock แล้ว spread เชื้อที่ได้ลงไปบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม นำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม แช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ใส่ลงไปในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.4-0.6) เหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์

โปรตีนด้วยการเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เข้าต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เก็บเซลล์ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ นอกจากนี้ทำการละลายตะกอนเซลล์ใน Lysis buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5mM Imidazole, 1% Triton X-100, β -mercaptoethanol, 1mM PMSF) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสและตะกอนที่ได้เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วย SDS-PAGE

6.5 การละลาย Inclusion bodies (Du *et al.*, 2006)

นำตะกอน inclusion bodies มาล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วปั่นแยกตะกอน ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง ตามด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 M urea) แล้วปั่นแยกตะกอน ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง และสารละลายบัฟเฟอร์ C (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM DTT, 8 ML urea) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายแต่ละส่วนไปตรวจสอบขนาดด้วย SDS-PAGE

6.6 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Western Blotting

หลังจากแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตัดแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสที่มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล SDS-PAGE แช่ในน้ำกลั่น และตัดกระดาษกรองประมาณ 8 แผ่น แช่ในสารละลาย Towbin พร้อมกับแผ่นเจล SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรนด้วยเครื่อง Transfer blotting โดยวางกระดาษกรองด้านล่าง 4 แผ่น ตามด้วยแผ่นเมมเบรน แผ่นเจล และปิดทับด้วยกระดาษกรองด้านบน 4 แผ่น ตามลำดับ ใช้กระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้บัฟเฟอร์ Towbin จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาทำตามขั้นตอนของ SuperSignal[®] West HisProbe[™] Kit (Thermoscientific, USA) โดยการ Block ด้วยสารละลาย BSA/TBST ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยสารละลาย TBST อีก 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในแอนติบอดี HisProbe[™]-HRP ที่เจือจางด้วยสารละลาย TBST ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าตามแนวนอน จากนั้นล้างด้วยสารละลาย TBST อีก 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที บ่มใน SuperSignal[®] West Pico Substrate Working Solution เป็นเวลา 5 นาที แล้วเททิ้ง นำแผ่นเมมเบรนมาปิดทับด้วย Wrab แล้วนำไปประกบด้วยแผ่นฟิล์มในห้องมืด ล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย developer ประมาณ 20 วินาที และสารละลาย fixer ประมาณ 20 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ตามลำดับ ตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่เกิดขึ้นบนแผ่นฟิล์ม

6.7 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี FPLC

นำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาชะลงในคอลัมน์ HisTrap (GE Healthcare) ที่เชื่อมต่ออยู่กับเครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography แล้วล้างคอลัมน์ด้วย Washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 30 mM Imidazole) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วชะโปรตีนที่จับคอลัมน์ด้วย elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazole) เก็บโปรตีนที่ถูกชะออกมาหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

7. การแสดงออกรีคอมบิแนนท์ C-type lectin ในยีสต์

เนื่องจากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระบบแบคทีเรีย สามารถผลิตโปรตีนได้ในระดับต่ำ จึงไม่มีโปรตีนเลคตินเพียงพอเพื่อใช้ในการหาสมบัติต่างๆ ได้ จึงได้ทดลองผลิตโปรตีนเลคตินในระบบยีสต์

7.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด Pmlectin

ทำการเพิ่มปริมาณยีน C-type lectin ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีส่วนของบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อสามารถนำไปตัดและส่งชิ้นส่วนยีนที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pPICZaBNH8-NEW

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน C-type lectin เพื่อนำยีนเข้าสู่เซลล์ยีสต์ (ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ อักษรตัวหนา คือ stop codon)

ไพรเมอร์	ลำดับ (5' → 3')	ขนาดที่คาดหมาย (bp)
FyLec_EcoRI	5'-AGGAATTCTGCAACTACAGAGGAATTGC-3'	611
RLec_NotI	5'-ATGCGGCCGCTCTGCATTAGACCATGACTGC-3'	

นำผลผลิต PCR ที่ทำบริสุทธิ์และเวกเตอร์ pPICZaBNH8-NEW มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำผลที่ได้ไปตรวจสอบในอเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น ตัดชิ้นดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ และนำมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ไลเกส โดยบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้รีคอมบิแนนท์ pPICZa-lectin นำเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี Heat shock จากนั้นคัดเลือกบนอาหาร LB agar ที่มี Zeocin ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

7.2 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วย 2 วิธี คือ 1) การทำ colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ข้างต้น จากนั้นตรวจสอบผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น 2) ทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยตัดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* นำผลที่ได้ไปตรวจสอบในอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น ย้อมด้วย Ethidium bromide และตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation

7.3 การตัด pPICZa-lectin ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI*

นำพลาสมิด pPICZa-lectin ที่ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เรียบร้อยแล้วมาตัดให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยเอนไซม์ *SacI* โดยบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น แล้วนำมาย้อมด้วย Ethidium bromide คัดเลือกโคลนที่ถูกตัดอย่างสมบูรณ์นำไปใช้ในการส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ยีสต์

7.4 การชักนำ linearized pPICZa-lectin เข้าสู่เซลล์ยีสต์

เริ่มต้นจากการเตรียมเซลล์ยีสต์ในรูป competent cell (Higgins *et. al.*, 1998) โดยนำโคโลนีเดี่ยวของเซลล์ยีสต์ *Pichia Pastoris* สายพันธุ์ Y11430 มาเลี้ยงในอาหาร YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เช้าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ใส่ลงไปในอาหาร YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเช้าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.3 – 1.5 (ประมาณ 6 ชั่วโมง) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายเซลล์ใน YPD/0.02 M HEPES ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DTT เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเช้าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เย็น 100 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เย็น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย sorbital เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม sorbital เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดๆ ละ 40 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ โดยนำ linearized pPICZa-lectin เข้าสู่เซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Electroporation และคัดเลือกในอาหาร YPDS agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1M sorbital, 2% agar) ที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 3 ถึง 5 วัน

7.5 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris*

7.5.1 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* โดย Colony PCR

ทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ซึ่งดัดแปลงตามวิธี Oliveira *et al*, 2008 โดยใช้ สุ่มเลือกโคโลนีบนอาหาร YPDS agar (ประมาณ 10 – 20 โคโลนี) แล้วจุ่มในหลอด PCR ซึ่งภายในหลอดมี น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 9 ไมโครลิตร นำหลอด PCR ดังกล่าว เข้าเครื่อง Microwave ที่มีกำลังไฟฟ้า 900 วัตต์ เป็นเวลา 45 วินาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นเตรียม master mix ของปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบวุ้น ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

7.5.2 การตรวจสอบ genomic DNA ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* โดย PCR

สกัด Genomic DNA ของยีสต์ (ดัดแปลงตามวิธี Harju *et al*, 2004) โดยนำโคโลนีบนอาหาร แข็ง YPDS agar มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD broth ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 100 ug/ ml Zeocin เขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเซลล์ลงในหลอด microcentrifuge นำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ ปราศจากเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ดูด ส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนด้วย lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย CHCl₃:isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย CHCl₃:isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้งเพื่อให้ Genomic DNA มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม Isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตรเท่าตัว กลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15-20 นาที ดูดส่วนใสทิ้งและเก็บ ตะกอนของดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออกให้หมด แล้วทำให้ตะกอนแห้ง จากนั้นนำมา ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อประมาณ 20-50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ FyLec_*EcoRI* และ RLec_*NoI*

7.6 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีบนอาหารแข็ง YPDS agar มาเลี้ยงในอาหาร BMGY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotin, 1% glycerol) ที่มียา

ปฏิชีวนะ zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนในน้ำกลั่นประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ในอาหาร BMMY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34 % YNB, 4×10^{-5} % biotin, 0.5 % methanol) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยการเติมเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน ในแต่ละวัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบและหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน สำหรับตัวอย่างที่เก็บได้ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที ดูดส่วนใสถ่ายใส่หลอดใหม่ นำส่วนใสและตะกอนเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์และตรวจสอบด้วย SDS-PAGE

ผลการทดลอง

1. การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Full-length cDNA) ของยีน novel c-type lectin

