



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในกิ้งกูดดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Vibrio harveyi*

โดย

ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์

มีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในกุ้งกุลาดำที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Vibrio harveyi*

ผู้วิจัย

สังกัด

ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ทัศนชาจร และ รศ.ดร. วิเชียร ริมพนิชยกิจ ที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ศ. ดร. บุญเสริม วิทย์ชำนานกุล ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และขอขอบคุณ ดร.สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวิ หน่วยวิจัยกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกุ้งเพื่อใช้ในการศึกษา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกสำหรับนายวรพจน์ ชัยกীরติศักดิ์

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5280119

ชื่อโครงการ การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในกึ่งกลูตาต้าที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Vibrio harveyi*

ชื่อนักวิจัย ดร.กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ระยะเวลาโครงการ 16 มีนาคม 2552 – 15 มีนาคม 2554

งานวิจัยนี้ นำเทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์มาใช้ค้นหาและศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลืองของกึ่งกลูตาต้าที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *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 ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในอวัยวะน้ำเหลืองของกึ่งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ โปรตีน A2M ซึ่งมีการแสดงออกลดลงในเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกลูตาต้าที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาศึกษาความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มเติม โดยพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* ในกึ่งมีผลทำให้อัตราการตายของกึ่งสูงถึง 73.33% และกึ่งดังกล่าวมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วย แสดงว่าโปรตีน ATP synthase beta subunit มีความสำคัญต่อกึ่งทั้งในสภาวะปกติและในสภาวะที่กึ่งติดเชื้อ สำหรับโปรตีน A2M ได้ค้นหาโปรตีนของกึ่งกลูตาต้าที่เกิดอันตรปฏิกิริยากับ 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 ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดเพื่อช่วยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบไหลเวียนเลือดของกึ่ง

คำหลัก : โปรตีโอมิกส์; กึ่งกลูตาต้า; *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 typell, 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

1. บทนำ

กุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยในแต่ละปีประเทศไทยสามารถส่งออกกุ้งได้ไม่น้อยกว่า 200,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งยังประสบปัญหาต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โรคระบาดที่พบ เช่น โรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัสทอราไวรัสแคระแกรนและแบคทีเรียกลุ่มฟิโร (Flegel, 2007) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีการงานวิจัยทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าว เช่น การใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจโรค (Kiatpathomchai และคณะ, 2004; Kiatpathomchai และคณะ, 2007) การศึกษาจีโนมของไวรัสในกุ้งเพื่อพัฒนาวัคซีนหรือยับยั้งไวรัสด้วยเทคนิค RNA interference (Robalino และคณะ, 2007; Tirasophon และคณะ, 2005) แต่ความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจะช่วยให้สามารถหาวิธีการป้องกันและแก้ไขปัญหาการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งอย่างมีประสิทธิภาพได้

ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมักนำเทคนิคทางด้านจีโนมิกส์มาใช้ในการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เทคนิคด้านโปรตีโอมิกส์เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่จะใช้ศึกษาและค้นหาโปรตีนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้เช่นเดียวกัน มีงานวิจัยหลายชิ้นที่นำเอาเทคนิค 2-dimensional gel electrophoresis (2DGE) และ mass spectrometry มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของกุ้ง เพื่อค้นหาโปรตีนที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง เช่น การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากกระเพาะอาหาร (stomach) ของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* และโปรตีนจากตับ (hepatopancreas) ของ *Fenneropenaeus chinensis* ที่ติดเชื้อไวรัส WSSV (Wang และคณะ, 2007; Chai และคณะ, 2010) การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกุ้ง *F. chinensis* ที่ติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* (Zhang และคณะ, 2010) และของกุ้ง *P. vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส YHV (Bourchookarn และคณะ, 2008) เป็นต้น ถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสก่อโรคในกุ้งจะมีการระบาดรุนแรงในกุ้ง และงานวิจัยส่วนใหญ่เน้นศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียกลุ่มฟิโรก็นับเป็นเชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคระบาดที่มีความรุนแรงอีกชนิดหนึ่งอีกด้วย

เชื้อแบคทีเรียกลุ่มฟิโร เป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคเรื้อรัง (vibriosis) ในกุ้งหากเกิดการระบาดของโรคนี้ในกุ้งจะทำให้กุ้งตายหมดทั้งบ่อ แบคทีเรียกลุ่มฟิโรมีหลาย species ที่ก่อโรคได้ในกุ้ง โดย *Vibrio harveyi* นับเป็นอีก species หนึ่งที่ก่อโรครุนแรงในกุ้ง โดยจะก่อให้เกิดโรคได้เมื่อกุ้งอยู่ใน

สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม มีความเครียด อ่อนแอ (Jiravanichpaisal และคณะ, 1994; Saulnier และคณะ, 2000) นอกจากนี้การติดเชื้อไวรัสพร้อมกับไวรัสยังทำให้กุ้งมีอัตราการตายสูงขึ้นอีกด้วย (Phuoc และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามความรู้ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อการรุกรานของเชื้อไวรัสไว้อยู่มีอยู่น้อย ทำให้ยังมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียเพิ่มเติม ซึ่งความรู้ดังกล่าวจะช่วยให้การแก้ปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งมีความยั่งยืนในที่สุด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาโปรตีนจากกุ้งกุลาดำที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อเชื้อ *V. harveyi* ในเนื้อเยื่อที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) อวัยวะน้ำเหลือง โดยใช้เทคนิค 2DGE และ mass spectrometry และศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่สนใจที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

2 ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การค้นหาโปรตีนที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสและแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 2DGE

1) การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

นำกุ้งกุลาดำขนาดประมาณ 15 กรัม แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กุ้งปกติ กุ้งที่ถูกฉีดด้วย 0.85% NaCl และกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (10^5 cfu) เก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดจากกุ้งปกติ และกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างอวัยวะน้ำเหลืองจากกุ้งถูกฉีดด้วย 0.85% NaCl และกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง สกัดโปรตีนโดยใช้ lysis buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 0.2% (v/v) TritonX-100, 50 mM DTT, 1× proteinase inhibitor cocktail) นำส่วนสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ไปตกตะกอนด้วย acetone:methanol (3:1) จากนั้นละลายตะกอนด้วย rehydration buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1X proteinase inhibitor cocktail) เก็บโปรตีนที่ละลายได้ที่ -80°C ในการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างเวลาละ 3 ชุด ตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชุดได้จากการรวมโปรตีนของกุ้ง 3 ตัว และสำหรับโปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลืองแต่ละชุดได้จากการรวมโปรตีนของกุ้ง 7 ตัว และโปรตีน 1 ชุดใช้สำหรับ 1 เจล

2) การแยกโปรตีนที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค 2DGE

สำหรับตัวอย่างโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือด นำตัวอย่างโปรตีนมาหาความเข้มข้นโดยใช้ 2D-Quant Kit (GE healthcare) นำโปรตีนปริมาณ 200 μg ผสมกับ rehydration buffer ที่มี 0.5% IPG buffer pH 4-7 50 mM DTT และ 0.002% bromophenol blue และทำการ rehydrate IPG (immobilized pH gradient) strip pH 4-7 ขนาด 13 cm พร้อมกับ load โปรตีนลงบน IPG strip โดยการให้กระแสไฟฟ้า 50 μA เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20°C จากนั้นทำการแยกโปรตีนตามค่า pI โดยตั้งโปรแกรมดังนี้คือ 300 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 500 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 1000 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 4000 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ

8000 V จนถึง 80000 Vhr จากนั้นทำการย้าย strip เพื่อนำมาแยกโปรตีนในทิศทางที่สองด้วย 12.5% SDS-PAGE ที่กระแสไฟฟ้าคงที่ 20 mA นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย SYPRO Ruby ข้ามคืน

สำหรับโปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลืองจะทำการทดลองคล้ายกับวิธีข้างต้น โดยมีวิธีการต่างกัน คือใช้โปรตีนปริมาณ 700 µg และทำการ rehydrate strip พร้อมกับ load โปรตีนลงบน IPG strip pH 4-7 ขนาด 13 ซม. ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการแยกโปรตีนตามค่า pI ตามโปรแกรมข้างต้น เมื่อแยกโปรตีนในทิศทางที่สองด้วย 12.5% SDS-PAGE เสร็จแล้วนำไปแช่ใน fixative solution และย้อมด้วย colloidal coomassie blue ข้ามคืน

3) การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในกึ่งปกติและกึ่งติดเชื้อ *V. harveyi*

นำเจลที่ย้อมแล้วไป scan และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Typhoon 9400 scanner หรือเครื่อง Imagescanner III (GE Healthcare) นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เลือก spot ของโปรตีนที่สนใจ ตัด spot โปรตีนที่สนใจออกจากเจล และทำ trypsin digestion จากนั้น นำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค nano-LC-ESI-MS/MS

2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Western blot

1) การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

เตรียมโปรตีนทั้งหมดของเซลล์เม็ดเลือดจากกึ่งปกติขนาดประมาณ 15 กรัม จำนวน 3 กลุ่ม ละ 20 ตัว ได้แก่ กึ่งปกติ และกึ่งที่ทำการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (10^5 cfu) ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง สกัดโปรตีนด้วยวิธีข้างต้น และวัดปริมาณโปรตีนด้วย 2D-Quant Kit (GE healthcare)

2) วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Western blot

แยกโปรตีนปริมาณ 5 µg สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน hemocyanin และแยกโปรตีนปริมาณ 15 µg สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน phosphopyruvate hydratase ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกคงที่ ๆ ใช้เป็นโปรตีนเปรียบเทียบบน SDS-PAGE จากนั้นทำ Western blot เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าว ตรวจสอบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกโดยใช้เทคนิค chemiluminescence และวัดความเข้มของแถบโปรตีน คำนวณค่าการแสดงออกของโปรตีน hemocyanin โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีน hemocyanin กับของโปรตีน phosphopyruvate hydratase โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Real time PCR

1) การเตรียมตัวอย่างกึ่ง

แบ่งกึ่งปกติขนาด 15 กรัมเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กึ่งที่ทำการจืดน้ำเกลือ และกึ่งที่ทำการติดเชื้อ *V. harveyi* (10^5 cfu) จากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลืองที่เวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างเวลาละ 3 ตัว โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2) การศึกษาการแสดงออกในระดับยีนของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Real time PCR

ทำการสกัด RNA ทั้งหมด โดยใช้ TRIReagent® (Molecular Research Center) กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วย DNase I (Promega) และนำ total RNA ปริมาณ 1 µg ที่ได้จากตัวอย่างทั้ง 3 ตัวในปริมาณที่เท่ากัน มาสร้าง cDNA สายเดี่ยว (single stranded cDNA) โดยใช้เอนไซม์ RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) และไพรเมอร์ oligo (dT) ทำการเพิ่มจำนวนของยีนที่สนใจ คือ ยีน *Alpha-2-macroglobulin* ยีน *14-3-3 protein epsilon* ยีน *hemocyanin* และยีน *ATP synthase beta subunit* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนนั้น ๆ (ตารางที่ 1) ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ใน 1X Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) ระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของยีนกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Relative expression ratio เปรียบเทียบกับยีน *β-actin* คำนวณดังสมการข้างล่าง

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CPtarget}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CPref}(\text{control-sample})}}$$

เมื่อ E_{target} = real time PCR efficiency ของยีนที่ทำการศึกษา

E_{ref} = real time PCR efficiency ของยีน *β-actin*

$E = 10^{[-1/\text{slope}]}$

$\Delta\text{CPtarget}$ = ค่า crossing point (CP) ของยีนที่ทำการศึกษาของกลุ่มควบคุม - กลุ่มทดลอง

ΔCPref = ค่า crossing point (CP) ของยีน *β-actin* ของกลุ่มควบคุม - กลุ่มทดลอง

และรายงานผลการแสดงออกที่เวลาต่าง ๆ เป็น fold change โดยเปรียบเทียบกับแสดงออกที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ

2.4 การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค RNAi

1) การสังเคราะห์ dsRNA และทำ gene silencing ด้วยเทคนิค RNAi

สร้าง double stranded RNA (dsRNA) ที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา คือ ยีน *ATP synthase beta subunit* และยีน *GFP* โดย dsRNA GFP ใช้สำหรับการทดลองควบคุม โดยใช้ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega) เมื่อได้ dsRNA แล้ว จึงหาปริมาณที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการลดการแสดงออกของยีน โดยฉีด dsRNA ที่ปริมาณแตกต่างกันเข้าสู่กุงกุลดำขนาดประมาณ 3 กรัม จำนวน 3 ตัวต่อ 1 กลุ่ม ภายหลังการฉีด dsRNA นาน 24 ชั่วโมง เก็บเลือดของกุง พร้อมทั้งสกัด total RNA โดยใช้ TRIReagent® พร้อมทั้งสร้าง cDNA โดยใช้ชุด RevertAID™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ทำการเพิ่มจำนวนของยีนที่สนใจโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนด้วยเทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกคงที่

2) การศึกษาอัตราการตายและเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำหลังการ ทำ gene silencing

ทำการทดลองโดยแบ่งกุ้งกุลาดำขนาดประมาณ 3 กรัม ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ กลุ่มที่ถูกฉีดด้วย dsRNA ของ GFP และกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย dsRNA ของ ATP synthase beta subunit จากนั้นบันทึกอัตราการตายของกุ้งในระยะเวลา 5 วัน โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ศึกษาผลของการ knockdown ยีน *ATP synthase beta subunit* ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ โดยทำการทดลองแบ่งกุ้งขนาดประมาณ 3 กรัม ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ถูกฉีดด้วย 0.85% NaCl กลุ่มที่ถูกฉีดด้วย dsRNA ของ GFP และกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย dsRNA ของ ATP synthase beta subunit ภายหลังการฉีด 0.85% NaCl และ dsRNA เป็นเวลา 0 และ 12 ชั่วโมง เก็บเลือดกุ้งและนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดโดยใช้เครื่อง hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบระหว่างกุ้งทั้งสองกลุ่ม

2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนของโปรตีนที่สนใจในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RT-PCR

ทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะทั้งหมด 11 อวัยวะ ได้แก่ ก้านตา เหงือก หัวใจ เซลล์เม็ดเลือด ตับ ลำไส้ ต่อมน้ำเหลือง กระเพาะอาหาร ต่อมแอนเทนนาอล เอพิโพไต์ และเนื้อเยื่อสร้างเลือด จากกุ้งกุลาดำ ขนาด 15 กรัม สกัด total RNA โดยใช้ TRIreagent® พร้อมทั้งสร้าง cDNA โดยใช้ชุด RevertAID™ First Strand cDNA Synthesis Kit ทำการเพิ่มจำนวนของยีนที่สนใจ คือ *ATP synthase beta subunit* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนด้วยเทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกคงที่

2.6 การค้นหาโปรตีนในกุ้งกุลาดำที่เกิดอันตรปฏิกิริยากับโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค yeast two-hybrid assay

1) การเตรียมตัวอย่างกุ้ง

ทำการทดลองโดยแบ่งกุ้งกุลาดำขนาด 15 กรัมเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กุ้งที่ทำการฉีดน้ำเกลือ และกุ้งที่ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (10^6 cfu) จากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดที่เวลา 6 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังการติดเชื้อ

3) การสร้างห้องสมุดยีนสำหรับ yeast two-hybrid screening

เตรียม total RNA จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6 และ 48 ชั่วโมง สำหรับการสร้าง library โดยใช้ Make Your Own “Mate & Plate™” Library System (Clontech) สกัด total RNA โดยใช้ TRIReagent® นำ total RNA ที่เตรียมได้ 2 µg (นำมาจากตัวอย่างกลุ่มละ 1 µg) มาสร้าง first strand cDNA โดยใช้ oligo-dT primer จากนั้นสร้าง ds-cDNA โดยเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค LD-PCR นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ CHROMA SPIN™ TE-400 (Clontech) สร้าง GAL4 activation domain (AD) fusion library โดยนำ cDNA และ linearized pGADT7-Rec vector ไปแทรนส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Y187 คัดเลือกแทรนส์ฟอร์มแมนท์

บนอาหารแข็ง synthetic dropout ที่ขาดกรดอะมิโน leucine (SD/-Leu) และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเก็บโคลนีทั้งหมดใน freezing medium (YPDA/25% Glycerol) และแบ่งเก็บหลอดละ 1 ml ที่ -80°C สำหรับใช้ในการ screening ต่อไป

4) การเตรียมโคลนยีสต์ที่มีชิ้นยีน receptor binding domain ของโปรตีน A2M ในเวกเตอร์ pGBKT7 (Bait vector)

ทำการเพิ่มจำนวนยีนในส่วน receptor binding domain ของโปรตีน A2M สำหรับการโคลนเข้าเวกเตอร์ pGBKT7 ซึ่งเป็น bait vector ที่มี GAL4 DNA binding domain ที่ใช้ในการเกิดอันตรปฏิกิริยากับ GAL4 activation domain ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGBKT7 จะได้เวกเตอร์ pGBKT7-A2M และแทรนส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL-1 blue โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ต่อมาทำการคัดโคลนรีคอมบิแนนท์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin นำโคลนรีคอมบิแนนท์มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อสกัดพลาสมิด จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ โดยตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันว่า ได้โคลนส่วนยีน receptor binding domain ของโปรตีน A2M ได้ และมีลำดับเบสที่ถูกต้อง แทรนส์ฟอร์ม pGBKT7-A2M 100 ng เข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Y2H Gold ตามรายละเอียดใน Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech)

หลังจากแทรนส์ฟอร์มพลาสมิด pGBKT7-A2M เข้าสู่ยีสต์ Y2HGold (BD-A2M) แล้ว นำโคลนยีสต์ที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนต่อเซลล์ยีสต์ (toxicity) โดยเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ที่มีเวกเตอร์ pGBKT7 และ pGBKT7-A2M บนอาหารแข็ง synthetic dropout ที่ขาดกรดอะมิโน tryptophan (SD/-Trp) หากเซลล์ที่เปรียบเทียบกันมีขนาดและจำนวนของโคลนีของเซลล์ควรจะใกล้เคียงกันแสดงว่า pGBKT7-A2M ที่ใส่เข้าไปในเซลล์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของ reporter gene ของ Bait protein (autoactivation) โดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่มี pGBKT7-A2M บนอาหาร SD/-Trp SD/-Trp ที่มี X-alpha-Gal (SDO/X) และ SD/-Trp ที่มี X-alpha-Gal และ aureobasidin A(SDO/X/A) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน หากเกิดโคลนีสีฟ้าแสดงว่า pGBKT7-A2M ที่สนใจสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ reporter gene ของยีสต์ได้ด้วยตัวเอง โดยจากการทดสอบนี้จะสามารถนำเซลล์ยีสต์ที่มี pGBKT7-A2M ไปใช้คัดเลือกโปรตีนที่เกิดอันตรปฏิกิริยากับโปรตีนที่สนใจต่อไปได้หาก pGBKT7-A2M ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่กระตุ้นการแสดงออกของ reporter gene

