บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5280119

ชื่อโครงการ การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในกุ้งกุลาดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Vibrio harveyi*

ชื่อนักวิจัย ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : kunlaya.s@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 16 มีนาคม 2552 – 15 มีนาคม 2554

งานวิจัยนี้ นำเทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์มาใช้ค้นหาและศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยใช้ เทคนิค 2-dimensional gel electrophoresis (2DGE) และ mass spectrometry จากผลการทดลองพบโปรตีนหลายชนิดที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อเชื้อ *V. harveyi* เช่น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ hemocyanin prophenoloxidase prophenoloxidase 2 serine proteinase-like protein heat shock protein 90 และ alpha-2-macroglobulin (A2M) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ calmodulin calreticulin และ 14-3-3 protein โปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์พลังงานในเซลล์ ได้แก่ arginine kinase และ ATP synthase beta subunit จากข้อมูลที่ได้จึงคัดเลือกโปรตีน ATP synthase beta subunit ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ โปรตีน A2M ซึ่งมีการแสดงออกลดลงในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาศึกษาความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มเติม โดยพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* ในกุ้งมีผลทำให้อัตราการตายของกุ้งสูงถึง 73.33% และกุ้งดังกล่าวมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วย แสดงว่าโปรตีน ATP synthase beta subunit มีความสำคัญต่อกุ้งทั้งในสภาวะปกติและในสภาวะที่กุ้งติดเชื้อ สำหรับโปรตีน A2M ได้ค้นหาโปรตีนของกุ้งกุลาดำที่เกิดอันตรปฏิกิริยากับ receptor binding domain ของโปรตีน A2M โดยใช้เทคนิค yeast two-hybrid assay พบว่า receptor binding domain ของโปรตีน A2M เกิดอันตรปฏิกิริยากับปลาย C –ของ transglutaminase type II และเนื่องจากโปรตีน transglutaminase type II เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือดจึงคาดว่าโปรตีน A2M น่าจะทำงานร่วมกับโปรตีน transglutaminase type II ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดเพื่อช่วยกำจัดเชื้อจุลชีพที่อยู่ในระบบไหลเวียนเลือดของกุ้ง

คำหลัก : โปรติโอมิกส์; กุ้งกุลาดำ; *Vibrio harveyi*; ATP synthase beta subunit; alpha-2-macroglobulin

Abstract

Project Code : MRG5280119

Project Title : Identification and functional characterization of the *Penaeus monodon* protein involving in *Vibrio harveyi* infection

Investigator : Dr. Kunlaya Somboonwiwat Chulalongkorn University

E-mail Address : kunlaya.s@chula.ac.th

Project Period : 16 March 2009 – 15 March 2011

Proteomic approaches such as 2-dimensional electrophoresis (2DGE) and mass spectrometry were used to identify the *Vibrio haveyi*-responsive proteins in the hemocytes and lymphoid organs of *Penaeus monodon*. The differentially expressed proteins identified were that involved in the host defense responses, such as hemocyanin, prophenoloxidase, prophenoloxidase 2, serine proteinase-like protein, heat shock protein 90 and alpha-2-macroglobulin (A2M); those involved in signal transduction, such as the calmodulin, calreticulin and 14-3-3 protein; and those involved in energy metabolism, such as arginine kinase and ATP synthase beta subunit. To study the involvement of the interested proteins in bacterial responses, ATP synthase beta subunit, the highly expressed protein in lymphoid organ of 6 h *V. harveyi* infected shrimp, and A2M whose expression in hemocyte was down-regulated at 24 and 48 h post *V. harveyi* infection, were chosen. Partial silencing of ATP synthase beta subunit gene revealed a high cumulative mortality of shrimps (73.3%) and the total hemocyte numbers in the surviving ATP synthase beta subunit knockdown shrimps was dramatically reduced. These revealed its prime importance in shrimp. Moreover, receptor binding domain of A2M was screened for its interacting proteins using yeast-two-hybrid assay. The C-terminus part of transglutaminase typeII, a protein mainly involved in the coagulation system, was identified as an A2M receptor binding domain-interacting protein implying that A2M might involve in the coagulation system by eradicating the invading bacteria.

Keywords : Proteomics; *Penaeus monodon*; *Vibrio haveyi*; ATP synthase beta subunit; Alpha-2-macroglobulin