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากห้องสมุด cDNA ของเนื้อเยื่อต่างๆ ของกิ้งกูดาคาจากห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยาและจีโนมกิ้ง พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน C-type lectins ด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจสอบขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลการทดลองพบว่าได้ที่ยีนมีขนาดประมาณ 650 คู่เบส เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy และส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast พบว่าเป็นยีน C-type lectin โดยมี open reading frame (ORF) ขนาด 657 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วย 218 กรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม SignalP พบว่าโปรตีนนี้มี signal peptide อยู่ทางด้านปลายกรดอะมิโนความยาว 24 กรดอะมิโน และเมื่อวิเคราะห์โปรตีน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลและมีค่า pI เท่ากับ 23,980 ดาลตัน และ 4.60 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ด้วย ScanProsite พบว่า C-type lectin นี้มี carbohydrate recognition domain (CRD) จำนวน 1 โดเมน (E-value = $1.18e^{-12}$) และมีตำแหน่งซิสเทอีนอนุรักษ์ (conserved cysteines) 4 ตำแหน่ง คือ Cys⁵⁸, Cys¹²⁶, Cys¹⁴¹ และ Cys¹⁴⁹ ซึ่งสามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ภายในโครงสร้างได้ (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ไม่มีบริเวณจำเพาะ (motif) ที่เกี่ยวข้องกับการจับกับน้ำตาล ที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ เช่น EPN (Glu-Pro-Asn) หรือ QPD (Gln-Pro-Asp) ที่สามารถจับกับน้ำตาลแมนโนส (mannose) หรือกาแลคโตส (galactose) ได้ตามลำดับ (Wang *et al.*, 2009)

จากการจำลองโครงสร้างโปรตีน C-type lectin ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL โดยใช้โปรตีน Ca²⁺-independent type II antifreeze (PDB accession code 2zibA) เป็นต้นแบบ พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ C-type lectin ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 3–129 มีความเหมือนกับโปรตีนต้นแบบ ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) เท่ากับ 28 % (E-value = $2.60e^{-12}$) และเมื่อสร้างภาพจำลองโครงสร้างด้วยโปรแกรม PyMOL (ภาพที่ 2) พบว่าโครงสร้างที่จำลองขึ้นมีการจำลองพันธะไดซัลไฟด์จำนวน 1 คู่ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่าง Cys⁵⁸ และ Cys¹⁴⁹ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สอดคล้องกับการทำนายด้วยโปรแกรม ScanProsite

A

```

1  M T S L T T S L L F T A A Y L V L V P S
1  ATGACCTCGTTGACAACAAGTCTTTTATTCACCGCTGCTTATCTGGTCTTGGTGCCGAGC
21  L A V S Q L Q R N C P D N Y V L L A D K
61  CTTGCGGTCTCACAACCTACAGAGGAATTGCCAGACAACATATGTGCTCTTGGCTGACAAA
41  C Y G F R R T V T D W N N A R A T C L N
121 TGCTATGGCTTCGGGCGCACAGTGACAGACTGGAATAACGCCCGTGCAACTTGTCTGAAC
61  E N A D L T S V L T T Q E Y T E I L A H
181 GAGAATGTGACCTGACCTCCGTTCTCAGACTCAAGAGTACACGGAGATTCTGGCGCAT
81  L A A N Y P G V Y W V G G A T S N Q G A
241 CTGGCTGCTAACTACCCCGCGGTGTACTGGGTTGGAGGCGCCACGAGTAACCGGGCGCG
101 W R W V A S G A P M N E Q W W G G D H T
301 TGGAGGTGGGTGGCTTCGGGCGCGCCCATGAATGAGCAGTGGTGGGCGGCGACCAACC
121 P T S Q R C A Y F C S H T R K Y W S S T
361 CCCACTTCACAACGCTGCGCCTACTTCTGCTCCCATACTCGCAATACTGGAGCAGACACA
141 C G V S K N F I C E K S A E T E A E S G
421 TGGCGGGTGTCCAAGAACTTCATCTGCGAAAAAGTGCGGAGACCGAAGCCGAATCAGGA
161 E E F E P E G D T D P E N E S D E S D A
481 GAAGAATTGAACAGAGGGGACACCGATCCGGAATAATCGGACGAATCGGACGCT
181 E R I P S L P S V R A E L R S G V S S T
541 GAGAGGATACCTTCCCTTCCCTCTGTAAGGGCGGAGCTGCGGTCTGGAGTTTCGTCCACC
201 T R N M A C L V F L L S F C A V M V -
601 ACACGAAACATGGCTGTCTCGTTTTTCTGTTGAGTTTTTGTGAGTCATGGTCTAA

```

B

```

PMlectin1      MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMQLQRNCPDNYVLLADKCYGFRRTVTDWNNARATCLNENA 60
22IB_A|PDBID   -----HHHHHHAL-----VCPAGWTLHGQRCFYSEATAMTDLAENGVNKGG 43
sp|Q7TN88|33-152 -----FRDACEFVPLEHTFPGAQGWCEGHGG 27
                  : * : : * . . . .

PMlectin1      DLTSVLTQYETIELAHLAANYPGVYWVG-ATSNQ-----GANRWVASGAPMNEQWGG 114
22IB_A|PDBID   HLASIHSLLEQLYIKDIVAG----IVWIGGSACKVA-----GANSWIDGTPVDYRIWCPT 94
sp|Q7TN88|33-152 HLAFIGDEDTQQLQRHITQD--REWWIGLTGGSGHNGTVGGSGTWLDTSNVNYSNWQEG 85
                  . * : : : : : * . . . .

PMlectin1      -DHTPTSQRCAYFCSHIRKYWSST--GVSKNFICEKSAETEAESEGEFEPEGDTDPENE 171
22IB_A|PDBID   KPNIDILSDCMQMTAAVDKWDLDL-CPASHASTCAKAAI----- 133
sp|Q7TN88|33-152 -QATPAPGSGGYIGSGPSSQWAALEDITQTFAFVCE----- 120
                  . * : : . * * : : *

PMlectin1      SDEADAERIPSLPSVRAELRSGVSSSTQNMACLVFLLSFCAMV 215
22IB_A|PDBID   -----
sp|Q7TN88|33-152 -----

```

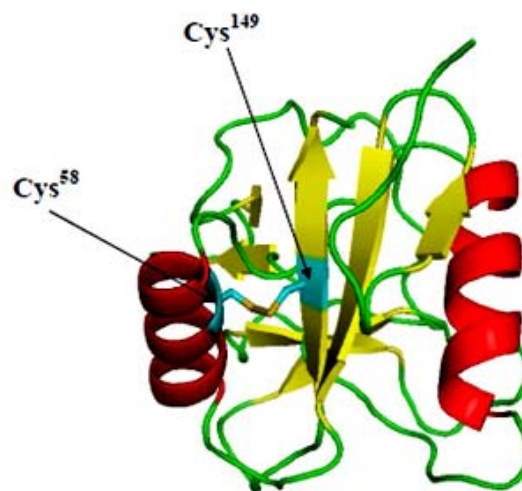
ภาพที่ 1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C-type lectin หรือ PMlectin1

- (A) ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ C-type lectin โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้ แสดง signal peptide ส่วนตัวเลขแสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน
- (B) การเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโน (Alignment) ระหว่าง C-type lectin (PMlectin1) Ca^{2+} -independent type II antifreeze (22IB_A|PDBID) และ sperm receptor for egg jelly C-type lectin1 (sp|Q7TN88|33-152) ตำแหน่งซีสเตอีนอนุรักษ์ (conserved cysteines) แสดงด้วยแถบสีเทาซึ่งสามารถสร้าง พันธะไดซัลไฟด์ได้ 2 พันธะ

A

TARGET	3	QRNCP	DNYVLLADKC	YGFRRTVIDW	NNARATCLNE	NADLTSVLTT
2zibA	4	hhh--alvcp	agwtihgqrc	fyseatamtw	dlaeancvkn	gghlasihsl
TARGET			sss sss ssss		h hhhhhhhhhh	sss h
2zibA			sss sss ssss		h hhhhhhhhhh	sss h
TARGET	48	QEYTEILAH	LAANYPGVY	WVGAT-SNO	GAWRWVAG	APMNEQW
2zibA	52	eeqlyikdiv	a----givwi	qgsackvaga	wsu--tdgtpv	dyrtwcpktp
TARGET		hhhhhhhhh		sss ssss		sss
2zibA		hhhhhhhhh		sss ssss		ss s
TARGET	97	PTS--QRCAY	FCSHTPKYWS	STCG-VSKNF	ICEKSA	
2zibA	97	ndilsdcmq	mtaavdkcud	dlpcpashas	icakaal	
TARGET			ssss ssss sssss ss		s sssssss	
2zibA			ssss ssss sssss ss		s sssssss	