5) การผสมพันธุ์เซลล์ยีสต์ (yeast mating)

นำโคลนีเดี่ยวของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Y2H Gold ที่มีเวกเตอร์ pGBKT7-A2M (BD-A2M) มาเลี้ยงในอาหารเหลว SD/-trp บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm ข้ามคืนจนมีค่าความหนาแน่นที่ 600 nm เท่ากับ 0.8 หลังจากนั้นปั่นเก็บตะกอนเซลล์โดยการนำไปปั่นที่ 1000 × g 5 นาที กระจายตะกอนด้วย SD/-Trp ประมาณ 4-5 ml นำ BD-A2M ไปผสมกับห้องสมุดดีเอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* 1 ml กับอาหารเหลว 2X YPDA 45 ml ที่มี kanamycin 50 µg/ml ใน flask ขนาด 2 L บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C และเขย่าที่ 30-50 rpm เป็นเวลา 20-24 h

หลังจากนั้นปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ $1000 \times g$ 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 0.5X YPDA 50 ml ที่มี kanamycin 50 $\mu g/ml$ สองครั้ง นำไปปั่นเก็บเซลล์ที่ $1000 \times g$ 10 นาที อีกครั้ง แล้วกระจายตะกอนด้วย 0.5X YPDA 10 ml ที่มี kanamycin ต่อมาจึงนำเชื้อที่ mate แล้วไปคัดเลือกโคลนที่เกิดอันตรปฏิกิริยากันระหว่าง receptor binding domain ของโปรตีน A2M กับโปรตีนจากกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

6) คัดเลือกโคลนของยีสต์ที่มี receptor binding domain ของโปรตีน A2M และโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* เกิดอันตรปฏิกิริยากัน

ทำการคัดเลือกโคลนของยีสต์ที่มี receptor binding domain ของโปรตีน A2M และโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* เกิดอันตรปฏิกิริยากัน โดยนำยีสต์ที่ผ่านการ mating มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ขาดกรดอะมิโน leucine และ tryptophan ที่มี X-alpha-Gal และ aureobasidin A (DDO/X/A) เป็นเวลา 3-5 วัน โดยจะเลือกโคโลนีเดี่ยวที่สามารถโตได้และมีสีฟ้าทั้งหมด เพื่อนำไปคัดเลือกซ้ำบนอาหารแข็งที่ขาด leucine tryptophan adenine และ histidine ที่มี X-alpha-Gal และ aureobasidin A (QDO/X/A) ซึ่งมี stringency สูงขึ้น และคัดเลือกโคลนที่ยังคงให้สีฟ้าบนอาหาร QDO/X/A เพื่อนำไปยืนยันการเกิดอันตรปฏิกิริยาต่อไป

7) การยืนยันการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี co-transformation

สกัดพลาสมิด pGADT7-Rec vector ที่มียีนจากกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* จากโคลน positive ที่เกิดอันตรปฏิกิริยากับ receptor binding domain ของโปรตีน A2M จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้แต่ละตัวมาแทรนส์ฟอร์มร่วมกับเวกเตอร์ pGBKT7-A2M หรือ pGBKT7 (control) จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหารแข็งชนิด DDO/X และ QDO/X/A ถ้าโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดจากโคลน positive และเวกเตอร์ pGBKT7 มีการแสดงออกของยีน reporter บน QDO/X/A ได้ ถือว่าเป็นการเกิดอันตรปฏิกิริยาที่ไม่ถูกต้อง (false positive)

8) การระบุชนิดของโปรตีนที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ A2M

นำพลาสมิดที่มียีนของโปรตีนที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ receptor binding domain ของโปรตีน A2M ที่ยืนยันผลแล้วโดยการทำ co-transformation ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุชนิดของโปรตีนต่อไป

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการทำ Realtime RT-PCR

ยีน	ไพรเมอร์ (Sequence (5'-3'))	ความเข้มข้น สุดท้าย (nM)	อุณหภูมิ (°C) / เวลา (sec)		
			Denaturation	Annealing	Elongation
<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	A2M_F (CCTCATATCCGGCTTCATCC)	100	95 / 10	60 / 20	72 / 10
	A2M_R (CCGTGAACTCCTCGATGTAG)				
<i>14-3-3 protein epsilon</i>	14-3-3_EpF (GTATCTTGCCGAGACCGCCACT)	200	95 / 10	63 / 15	72 / 20
	14-3-3_EpR (CAATGTCGCTGGCTGCCTTGT)				
<i>14-3-3 like protein</i>	14-3-3_likeF (ATCGCCAAGGCAGAGATGCAG)	200	95 / 10	55 / 20	72 / 10
	14-3-3_likeR (CCAACCTCCGCAATAGCGTCGT)				
<i>Hemocyanin</i>	Hemocyanin_F (de la Vega และคณะ, 2007) (AAGTGCTCGGAATCTTCGGTAA)	200	95 / 10	60 / 15	72 / 10
	Hemocyanin_R (de la Vega และคณะ, 2007) (CCTGCCTCGATCTTTGCAA)				
<i>ATP synthase beta subunit</i>	ATP_F (AGGCTCACGGTGGTTACTCT)	300	95 / 10	60 / 20	72 / 10
	ATP_R (CCTTGGAGGTGTCATCCTTCAG)				
<i>Elongation factor</i>	EF1-alpha_F (GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC)	500	95 / 10	58 / 20	72 / 10
	EF1-alpha_R (CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG)				
<i>β-actin</i>	Beta_F (GAACCTCTCGTTGCCGATGGTG)	200	95 / 30	60 / 30	72 / 45
	Beta_R (GAAGCTGTGCTACGTGGCTCTG)				

3 ผลงานวิจัย

3.1 การค้นหาโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*

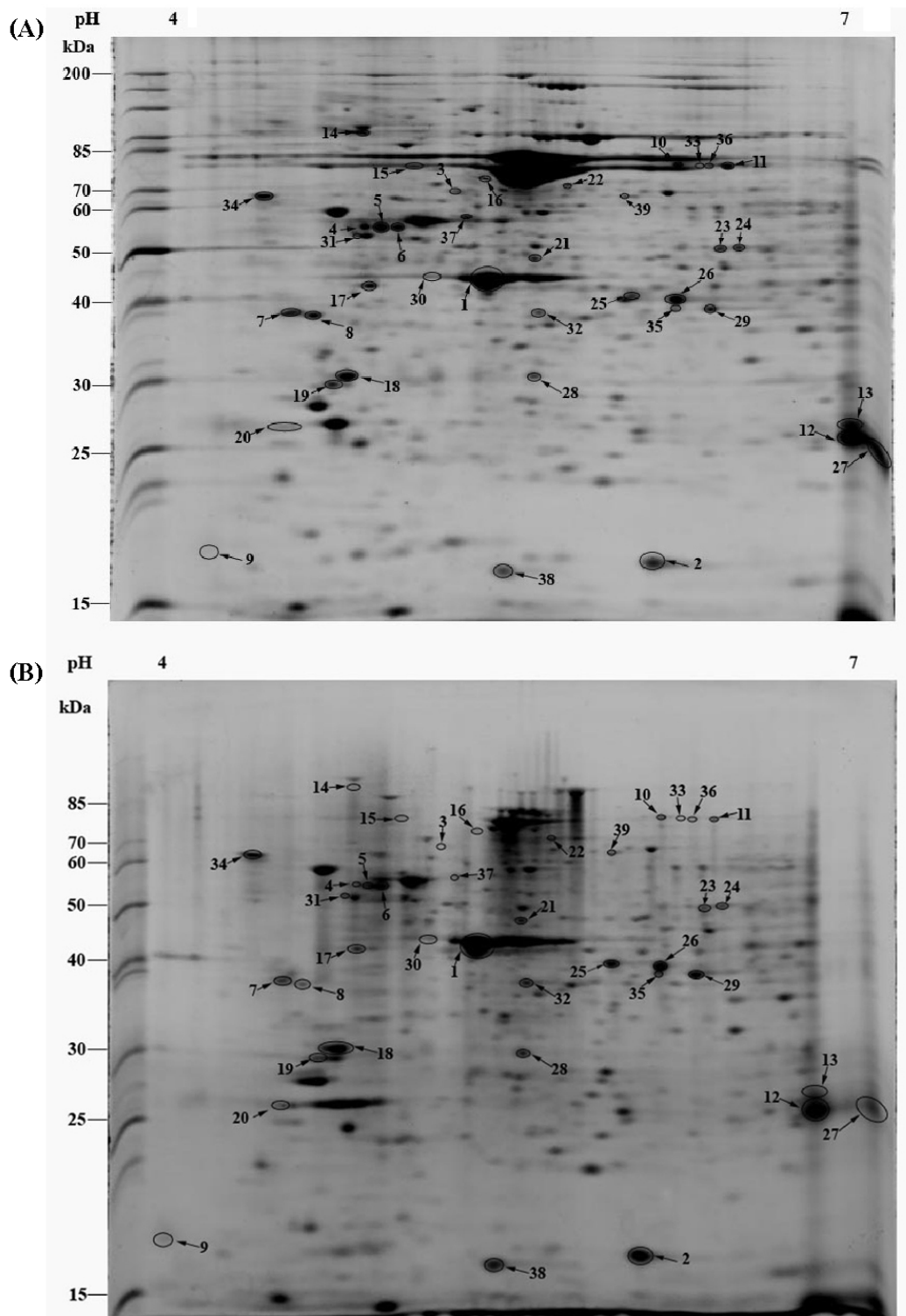
3.1.1 การค้นหาโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยใช้เทคนิค 2DGE

นำโปรตีนแต่ละชุด (โปรตีนที่เตรียมจากกุ้ง 3 ตัว) ที่เตรียมจากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง 3 กลุ่ม คือ กุ้งปกติ กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ไปแยกโดยใช้เทคนิค 2DGE โดยทำการแยกตัวอย่างทั้งหมด 3 ชุด (คิดเป็นตัวแทนกุ้ง 9 ตัว) พร้อมๆกัน จากการวิเคราะห์ภาพเจลพบว่า รูปแบบของโปรตีนที่แยกบนเจลคล้ายคลึงกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง รูปที่ 1 แสดงภาพของเจลตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม จากนั้นทำการวิเคราะห์จุดของโปรตีนบนเจลเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์

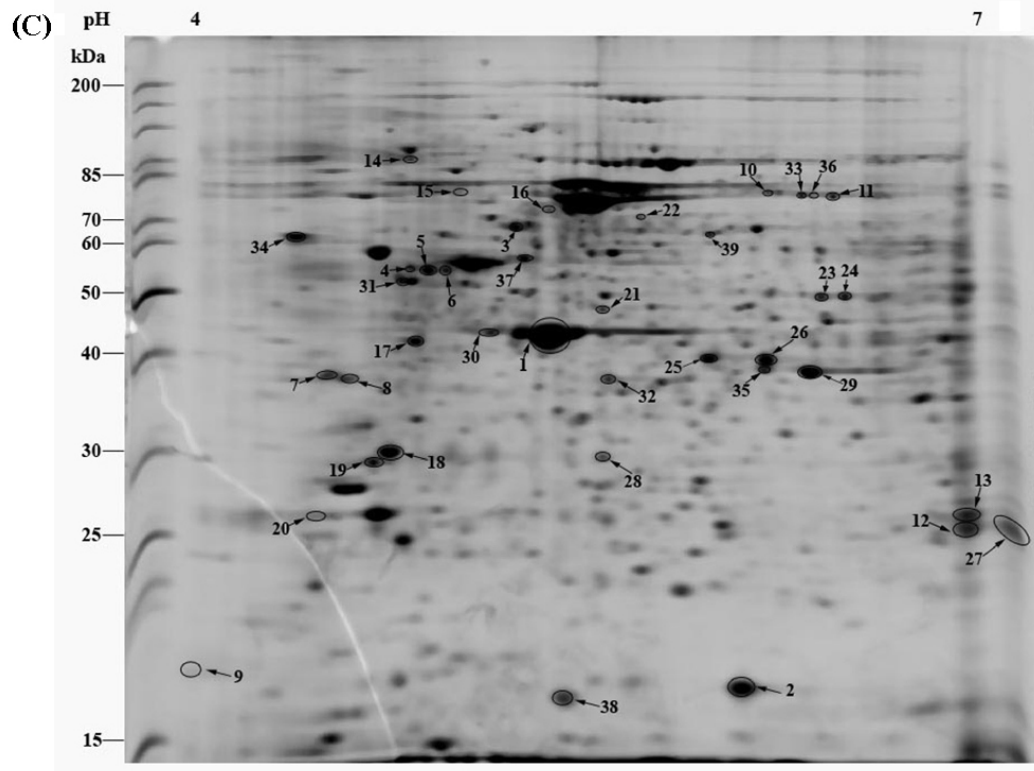
เม็ดเลือดกุ้งในสภาวะที่กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกุ้งปกติโดยการเปรียบเทียบค่า %vol ของ spot ที่ตรงกันในแต่ละเจล จากผลการวิเคราะห์เจลด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum ทำการคัดเลือก spot ที่สนใจทั้งหมด 39 spot และตัดโปรตีน spot เหล่านั้นออกจากเจล นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน เพื่อส่งไปวิเคราะห์ต่อยด้วย Mass spectrometry และนำข้อมูลที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และ *Penaeus monodon* EST database โดยใช้ Mascot program ได้ข้อมูลของโปรตีนต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 เนื่องจากข้อจำกัดของข้อมูลในฐานข้อมูล และกุ้งกุลาดำยังไม่มี Genome sequence ที่สมบูรณ์ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีน spot บางตัวได้ ข้อมูลของโปรตีนต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2 จากการวิเคราะห์ผลสามารถแบ่งกลุ่มของโปรตีนที่น่าสนใจได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเชื้อ *V. harveyi* (%vol มี ratio > 1.5) กลุ่มที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อได้รับเชื้อ *V. harveyi* (%vol มี ratio < -1.5) และกลุ่มที่มีการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับเชื้อ *V. harveyi* (%vol มี $-1.5 \geq \text{ratio} \geq 1.5$) จากโปรตีนที่คัดเลือกมา 39 spot พบว่า 8 spot เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 16 spot เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง และ 15 spot เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อติดเชื้อ *V. harveyi* อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าโปรตีนที่สนใจที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันเมื่อติดเชื้อ *V. harveyi* ณ เวลาที่ทดสอบ คือ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (ตารางที่ 2) โปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุด คือ prophenoloxidase 2 (proPO-2) และโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงมากที่สุด คือ alpha-2-macroglobulin (A2M) ทั้งนี้ยังพบว่าโปรตีนหลาย spot ที่เลือกมาศึกษาเป็นโปรตีนชนิดเดียวกันซึ่งมีขนาดเท่ากันแต่ค่า pi แตกต่างกัน และยังพบว่าโปรตีนเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกทั้งแบบที่การแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลง เช่น proPO-2 (spot ที่ 11 33 และ 36) serine proteinase-like protein (spot ที่ 4 5 และ 6) เป็นต้น จากการทดลองพบโปรตีนหลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับเชื้อ *V. harveyi* ได้แก่ hemocyanin prophenoloxidase (proPO) proPO-2 serine proteinase-like protein heat shock protein 90 และ A2M และพบโปรตีนบางชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ 14-3-3 protein epsilon และ calmodulin

3.1.2 การยืนยันผลของ 2DGE ด้วยวิธี Western blot

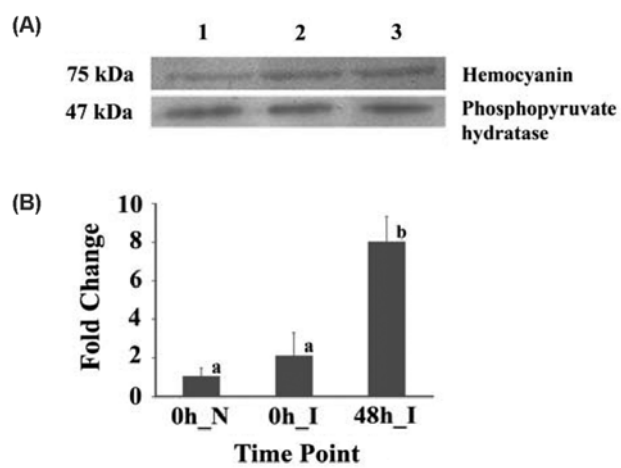
จากผลการทดลองข้างต้นซึ่งพบว่า โปรตีน hemocyanin มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 6.88 เท่าในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ จึงได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลของ 2DGE โดยการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน hemocyanin ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับโปรตีน phosphopyruvate hydratase ซึ่งเป็น internal control โดยใช้เทคนิค Western blot (รูปที่ 2A) จากการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot ให้ผลสอดคล้องกับเทคนิค 2DGE คือ โปรตีน hemocyanin มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ 8 เท่า เมื่อเทียบกับกุ้งปกติ และเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าเมื่อเทียบกับกุ้งที่ติดเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง (รูปที่ 2B)



รูปที่ 1. การแยกโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาตาปกติ (A) และกึ่งที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 ชั่วโมง (B) และ 48 ชั่วโมง (C) ด้วยเทคนิค 2DGE โดยใช้ IPG strip pH 4-7 และ 12.5% SDS-PAGE ตัวเลขที่แสดงบนเจลแทนโปรตีนที่น่าสนใจซึ่งนำไปวิเคราะห์ดังตารางที่ 2



รูปที่ 1. (ต่อ)



รูปที่ 2 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน hemocyanin ด้วยเทคนิค Western blot (A) โดยเปรียบเทียบกับแสดงออกของ phosphopyruvate hydratase ในกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่เวลา 0 และ 48 ชั่วโมง (B)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่สนใจด้วย LC-nano ESI-MS/MS และผลการวิเคราะห์การ แสดงออกที่เปลี่ยนแปลงเมื่อกุ้งได้รับเชื้อ *V. harveyi* ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

Spot no.	Predicted MW (Da)	Predicted pI	Protein hit	Mowse	Accession no.	Fold change*	
				Score/no. of match peptides		24h	48h
Up-regulated protein spots							
33	78700	6.05	prophenoloxidase 2 [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	71/2	ABQ45957	U	U
30	41822	5.11	actin 2 [<i>Penaeus monodon</i>]	240/7	AAC78682	U	U
3	74934	5.27	hemocyanin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	99/4	CAA57880	-1.35	+6.88
16			unknown			-2.92	+4.11
35	40087	6.05	allergen Pen m 2 [<i>Penaeus monodon</i>]	485/13	AAO15713	+1.85	+4.09
29	40087	6.05	allergen Pen m 2 [<i>Penaeus monodon</i>]	704/32	AAO15713	+2.33	+3.16
2	17142	6.74	twinstar [<i>Drosophila melanogaster</i>]	150/8	NP_477034	+1.88	+1.20
37	49283	4.92	tubulin alpha chain [<i>Oncorhynchus keta</i>]	94/3	P30436	-1.38	+1.88
4	52810	5.08	serine proteinase-like protein [<i>Penaeus monodon</i>]	119/5	ABD62888	+1.69	-1.25
32	37134	6.73	transaldolase [<i>Bombyx mori</i>]	110/1	NP_001040544	+1.60	+1.58
Down-regulated protein spots							
20	32431	5.04	alpha-2-macroglobulin [<i>Penaeus monodon</i>]	59/1	AAX24130	D	D
9	16671	4.04	calmodulin [<i>Patinopecten</i> sp.]	54/3	0711223A	D	-13.89
19	29054	4.65	14-3-3 protein epsilon [<i>Danio rerio</i>]	114/5	NP_997770	D	+1.12
12			unknown			-1.08	-3.75
14	96846	4.73	karyopherin (importin) beta [<i>Nematostella vectensis</i>]	109/3	XP_001636221	-8.14	-3.21
8			unknown			-3.42	-2.70
36	78700	6.05	prophenoloxidase 2 [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	119/3	ABQ45957	-3.49	-2.64
11	78700	6.05	prophenoloxidase 2 [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	127/3	ABQ45957	-2.31	-2.87
7			unknown			-1.59	-2.73
13	24283	6.52	GTP-binding nuclear protein Ran (GTPase Ran) (Ras-like protein TC4) [<i>Brugia malayi</i>]	104/2	P38542	-1.52	-2.75
27			unknown			-1.35	-2.39
6	52810	5.08	serine proteinase-like protein [<i>Penaeus monodon</i>]	84/2	ABD62888	-1.37	-2.42
10	78426	5.83	prophenoloxidase 1 [<i>Penaeus monodon</i>]	973/20	AAM77689	-1.88	-2.32
31	56040	5.10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor [<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>]	411/7	Q25117	-2.06	-1.17
5	52810	5.08	serine proteinase-like protein [<i>Penaeus monodon</i>]	119/5	ABD62888	-1.92	-1.48
15	83278	4.89	heat shock protein 90 [<i>Metapenaeus ensis</i>]	484/17	ABR66910	-1.17	-1.59
25			unknown			-1.40	-1.62
Constant protein spots							
38	28203	5.89	thymosin beta-11 [<i>Penaeus monodon</i>]	419/10	BI018085	+1.41	+0.98
34	46851	4.41	calreticulin [<i>Gallus gallus</i>]	82/3	AAS49610	-1.17	+1.48
28	31358	5.42	cytosolic manganese superoxide dismutase [<i>Penaeus monodon</i>]	421/12	AAW50395	+1.18	-1.50
26	40087	6.05	allergen Pen m 2 [<i>Penaeus monodon</i>]	103/3	AAO15713	+1.03	+1.16
24	47235	6.18	phosphopyruvate hydratase [<i>Penaeus monodon</i>]	452/9	AAC78141	+1.06	+1.01
17	32574	4.78	hypothetical protein LOC550536 [<i>Danio rerio</i>]	58/3	NP_001017838	+1.24	+1.12
18	32420	4.70	tropomyosin [<i>Locusta migratoria</i>]	305/17	P31816	+1.47	+1.06
1	41841	5.30	beta-actin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	1083/80	AAG16253	+1.46	+1.32
39			unknown			+1.12	+1.21
21			unknown			-1.07	-1.36
22			unknown			+1.21	+1.14
23			unknown			-1.24	+1.19

* indicates the decrease in the spot intensity at a given time point after *V. harveyi* infection compared to that of normal shrimp.

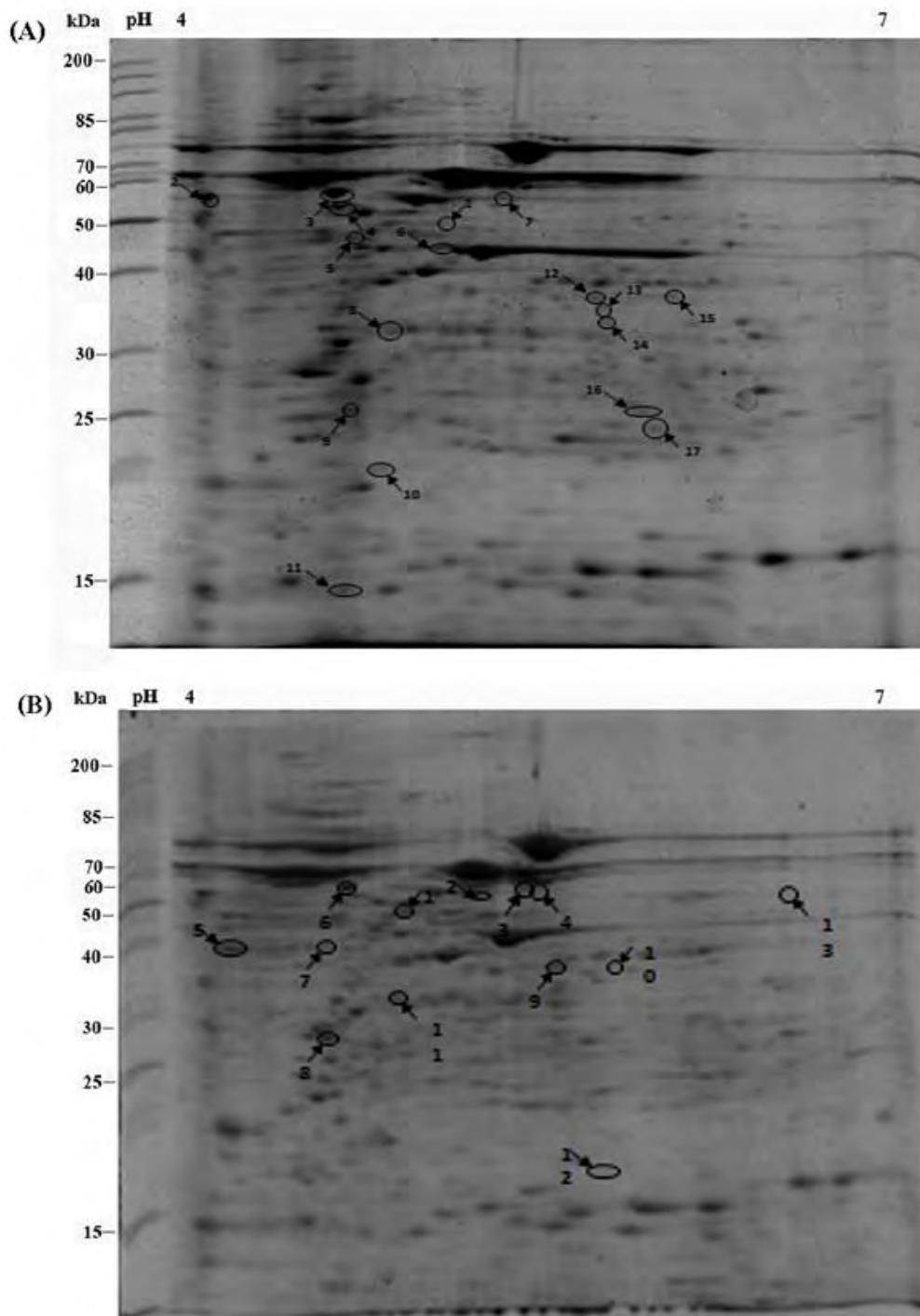
+ indicates the increase in the spot intensity at a given time point after *V. harveyi* infection compared to that of normal shrimp.

U indicates the up-regulated protein spot detected only in the protein extracts of infected animals.

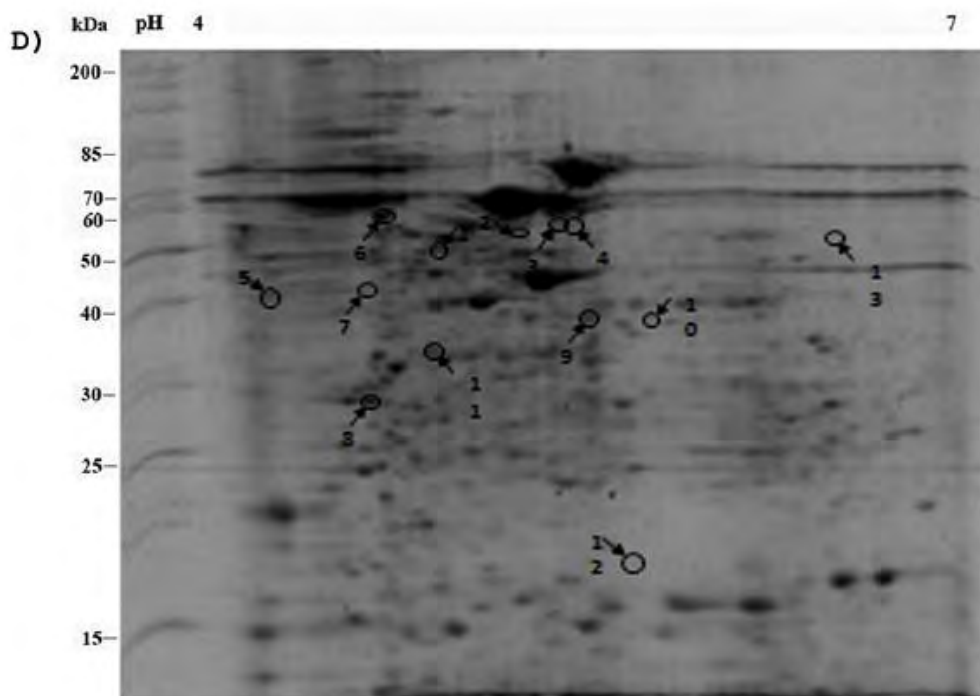
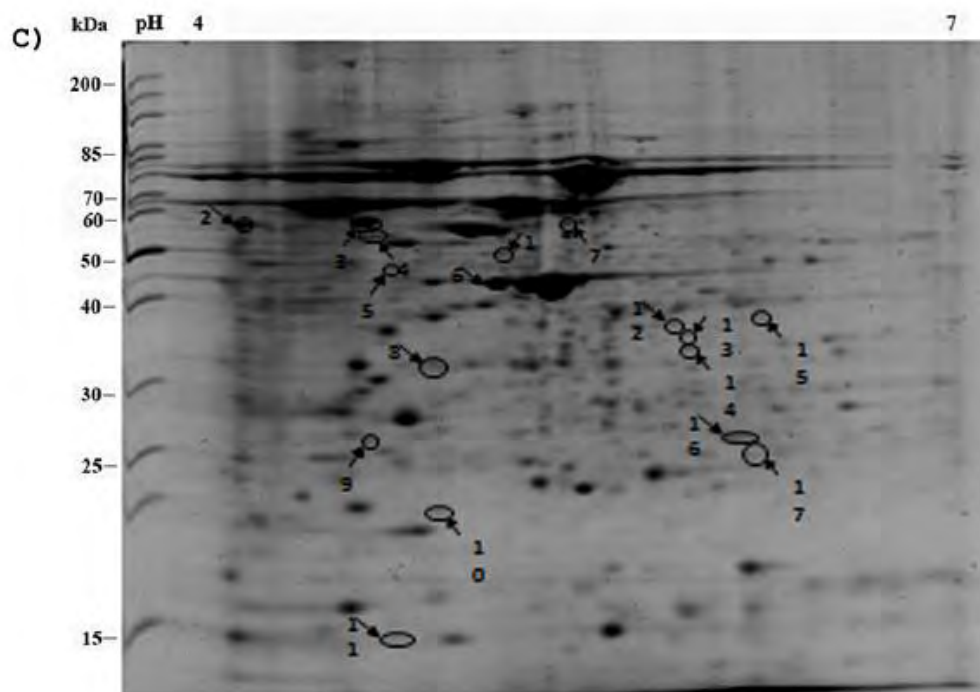
D indicates the down-regulated protein spot detected only in the protein extracts of normal animals.

3.2 การค้นหาโปรตีนจากอวัยวะของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 2DGE

นำตัวอย่างโปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่เตรียมได้แต่ละกลุ่ม คือ กุ้งที่ได้รับน้ำเกลือ กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ไปแยกโดยใช้เทคนิค 2DGE ได้ผลดังรูปที่ 3 เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในอวัยวะน้ำเหลืองในสภาวะที่กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* เปรียบเทียบกับกุ้งที่ได้รับน้ำเกลือ และคัดเลือก spot ที่สนใจที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 17 spot และ 13 spot ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ต่อยด้วย mass spectrometry ทำการวิเคราะห์ผลและจัดกลุ่มโปรตีนเช่นเดียวกับการศึกษาโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดข้างต้น (ตารางที่ 3 และ 4) พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง มีโปรตีน 2 spot ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและ 13 spot ที่มีการแสดงออกลดลง ส่วนอีก 2 spot เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อกุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* สำหรับที่เวลา 48 ชั่วโมง มีโปรตีน 2 spot ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและ 10 spot ที่มีการแสดงออกลดลง อีก 1 spot เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อกุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* จากข้อมูลที่ได้ในตารางที่ 3 และ 4 จะเห็นได้ว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่แสดงออกในอวัยวะน้ำเหลือง มีการแสดงออกลดลงทั้งที่เวลา 6 และ 48 ชั่วโมง โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุด คือ ATP synthase beta subunit และโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงมากที่สุด คือ actin 2 และโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ transglutaminase A2M histone H2B hemocyanin subunit Y และโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ calreticulin และ 14-3-3 like protein



รูปที่ 3 การแยกโปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ที่เวลา 6 ชั่วโมง (A) และ 48 ชั่วโมง (B) ตามลำดับ และ กุ้งที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6 ชั่วโมง (C) และ 48 ชั่วโมง (D) ตามลำดับ ด้วยเทคนิค 2DGE โดยใช้ IPG strip pH 4-7 และ 12.5% SDS-PAGE ตัวเลขบนเจลแสดงถึงจุดโปรตีนที่น่าสนใจซึ่งได้นำไปวิเคราะห์ และแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4



รูปที่ 3 (ต่อ)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลืองที่สนใจด้วย LC-nano ESI-MS/MS และผลการวิเคราะห์การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงเมื่อกุ้งได้รับเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6 ชั่วโมงด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

Spot no.	Predicted MW (Da)	Predicted pI	Protein hit	Score	Accession no.	Fold change at 6 hpi
Up-regulated protein spots						
1	47598	5.06	PREDICTED: similar to Tat-binding protein-1 [<i>Apis mellifera</i>]	362	XP_392722	2.98
6	46181	4.90	ATP synthase beta subunit [<i>Haliotis rufescens</i>]	427	AAZ30686	5.50
Down-regulated protein spots						
2	47212	4.52	calreticulin [<i>Amblyomma brasiliense</i>]	93	AAR29933	-3.46
4	58480	4.70	PREDICTED : similar to heat shock protein 1, beta isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]	171	XP_392456	-3.13
5	41822	5.11	actin 2 [<i>Penaeus monodon</i>]	1141	AAC78682	-16.75
7	84660	5.51	transglutaminase [<i>Penaeus monodon</i>]	207	AAL78166	-3.43
9	32431	5.04	alpha-2-macroglobulin [<i>Penaeus monodon</i>]	252	AAX24130	-4.55
10	29673	8.24	beta tubulin [<i>Penaeus monodon</i>]	588	ABU49604	-4.00
11	13629	10.52	histone H2B	131	P19374	-3.58
12	50126	4.78	beta tubulin [<i>Bombyx mori</i>]	142	BBA32102	-4.05
13	41513	5.30	actin	339	1101351C	-3.72
14	-	-	unknown	-	-	-3.73
15	-	-	unknown	-	-	-4.23
16	24355	5.33	triosephosphate isomerase [<i>Archaeopotamobius sibiriensis</i>]	178	CAD29196	-8.65
17	-	-	unknown	-	-	-3.65
Constant protein spots						
3	57261	4.81	PREDICTED: similar to disulfide isomerase [<i>Acyrtosiphon pisum</i>]	172	XP_001950073	1.38
8	56321	-	beta actin [<i>Penaeus monodon</i> EST database]	39.87*	CT160_3	1.45

* โปรตีนที่ถูกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EST ในกุ้งกุลาดำ

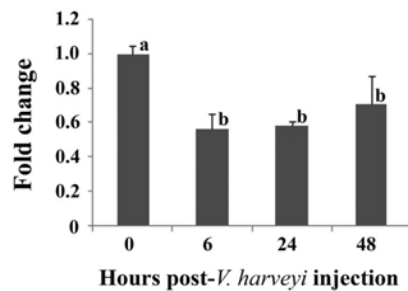
ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลืองที่สนใจด้วย LC-nano ESI-MS/MS และผลการวิเคราะห์การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงเมื่อกึ่งได้รับเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 48 ชั่วโมงด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

Spot no.	Predicted MW (Da)	Predicted pI	Protein hit	Score	Accession no.	Fold change at 48 hpi
Up-regulated protein spots						
1	-	-	unknown	-	-	3.33
11	40313	5.56	Cytoplasmic actin Cy II [<i>Meliocidaris erythrogramma</i>]	160	AAB66304	5.11
Down-regulated protein spots						
2	-	-	unknown	-	-	-3.98
3	84910	5.61	transglutaminase [<i>Fenneropenaeus chinensis</i>]	78	ABC33914	-4.62
4	75092	5.38	hemocyanin subunit Y [<i>Marsupenaeus japonicus</i>]	50	ABR14694	-5.25
5	-	-	unknown	-	-	-5.79
7	-	-	unknown	-	-	-3.14
8	27834	4.61	14-3-3 like protein [<i>Penaeus monodon</i>]	366	AAAY56092	-3.15
9	41841	5.30	beta-actin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	99	AAG16253	-4.67
10	21914	5.78	cytochrome oxidase subunit I	48	ABG46959	-4.38
12	-	-	unknown	-	-	-3.78
13	-	-	unknown	-	-	-3.43
Constant protein spots						
6	55706	4.71	PREDICTED : similar to protein disulfide isomerase [<i>Nasonia vitripennis</i>]	213	XP_001605359	1.30