B

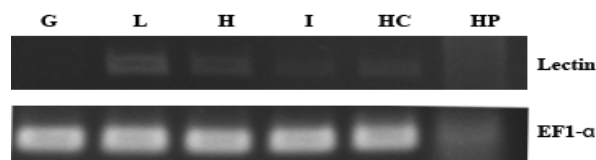


ภาพที่ 2 แบบจำลองโครงสร้างโปรตีนของ C-type lectin หรือ PMlectin1

- (ก) Sequence alignment ระหว่าง PMlectin1 และ โปรตีนต้นแบบ คือ โปรตีน Ca^{2+} -independent type II antifreeze โดยที่ 's' คือ strand region และ 'h' คือ helical region
- (ข) Ribbon diagram ของ PMlectin1 เส้นที่ขดไปมาแสดงโครงสร้าง Alpha helices แผ่นภาพหัวลูกศรแสดง Beta strand ลูกศรชี้แสดง Disulfide-bonded cysteine ที่ตำแหน่ง Cys⁵⁸ และ Cys¹⁴⁹

2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR

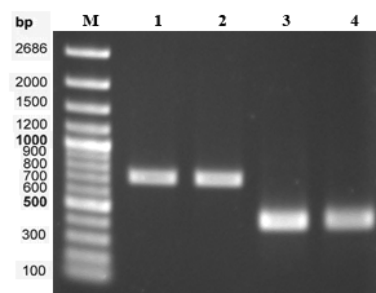
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน C-type lectin ในเหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้ เม็ดเลือดและตับของกิ้งกูดำปกติด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้การแสดงออกของยีน elongation factor-1 alpha (EF1- α) เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า ยีน C-type lectin มีการแสดงออกใน ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้และเม็ดเลือดในระดับต่ำ ซึ่งไม่พบการแสดงออกของยีนในเหงือกและตับ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน C-type lectin ของกิ้งกูดำในเนื้อเยื่อต่างๆ (G: เหงือก L: ต่อม น้ำเหลือง H: หัวใจ I: ลำไส้ HC: เม็ดเลือด และ HP: ตับ) เทียบกับยีน EF1- α ด้วยเทคนิค RT-PCR

3. ศึกษาผลการ knockdown ยีน C-type lectin ต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

จากการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน C-type lectin และ GFP (control) ด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อผลิตสายดีเอ็นเอต้นแบบที่มีส่วนของ T7 promoter เพื่อใช้ในการสร้าง ssRNA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แสดงดังรูปที่ 4 เมื่อนำไปตรวจสอบความเข้มข้น พบว่า GFP-sense GFP-anti-sense Lectin-sense และ Lectin-anti-sense มีค่าเท่ากับ 34.6 37.4 61.2 และ 39.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

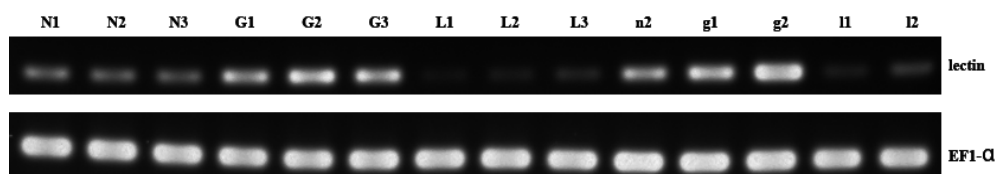


ภาพที่ 4 ผลการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง ssRNA โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน แถวที่ 1 และ 2 คือ GFP ที่มี T7 promoter สำหรับสร้าง sense และ anti-sense ตามลำดับ แถวที่ 3 และ 4 คือ C-type lectin ที่มี T7 promoter สำหรับสร้าง sense และ anti-sense ตามลำดับ

เมื่อทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอดังกล่าว และนำมาใช้ในการสร้าง ssRNA ด้วย T7 Ribomax จากนั้นตรวจสอบ ssRNA ที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิสและหาปริมาณด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และใช้ปริมาณ ssRNA ที่เท่ากันของ sense และ anti-sense มาผสมกันเพื่อสร้าง dsRNA ผลการทดลองพบว่า ความ

เข้มข้น dsRNA ของ C-type lectin และ GFP มีค่าเท่ากับ 4.774 และ 4.707 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

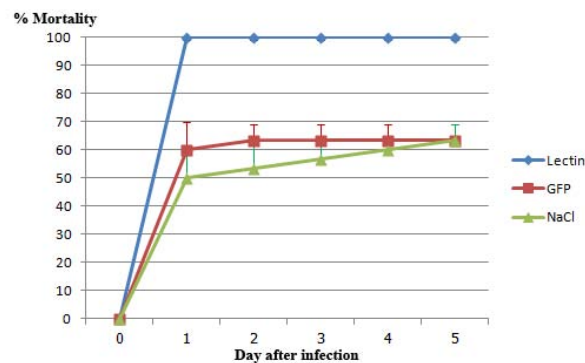
จากนั้นแบ่งตัวอย่างกุ้งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ฉีดกุ้งด้วย C-type lectin dsRNA (L และ l) กลุ่มที่ 2 ฉีดด้วย GFP dsRNA (G และ g) โดยใช้ dsRNA ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม และกลุ่มที่ 3 ฉีดด้วยไซโตเมคโครไรด์ (N และ n) เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม จากนั้นเก็บเม็ดเลือดของกุ้งที่ 2 และ 7 วัน หลังฉีดตามลำดับ เพื่อสกัด RNA และตรวจสอบแสดงออกของยีน C-type lectin ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยสกัด Total RNA ด้วย NucleoSpin1 RNAII (MACHEREY-NAGEL) แล้วนำ Total RNA ที่ได้มาสร้าง First-strand cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, USA) ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน Elongation factor 1 alpha (EF1- α) ผลการทดลองพบว่า สามารถสกัด total RNA จากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำจากทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง ด้วยความเข้มข้นระหว่าง 50-150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และใช้ปริมาณ 200 นาโนกรัม ในการสร้าง cDNA ซึ่งจะใช้เป็นต้นแบบในการตรวจสอบผลการ knockdown โดยพบว่ายีน C-type lectin มีปริมาณการแสดงออกลดลงหรืออาจเรียกว่าถูก knockdown ในกุ้งที่ฉีดด้วย dsRNA ของ C-type lectin ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งยีน C-type lectin มีการแสดงออกน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลายไซโตเมคโครไรด์และ dsRNA ของ GFP ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยการแสดงออกของยีน EF1- α ในทุกตัวอย่างมีปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณ cDNA ต้นแบบในการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 5 ผลการ knockdown ยีน C-type lectin ในเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ โดย N1 N2 และ N3 คือ กุ้งแต่ละตัวที่ฉีดด้วยสารละลายไซโตเมคโครไรด์เป็นเวลา 2 วัน แถว G1 G2 และ G3 คือ กุ้งแต่ละตัวที่ฉีดด้วย dsRNA-GFP เป็นเวลา 2 วัน แถว L1 L2 และ L3 คือ กุ้งแต่ละตัวที่ฉีดด้วย dsRNA-lectin เป็นเวลา 2 วัน ส่วน n g และ l คือหลังฉีดเป็นเวลา 7 วัน

เมื่อตรวจสอบและพบว่าสามารถทำการ knockdown ยีน C-type lectin ได้แล้ว จึงทำการทดลองผลการ knockdown ต่อการตายเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งทำการทดลองเหมือนครั้งแรกโดยแบ่งกุ้งเป็น 3 กลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายและ dsRNA ข้างต้น หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (2×10^5 CFU) ในกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม แล้วตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายหลังฉีดเชื้อเวลา 1-7 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง ผลการศึกษาอัตราการตายของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* เมื่อมี