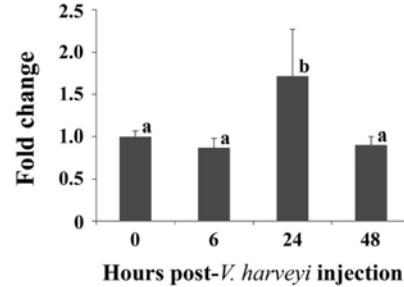
3.3 การศึกษาระดับการแสดงออกในระดับยีนของโปรตีนที่ระบุว่าการแสดงออกแตกต่างกันในกึ่งปกติและกึ่งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

ในการทดลองนี้ได้ใช้เทคนิค Realtime RT-PCR ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีนที่สนใจที่พบว่าการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปทั้งในเซลล์เม็ดเลือด (รูปที่ 4) และต่อมน้ำเหลือง (รูปที่ 5) เมื่อกึ่งติดเชื้อ *V. harveyi* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกในระดับยีนและระดับโปรตีนของโปรตีนที่สนใจเหล่านั้น โปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดที่สนใจ ได้แก่ A2M และ 14-3-3 protein epsilon ซึ่งมีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งปกติ แต่ไม่พบการแสดงออกในกึ่งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ และโปรตีน hemocyanin ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 6.88 เท่า หลังการติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ และโปรตีนจากอวัยวะน้ำเหลืองที่สนใจ ได้แก่ A2M และ 14-3-3 like protein ซึ่งมีการแสดงออกลดลงที่เวลา 6 และ 48 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ และโปรตีน ATP synthase beta subunit ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 5.5 เท่าที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ

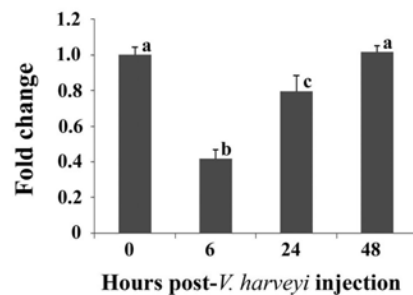
A) Alpha-2-macroglobulin



B) 14-3-3 protein epsilon



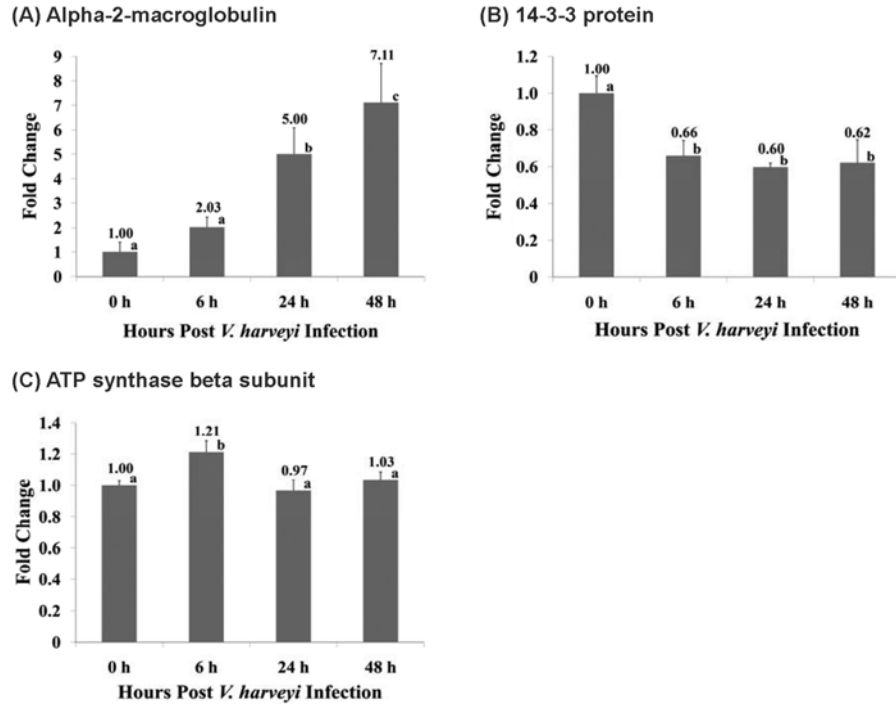
C) Hemocyanin



รูปที่ 4 การศึกษาการแสดงออกของยีน *alpha-2-macroglobulin* (A) ยีน *14-3-3 protein epsilon* (B) และยีน *hemocyanin* (C) ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค Real-time RT-PCR

เมื่อศึกษาการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของยีน A2M ยีน *14-3-3 protein epsilon* และยีน *hemocyanin* ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่ายีน A2M มีการแสดงออกในกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6-48 ชั่วโมงต่ำกว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง (รูปที่ 4A) การแสดงออกของยีน *14-3-3 protein epsilon* เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (รูปที่ 4B) และยีน *hemocyanin* มีการแสดงออกลดลงที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อมาอยู่ที่ระดับเดียวกับที่เวลา 0 ชั่วโมง (รูปที่ 4C)

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน A2M ยีน *14-3-3 like* และยีน *ATP synthase beta subunit* ในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่เวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน A2M เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากติดเชื้อ *V. harveyi* ที่ 6 ชั่วโมงขึ้นไป (รูปที่ 5A) และระดับการแสดงออกของยีน *14-3-3 like protein* มีปริมาณลดลงภายหลังการติดเชื้อตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป (รูปที่ 5B) และระดับการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญที่ 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ (รูปที่ 5C)



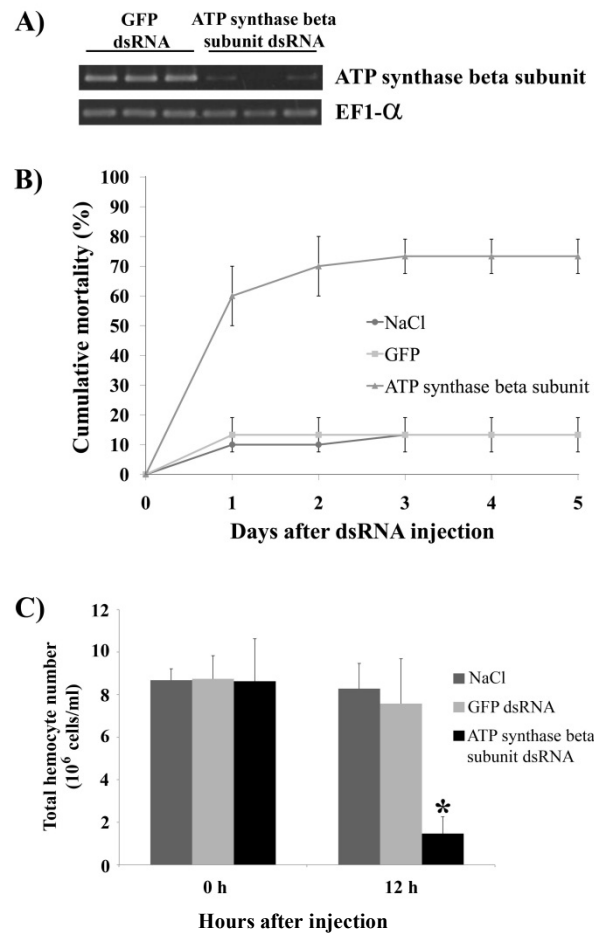
รูปที่ 5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *alpha-2-macroglobulin* (A), ยีน *14-3-3 like protein* (B) และยีน *ATP synthase beta subunit* (C) ในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 0 6 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค Realtime RT-PCR

3.4 การศึกษาอัตราการตายและการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำหลังการทำ gene silencing ของยีน *ATP synthase beta subunit*

เนื่องจากโปรตีน ATP synthase beta subunit มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ดังนั้นจึงคาดว่าเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ ในการทดลองนี้ได้ทำการ knockdown ยีน *ATP synthase beta subunit* โดยใช้เทคนิค RNA interference เพื่อศึกษาความสำคัญของโปรตีน ATP synthase beta subunit ในกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* จากการทดลองฉีด dsRNA ของยีน *ATP synthase beta subunit* ปริมาณ 10 µg/น้ำหนักตัวกุ้ง (g) ให้กุ้งกุลาดำขนาดประมาณ 3 กรัม พบว่าทำให้การแสดงออกของยีนดังกล่าวลดลงถึง 86.86% ดังรูปที่ 6A และเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* เพียงอย่างเดียวโดยไม่ได้ทำให้กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* พบว่ากุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 73.33% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6B)

จากรายงานของ Lin และคณะ ในปี 2009 ได้กล่าวถึงหน้าที่ของ ATP synthase beta subunit ว่าเป็น receptor ของ astakine1 และพบ ATP synthase beta subunit ได้บนผิวเซลล์ hematopoietic ของ crayfish และเนื่องจาก astakine1 นี้มีความเกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยเซลล์เม็ดเลือดที่ผลิตขึ้นใหม่ออกสู่ระบบเลือดแบบเปิดใน crayfish จึงคาดว่า ATP synthase beta subunit น่าจะมีความสำคัญต่อ

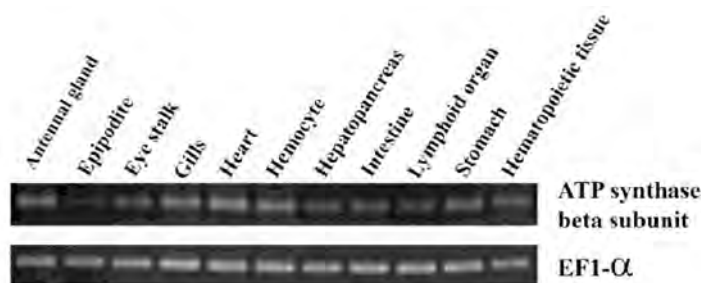
กระบวนการนี้ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองหาปริมาณเซลล์เม็ดเลือด (circulating hemocyte) ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในระบบเลือด จากการทดลองพบว่า เมื่อกุ้งมีการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* ลดลงอันเป็นผลมาจากการฉีด dsRNA นั้น ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งลดลงประมาณ 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6C)



รูปที่ 6 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* โดยใช้เทคนิค RNA interference (A) ผลของ dsRNA ของยีน *ATP synthase beta subunit* ปริมาณ 10 μ g/น้ำหนักตัวกุ้ง (g) ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย dsRNA ของยีน *GFP* (B) กราฟแสดงอัตราการตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ได้รับ dsRNA ของยีน *ATP synthase beta subunit* เป็นระยะเวลา 5 วัน (C) ผลการนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* เทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 0 และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด dsRNA

3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* ในอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งกูด

ศึกษาการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกิ้งกูดจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ ต่อมแอนเทนนอนล เอพิโพไต์ ก้านตา เหงือก หัวใจ เซลล์เม็ดเลือด เฮพาโทแพนเครส ลำไส้ ต่อมน้ำเหลือง กระเพาะอาหาร และเนื้อเยื่อสร้างเลือด พบว่า ยีน *ATP synthase beta subunit* สามารถแสดงออกได้ในทุกอวัยวะ แต่พบการแสดงออกมากในต่อมแอนเทนนอนล เหงือก หัวใจ เซลล์เม็ดเลือด และกระเพาะอาหาร (รูปที่ 7)



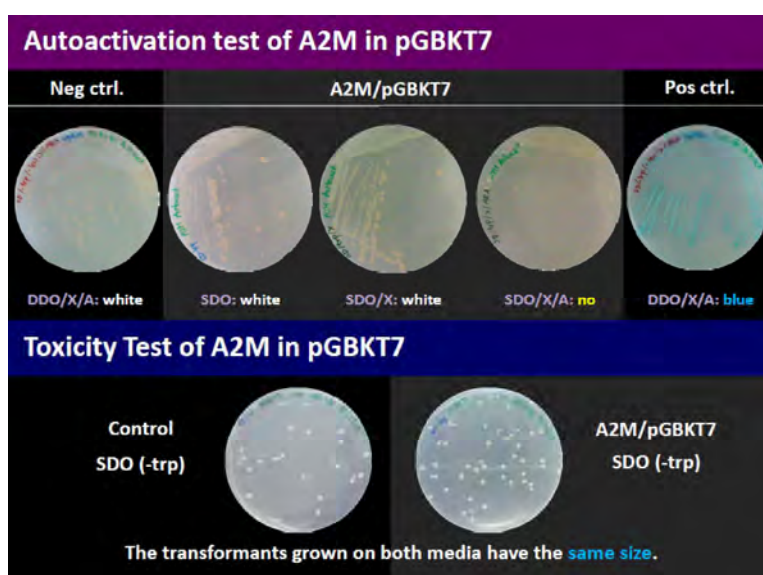
รูปที่ 7 การแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* ในอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งกูด ได้แก่ ต่อมแอนเทนนอนล (antennal gland) เอพิโพไต์ (epipodite) ก้านตา (eye stalk) เหงือก (gill) หัวใจ (heart) เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) เฮพาโทแพนเครส (hepatopancreas) ลำไส้ (intestine) ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) กระเพาะอาหาร (stomach) และเนื้อเยื่อสร้างเลือด (hematopoietic tissue)

3.6 การค้นหาโปรตีนในกิ้งกูดที่เกิตรปฏิกิริยากับโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค yeast two-hybrid assay

จากผลการทดลองข้างต้นที่พบว่าโปรตีน A2M ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มตัวยับยั้งซีรีนโปรติเนสมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* มีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูด แต่ไม่พบการแสดงออกในกิ้งกูดที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และการแสดงออกในระดับยีนในเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูดที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 6 - 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อต่ำกว่าในกิ้งกูดที่ติดเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีนนี้ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกูด งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาโปรตีน A2M ในเชิงลึก โดยจะค้นหาโปรตีนของกิ้งกูดที่เกิตรปฏิกิริยากับโปรตีนนี้โดยใช้เทคนิค yeast two-hybrid assay

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน A2M ที่มีรายงานแล้วในกิ้งกูด (Lin และคณะ, 2007) พบว่ายีน A2M ของกิ้งกูดมี ORF ขนาด 4494 bp และคิดเป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโน 1148

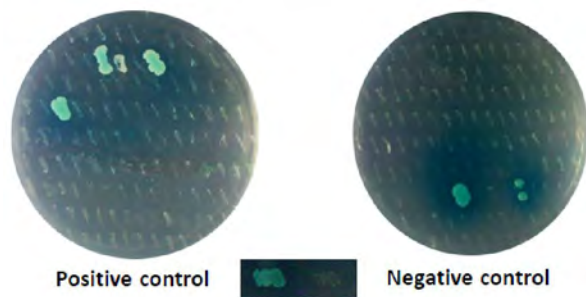
หน่วย และ mature protein มีขนาดประมาณ 167.7 kDa ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 3 ส่วนคือ 1) bait region 2) thiol ester domain และ 3) receptor-binding domain ในการทดลองนี้ได้เลือกศึกษาส่วน receptor binding domain เนื่องจากเคยมีรายงานว่า receptor binding domain ของโปรตีน A2M เป็นส่วนที่จับกับโปรตีน A2M ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ จึงเลือกส่วน receptor binding domain ของโปรตีน A2M มาสร้าง bait vector เพื่อใช้ในการ screen หาโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำที่สามารถเกิดอันตรปฏิกิริยากับโปรตีน A2M ได้ จากการทดลอง พบว่า bait vector ที่มียีนของ receptor binding domain ของโปรตีน A2M (pGBKT7-A2M) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์และยีนในส่วนของ receptor binding domain ของโปรตีน A2M ไม่กระตุ้นให้เกิด autoactivation (รูปที่ 8) จึงนำไปใช้ในการ screen ต่อไปได้



รูปที่ 8 การทดสอบการเกิด autoactivation และ toxicity ของ pGBKT7-A2M ในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Y2H Gold

เมื่อได้ยีสต์ที่มี bait vector pGBKT7-A2M แล้ว จึงนำมา mate กับห้องสมุดยีสต์ที่มียีนจากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* และทำการ screen บนอาหารแข็ง DDO/X/A และ QDO/X/A ตามลำดับ เพื่อหาโคลนที่มีการแสดงออกของ reporter gene ซึ่งจะได้โคโลนีของยีสต์เป็นสีฟ้า จากการทดลองพบโคลน positive ทั้งหมด 6 โคลน ได้แก่ SB1 – SB4 และโคลน PB1 - PB2 (รูปที่ 9) ทำการยืนยันผลการทดลองโดยการทำ co-transformation โดยนำแต่ละโคลนมาสกัดแยกพลาสมิด pGADT7-Rec ที่มียีนของกึ่งกลาดำจากห้องสมุดยีสต์ แล้วนำไปแทรนส์ฟอร์มเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Y2H Gold ร่วมกับ pGBKT7-A2M หรือ pGBKT7 เพื่อยืนยันการเกิดอันตรปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนทั้งสอง โคลนที่ให้ผลบวกจริง คือโคลนที่เกิดจากการ co-transform ระหว่าง pGBKT7 กับพลาสมิด pGADT7-Rec ที่มียีนของกึ่งกลาดำ และ

ไม่สามารถโตได้บนอาหาร DDO/X และ QDO/X/A และโคลนที่เกิดจากการ co-transform ระหว่าง pGBKT7-A2M กับพลาสมิด pGADT7-Rec ที่มียีนของกุ้งกุลาดำ สามารถโตได้และมีโคโลนีเป็นสีฟ้าบนอาหาร DDO/X และ QDO/X/A จากการทดลองพบว่า โคลนที่มียีนจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเกิดอันตรปฏิกิริยากับ A2M ได้จริงมี 4 โคลน เท่านั้น คือ SB1 SB2 SB3 และ SB4 (รูปที่ 10) จากนั้นจึงตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พลาสมิดของยีนจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* จากโคลน SB1 - SB4 พบว่า พลาสมิดที่มียีนของกุ้งกุลาดำที่ได้จากโคลน SB1 - SB4 มีลำดับเบสที่เหมือนกัน คือ เป็นส่วนของยีน *transglutaminase typell* ทางด้านปลาย C ขนาด 192 bp จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่า receptor binding domain ของโปรตีน A2M สามารถเกิดอันตรปฏิกิริยากับโปรตีน *transglutaminase typell* ทางด้านปลาย C ได้ อย่างไรก็ตามก็ดียังคงต้องทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองนี้ด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น *in vitro* pull down assay อีกครั้งหนึ่ง



รูปที่ 9 การคัดเลือกโคลนของยีสต์ที่เกิดอันตรปฏิกิริยากันระหว่าง receptor binding domain ของโปรตีน alpha-2-macroglobulin กับโปรตีนที่มียีนจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ด้วยเทคนิค yeast two-hybrid screening