การลดการแสดงออกของยีน C-type lectin ด้วยเทคนิค RNA interference พบว่ากุ้งที่ถูกลดการแสดงออกของยีน C-type lectin มีอัตราการตายที่สูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 6) โดยกุ้งที่ฉีดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์และ dsRNA ของ GFP มีอัตราการตายประมาณ 60% ในวันที่ 1 หลังการฉีดเชื้อแบคทีเรีย และมีอัตราการตายที่ค่อนข้างคงที่ จนกระทั่งตายเกือบ 100% ในวันที่ 8 หลังการฉีดเชื้อ (ไม่ได้แสดงในรูปแบบที่ 6) ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย dsRNA ของ C-type lectin มีอัตราการตายที่ 100% ในวันที่ 1 นั้นอาจกล่าวได้ว่า C-type lectin มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

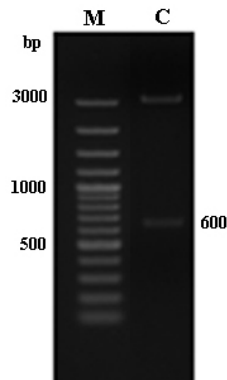


ภาพที่ 6 กราฟแสดงอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* หลังจากฉีด dsRNA ของ GFP และ C-type lectin

4. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ในระบบแบคทีเรีย

4.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ใน pET28b

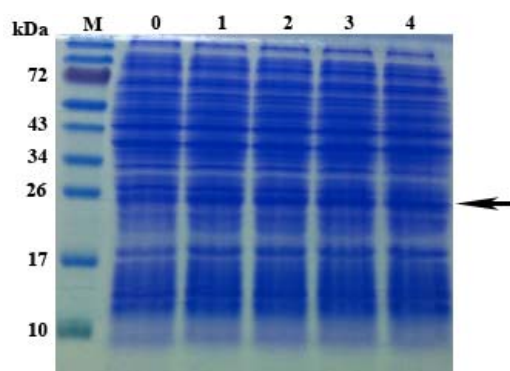
เริ่มต้นด้วยการเพิ่มปริมาณของยีน C-type lectin ที่ไม่มีส่วนของ signal sequence ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบไว้ FLecpET_NdeI และ RLecpET_EcoRI หลังจากทำปฏิกิริยาและนำมาตรวจสอบผลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp ซึ่งเป็นขนาดที่คาดไว้ จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจากเจล นำไปทำให้บริสุทธิ์และเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy และนำไป transform เพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E. coli* (JM109) และเลี้ยงบนอาหาร LB-agar plate ที่มี X-gal IPTG และ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเพื่อใช้ในการคัดเลือกโคลนที่ต้องการ จากนั้นนำโคลนที่คาดว่าน่าจะมีชิ้นส่วนของยีนแทรกอยู่มาเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิด เพื่อตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NdeI* เมื่อตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น พบว่าพลาสมิดถูกตัดอย่างสมบูรณ์ โดยมีแถบดีเอ็นเอสองแถบขนาดประมาณ 3,000 และ 600 bp ตามลำดับ ตามที่คาดไว้ (ภาพที่ 7)



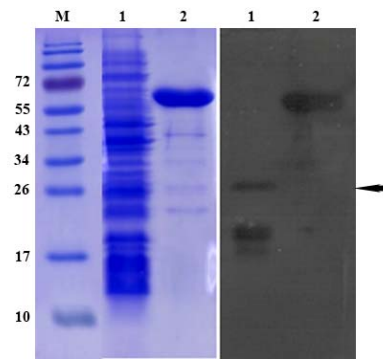
ภาพที่ 7 อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้นแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ EcoRI โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถว C คือ พลาสมิด pGEM-C-type lectin ที่ตัดด้วย EcoRI และ NdeI

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 pb มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นเชื่อมต่อเข้าไปในเวกเตอร์ pET-28b ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และนำไปถ่ายส่งเข้าไปใน *E. coli* (DH5α) ตรวจสอบโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-28b-C-type lectin ด้วยวิธี Colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ FLecpET_NdeI และ RLecpET_EcoRI และเมื่อตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น พบว่าสามารถสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-28b-C-type lectin ได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp จึงทำการคัดเลือกโคลนเพื่อนำมาเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิด เพื่อส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศเกาหลี ซึ่งพบว่ายีนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น C-type lectin และมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องต่อการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน จึงนำพลาสมิดนี้ไปใช้ในการส่งผ่านเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยเห็นย่นำการแสดงออกด้วย IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และตรวจสอบโปรตีนใน 15 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE พบแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่มีขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน (ตามที่คาดหมาย) แต่พบว่าการแสดงออกอยู่ในระดับต่ำ (low-level expression) ดังแสดงในภาพที่ 8 ซึ่งจะเห็นว่าตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมง ถึง 4 ชั่วโมง หลังการเหนี่ยวนำปริมาณของโปรตีนเป้าหมายมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี Western blot โดยใช้ Anti-His antibodies พบว่าปรากฏแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้จริง แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่าปรากฏแถบที่มีขนาดประมาณ 21 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่ต่ำกว่าโปรตีนคาดหมาย ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากการตัดของเอนไซม์โปรติเอสบางชนิด ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีขนาดเล็กลง ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป จากนั้นตรวจสอบ

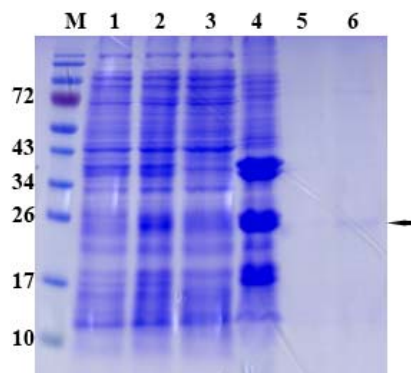
ลักษณะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ ว่าอยู่ในรูปใด จึงทำการทำให้เซลล์แตกด้วย sonication และปั่นแยกชั้น แล้วตรวจสอบผลด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนอยู่ทั้งในส่วน inclusion bodies และ soluble โดยพบมากในส่วน inclusion bodies อย่างไรก็ตามเนื่องจากการแยกบริสุทธิ์ส่วน soluble ทำได้ง่าย และไม่ต้องทำ refolding ก่อนนำไปศึกษาสมบัติ จึงนำส่วน soluble มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ HisTrap (GE Healthcare) ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC ผลการทดลองพบว่าโปรตีนถูกชะออกมาหลอดที่ 27 และ 28 จึงนำมาตรวจสอบใน SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 10) แต่เนื่องจากปริมาณโปรตีนมีน้อยมาก ทำให้เห็นเป็นแถบที่ค่อนข้างบาง สำหรับส่วน inclusion bodies นำมาล้างในบัฟเฟอร์ A และ B ตามลำดับ จากนั้นนำมาละลายในบัฟเฟอร์ C ซึ่งมียูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์ ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เมื่อตรวจสอบขนาดใน SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 11) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้นี้อยู่ในลักษณะที่เสถียรภาพ หากจะนำไปศึกษาสมบัติต้องทำให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ ก่อนจะนำไปแยกบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่อไป



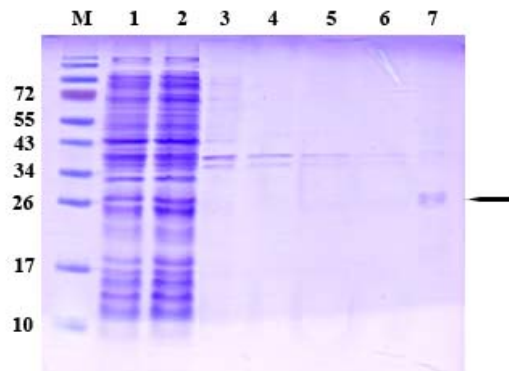
ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b หลังการชักนำด้วย IPTG ที่เวลาต่างๆ ด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE แถว M คือโปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1 คือ โปรตีนในแบคทีเรียก่อนการเหนี่ยวนำ แถวที่ 2-5 คือโปรตีนในแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง ตามลำดับ ลูกศรแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin



ภาพที่ 9 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b ด้วยเทคนิค Western Blotting โดย M คือโปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1 คือโปรตีนในแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แถวที่ 2 คือโปรตีนควบคุม (betain aldehyde dehydrogenase1 หรือ BADH1 มีขนาด 56 กิโลดาลตัน) ถูกตรึงแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin



ภาพที่ 10 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b ในส่วนสารละลายและตะกอนเซลล์ ด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1 คือโปรตีนในแบคทีเรียก่อนการเหนี่ยวนำ แถวที่ 2 คือโปรตีนในแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แถวที่ 3 คือส่วน soluble แถวที่ 4 คือ ส่วน inclusion bodies แถวที่ 5 และ 6 คือส่วน soluble ที่แยกบริสุทธิ์หลอดที่ 27 และ 28 ตามลำดับ ถูกตรึงแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin

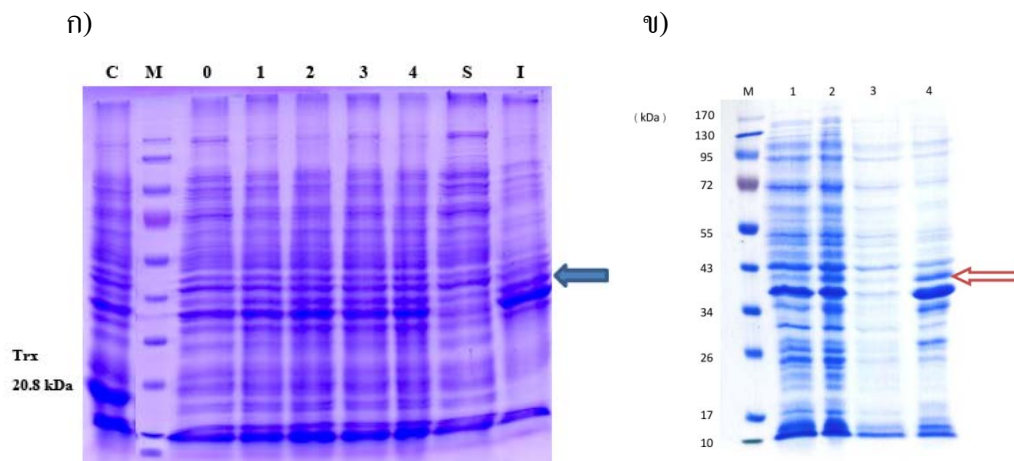


ภาพที่ 11 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET28b หลังจากทำบริสุทธิ์ ด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1 คือโปรตีนในแบคทีเรียก่อนการเหนี่ยวนำ แถวที่ 2 โปรตีนในแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แถวที่ 3 และ 4 คือโปรตีนที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ A แถวที่ 5 และ 6 คือโปรตีนที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ B และแถวที่ 7 คือ โปรตีนที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ C ซึ่งมียูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์ ลูกศรแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ขนาด 24 กิโลดาลตัน

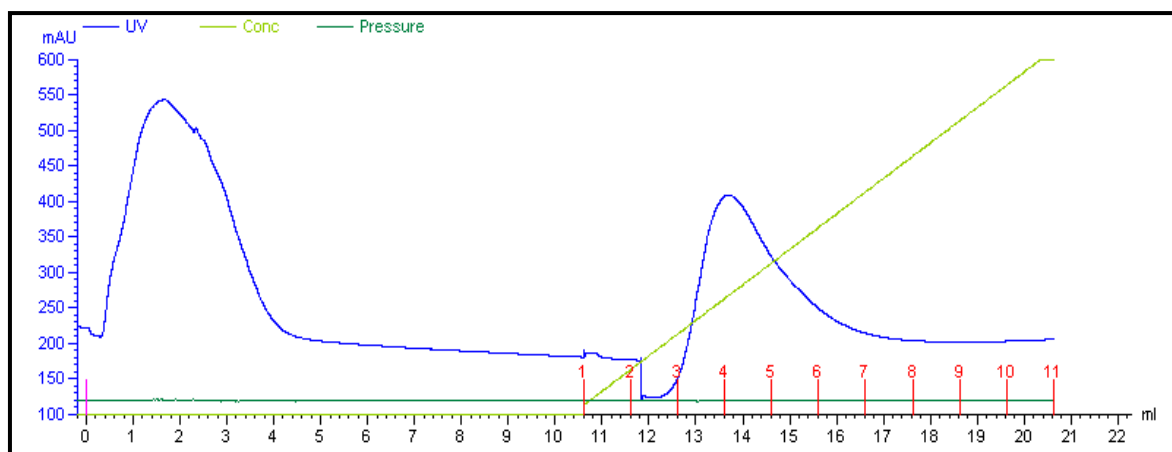
4.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ใน pET32a

เนื่องจากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยเวกเตอร์ pET28b สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณน้อยจึงไม่สามารถนำมาใช้ศึกษาสมบัติของโปรตีนได้ นอกจากนี้ยังมีลักษณะเป็นตะกอนไม่พร้อมสำหรับนำมาศึกษาสมบัติของโปรตีน จึงทดลองเปลี่ยนเวกเตอร์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน ซึ่ง pET32 เป็นเวกเตอร์ที่มีส่วนของโปรตีน Thioredoxin (Trx) ซึ่งอาจช่วยทำให้ผลิตโปรตีนได้ดีขึ้นรวมถึงอยู่ในรูปที่พร้อมสำหรับศึกษาสมบัติได้ โดยทำการทดลองการเพิ่มปริมาณของยีน C-type lectin ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ FLec_EcoRI และ RLec_NotI ตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาดประมาณ 600 bp นำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy และเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E.coli* (DH5α) คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวบน LB-agar plate ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG มาตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ FLec_EcoRI และ RLec_NotI พบว่าทั้ง 20 โคโลนีที่ตรวจสอบมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 600 คู่เบส จึงเลือกโคโลนีเหล่านั้นมาทำการสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* และตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบวุ้น พบว่าพลาสมิดถูกตัดอย่างสมบูรณ์ โดยพบแถบดีเอ็นเอสองแถบขนาด

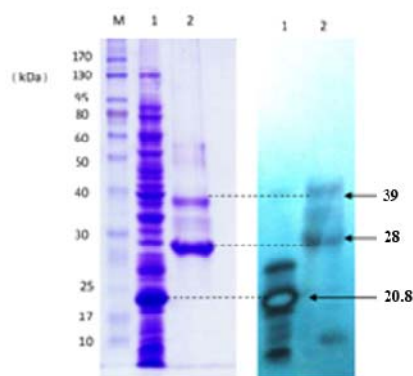
ประมาณ 3,000 และ 600 bp ตามลำดับ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดมาทำให้บริสุทธิ์แล้วเชื่อมต่อเข้าไปในเวกเตอร์ pET-32a แล้วถ่ายส่งเข้าไปใน *E. coli* (DH5α) ตรวจสอบโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-32a-lectin ด้วยวิธี colony PCR หลังตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp ตามที่คาดไว้ จึงคัดเลือกโคโลนีมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบอีกครั้งด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *NotI* พบว่ามีโคโลนีถูกตัดอย่างสมบูรณ์และพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ประมาณ 6,000 และ 600 bp ตามลำดับ จึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการตรวจสอบพบว่า ยีนที่ได้เป็นยีน C-type lectin และมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน จึงนำพลาสมิดนี้ไปใช้ในการส่งผ่านเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ต้องมีขนาดประมาณ 39 kDa และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG มีขนาดประมาณ 39 กิโลดาลตัน ตามที่คาดหมายไว้ โดยปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ยังอยู่ในระดับต่ำเช่นเดิม (low-level expression) เมื่อทำการแตกเซลล์ด้วยเทคนิค sonication และปั่นแยก พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนยังคงอยู่ในส่วน inclusion bodies (ภาพที่ 12) จึงนำส่วน inclusion bodies นำมาล้างในบัฟเฟอร์ A และ B ตามลำดับ จากนั้นนำมาละลายในบัฟเฟอร์ C ซึ่งมียูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์ และนำโปรตีนในส่วนนี้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ HisTrap (GE Healthcare) ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC พบว่าโปรตีนถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของอิมิดาโซล ที่ความเข้มข้นประมาณ 100-200 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 13) และเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค western blot พบแถบโปรตีน 2 แถบ มีขนาดประมาณ 39 กิโลดาลตัน ตามที่คาดไว้ (ภาพที่ 14) แต่อย่างไรก็ตามยังพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดเล็กกว่าที่คาดไว้ โปรตีนขนาดเล็กดังกล่าวอาจเกิดจากการตัดของเอนไซม์โปรติเอส อย่างไรก็ตามสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้นี้ยังอยู่ในลักษณะที่เสียสภาพ (denature) จำเป็นต้องนำไปทำ Refolding เพื่อให้โปรตีนกลับมาอยู่ในรูปที่ทำงานได้ก่อนนำศึกษาสมบัติโปรตีน