รูปที่ 10 ผลการทำ co-transformation เพื่อยืนยันผลการทดลองจากการทำ yeast two-hybrid screening

บทวิจารณ์

เซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลืองจัดเป็นเนื้อเยื่อที่มีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในสภาวะที่กุ้งติดเชื้อก่อโรคในอวัยวะทั้งสองนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญต่อการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อไป ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วยเทคนิค 2DGE พบโปรตีนที่สนใจที่แสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 39 spot และที่แสดงออกในอวัยวะน้ำเหลืองทั้งหมด 30 spot เมื่อนำไปวิเคราะห์พบว่า สามารถจัดกลุ่มของโปรตีนออกเป็น 3 กลุ่ม ตามระดับการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้แก่ กลุ่มที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น กลุ่มที่มีการแสดงออกลดลง และกลุ่มที่การแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อนำโปรตีนที่สนใจไปวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของโปรตีนโดยนำข้อมูลที่ได้จาก mass spectrometry ไปสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank และ *P. monodon* EST database พบว่า โปรตีนบางชนิดไม่สามารถระบุชนิดได้ ทั้งนี้เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลจีโนมของกุ้งที่สมบูรณ์

ในงานวิจัยนี้ พบโปรตีนหลายชนิดทั้งจากเซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลือง มีการแสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เป็นที่น่าสังเกตว่า โปรตีนส่วนใหญ่มีการแสดงออกลดลงเมื่อกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดที่คาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น คือ hemocyanin proPO-2 และ serine protease-like protein โปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีการแสดงออกลดลง คือ A2M proPO และ proPO-2 โปรตีนที่คาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่มีการแสดงออกลดลง คือ 14-3-3 protein epsilon และ calmodulin นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนหลาย spot ที่นำมาวิเคราะห์เป็นโปรตีนชนิดเดียวกันแต่นำหนักโมเลกุลและค่า pI ต่างกัน ได้แก่ proPO-2 arginine kinase และ serine protease-like protein ทั้งนี้คาดว่าความแตกต่างดังกล่าวเกิดจาก posttranslation modification บนโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆ จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในอวัยวะน้ำเหลือง พบว่า โปรตีนส่วนใหญ่มีการแสดงออกลดลงทั้งที่เวลา 6 และ 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ โดยโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีการแสดงออกลดลง ได้แก่ transglutaminase A2M histone H2B และ hemocyanin subunit Y โปรตีนที่คาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่มีการแสดงออกลดลง คือ 14-3-3 like และ calreticulin โดยโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมาก คือ ATP synthase beta subunit

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดที่พบที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงนั้น ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ phenoloxidase ได้แก่ proPO และ proPO-2 แสดงให้เห็นว่าในระบบ phenoloxidase มีความสำคัญต่อการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในกุ้งกุลาดำ ดังเช่นที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีน *proPO* และ *proPO-2* ทั้งสองชนิดมีผลทำให้กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* ได้ง่ายขึ้น (Amparyup และคณะ, 2009) การศึกษาการแสดงออกของยีน *proPO-1* และ *proPO-2* ในกุ้งขาว *P. vannamei* พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* และระดับการแสดงออกของยีนลดลงจนที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ มีระดับการแสดงออกใกล้เคียงกับกุ้งกลุ่ม

ควบคุม (Yeh และคณะ, 2009) และจากงานวิจัยนี้พบว่า โปรตีน proPO และ proPO-2 ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่มีการแสดงออกลดลงหลังจากติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าการแสดงออกในระดับยีนและระดับโปรตีนของ proPO มีความสอดคล้องกัน

เมื่อวิเคราะห์โปรตีนในกลุ่มที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นชัดเจนภายหลังการติดเชื้อ *V. harveyi* ในเซลล์เม็ดเลือด คือ arginine kinase (AK) และในอวัยวะน้ำเหลือง คือ ATP synthase beta subunit จะเห็นได้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์พลังงานในเซลล์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในกระเพาะอาหารของกุ้งขาว *P. vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส WSSV พบว่า โปรตีน AK มีการแสดงออกคงที่ และ ATP synthase beta subunit มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Wang และคณะ, 2007) และจากรายงานของ Rattanarojpong และคณะ (2007) พบว่า โปรตีน AK มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเหงือกของกุ้งขาว *P. vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส YHV การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์พลังงานในเซลล์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์มีความต้องการพลังงานอย่างมากในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ

การศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน hemocyanin ด้วยเทคนิค Western blot เพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค 2DGE ซึ่งจากการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน hemocyanin ในเซลล์เม็ดเลือดที่ได้จากเทคนิคทั้งสองมีความสอดคล้องกัน คือ มีระดับการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดเพิ่มขึ้นหลังการติดเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ นอกจากนี้จากข้อมูลในตารางที่ 2 และรูปที่ 1 ชี้ให้เห็นว่าผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค 2DGE มีความน่าเชื่อถือ

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกโปรตีนที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* อย่างชัดเจนทั้งในเซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลืองมาทำการศึกษาระดับการแสดงออกในระดับยีน เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนและโปรตีน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการแสดงออกในระดับยีนและในระดับโปรตีนของโปรตีนที่เลือกมาศึกษาส่วนใหญ่ไม่สอดคล้องกัน ชี้ให้เห็นว่าการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อแตกต่างกันในระดับยีนและระดับโปรตีน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ในกุ้ง (Rattanarojpong และคณะ, 2007; Wang และคณะ, 2007)

จากผลการค้นหาโปรตีนที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* ข้างต้น ได้คัดเลือกโปรตีนที่สนใจ 2 ชนิด คือ ATP synthase beta subunit และ A2M มาทำการศึกษาความสำคัญของโปรตีนทั้งสองต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยใช้เทคนิค RNAi ในการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่ ATP synthase beta subunit และใช้เทคนิค yeast two hybrid screening ในการค้นหาโปรตีนอื่นๆจากกุ้งกุลาดำที่เกิดอันตรปฏิกิริยากับโปรตีน A2M ได้

โปรตีน ATP synthase beta subunit ทำหน้าที่เป็น receptor ของ astakine ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยเซลล์เม็ดเลือดที่ผลิตขึ้นใหม่ออกสู่ระบบเลือดแบบเปิดใน crayfish (Lin และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า ATP synthase beta subunit สามารถจับกับ WSSV ได้อีกด้วย (Liang และคณะ, 2010) จากการศึกษาความเกี่ยวข้องของโปรตีน ATP synthase beta subunit ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้เทคนิค RNAi พบว่า เมื่อฉีด dsRNA ของยีน *ATP synthase beta subunit* ให้กับกุ้ง

กุลาดำ พบว่า อัตราการตายของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *ATP synthase beta subunit* สูงถึง 73.33% อีกทั้งเซลล์เม็ดเลือดในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า โปรตีน *ATP synthase beta subunit* นี้มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้ง ซึ่งนอกจากทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงานในเซลล์แล้ว ยังคาดว่า โปรตีน *ATP synthase beta subunit* เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดซึ่งเป็นเซลล์ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอีกด้วย

โปรตีน A2M เป็นตัวยับยั้งโปรตีนเอนไซม์ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบ prophenoloxidase (Cerenius และ Söderhäll, 2004) นอกจากนี้ยังทำงานโดยการยับยั้งและกำจัดโปรตีนของพาราไซส์อีกด้วย (Armstrong, 2006) และโปรตีน A2M ของกุ้งกุลาดำสามารถจับกับโปรตีน Pm-synthenin ซึ่งมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV (Tonganunt และคณะ, 2005) จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าโปรตีน A2M มีการแสดงออกลดลงทั้งในเซลล์เม็ดเลือดและอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาบทบาทของโปรตีน A2M ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียของกุ้งกุลาดำ โดยทำการค้นหาโปรตีนในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งเกิดปฏิสัมพันธ์ได้กับ receptor binding domain ของโปรตีน A2M โดยใช้เทคนิค yeast two-hybrid screening ซึ่งจากการทดลองพบว่า receptor binding domain ของโปรตีน A2M สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้กับโปรตีน transglutaminase type II ส่วนปลาย C-terminus จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในกุ้งกุลาดำ ในปี 2005 โดย Chen และคณะ ระบุว่า transglutaminase type II เป็นโปรตีนที่พบได้ในเซลล์เม็ดเลือดซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการเกิด polymerization ของ clottable protein ในกระบวนการแข็งตัวของเลือด ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งโดยมีบทบาทช่วยลดการสูญเสียเลือด ช่วยดักจับและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ที่รุกรานกุ้งได้ จากผลการทดลองจึงทำให้คาดได้ว่าโปรตีน A2M น่าจะทำงานร่วมกับโปรตีน transglutaminase type II ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดเพื่อช่วยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบไหลเวียนเลือดของกุ้ง โดยจะทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน A2M ในระหว่างการสร้าง clot หลังจากกุ้งถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียเพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานดังกล่าวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A: Two prophenoloxidasases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 2009, 33:247-56.
- Armstrong PB: Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. Immunobiology 2006, 211:263-81.
- Bourchookarn A, Havanapan PO, Thongboonkerd V, Krittanai C. Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus monodon*. Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics 2008, 1784:504-11.
- Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol Rev 2004,198:116-26.
- Chai YM., Yu SS, Zhao XF, Zhu Q, Wang JX. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol 2010, 29:480-6.
- Chen MY, Hu KY, Huang CC, Song YL. More than one type of transglutaminase in invertebrates? A second type of transglutaminase is involved in shrimp coagulation. Dev Comp Immunol. 2005, 29:1003-16.
- Flegel TW: Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. Dev Comp Immunol 2007, 31:217 – 31.
- Jiravanichpaisal P, Miyazaki T, Limsuwan C: Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J Aquat Anim Health 1994, 6:27-35.
- Kiatpathomchai W, Jareonram W, Jitrapakdee S, Flegel TW. Rapid and sensitive detection of Taura syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods 2007, 146:125-8.
- Kiatpathomchai W, Jitrapakdee S, Panyim S, Boonsaeng V. RT-PCR detection of yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus monodon* using dried haemolymph spots. J Virol Methods 2004, 119:1-5.

- Liang Y, Cheng J-J, Yang B, Huang J. The role of F1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Virol J 2010, 7:144.
- Lin X, Kim Y-A, Lee BL, Söderhäll K, Söderhäll I. Identification and properties of a receptor for the invertebrate cytokine astakine, involved in hematopoiesis. Exp Cell Res 2009, 315:1171-80.
- Lin YC, Vaseeharan B, Ko CF, Chiou TT, Chen JC. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin (α 2-M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon*. Molecular Immunology 2007;44:1065-74.
- Phuoc LH, Corteel M, Nauwynck HJ, Pensaert MB, Alday-Sanz V, Van den Broeck W, Sorgeloos P, Bossier P: Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. Environ Microbiol 2008, 10:2718-727.
- Rattanarojpong T, Wang HC, Lo CF, Flegel TW: Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection. Proteomics 2007, 7:3809-14.
- Robalino J, Bartlett TC, Chapman RW, Gross PS, Browdy CL, Warr GW. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. Dev Comp Immunol. 2007, 31:539-47.
- Saulnier D, Haffner P, Goarant C, Levy P, Ansquer D, Sunaryanto A, Mariam A: Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 2000, 191:133-44.
- Tirasophon W, Roshorm Y, Panyim S. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. Biochem Biophys Res Commun. 2005, 334:102-7.
- Tonganunt M, Phongdara A, Chotigeat W, Fujise K: Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. J Biotechnol 2005,120:135-45.
- de la Vega E, Hall MR, Wilson KJ, Reverter A, Woods RG, Degnan BM: Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Physiol Genomics 2007, 31:126-138.
- Wang HC, Leu JH, Kou GH, Wang AH, Lo CF: Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. Dev Comp Immunol 2007, 31:672-86.

Yeh M-S, Lai C-Y, Liu C-H, Kuo C-M, Cheng W: A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. Fish Shellfish Immunol 2009, 26:49-55.

Zhang J, Li F, Jiang H, Yu Y, Liu C, Li S, Wang B, Xiang J. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in lymphoid organ of *Fenneropenaeus chinensis* response to *Vibrio anguillarum* stimulation. Fish Shellfish Immunol 2010, 29:186-94.

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Somboonwiwat K**, Chaikerasitak V, Wang HC, Lo CF, Tassanakajon A. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. Proteome Science 2010, 8:39 (online 13 July 2010).
2. Chaikerasitak V, **Somboonwiwat K**, Wang HC, Lo CF, Tassanakajon A. ATP synthase beta subunit, a highly responsive protein to *Vibrio harveyi*, is vital for the survival of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol (submitted).

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

ระดับชาติ

- บรรยาย

1. Somboonwiwat, K., Chaikerasitak, V., Wang, H., Lo, C., Tassanakajon, A. Proteomic identification of *Vibrio harveyi*-responsive proteins in *Penaeus monodon* hemocyte. The 35th Congress on Science and Technology of Thailand, 15-17 Oct, 2009, Chonburi, Thailand.
2. Chaikerasitak, V., Somboonwiwat, K., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon A. "Identification of binding partners of alpha-2-macroglobulin in the black tiger shrimp using yeast two-hybrid screening" 7th National Symposium on Marine Shrimp, 7-8 September 2010, Nakornsithammarat, Thailand.

- โปสเตอร์

1. Chaikerasitak, V., Somboonwiwat, K., Wang, H., Lo, C., Tassanakajon, A. Proteomic analysis of responsive proteins in lymphoid organ of *Vibrio harveyi* infected *Penaeus monodon*. The 35th Congress on Science and Technology of Thailand, 15-17 Oct, 2009, Chonburi, Thailand.

ระดับนานาชาติ

- บรรยาย

1. Chaikerasitak, V., Somboonwiwat, K., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon A. Yeast two-hybrid screening for identification of interacting proteins with alpha-2-macroglobulin in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. 15th Biological Sciences Graduate Congress, 15-17 December 2010, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.

- โพสต์เตอร์

1. Somboonwiwat, K., Chaikeeratisak, V., Tassanakajon, A. Identification of proteins differentially expressed in *Penaeus monodon* hemocyte in response to *Vibrio harveyi* infection. ISGAX, 22-26 June, 2009, Bangkok, Thailand.

ภาคผนวก

RESEARCH

Open Access

Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection

Kunlaya Somboonwiwat¹, Vorrapon Chaikeratisak¹, Hao-Ching Wang², Chu Fang Lo³, Anchalee Tassanakajon^{1*}

Abstract

Background: Viral and bacterial diseases can cause mass mortalities in commercial shrimp aquaculture. In contrast to studies on the antiviral response, the responses of shrimps to bacterial infections by high throughput techniques have been reported only at the transcriptional level and not at the translational level. In this study, a proteomic analysis of shrimp hemocytes to identify differentially expressed proteins in response to a luminous bacterium *Vibrio harveyi* was evaluated for its feasibility and is reported for the first time.

Results: The two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) patterns of the hemocyte proteins from the unchallenged and *V. harveyi* challenged shrimp, *Penaeus monodon*, at 24 and 48 h post infection were compared. From this, 27 differentially expressed protein spots, and a further 12 weakly to non-differentially regulated control spots, were selected for further analyses by the LC-ESI-MS/MS. The 21 differentially expressed proteins that could be identified by homologous annotation were comprised of proteins that are directly involved in the host defense responses, such as hemocyanin, prophenoloxidase, serine proteinase-like protein, heat shock protein 90 and alpha-2-macroglobulin, and those involved in signal transduction, such as the 14-3-3 protein epsilon and calmodulin. Western blot analysis confirmed the up-regulation of hemocyanin expression upon bacterial infection. The expression of the selected proteins which were the representatives of the down-regulated proteins (the 14-3-3 protein epsilon and alpha-2-macroglobulin) and of the up-regulated proteins (hemocyanin) was further assessed at the transcription level using real-time RT-PCR.

Conclusions: This work suggests the usefulness of a proteomic approach to the study of shrimp immunity and revealed hemocyte proteins whose expression were up regulated upon *V. harveyi* infection such as hemocyanin, arginine kinase and down regulated such as alpha-2-macroglobulin, calmodulin and 14-3-3 protein epsilon. The information is useful for understanding the immune system of shrimp against pathogenic bacteria.

Background

Shrimps are one of the most economically important species in aquaculture due to their high world-wide demand. With a gradually increasing experience and effort in the development of production technologies, they have become important export products for many countries along the Indo-Pacific coast. The domestic consumption of shrimp has also increased accordingly. Together, these have resulted in a rapid increase in the global shrimp production via aquaculture. Unavoidably,

the rise of large scale high density shrimp aquaculture industries has led to several problems in the management of shrimp diseases including pathogens.

The major current viral diseases are white spot syndrome and yellow head diseases, which are caused by white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV), respectively [1]. In addition, vibriosis is the major bacterial disease caused by bacteria in the genus *Vibrio* [2]. The outbreaks of these diseases have led to the near or total collapse of the shrimp farming industry throughout the world. Although viral infections typically have more deleterious effects on shrimp farm stocks, vibriosis can also cause mass mortalities of farmed shrimps [3]. In the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, vibriosis

* Correspondence: anchalee.k@chula.ac.th

¹Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

caused by *Vibrio harveyi*, a luminous bacterium, usually affects the animal at larval stages. It is considered as an opportunistic pathogen for juvenile and adult shrimps under environmental stress [2,3]. Moreover, the combined infection of pathogenic *Vibrio* spp. and viruses causes a higher and faster mortality rate than viral or bacterial infection alone [4]. Therefore, the elucidation of the shrimp immune responses to vibriosis is of great interest for the prevention and control of infectious diseases in shrimp aquaculture.

Thus far, the response of shrimps upon *Vibrio* infection has been reported only at the transcriptional level [5-7]. Indeed, several groups of *V. harveyi*-responsive genes in shrimps have been identified. They are genes coding for proteins that are involved in diverse cellular functions, for instance, the immune related proteins, metabolic enzymes, structural proteins, proteins involved in signaling and communication, and in apoptosis [6]. Of these, the immune genes are of prime interest. Nevertheless, more information is still needed to gain insight into the defense mechanisms of shrimps against bacterial invasion.

The shrimp hemocytes are the main site where immune defense components are released and the defenses against microbes take place. Besides the secretion of antimicrobial peptides that are considered as the first line of defense against pathogen infections, the other important shrimp defense systems include enzymes and proteins in the prophenoloxidase (proPO) activation and blood coagulation systems. To study in greater depth the immune and related components in the defense system of shrimps, many approaches have been applied. Genomic approaches, such as simple gene cloning, high throughput expressed sequence tag analysis, suppression subtractive hybridization, and others, are important tools for the identification of candidate genes involved in shrimp immunity [8-14]. Nevertheless, the full-genome sequence data of shrimps is seemingly necessary for a more complete search of immune-related proteins.

Recently, a few reports have indicated that proteomic based techniques are a useful alternative method of choice in the identification of shrimp immune-related proteins [11,15-17]. In these studies, differentially expressed proteins from shrimp tissues under hypoxia stress and various pathogenic conditions were examined and compared to those found in shrimps under normal states. Typically, the pathogenicity of viral infections has been the main focus of such studies. For example, the expression profile of proteins from the stomach of WSSV-infected *Litopenaeus vannamei* was determined using 2D-gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry [16]. Wu et al. [18] used two proteomic approaches, a shotgun 2D-LC-MS/MS and a cleavable

isotope-coded affinity tag, to study the differentially expressed cellular proteins from WSSV-infected shrimp epithelium. A 2D-LC-MS/MS approach has also been applied to explore the response of shrimps to WSSV infection in gill tissues [11].

Here, a proteomic analysis of shrimp hemocytes to elucidate the shrimp immune responses at the translational level upon bacterial challenge is reported for the first time. The hemocyte proteins of *P. monodon* whose expression changed upon *V. harveyi* infection were identified in order to explore the shrimp immune responses against bacterial infection. Then the expression patterns during the course of *V. harveyi* infection of some differentially expressed proteins were further assessed by western analysis and real-time RT-PCR. The results provide important information on shrimp immune responses against bacterial infection.

Results

Identification of differentially expressed proteins in hemocytes of *Vibrio harveyi* infected shrimp

A proteomic approach was used in this study to reveal the protein expression in shrimp hemocytes in response to *V. harveyi* infection. The total proteins extracted from the hemocytes of unchallenged and *V. harveyi*-challenged shrimps were separated using 2-DE. In preliminary work, the appropriate pH range for the first dimension isoelectric focussing (IEF) based separation of the hemocyte proteins was determined using a 13-cm IPG strip of pH 3 - 10. Since most of the protein spots were present in the pH range of 4 - 7 (data not shown), subsequent 2-DE resolutions utilised 13 cm IPG strips of pH 4 - 7 for better separation and resolution. The amount of protein and staining procedure used in the experiment were also empirically optimised. It was found that 200 and 700 µg protein samples were required for the optimal SYPRO Ruby and colloidal Coomassie Blue G-250 staining, respectively. Consequently, we separated 200 µg protein samples and stained the gels with SYPRO Ruby.

Under the appropriately set conditions, 200 µg of hemocyte protein samples, each from three individuals of unchallenged or *V. harveyi*-challenged shrimps at 24 or 48 h, were separated through 2-DE. Three gel replicates, representing nine individual shrimps, were analyzed at each time point. The gel images were compared and analyzed. The patterns of protein expression in unchallenged and *V. harveyi*-challenged shrimp hemocytes appeared largely similar but some clear differences in protein expression levels of certain protein spots were evident (Figure 1). These were grouped, in terms of their expression level relative to that in the control shrimps as significantly up-regulated, significantly down-regulated and 'constant' protein spots, as outlined in the

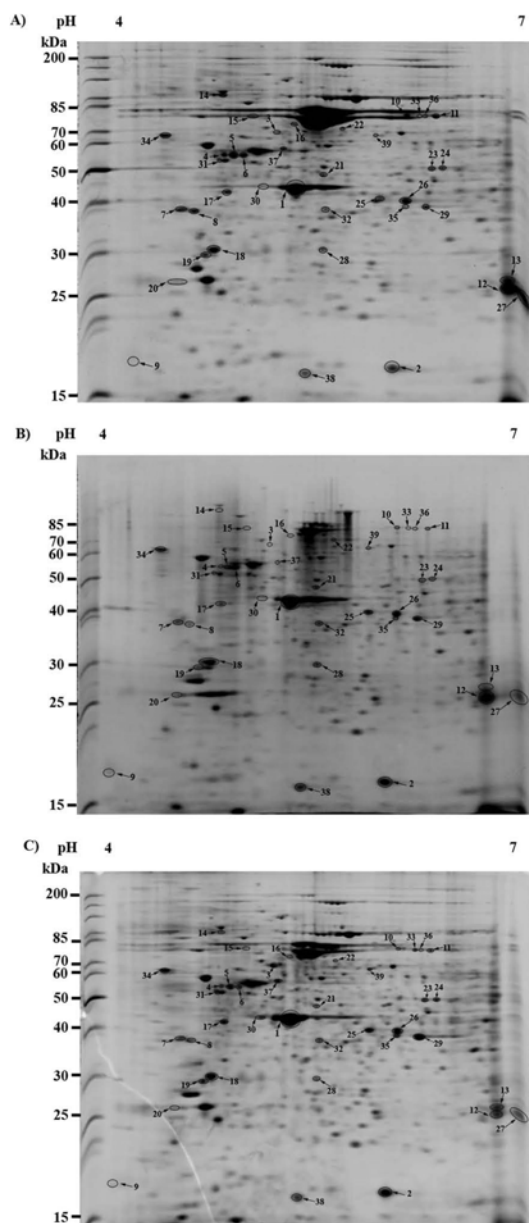


Figure 1 Representative 2-DE resolution of the protein spots of *Penaeus monodon* hemocytes with or without *Vibrio harveyi* challenge at 24 and 48 hpi. The hemocyte protein expression profile of (A) unchallenged shrimps was compared to that of *V. harveyi*-challenged shrimps at (B) 24 hpi and (C) 48 hpi. The 27 differentially expressed protein spots and a further 12 control spots selected are circled and numbered (see Table 1).

methods. Thirty-nine protein spots were excised for further analysis by the nano-LC-ESI-MS/MS (Figure 1). Of these, 10 spots were up-regulated, 17 were down-regulated and 12 ranged from weakly up-regulated or down-regulated (10) to no detectable difference (2) and were selected as the control constantly expressed protein spots (Figure 1). Nevertheless, 10 of these protein

spots were unable to be identified to annotated proteins, leaving just nine, twelve and eight annotated up-regulated, down-regulated and constant proteins, respectively (Table 1).

Differentially expressed hemocyte proteins after *V. harveyi* infection

The proteins showing significant changes in their expression levels upon *V. harveyi* infection are summarized in Table 1. The 21 identified proteins that varied in expression levels showed diverse annotated functions, including the immune related proteins (proPO-1, proPO-2, serine proteinase-like protein and hemocyanin), stress response protein (heat shock protein 90), serine proteinase inhibitor (alpha-2-macroglobulin), cytoskeletal proteins (actin, tubulin and twinstar), enzymes involved in energy (arginine kinase (AK)) and carbohydrate (tal1) metabolism, and proteins involved in nuclear cytoplasmic transport (GTPase Ran), and mediators of signal transduction (14-3-3 protein epsilon and calmodulin) or intracellular trafficking and secretion (karyopherin beta).

Among the proteins identified, the up-regulated proteins, the more acidic proPO-2 spot (spot 33) and actin 2 were found to be expressed only at 24 and 48 h post *V. harveyi* injection (hpi) but not in the unchallenged shrimps. Moreover, the translational level of hemocyanin in the hemocytes of *P. monodon* was dramatically increased by 6.88-fold at 48 hpi after an initial slight down-regulation (-1.35-fold) at 24 hpi. In addition, both the up-regulated AK spots revealed a late response, being strongly up-regulated at 48 hpi, (spots 29, 35).

For the down-regulated protein spots, alpha-2-macroglobulin was found to be down-regulated at 24 and 48 hpi such that it could only be detected in the unchallenged shrimps, whilst calmodulin and 14-3-3 protein epsilon were more transiently down-regulated in that they were not observed at 24 hpi but then expressed at 48 hpi at very low (calmodulin) or normal (14-3-3-epsilon) levels (Table 1). Finally, the importin homologue (spot 14) showed a strong earlier down-regulation, with a marked down-regulation at 24 hpi and then recovering partially by 48 hpi. The down-regulation of the two proPO-2 isoforms (spots) is discussed below.

Western blot analysis and validation of the protein expression levels

The proteomic data were preliminary validated by determining the protein expression level of hemocyanin by quantitative western blots. This protein was selected, along with the 'constant spot' protein of phosphopyruvate hydratase as a reference control, on the basis that in each case a specific antibody was available.

Table 1 Thirty nine selected 2-DE spots (proteins) from the hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged *Penaeus monodon*, resolved by 2-DE and identified by LC-nano ESI-MS/MS.

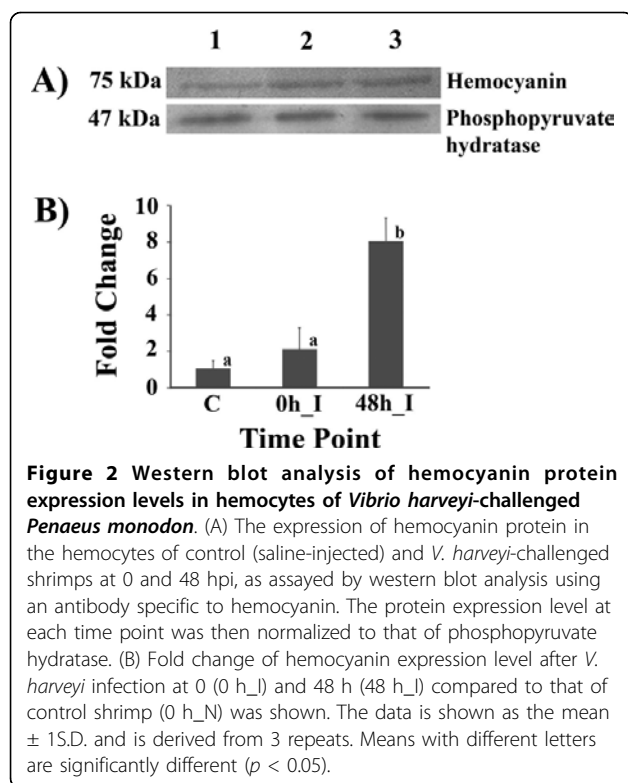
Spot no.	Predicted MW (Da)	Predicted pI	Protein hit	Mowse Score/no. of match peptides	Accession no.	Fold change*	
						24 h	48 h
Up-regulated protein spots							
33	78700	6.05	prophenoloxidase 2 [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	71/2	ABQ45957	U	U
30	41822	5.11	actin 2 [<i>Penaeus monodon</i>]	240/7	AAC78682	U	U
3	74934	5.27	hemocyanin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	99/4	CAA57880	-1.35	+6.88
16			unknown			-2.92	+4.1
35	40087	6.05	arginine kinase [<i>Penaeus monodon</i>]	485/13	AAO15713	+1.85	+4.09
29	40087	6.05	arginine kinase [<i>Penaeus monodon</i>]	704/32	AAO15713	+2.33	+3.16
2	17142	6.74	twinstar [<i>Drosophila melanogaster</i>]	150/8	NP_477034	+1.88	+1.20
37	49283	4.92	tubulin alpha chain [<i>Oncorhynchus keta</i>]	94/3	P30436	-1.38	+1.88
4	52810	5.08	serine proteinase-like protein [<i>Penaeus monodon</i>]	119/5	ABD62888	+1.69	-1.25
32	37134	6.73	transaldolase [<i>Bombyx mori</i>]	110/1	NP_001040544	+1.60	+1.58
Down-regulated protein spots							
20	32431	5.04	alpha-2-macroglobulin [<i>Penaeus monodon</i>]	59/1	AAX24130	D	D
9	16671	4.04	calmodulin [<i>Patinopecten</i> sp.]	54/3	0711223A	D	-13.89
19	29054	4.65	14-3-3 protein epsilon [<i>Danio rerio</i>]	114/5	NP_997770	D	+1.12
12			unknown			-1.08	-3.75
14	96846	4.73	karyopherin (importin) beta [<i>Nematostella vectensis</i>]	109/3	XP_001636221	-8.14	-3.21
8			unknown			-3.42	-2.70
36	78700	6.05	prophenoloxidase 2 [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	119/3	ABQ45957	-3.49	-2.64
11	78700	6.05	prophenoloxidase 2 [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	127/3	ABQ45957	-2.31	-2.87
7			unknown			-1.59	-2.73
13	24283	6.52	GTP-binding nuclear protein Ran (GTPase Ran) (Ras-like protein TC4) [<i>Brugia malayi</i>]	104/2	P38542	-1.52	-2.75
27			Unknown			-1.35	-2.39
6	52810	5.08	serine proteinase-like protein [<i>Penaeus monodon</i>]	84/2	ABD62888	-1.37	-2.42
10	78426	5.83	Prophenoloxidase-1 [<i>Penaeus monodon</i>]	973/20	AAM77689	-1.88	-2.32
31	56040	5.10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor [<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>]	411/7	Q25117	-2.06	-1.17
5	52810	5.08	serine proteinase-like protein [<i>Penaeus monodon</i>]	119/5	ABD62888	-1.92	-1.48
15	83278	4.89	heat shock protein 90 [<i>Metapenaeus ensis</i>]	484/17	ABR66910	-1.17	-1.59
25			Unknown			-1.40	-1.62
Constant protein spots							
38	28203	5.89	thymosin beta-11 [<i>Penaeus monodon</i>]	419/10	BI018085	+1.41	+0.98
34	46851	4.41	calreticulin [<i>Gallus gallus</i>]	82/3	AAS49610	-1.17	+1.48
28	31358	5.42	cytosolic manganese superoxide dismutase [<i>Penaeus monodon</i>]	421/12	AAW50395	+1.18	-1.50
26	40087	6.05	arginine kinase [<i>Penaeus monodon</i>]	103/3	AAO15713	+1.03	+1.16
24	47235	6.18	phosphopyruvatehydratase [<i>Penaeus monodon</i>]	452/9	AAC78141	+1.06	+1.01
17	32574	4.78	hypothetical protein LOC550536 [<i>Danio rerio</i>]	58/3	NP_001017838	+1.24	+1.12
18	32420	4.70	tropomyosin [<i>Locusta migratoria</i>]	305/17	P31816	+1.47	+1.06
1	41841	5.30	beta-actin [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	1083/80	AAG16253	+1.46	+1.32
39			Unknown			+1.12	+1.21
21			Unknown			-1.07	-1.36
22			Unknown			+1.21	+1.14
23			Unknown			-1.24	+1.19

* indicates the decrease in the spot intensity at a given time point after *V. harveyi* infection compared to that of normal shrimp.

+ indicates the increase in the spot intensity at a given time point after *V. harveyi* infection compared to that of normal shrimp.

U indicates the up-regulated protein spot detected only in the protein extracts of infected animals.

D indicates the down-regulated protein spot detected only in the protein extracts of normal animals.



The results, summarised in Figure 2, show a remarkable eight-fold increase in hemocyanin protein levels at 48 h post *V. harveyi* infection compared to that at 0 hpi. The western blot result seems to agree well with the proteomic results, where the expression of hemocyanin protein was increased by 6.88 fold (Table 1). Although this represents only a single verification, and is based on the somewhat reasonable assumption that phosphopyruvate hydratase protein levels do not change, the proteomic data is nevertheless deemed to be likely to be more or less acceptable.

Real-time RT-PCR of the differentially expressed protein genes

Besides expression at the post translational level, we determined the expression of certain genes of interest at the transcriptional level to see if they were related. The 14-3-3 protein epsilon and alpha-2-macroglobulin were interesting because their protein levels decreased significantly at 24 h after *V. harveyi* injection, and hemocyanin whose protein expression levels increased at 48 hpi, were chosen for the quantitative real-time RT-PCR analysis to evaluate their transcript expression. The temporal gene expression analysis was examined in *V. harveyi*-challenged *P. monodon* at various time points (0, 6, 24 and 48 hpi) and compared to that in the saline injected control shrimps. The β -actin gene was used as an internal control.

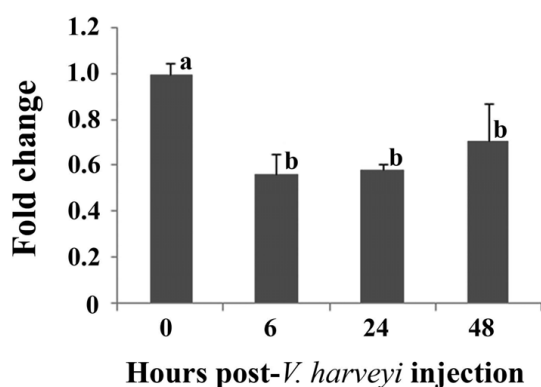
The alpha-2-macroglobulin transcription decreased significantly at 6 hpi to a 0.57-fold lower than that at 0 hpi and remained at this level at 24 hpi with a slight numerical but not statistically significant increase at 48 hpi to 0.71-fold lower than at 0 hpi, as illustrated in Figure 3A. The 14-3-3 protein epsilon transcription expression levels were significantly up-regulated, 1.72-fold over that of the control, by 24 hpi (Figure 3B). The hemocyanin transcript levels decreased significantly at 6 hpi to a 0.42 fold lower than that at 0 hpi and then returned to normal level at 48 hpi (Figure 3C). It was found that the levels of transcription of the alpha-2-macroglobulin gene were found to relate well with that of its translation products in that it was down-regulated upon *V. harveyi* infection, whilst the levels of hemocyanin and 14-3-3 protein epsilon transcripts were not corresponded with that of their translation products.

Discussion

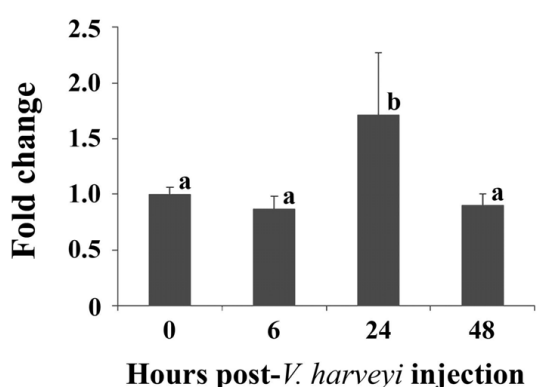
With advancing analytical techniques, proteomic analysis has become a new frontier of study in molecular biology in which the differences or changes in protein expression patterns of organs, cells or subcellular compartments can be readily elucidated to a high to a reasonable level of coverage. Under several circumstances, such studies can provide an understanding of the response of cells to various external factors. The analysis, generally, involves 2-DE in conjunction with mass spectrometry for protein separation and protein identification, respectively [19].