ภาพที่ 12 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET32a ด้วย SDS-PAGE ช่องที่ M คือโปรตีนมาตรฐาน รูป ก) แถว C คือโปรตีนในแบคทีเรียที่มี pET-32a หลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แถวที่ 0 คือโปรตีนในแบคทีเรียที่มี pET-32a-lectin ก่อนการเหนี่ยวนำด้วย IPTG แถวที่ 1-4 คือโปรตีนในแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 1-4 ชั่วโมง ตามลำดับ แถว S คือส่วน soluble และแถวที่ I คือส่วน inclusion bodies รูป ข) แถวที่ 1 คือโปรตีนในแบคทีเรียที่มี pET-32a-lectin ก่อนการเหนี่ยวนำด้วย IPTG แถวที่ 2 คือโปรตีนในแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 4 ชั่วโมง แถวที่ 3 คือส่วน soluble และแถวที่ 4 คือส่วน inclusion bodies ลูกศรแสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ขนาดประมาณ 39 กิโลดาลตัน



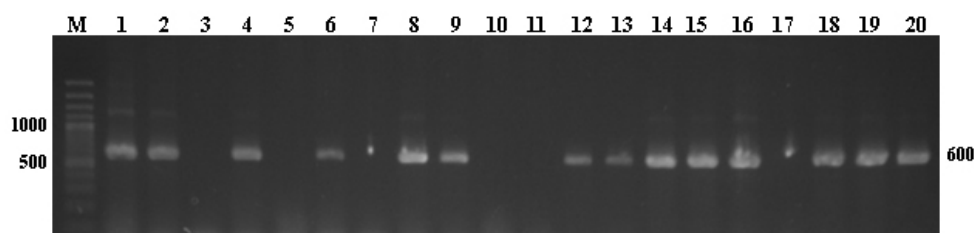
ภาพที่ 13 Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน Pmlectin1 ด้วย FPLC



ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin จาก pET-32a ด้วยเทคนิค western blotting โดย M คือโปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1 คือโปรตีนในแบคทีเรียที่มี pET-32a หลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แถวที่ 2 คือเซลล์ที่มี pET-32a-lectin และเหนี่ยวนำด้วย IPTG 4 ชั่วโมง

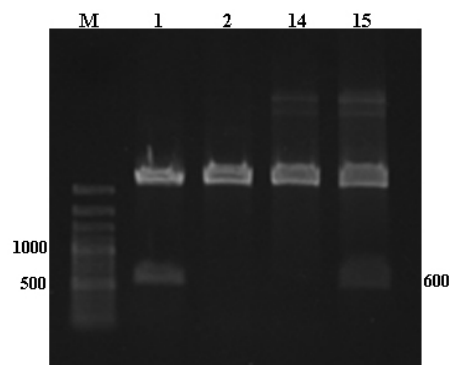
5. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน C-type lectin ในระบบยีสต์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน C-type lectin ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ FLec_EcoRI และ RLec_NotI พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาดประมาณ 600 bp เมื่อนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* เพื่อนำเข้าสู่เวกเตอร์ pPICZaBNH8-NEW ซึ่งทำการตัดด้วย *EcoRI* และ *NotI* มาก่อนหน้านั้นเช่นเดียวกัน จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และเมื่อคัดเลือกโคโลนีบน LB-agar plate ที่มี Zeocin ด้วยวิธี Colony PCR พบว่า มีโคโลนีที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp (ภาพที่ 15) ตามที่คาดหมายไว้



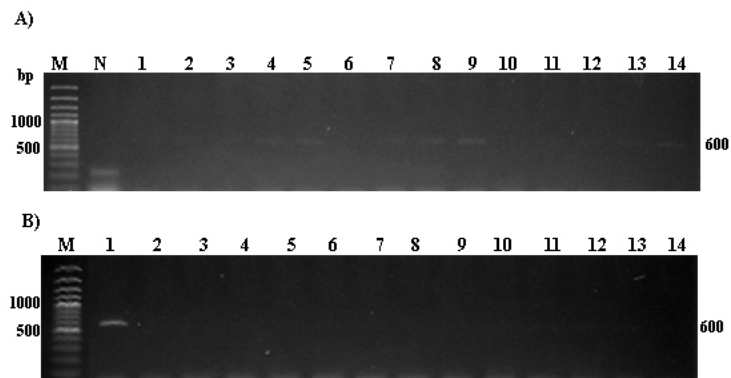
ภาพที่ 15 การตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-lectin ด้วยเทคนิค colony PCR โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แถว 1-20 คือ โคโลนีที่ 1-20

จากนั้นเลือกโคโลนีที่ 1, 2, 14 และ 15 มาสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* พบว่า โคโลนีที่ 1 และ 15 ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 16) โดยพบแถบดีเอ็นเอสองแถบขนาดประมาณ 3,000 bp และ 600 bp ตามลำดับ จึงเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคโลนีที่ 1 และ 15 มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่า พลาสมิด pPICZa-lectinC1 จากโคโลนีที่ 1 และ pPICZa-lectinC15 จากโคโลนีที่ 15 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง จึงนำทั้งสองโคลน ส่งผ่านเข้าสู่ยีสต์ *P.pastoris* สายพันธุ์ Y11430 เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

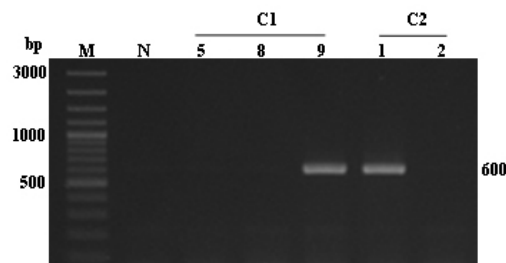


ภาพที่ 16 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZa-lectin1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp โคโลนีที่ 1, 2, 14 และ 15 แสดงดังรูป ตามลำดับ

หลังจากตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* แล้วทำการส่งถ่ายพลาสมิดเส้นตรงเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *P.pastoris* Y11430 แล้ว คัดเลือกโคลนโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะ seocine แล้วทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ด้วยวิธี colony PCR พบว่า รีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่รับการส่งถ่ายพลาสมิด pPICZa-lectinC1 เข้าไป สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp ในโคลนที่ 4 5 8 และ 9 (ภาพที่ 17 A) ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่รับพลาสมิด pPICZa-lectinC15 พบเพียงโคลนเดียวที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ คือโคลนที่ 1 (ภาพที่ 17 B) อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันว่าชั้นยีน C-type lectin สามารถสอดแทรกเข้าไปในจีโนมของยีสต์ได้ จึงเลือกโคลนที่ 5 8 และ 9 จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่รับพลาสมิด pPICZa-lectinC1 และโคลนที่ 1 และ 2 จากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่รับพลาสมิด pPICZa-lectinC15 มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วย PCR ผลการตรวจสอบพบว่า รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZa-lectinC1 โคลนที่ 9 และ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZa-lectinC15 โคลนที่ 1 สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่ได้รับ pPICZa-lectin ด้วยเทคนิค colony PCR โดย A) พลาสมิด pPICZa-lectinC1 และ B) พลาสมิด pPICZa-lectinC15 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp แถว N คือ *P. pastoris* ที่รับพลาสมิด pPICZaBNH8-NEW แถว 1 - 14 คือ โคลนที่ 1-14 ตามลำดับ



ภาพที่ 18 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ด้วยการใช้ genomic DNA ของยีสต์เป็นต้นแบบใน ปฏิกิริยา PCR โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แถว N คือ *P. pastoris* ที่รับพลาสมิด pPICZaBNH8-NEW ตัวเลข 5 7 และ 8 คือ โคลนที่ได้รับ pPICZa-lectinC1 โคลนที่ 1 และ 2 คือ โคลนที่ได้รับ pPICZa-lectinC15