In this study, we used a proteomic approach to analyze the complex proteome of shrimp hemocytes to evaluate those proteins whose expression was significantly up-regulated or down-regulated after systemic challenge with the bacterial pathogen *V. harveyi*. Among these, hemocyanin (~75 kDa) which is the most abundant protein in the hemolymph, was found to be one of the prominent proteins, in accord with a previous report [20], even though an extensive washing of the hemocytes was performed to remove hemolymph prior to protein extraction and preparation. A total of 27 differentially expressed protein spots, 10 up-regulated and 17 down-regulated, plus 12 other spots that ranged from unchanged to only weakly altered expression levels as controls were selected and processed via mass spectrometry for annotation. From all 39 selected samples, however, 10 were not able to be identified from the annotated databases, leaving 9, 12 and 8 up-, down- and non-regulated protein spots, respectively, as annotated. Since the genome sequence of the shrimp is still unavailable, the origins of these 10 unidentified protein spots are uncertain although most of them are probably shrimp proteins. It is of note that several *Vibrio* sp. genomes, including *V. harveyi* and some of its phages, are

A) Alpha-2-macroglobulin



B) 14-3-3 protein epsilon



C) Hemocyanin

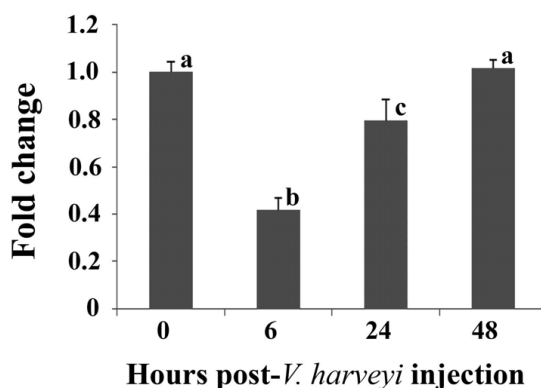


Figure 3 Time course analysis of alpha-2-macroglobulin, the 14-3-3 protein epsilon and hemocyanin gene transcript levels after *Vibrio harveyi* challenge, assayed using quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from hemocytes of saline-injected and *V. harveyi*-challenged shrimps collected at 0, 6, 24 and 48 hpi and the cDNA was then synthesized. The mRNA expression levels of (A) alpha-2-macroglobulin, (B) 14-3-3 protein epsilon and (C) hemocyanin upon *V. harveyi* challenge were determined using the beta-actin gene as an internal control. Data are shown as the mean $\pm$ 1S.D. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

available allowing, subject to equivocal caveats of their correct annotation and conserved nature across isolates, exclusion of their proteins and some of their phage encoded proteins too. Moreover, nine of the protein spots were annotated to just three proteins, that being three isoforms that differ in pI and or mass of each of proPO-2, AK and serine protease-like protein (Table 1). Assuming the more likely correct annotation of these different protein spots, rather than miss annotation of related proteins or conserved domains, these differences then probably arise from posttranslational modifications of a portion of the same protein population, and this is discussed below.

From the protein profiles obtained, those with altered protein expression levels (or posttranslational modifications) are expected to be involved directly or indirectly in shrimp immune responses. These proteins participate in various cellular functions, including immunity such as hemocyanin, prophenoloxidase, serine proteinase-like protein, heat shock protein 90 and alpha-2-macroglobulin as well as the cytoskeletal proteins including actin 2, twinstar and tubulin alpha chain. Among the immune proteins, those involved in melanization and phagocytosis were prominent suggesting the importance of these immune processes in antibacterial defence. In the previous studies, melanization of bacteria was shown to be a critical defense reaction in invertebrates and appears to be associated with phagocytosis [21,22].

The proPO activating system is an important immune response that produces melanin and reactive oxygen species to kill, trap and eliminate invading microorganisms. For invertebrates, this system is of the utmost importance in the immune response against bacterial infections. Two different proPOs, proPO-1 and proPO-2, which each play crucial roles in the proPO activating system, have been identified in several shrimp species including *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis* and *L. vannamei* [23-25].

In *P. monodon*, the proPOs were found to be essential against *V. harveyi* infection by gene knockdown experiments [24]. In this study, we found that the protein spots identified as proPO-1 and proPO-2 (1 and 3 spots, respectively, out of 39 protein spots) were the most dramatically differentially expressed immune related proteins upon *V. harveyi* infection. The three spots of proPO-2 (spot nos. 33, 36 and 11) were the same protein judging from their partial amino acid sequences and molecular masses, but presumably with different posttranslational modifications. proPO-2 (spot no. 33) was up-regulated from no detectable expression in control (uninfected) hemocytes, while the two other proPO-2 isoforms (spot nos. 11 and 36) were down-regulated, suggesting a possible pI altering posttranslational modification of the proPO-2 of spot 11 to 36 and 33.

In *L. vannamei*, the expression of the proPO-I gene in the hemocytes of *Vibrio alginolyticus* infected shrimps was found to be up-regulated at an early phase of infection (6 and 12 hpi), whereas that of proPO-II was reduced significantly at 3 hpi and subsequently increased at 12 hpi, and by 24 hpi, both proPO-I and proPO-II showed no difference in the expression as compared to the control shrimp [26]. This more or less corresponds to our observation where at the late phase of bacterial infection (24 and 48 hpi) the two spots of proPO-2 (spot nos. 11 and 36) and that of proPO-1 (spot no. 10) were found to have a low protein expression level. Considering the expression of the up-regulated form of the proPO-2 (spot no. 33) observed at the late phase of *Vibrio* infection, we speculated that it was the inactive form of proPO-2 that the shrimp produced to restore the level of proPO-2 in the hemocyte in order for the shrimp to promptly fight against another invasion, if any.

The serine proteinase-like protein (spot nos. 4, 5 and 6) was observed as differentially expressed protein spots. They were down-regulated as the infection progressed, albeit with a somewhat up-regulated expression level for spot no. 4 at 24 hpi. They were found to be identical proteins from the partial peptide sequences, and if so likely represent different pI changing posttranslational modifications. Their amino acid sequences matched the serine proteinase homolog 516 (SPH516) from *P. monodon*, which could interact with a putative metal ion-binding domain of the yellow head virus [27]. The SPH516 protein is nearly identical in sequence to the masquerade-like serine proteinase homolog, *PmMasSPH*. Amparyup et al. [28] reported that the *PmMasSPH* transcript in the hemocyte of *P. monodon* was up-regulated 24 h after *V. harveyi* injection. Therefore, spot no. 4, which showed corresponding expression levels at both the transcription and translation levels, may be the active form of this serine proteinase homolog. Recently, it was shown that the *PmMasSPH* protein was a multifunctional immune effector. The C-terminal SP-like domain of *PmMasSPH* possesses a hemocyte adhesion activity and binding activity to *V. harveyi* and lipopolysaccharide, the bacterial cell wall component. The N-terminal region exhibits an anti-Gram-positive bacteria activity. Moreover, the *PmMasSPH* protein also displays an opsonic activity upon bacterial clearance from the shrimp circulation [29]. Taken together these results support the likely role if not importance of SPH in the shrimp immune response to bacterial infection.

The other two up-regulated protein spots, nos. 29 and 35, were identified as AK, an enzyme important in cellular energy metabolism in invertebrates. The most significant up-regulation was found for AK spot no. 35. These three protein spots had identical peptide fragment

sequences. However, this later constantly expressed AK spot 26 was of a slightly higher MW than AK spots 29 and 35, which differ from each other in pI. Thus, these may represent separate alleles or isoforms under separate regulation and not simple interchanges of posttranslational modifications. Previously, the synthesis of AK in the stomach of *P. monodon* was shown not to be affected by WSSV infection at 48 h [16]. In contrast, AK up-regulation was observed in the gills of YHV-infected *P. monodon* [30]. In addition, AK protein levels in the plasma of *F. chinensis* exhibited the most significant changes, as assayed by 2-DE, at 45 min and 3 h after laminarin stimulation [17]. The up-regulation of AK protein levels likely indicates that energy was required in response to infection.

Alpha-2-macroglobulin (spot no.20) was detected only in unchallenged shrimp indicating that the protein was down-regulated upon bacterial challenge. Alpha-2-macroglobulin is a family of protease inhibitors that participates in innate immune system as a regulator of the proPO system [31]. Also it acts against invading parasites by inactivating and clearing the protease virulence factors of parasites. After trapping the target protease, alpha-2-macroglobulin and its bound protease are degraded in secondary lysosomes [32]. In *P. monodon*, alpha-2-macroglobulin has been also shown to have the ability to bind to Pm-syntenin whose transcript was up-regulated upon WSSV infection [33]. According to our result, alpha-2-macroglobulin protein was expressed only in the unchallenged shrimp while its transcript was still detectable even at lower level upon *V. harveyi* infection. We speculated that alpha-2-macroglobulin and its bound protease might be in the degradation process during 24 and 48 hpi which caused the disappearance of the protein on the 2DE-gel.

Heat shock proteins (HSPs) are ubiquitous and highly conserved among various organisms. They play roles in the stress response in animals by acting as molecular chaperones which help refolding the misfolded proteins. HSP 90, is a family of HSPs in which its family members are either constitutive or inducible genes. Apart from being an important cytoplasmic chaperone, HSP 90 is essential for many cellular processes such as cell proliferation, differentiation, and apoptosis [34,35]. HSP 90 has been currently identified in *P. monodon* and the expression analysis revealed that it was heat inducible gene [36]. Upon heat-killed *V. harveyi* challenge, the HSP 90 transcript level in gill was obviously induced as compared to those of saline-injected shrimp at 3, 12 and 24 hpi and appeared to be expressed at the normal level at 72 hpi [37]. However, the data on expression of HSP 90 in hemocyte of bacterial challenge shrimp is not available. Herein, proteomic data indicated that the level of expression of HSP 90 protein (spot no.15) in shrimp

hemocyte after *V. harveyi* challenge was unchanged at 24 hpi but slightly decrease at 48 hpi.

Cytoskeletal proteins, including actin 2 (spot no. 30), twinstar (actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin-like) (spot no. 2) and tubulin alpha chain (spot no. 37), were found to be up-regulated significantly upon *V. harveyi* infection, especially that for actin 2 that was up-regulated from no detectable expression in the control shrimp hemocytes. It is well-known that actin polymerization is required for phagocytic process [38], which are one of the important innate immune reactions in all multicellular organisms including shrimps. Indeed, it has been shown that semi-granulocytes and granulocytes are responsible for the phagocytosis of invading *V. alginolyticus* in the shrimp *Penaeus indicus* [39], and that this requires remodelling of the actin skeleton. Meanwhile, the actin dynamics are regulated by a complex mechanism through the actions of several actin-binding proteins. The ADF/cofilin is one of the essential actin-binding proteins that participate in actin filament assembly by enhancing the depolymerization of actin monomers and so accelerating the filament treadmill [40]. The significant increase in the production of actin2 and ADF/cofilin at 24 hpi that was observed with *V. harveyi* infection thus likely reflects the induction of phagocytosis in shrimp hemocytes in response to infection with *V. harveyi*.

The Ran GTPases are small G proteins that function to regulate nucleocytoplasmic transportation [41]. In shrimps, a Ran GTPase gene of *Penaeus japonicus* (PjRan) was reported to be up-regulated in WSSV resistant and WSSV-infected shrimps, implying its potential involvement in the shrimp antiviral immune response [42]. Very recently, it was found that Ran GTPase might help shrimps to combat viral infection via regulation of the hemocytic phagocytosis by interacting with an actin-associated molecular motor, the myosin light chain [43]. In contrast to the viral response, the expression of Ran GTPase protein (spot no. 13) upon *V. harveyi* challenge was noticed in this study to be reduced as the course of infection progressed. The reason why Ran GTPase protein expression was decreased in shrimp hemocytes at the late phase of bacterial infection remains unclear and in need of further investigation.

Conclusions

A proteomic analysis of shrimp hemocytes revealed several proteins whose expression levels were altered in response to *V. harveyi* invasion. These proteins were likely to be involved in various cellular functions, including immune functions, such as proPO-1, proPO-2, serine proteinase-like protein, hemocyanin, heat shock protein 90 and alpha-2 macroglobulin. Interestingly, among the immune-related proteins, those involved in

the proPO activating system and phagocytosis were dominant, implying a major role of these innate immune reactions in the antibacterial defense. The information provided here enhances our knowledge on the molecular responses of shrimps against pathogenic bacteria that will lead to a better understanding of the pathogenesis of vibriosis.

Methods

Shrimp and bacterial infection

For proteomic analysis and real-time RT-PCR, sub-adult *P. monodon* (approximately 3-months old, 15 - 20 g of live (wet) body weight) were obtained from the Thailand National Shrimp Improvement and Breeding Center, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) at Chaiya County, Suratthani Province, and from the Shrimp Quarantine and Broodstock and Larval Development Research Center at Walailuk University, Nakhon Si Thammarat Province, Thailand, respectively. They were acclimatized in aquaria at ambient temperature ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) in air-pumped circulated artificial seawater with a salinity of 15 ppt for at least 3 days before experimental use.

The shrimp pathogenic *V. harveyi* strain 639 was prepared as described by Ponprateep et al. [44]. Microbial challenge was carried out by intramuscular injection into the fourth abdominal segment of individual shrimps with a lethal dose (86.6% mortality within seven days) of 100 μl of live *V. harveyi* 639 (10^6 CFU) diluted in sterile saline solution (0.85% (w/v) NaCl). To confirm the presence of luminous bacteria in the *V. harveyi*-challenged shrimps but not in the unchallenged shrimp, the hepatopancreas lysate of each shrimp was streaked onto the tryptic soy broth agar plate (the selective media). After incubation at 30°C for overnight, the plates were observed for the luminous bacteria in the dark.

For the real-time RT-PCR and Western blot analysis, control shrimps were injected with bacteria-free normal saline solution but otherwise treated the same as the *V. harveyi* challenged shrimps.

Protein sample preparation

Hemolymph was collected from nine individual shrimps for each experimental group, either unchallenged or 24 and 48 h post *V. harveyi* challenge (hpi), using an equal volume of MAS solution (27 mM sodium citrate, 336 mM NaCl, 115 mM glucose and 9 mM EDTA, pH 7.0). Hemocyte was collected, extensively washed twice with MAS solution and then resuspended in lysis buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 0.2% (v/v) Triton X-100 and 50 mM DTT supplemented with $1 \times$ proteinase inhibitor mix (GE healthcare)). After that the supernatant was collected by centrifugation at $12,000 \times g$ at 4°C for 20 min and precipitated with a 3:1 (v/v) ice-cold

acetone/methanol mixture. The pellet was washed with cold acetone, and resuspended in sample buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS supplemented with 1× proteinase inhibitor mix). The soluble protein fractions from three individuals were pooled and kept at -80°C. Protein concentration was determined using a 2-D Quant Kit (GE healthcare).

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

A total of 200 µg of protein extract was mixed with rehydration buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS and 1% (w/v) bromophenol blue). Three IPG strips (nonlinear pH 4 - 7; 13 cm long) (GE healthcare) were used for each experimental group representing nine individuals per group. They were run simultaneously on an Ettan IPGphor II IEF system (GE healthcare). The strips were actively rehydrated for 16 h at 20°C and the IEF was continued using the following step voltage focusing protocol: 2 h each at 300 V, 500 V, 1000 V and 4000 V followed by 10 h at 8000 V.

The focused IPG strips were sequentially equilibrated in a SDS equilibration buffer containing 10 mg/ml DTT and 2.5 mg/ml iodoacetamide for 15 min each. Then, they were placed onto an SDS-PAGE (4% (w/v) acrylamide stacking gel, pH 6.8, and 12.5% (w/v) acrylamide separating gel, pH 8.8). After the second dimensional separation, the gels were fixed and stained with SyproRuby (Invitrogen) and then scanned using a Typhoon 9400 scanner (GE healthcare). The gel images were then analyzed using ImageMaster 2D Platinum software (GE healthcare). The spots were detected, matched across the gels and re-checked and edited manually to ensure the correctness. The percent volume (% vol), as the normalized value of the intensity volume of each spot to the total intensity volume of all spots detected on the gel, was statistically analyzed via Student's *t* test (*p* < 0.05). To identify the differentially expressed protein spots, spot intensities of infected groups were compared to those of normal groups and divided into three groups, in terms of their expression level relative to that in the control shrimps as; significantly up-regulated, significantly down-regulated and the weakly but not significantly or not detectably 'constant' protein spots. For this classification, the criterion for an up-regulated protein spot was that the % vol of the spot from the challenged shrimps was at least 1.5-fold higher than that of the unchallenged shrimps. For down-regulated protein spots; the % vol of the spot from the challenged shrimps to that of the unchallenged shrimps must be at least 1.5-fold lower. Spots that did not fall into either of these two categories, that is were only weakly changed in either direction or showed no change in expression level at all, were considered as the constantly expressed proteins.

Protein annotation

The differentially expressed protein spots were excised from the gel and subjected to in-gel trypsin digestion, as described by Wang et al. [16]. The tryptic peptides were analyzed by a nano-LC-ESI-MS/MS. The data obtained were searched against the NCBI protein and EST sequence databases using the MS/MS ion search tool of the MASCOT program. The parameters used for the MS/MS ion search were a peptide mass tolerance of 0.25 Da and up to one missed cleavage allowed. Methionine oxidation and cysteine carbamidomethylation were chosen as the variable modification parameters. The protein was annotated if significant hits, as defined by the Mascot probability analysis, were obtained. Moreover, the search results were always checked for confirmation with the predicted potential target protein's MW/pI values against those of the corresponding identified spot.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from the hemocytes of *V. harveyi*- and saline-injected control shrimps at 0, 6, 24 and 48 h post infection (hpi), as described by Ponprateep et al. [44]. At each time point, equal amounts of total RNA from three individual shrimps were pooled. Then, 1 µg of the pooled total RNA was reverse transcribed using RevertAID™ first strand cDNA synthesis kit (Fermentas).

Quantitative real-time RT-PCR was performed on an iCyclerQ™ Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories). Target genes, shown in Table 2, were amplified in triplicate in the reaction mixture containing 1 × Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas), an appropriate concentration of the specific primer pairs and optimised PCR amplification conditions, as noted in Table 2. The expression level of the target transcript was normalized to that of the internal control, the β-actin gene, and the relative expression ratio was determined according to Pfaffl [45]. Statistical analysis was performed using ANOVA and Post Hoc test with a *p* value < 0.05 being accepted as significant.