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการนำชิ้นส่วนของยีน C-type lectin เข้าสู่เซลล์ยีสต์จะประสบความสำเร็จ สามารถตรวจสอบยืนยันได้ในทุกขั้นตอนของการทดลอง แต่เมื่อนำโคลนดังกล่าวมาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบว่าหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วยการเติมเอทานอล ก็ไม่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนตามต้องการได้ หลังจากการตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ไม่ปรากฏแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งในส่วนของการเลี้ยงเชื้อ และส่วนของเซลล์ยีสต์เอง ดังนั้น การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระบบของยีสต์ จึงยังไม่ประสบความสำเร็จ และไม่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อศึกษาสมบัติต่างๆ ของโปรตีนได้

อภิปรายผลการวิจัย

เลคตินเป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โปรตีนเลคตินมีความสำคัญในกระบวนการจดจำ และเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสิ่งมีชีวิต เช่น พบว่าเลคตินมีความเกี่ยวข้องกับระบบ โปรตีนออกซิดาซีเคสใน red swamp crayfish (Wang et.al. 2011) จากรายงานพบว่าโปรตีนเลคตินแบ่ง ออกเป็นหลายชนิดตามโครงสร้างและหน้าที่ โดย C-type lectin เป็นเลคตินที่มีความสามารถในการจับกับ หมู่ น้ำตาลบนโปรตีนหรือผิวเซลล์ของแบคทีเรียหรือไวรัสซึ่งมีไอออนแคลเซียมช่วยให้โครงสร้างของเล คตินมีเสถียรภาพเหมาะสมกับการจับกับหมู่ น้ำตาลที่จำเพาะ โดยบริเวณจับน้ำตาล (carbohydrate recognition domain หรือ CRD) ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 130 ตัว โดย C-type lectin อาจพบ CRD จำนวน 1-2 ชุด (Zhang et.al., 2009) และมีความเฉพาะเจาะจงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลำดับกรดอะมิโน จากผล การศึกษาพบว่า C-type lectin ของกุ้งกุลาดำนี้มี CRD จำนวน 1 ชุด ซึ่งคล้ายกับที่พบในเลคติน 2 ชนิดของ กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* โดย Wei et.al (2012) พบว่า LvLectin-1 และ LvLectin-2 ประกอบด้วย CRD 1 ชุด และยังพบบริเวณจับน้ำตาลที่จำเพาะคือ QPN และ QPD ตามลำดับอีกด้วย รวมถึงในปลาทะเลและปูที่ พบเลคตินที่มี CRD เพียง 1 ชุดเช่นกัน (Wei et.al., 2010 และ Zhang et.al., 2011) แต่แตกต่างจาก C-type lectin ในกุ้งก้ามกรามทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมี CRD จำนวน 2 ชุด โดยแต่ละชุดพบบริเวณจดจำน้ำตาลที่จำเพาะ แตกต่างกัน (Ren et.al., 2012) รวมถึง C-type lectin ในกุ้งขาวด้วย (Costa et.al. 2011) จากรายงานพบว่า บริเวณจำน้ำตาลที่จำเพาะมักจะเป็นกรดอะมิโน 3 ตัว เช่น EPN EPG EPT EPA EPD QPD QPN QPE QPT NPR และ KPN โดยมีลักษณะสำคัญคือมีกรดอะมิโนประจุลบหรือมีขั้ว กรดอะมิโนโพรลีน และ กรดอะมิโนมีขั้ว ซึ่งลักษณะดังกล่าวไม่พบใน C-type lectin ของกุ้งกุลาดำที่ศึกษาในครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตามยัง พบบริเวณอนุรักษ์ซิสเตอีนต่างๆ นั้นแสดงให้เห็นว่า C-type lectin นี้ น่าจะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับที่เคย มีรายงานมาแล้ว แต่น้ำตาลที่จำเพาะยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปด้วยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนแล้ว นำมาศึกษาสมบัติต่างๆ รวมถึงสมบัติการตอบสนองต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วย และเมื่อศึกษาการ แสดงออกของยีน C-type lectin ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งกุลาดำปกติ พบว่ามีการแสดงออกในปริมาณ ก่อนข้างน้อยทั้งใน ต่อม้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้ และเม็ดเลือด โดยไม่พบการแสดงออกในตับ ซึ่งเป็นไปได้ว่า อาจมีการแสดงออกในตับของกุ้งกุลาดำเช่นกัน แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในครั้งนี้ อาจเกิดจากคุณภาพของ อาร์เอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากตับมีคุณภาพต่ำโดยสังเกตได้จากปริมาณของยีนควบคุมที่มีลักษณะแตกต่าง จากอวัยวะอื่นๆ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากตับเป็นแหล่งรวมของเอนไซม์สำคัญต่างๆ และมีขนาดใหญ่ ทำให้สกัด อาร์เอ็นเอได้ปริมาณน้อยและมีคุณภาพต่ำนั่นเอง โดยทั่วไปแล้วเลคตินมีการแสดงออกในอวัยวะต่างๆ ได้ เช่นกัน ซึ่งอาจพบการแสดงออกในตับของกุ้งและสัตว์ทะเลหลายชนิด (Zhang et.al. 2009, Wang et.al., 2011, Zhang et.al., 2011, Ren et.al., 2012 และ Wei et.al., 2012) โดยตับเป็นอวัยวะที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับ การตอบสนองของการติดเชื้อ ในปี ค.ศ. 2005 Pan et.al. พบว่ายีน lectin ferritin oxygenase และ chitinase ในตับของกุ้งขาว (*Penaeus japonicas*) มีการแสดงออกในกุ้งทนต่อเชื้อไวรัสมากกว่ากลุ่มที่ไม่ทน รวมถึง

พบการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction อีกด้วย การค้นพบดังกล่าวเป็นจุดเริ่มต้นเพื่อนำไปสู่การศึกษาการส่งสัญญาณภายในเซลล์เมื่อกึ่งได้รับเชื้อก่อโรคต่างๆ

ผลการศึกษาการทำให้ยีนเลคตินไม่ทำงาน (knockdown) พบว่ากึ่งที่มีการแสดงของยีนลดลงด้วยเทคนิค RNAi มีอัตราการตายสูงขึ้นเมื่อกึ่งติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* โอฮาไวอาย ทำให้กล่าวได้ว่ายีนดังกล่าวมีความสำคัญต่อกระบวนการบางอย่างที่ช่วยในการตอบสนองต่อการติดเชื้อของกึ่งได้ แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของเลคตินในกึ่งกุลาค่ายังคงต้องมีการศึกษาต่อไป โดยพยายามผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมาใช้ศึกษาสมบัติต่างๆ ซึ่งแม้ว่าขณะนี้ยังไม่สามารถผลิตโปรตีนออกมาได้เพียงพอทั้งในระบบของแบคทีเรียและยีสต์ โดยในระบบแบคทีเรียพบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณไม่มากและโปรตีนที่ได้อยู่ในรูปตะกอน (inclusion bodies) ซึ่งโครงสร้างของโปรตีนในรูปที่ผลิตได้อยู่ในสภาพการม้วนพับที่ไม่เหมาะสม ทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นไม่สามารถละลายอยู่ในสารละลายได้ จากรายงานการผลิตรีคอมบิแนนท์เลคตินในปลากรุปเปอร์ (Kassab *et.al.*, 2004) พบว่าสามารถผลิตโปรตีนได้ในระบบแบคทีเรีย ดังนั้นในการศึกษานี้จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนระบบเพื่อใช้ในการผลิตดังกล่าวทั้งการเปลี่ยนชนิดของเวกเตอร์และชนิดของเซลล์แบคทีเรีย เพื่อให้สามารถผลิตโปรตีนเลคตินได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C-type lectin ในกึ่งกุลาค่าโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่ได้จากการจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ การแสดงออกของยีนในอวัยวะต่างๆ รวมถึงผลของการลดการแสดงออกของยีนในกึ่งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ผลที่ได้จากการศึกษานี้นี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการเพิ่มความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกุลาค่า ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาและส่งเสริมอุตสาหกรรมการเลี้ยงกึ่งกุลาค่าที่ยั่งยืนต่อไป

สรุปผลการวิจัย

1. C-type lectin ของกึ่งกุลาค่ามีขนาด 218 กรดอะมิโน ประกอบด้วย 1 CRD และมีซิสเตอินอนุรักษ์ 4 ตัวเพื่อรักษาโครงสร้างของเลคติน
2. ยีน C-type lectin มีการแสดงออกระดับต่ำ ในต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้ และเม็ดเลือด ของกึ่งกุลาค่าปกติ
3. อัตราการตายของกึ่งติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* โอฮาไวอายเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระดับการแสดงออกของยีนเลคตินลดลง
4. สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์เลคตินได้ในปริมาณน้อยในระบบแบคทีเรีย จึงไม่สามารถนำมาศึกษาสมบัติของเลคตินได้

เอกสารอ้างอิง

1. Arason GJ. 1996. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrate. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 277-289.
2. Baricevic I, Vicovac L, Marinovi V and Cuperlovic M. 2002. Investigation of asialoglycoprotein receptor glycosylation by lectin affinity methods. *J Serb Chem Soc.* 67(5):331-338.
3. Chen SN. 1991. Environmental problems of aquaculture in Asia and their solutions. *Rev Sci Technol.* 10: 609-627.
4. Coombs PJ, Taylor ME and Drickame K. 2006. Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling. *Glycobiol.* 16(8): 1C-7C.
5. Costa FHF, Valença NSMS, Silva ARBP, Bezerra GA, Cavada BS and Rádis-Baptista G. 2011. Cloning and molecular modeling of *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) C-type lectin homologs with mutated mannose binding domain-2. *Gene Molecul Research* 10 (2): 650-664.
6. Dalton SR, Wiegert RL, Baldwin CR, Kessel KM and Casey CA. 2003. Impaired receptor-mediated endocytosis by the asialoglycoprotein receptor in ethanol-fed mice: implications for studying the role of this receptor in alcoholic apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 65: 535-543.
7. Drickamer K. 1993. Evolution of Ca^{2+} -dependent animal lectins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 45: 207-232.
8. Du XJ, Wang JX, Liu N, Zhao XF, Li FH and Xiang JH. 2006. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol. Immunol.* 43:1633-1644.
9. Flegel T. 1997. Special topic review: Major viral diseases of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Micro Biotech.* 13:433-442.
10. Goldstein IJ and Poretz RD. 1986 The lectins: properties, function and application in biology and medicine. *Academic Press Inc.*, p. 22-247.
11. Hasson KW, Lightner DV, Poulos BT, Redman RM, White BL, Brock JA and Bonami JR. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*, demonstration of a viral etiology *Dis Aqua Organ.* 23: 115-126.
12. Harju S, Fedosyuk H and Peterson KR. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol.* 4:8.; PMID: 15102338.
13. Higgins DR and Cregg JM (eds). 1998. Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols. Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey.

14. Kassab BH, de Carvalho DD, Oliveira MA, Baptista GR, Pereira GAG and Novello JC. 2004. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the Bothrops jararacussu snake venom. *Prot. Expr. Purif.* 35: 344–352.
15. Koizumi N, Imamura M, Kadotani T, Yaoi K, Iwahana H and Sato R. 1999. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Let.* 443: 139–43.
16. Kroll RM, Hawkins WE and Overstreet RM. 1991. Rickettsial and mollicute infection in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J Invert Pathol.* 57: 3622-3660.
17. Lightner DV. 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. In J. P. McVey (ed.), Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture, p. 289-320. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
18. Liu YC, Li FH, Dong B, Wang B, Luan W, Zhang XJ, Zhang LS and Xiang JH. 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol.* 44: 598-607.
19. Luo T, Li F, Lei K and Xu X. 2007. Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Penaeus monodon*. *Mol Immunol.* 44: 1516–1523.
20. Mohny LL and Lightner DV. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (*Crustacea Decapoda*) *J World Aqua Soc.* 25.
21. Nabatov AA, de Jong MAWP, de Witte L, Bulgheresi S and Geijtenbeek TBH. 2008. C-type lectin mermaid inhibits dendritic cell mediated HIV-1 transmission to CD4+ T cells. *Virology*. 378(2): 323-328.
22. Pan D, He N, Yang Z, Liu H and Xu X. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* 29(2): 103-112.
23. Ratanapo S and Chulavatnatol M. 1990. Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp Biochem Physiol.* 97B: 515-526.
24. Ratanapo S and Chulavatnatol M. 1992. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp Biochem Physiol.* 102B: 855-859.

25. Ren Q, Li M, Du J, Zhang CY and Wang W. 2012. Immune response of four dual-CRD C-type lectins to microbial challenges in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* **Inpress**.
26. Sun YD, Fu LD, Jia YP, Du XJ, Wang Q, Wang YH, Zhao XF, Yu XQ and Wang JX. 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol. Immunol.* 45: 348-361.
27. Sung HH, Hsu SF, Chen CK, Ting YY and Chao WL. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon*/and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aqual.* 192: 101-110.
28. Wang XW, Zhang XW, Xu WT, Zhao XF and Wang JX. 2009. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* *in vivo* in Chinese white shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 1039-1047.
29. Wang XW, Zhang HW, Li X, Zhao XF and Wang JX. 2011. Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the prophenoloxidase activating system of red swamp crayfish. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 241-247.
30. Wei J, Xu D, Zhou J, Cui H, Yan Y, Ouyang Z, Gong J, Huang Y, Huang X and Qin Q. 2010. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a C-type lectin (Ec-CTL) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* *Fish Shellfish Immunol.* 28: 178-186.
31. Wei X, Liu X, Yang J, Fang J, Qiao H, Zhang Y and Yang J. 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish Shellfish Immunol.* 32: 132-140.
32. Weis WI, Taylor ME and Drickamer K. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* 163: 19-34.
33. Wongpanya R, Aoki T, Hirono I, Yasuike M and Tassanakajon A. 2007. Analysis of gene expression in haemocytes of shrimp *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus by cDNA microarray. *ScienceAsia.* 33 (2): 165-174.
34. Zelensky AN and Gready JE. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272: 6179-217.
35. Zhang H, Chen L, Qin J, Zhao D, Wu P, Qin C, Yu N and Li E. 2011. Molecular cloning, characterization and expression of a C-type lectin cDNA in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 31: 358-363.

36. Zhang H, Wang H, Wang L, Song X, Zhao J, Qiu L, Li L, Cong M and Song L. 2009. A novel C-type lectin (Cflec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate-recognition domains. *Fish Shellfish Immunol.* 26: 707-715.
37. Zhang XW, Xu WT, Wang XW, Mu Y, Zhao XF, Yu XQ and Wang JX. 2009. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Mol. Immunol.* 46:1626–1637.
38. Zhu L, Song L, Xu W and Qian PY. 2008. Identification of a C-type lectin from the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mol Biol Rep.* Doi 10.1007/s11033-008-9293-5.
39. ประภาพร อุทาร์พันธุ์ และ นิษา ไพจิตร. 2544. สมบัติของเลคตินจากฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 37 น.

Output ที่ได้จากโครงการ

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยพื้นฐานที่มีประโยชน์ในเชิงวิชาการเพื่อให้เข้าใจถึงลักษณะสมบัติของโปรตีนเลคตินที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ หากมีความรู้ ความเข้าใจพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับระบบการตอบสนองของกุ้งกุลาดำต่อการติดเชื้อก่อโรคต่างๆ แล้ว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ของรูปธรรมเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ให้เกิดอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ยั่งยืน และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ของการพัฒนาสายพันธุ์กุ้งกุลาดำเพื่อให้ทนทานต่อโรค ทำให้ลดปริมาณการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งเป็นอันตรายทั้งต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ความรู้ที่ได้สามารถนำไปปรับใช้พัฒนาสัตว์เศรษฐกิจอื่นๆ ได้ และสิ่งที่สำคัญที่สุดของประโยชน์จากโครงการวิจัยในครั้งนี้ คือได้ฝึกฝนและสร้างบุคลากรซึ่งเป็นอาจารย์รุ่นใหม่ ให้มีศักยภาพพร้อมจะทำงานวิจัยที่ตนเองมีความถนัดในลักษณะที่พึ่งพาตนเอง รวมทั้งสามารถสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับนักวิจัยและนักวิชาการอื่นๆ ได้

ผลงานตีพิมพ์ที่คาดว่าจะได้จากโครงการ

ผู้วิจัยคาดว่าจะนำเสนอบทความเรื่อง Molecular cloning and characterization of a C-type lectin in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* ในวารสาร Fish & Shellfish Immunology ซึ่งมีค่า impact factor (2010) เท่ากับ 3.044 โดยขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อตีพิมพ์บทความ