Western blot analysis

Five or 15 µg, for hemocyanin and, as an internal control, phosphopyruvate hydratase, respectively, of the pooled hemocyte protein from 20 individual unchallenged or *V. harveyi*-challenged shrimps at 0 and 48 hpi were separated on a 10% (w/v) acrylamide SDS-PAGE gel and then transferred onto nitrocellulose membranes. Hemocyanin and phosphopyruvate hydratase were each detected using a specific rabbit polyclonal antibody at a dilution of 1:10,000 for 1 h at 37°C and at 1:20,000 for 3 h at 65°C, respectively. These conditions were empirically optimised in the laboratory (data not shown). The

Table 2 List of primers and optimal PCR amplification conditions used for the quantitative Real-time RT-PCR

Gene	Primer name (Sequence (5'-3'))	Final concentration (nM)	Temperature (°C)/time (sec)		
			Denaturation	Annealing	Elongation
Alpha-2-macroglobulin	A2M_F (CCTCATATCCGGCTTCATCC)	100	95/10	60/20	72/10
	A2M_R (CCGTGAACCTCTCGATGTAG)	100			
14-3-3 protein epsilon	14-3-3_F (GTATCTTGCCGAGACCGCCACT)	200	95/10	63/15	72/20
	14-3-3_R (CAATGTCGCTGGCTGCCTGT)	200			
Hemocyanin	Hemocyanin_F [46] (AAGTGCTCGGAATCTTCGGTAA)	200	95/10	60/15	72/10
	Hemocyanin_R [46] (CCTGCCTCGATCTTTGCAA)	200			
Beta actin	Beta_F (GAACCTCTCGTTGCCGATGGTG)	200	95/30	60/30	72/45
	Beta_R (GAAGCTGTGCTACGTGGCTCTG)	200			

secondary antibody was AP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories). The positive band was detected by adding Lumi-Phos™ WB substrate (Pierce) and exposing the membrane to the X-ray film. The band intensity was quantified by ImageQuant™ TL (GE healthcare). The experiment was done in triplicate. The band intensity of the hemocyanin protein expressed at each time point was normalized to that of the internal control. Statistical analysis was performed by ANOVA and Post Hoc test, with a *p* value < 0.05 being accepted as significant.

Acknowledgements

We thank Dr. Robert D. J. Butcher for critical reading the manuscript. Proteomic mass spectrometry analyses were performed by the Core Facilities for Proteomics Research located at the Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taiwan ROC. This work was financially supported by grants from the Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and from the Thailand Research Fund (TRF) to Kunlaya Somboonwiwat. Support from Chulalongkorn University, through the Ratchadaphisek Somphot Endowment Grants for Development of New Faculty Staff, the Faculty of Science, Chulalongkorn University (Grant No.RES-A1B1-11) and from the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under PERFECTA, are acknowledged with thanks. The scholarship from TRF under the Royal Golden Jubilee Ph.D. program to Vorrapon Chaikeratisak is also acknowledged.

Author details

¹Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. ²Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, ROC. ³Institute of Zoology, College of Life Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

Authors' contributions

KS contributed to the experimental design, performed the experiment, data analysis and manuscript preparation. VC participated in performing the experiment, data analysis and helped to draft the manuscript. HCW provided technical assistance in the experimental part, help in data interpretation and drafting the manuscript. CFL took part in supervision, supported the cost of peptide analysis by mass spectrometry, provided the antibodies for all tests and drafted the manuscript. AT was responsible for experimental design, supervision and preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declared that they have no competing interests.

Received: 18 February 2010 Accepted: 13 July 2010
Published: 13 July 2010

References

- Flegel TW: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J Microb Biot* 1997, **13**:433-442.
- Jiravanichpaisal P, Miyazaki T, Limsuwan C: Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J Aquat Anim Health* 1994, **6**:27-35.
- Saulnier D, Haffner P, Goarant C, Levy P, Ansquer D, Sunaryanto A, Mariani A: Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 2000, **191**:133-144.
- Phuoc LH, Corteel M, Nauwynck HJ, Pensaert MB, Alday-Sanz V, Van den Broeck W, Sorgeloos P, Bossier P: Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. *Environ Microbiol* 2008, **10**:2718-2727.
- de Lorgeril J, Gueguen Y, Goarant C, Goyard E, Mugnier C, Fievet J, Piquemal D, Bachère E: A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Mol Immunol* 2008, **45**:3438-3445.
- Somboonwiwat K, Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A: Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *J Biochem Mol Biol* 2006, **39**:26-36.
- Wang B, Li F, Luan W, Xie Y, Zhang C, Luo Z, Gui L, Yan H, Xiang J: Comparison of gene expression profiles of *Fenneropenaeus chinensis* challenged with WSSV and *Vibrio*. *Mar Biotechnol (NY)* 2008, **10**:664-675.
- Dong B, Xiang JH: Discovery of genes involved in defense/immunity functions in a haemocytes cDNA library from *Fenneropenaeus chinensis* by ESTs annotation. *Aquaculture* 2007, **272**:208-215.
- Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW: Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol* 2001, **25**:565-577.
- Leu JH, Chang CC, Wu JL, Hsu CW, Hirono I, Aoki T, Juan HF, Lo CF, Kou GH, Huang HC: Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics* 2007, **8**:120.
- Robalino J, Carnegie RB, O'Leary N, Ouvre-Patet SA, de la Vega E, Prior S, Gross PS, Browdy CL, Chapman RW, Schey KL, Warr G: Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Vet Immunol Immunopathol* 2009, **128**:110-118.
- Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, Takahashi Y, Aoki T: Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol* 2002, **13**:69-83.
- Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A: Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis Aquat Organ* 2004, **61**:123-135.
- Tassanakajon A, Klinbunga S, Paunglarp N, Rimphanitchayakit V, Udomkit A, Jitrapakdee S, Sritunyalucksana K, Phongdara A, Pongsomboon S, Supungul P, et al: *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 2006, **384**:104-112.

15. Jiang H, Li F, Xie Y, Huang B, Zhang J, Zhang C, Li S, Xiang J: **Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress.** *Proteomics* 2009, **9**:3353-3367.
16. Wang HC, Leu JH, Kou GH, Wang AH, Lo CF: **Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection.** *Dev Comp Immunol* 2007, **31**:672-686.
17. Yao CL, Wu CG, Xiang JH, Dong B: **Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*.** *Fish Shellfish Immunol* 2005, **19**:317-329.
18. Wu J, Lin Q, Lim TK, Liu T, Hew CL: **White spot syndrome virus proteins and differentially expressed host proteins identified in shrimp epithelium by shotgun proteomics and cleavable isotope-coded affinity tag.** *J Virol* 2007, **81**:11681-11689.
19. Guerrero IC, Kleiner O: **Application of mass spectrometry in proteomics.** *Biosci Rep* 2005, **25**:71-93.
20. Phattara-orn C, Apichai B, Chu Fang L, Visith T, Chartchai K: **Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon Taura syndrome virus infection.** *Proteomics* 2007, **7**:3592-3601.
21. Mavrouli MD, Tsakas S, Theodorou GL, Lampropoulou M, Marmaras VJ: **MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1744**:145-156.
22. Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K: **Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization.** *Immunobiology* 2006, **211**:213-236.
23. Ai HS, Liao JX, Huang XD, Yin ZX, Weng SP, Zhao ZY, Li SD, Yu XQ, He JG: **A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes.** *Dev Comp Immunol* 2009, **33**:59-68.
24. Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A: **Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*.** *Dev Comp Immunol* 2009, **33**:247-256.
25. Gao H, Li F, Dong B, Zhang Q, Xiang J: **Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (proPO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*.** *Mol Biol Rep* 2009, **36**:1159-1166.
26. Yeh MS, Lai CY, Liu CH, Kuo CM, Cheng W: **A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion.** *Fish Shellfish Immunol* 2009, **26**:49-55.
27. Sriphajit T, Flegel TW, Senapin S: **Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus.** *Dev Comp Immunol* 2007, **31**:1145-1158.
28. Amparyup P, Jitvaropas R, Pulsook N, Tassanakajon A: **Molecular cloning, characterization and expression of a masquerade-like serine proteinase homologue from black tiger shrimp *Penaeus monodon*.** *Fish Shellfish Immunol* 2007, **22**:535-546.
29. Jitvaropas R, Amparyup P, Gross PS, Tassanakajon A: **Functional characterization of a masquerade-like serine proteinase homologue from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2009, **153**:236-243.
30. Rattanarajpong T, Wang HC, Lo CF, Flegel TW: **Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection.** *Proteomics* 2007, **7**:3809-3814.
31. Cerenius L, Söderhäll K: **The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.** *Immunol Rev* 2004, **198**:116-126.
32. Armstrong PB: **Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction.** *Immunobiology* 2006, **211**:263-281.
33. Tonganunt M, Phongdara A, Chotigeat W, Fujise K: **Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*.** *J Biotechnol* 2005, **120**:135-145.
34. Sreedhar AS, Kalmár É, Csermely P, Shen YF: **Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance.** *FEBS Lett* 2004, **562**:11-15.
35. Sreedhar AS, Csermely P: **Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: A comprehensive review.** *Pharmacol Ther* 2004, **101**:227-257.
36. Jiang S, Qiu L, Zhou F, Huang J, Guo Y, Yang K: **Molecular cloning and expression analysis of a heat shock protein (Hsp90) gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).** *Mol Biol Rep* 2009, **36**:127-134.
37. Rungrassamee W, Leelatanawit R, Jiravanichpaisal P, Klinbunga S, Karoonthaisiri N: **Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*.** *Dev Comp Immunol* 2010.
38. Kaplan G: **Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages.** *Scand J Immunol* 1977, **6**:797-807.
39. Jayasree S: **Identification of immune cells interacting with *Vibrio* spp. and its *in vitro* post-phagocytic killing mechanism of haemocytes in the penaeid shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards.** *J Fish Dis* 2009, **32**:359-365.
40. Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D: **Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility.** *J Cell Biol* 1997, **136**:1307-1322.
41. Gorlich D, Mattaj JW: **Nucleocytoplasmic transport.** *Science* 1996, **271**:1513-1518.
42. Han F, Zhang X: **Characterization of a ras-related nuclear protein (Ran protein) up-regulated in shrimp antiviral immunity.** *Fish Shellfish Immunol* 2007, **23**:937-944.
43. Liu W, Han F, Zhang X: **Ran GTPase regulates hemocytic phagocytosis of shrimp by interaction with myosin.** *J Proteome Res* 2009, **8**:1198-1206.
44. Ponprateep S, Somboonwiwat K, Tassanakajon A: **Recombinant anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 and the prevention of vibriosis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.** *Aquaculture* 2009, **289**:219-224.
45. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e45.
46. de la Vega E, Hall MR, Wilson KJ, Reverter A, Woods RG, Degnan BM: **Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*.** *Physiol Genomics* 2007, **31**:126-138.

doi:10.1186/1477-5956-8-39

Cite this article as: Somboonwiwat et al.: Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. *Proteome Science* 2010 **8**:39.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



1 **ATP synthase beta subunit, a highly responsive protein to *Vibrio harveyi*, is**
2 **vital for the survival of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.**

3
4
5 Vorrapon Chaikerasitak¹, Kunlaya Somboonwiwat¹, Hao-Ching Wang², Chu Fang Lo² and
6 Anchalee Tassanakajon^{1*}

7
8
9 ¹*Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of*
10 *Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

11 ²*Institute of Zoology, College of Life Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan,*
12 *R.O.C.*

13
14
15
16
17
18 *Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5414.

19 *E-mail address:* anchalee.k@chula.ac.th (A. Tassanakajon).

20
21 **KEYWORDS:** Lymphoid organ; Proteomics; *Penaeus monodon*; *Vibrio harveyi*

22 **Abstract**

23 Even though ATP synthase beta subunit is recognized as an essential protein serving
24 major roles in the respiratory system of various organisms, its extra biological functions are
25 now vastly and continuously identified. In this study, ATP synthase beta subunit in lymphoid
26 organ of *Penaeus monodon* was identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass
27 spectrometry as the highest up-regulated protein upon *Vibrio harveyi* infection at the early
28 phase of infection, 6 hour post infection. Quantitative real time RT-PCR showed a slight up-
29 regulation of the ATP synthase beta subunit transcript indicating the response to bacterial
30 infection controlled more significance at the protein expression level. Additionally, a full
31 length of *Pm*ATP synthase beta subunit was firstly shown here with an ORF of 1829 bp
32 encoding a 525 amino acid residues long shared a close similarity with other crustaceans.
33 Three essential conserved regions; nucleotide binding domains , DELSEED motif and the
34 ATPase alpha/beta signature domain, were disclosed. mRNA expression analysis showed that
35 ATP synthase beta subunit was expressed in various shrimp tissues. To investigate the
36 importance of this protein in shrimp, gene silencing was done. A high cumulative mortality of
37 ATP synthase beta subunit knockdown shrimp (73.33%) was observed within 5 days.
38 Interestingly, it appeared that the total hemocyte number of ATP synthase beta subunit
39 knockdown shrimp was dramatically reduced as compared to the control shrimp. Taken
40 together, this study revealed the importance of the ATP synthase beta subunit in shrimp
41 survival that might possibly be due to the involvement in hemocyte production.

42

43

44

45

46

47 **1. Introduction**

48 Over the last decades, aquaculture has been substantially expanded worldwide to meet
49 the higher consumption rate of the world populations. With the rapid improvement of
50 aquaculture innovations and technologies, shrimp aquaculture has become one of the most
51 important farming. Unfortunately, the outbreaks of several deadly pathogens, such as white
52 spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus (YHV), taura syndrome virus (TSV) and the
53 luminescent bacterium, *Vibrio harveyi*, cause the losses of shrimp production and sometimes
54 business collapses to the industry (Flegel, 2006). Study on shrimp immunity to gain the better
55 understanding in shrimp pathogenic responses would offer an alternative solution for
56 sustainable shrimp aquaculture.

57 The innate immune system is widely known as the major host defense mechanism in
58 invertebrates consisting of many cellular and humoral reactions (Söderhäll and Cerenius,
59 1992). In shrimp, the lymphoid organ (LO) is one of the most essential immune tissues
60 which plays the main function in seizing pathogen substances out of the circulating system
61 (Burgents et al., 2005). A key clearance mechanism of severe pathogens, particularly *Vibrio*
62 spp., attributes to the cooperation between hemocyte and the lymphoid organ (Burgents et al.,
63 2005).

64 Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry was continuously
65 applied to examine differentially expressed protein profiling in different shrimp tissues in
66 response to several pathogens such as WSSV, YHV, TSV and *V. harveyi* in order to identify
67 the responsive proteins (Bourchokarn et al., 2008; Chongsatja et al., 2007; Somboonwiwat
68 et al., 2010; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2010). Interestingly, one type of the
69 substantially altered proteins found in those 2-DE researches was a protein group related to
70 ATP synthase beta subunit including vacuolar ATP synthase subunit B or even ATP synthase
71 subunit beta, mitochondrial precursor.

Found in chloroplast thylakoid membranes and mitochondrial inner membranes of various organisms, ATP synthase is a key enzyme complex involving in the energy production that controls the flows of proton gradient across the membranes. The ATP synthases also called F_1F_0 -ATP synthases, comprise of 2 main parts; a soluble part (the F_1 sector) and a membrane bound part (the F_0 sector). The F_1 sector functions in ATP formation and hydrolysis utilizing its subunits such as α , β and the central stalk subunit (γ , δ and ϵ) while the F_0 sector is a proton channel made up from several subunits such as C ring, subunit a and peripheral stalk subunit (b, d, F_6 and OSCP) (Devenish et al., 2008; Walker and Dickson, 2006). Nevertheless, the roles of the F_1F_0 -ATP synthase as a cell surface receptor with diverse cellular activities on various mamalian cell types such as adipocytes, endothelium, hepatocytes and tumor cells have been reported (Champagne et al., 2006; Chi and Pizzo, 2006). In crustacean, F_1 -ATP synthase beta subunit located on membranes of the hematopoietic tissue of crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, was identified to function as the receptor of the crayfish prokineticin and astakine which are essential for the hemocyte differentiation and secretion (Lin et al., 2009). The F_1 -ATP synthase beta subunit in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, was also found to be involved in WSSV infection (Liang et al., 2010).

In this study, 2-DE was initially utilized to reveal the protein expression profile in the lymphoid organ, another important immune tissue, of *P. monodon* infected with *V. harveyi* at the early stage of infection so as to identify the responsive proteins. ATP synthase beta subunit was found as a highly responsive protein against the infection, thus, it was then further characterized for its functions in the shrimp immune defense against the bacterial infection.

97 **2. Materials and methods**

98 *2.1 Shrimp and V. harveyi challenge*

99 The healthy juvenile black tiger shrimp (approximately 1-3 or 20 grams body weight
100 for the gene knockdown experiment and protein expression analysis, respectively) obtained
101 from the Broodstock and Larval Development Research Center at Walailuk University,
102 Nakornsrihammarat Province, Thailand, was acclimatized in the artificial sea water at the
103 salinity of 15 ppt at the temperature approximately 28±1 °C, for at least 3 days before use.
104 The sea water was ceaselessly aerated by electric air pumps. *V. harveyi* challenge was carried
105 out as described by Ponprateep et al. (2009) (Ponprateep et al., 2009). In brief, shrimp were
106 intramuscularly injected at the second abdominal segment with 100 µl of the diluted *V.*
107 *harveyi*-TSB culture medium (10⁵ CFU) whereas the control shrimp was injected with 100 µl
108 of sterile 0.85% (w/v) NaCl solution.

109

110 *2.2 Two-dimensional electrophoresis (2DE) and protein identification*

111 To prepare the protein samples, the lymphoid organ was dissected from saline- and *V.*
112 *harveyi*-injected shrimp at 6 hour post injection (hpi). Total proteins of the tissues from each
113 individual was then extracted as described by Somboonwiwat et al. (2010) (Somboonwiwat
114 et al., 2010). The samples from 7 individuals were pooled and all 3 sets, 21 individuals, were
115 kept at -80 °C until use

116 Afterward, the protein expression profile of the lymphoid organ of *V. harveyi*-infected
117 shrimp were compared to that of the control shrimp to identify the differentially expressed
118 proteins. After quantification of proteins by 2D-Quant kit (GE healthcare), seven hundred
119 micrograms of each pooled protein sample were separated through the 2DE. Briefly, the IPG
120 strips, nonlinear pH 4–7, 13 cm long (GE healthcare) were used for the first dimension
121 separation using Ettan IPG phor 3 (GE healthcare) followed by 12.5% SDS-PAGE in the

second dimension. The gels were further stained with Colloidal Coomassie Brilliant Blue G250. The gel image was acquired using Imagescanner III (GE Healthcare) and the protein spots were analyzed using ImageMaster 2D Platinum 6.0 software (GE Healthcare). The percentage of intensity volumes (% vol) of each protein spot was the normalized value to the total intensity volume of all protein spots in each gel. The protein spots were matched across all gels. The comparative analysis was performed by evaluation the differences of % vol of each individual protein spot between the control and challenged groups with the statistically analyses via Student's t test ($p < 0.05$). Only the protein spots with considerably significant change (>3.0 folds) in all 3 gels were further excised and identified by a nano-LC-ESI-MS/MS mass spectrometry as described by Wang et al. (2007) (Wang et al., 2007).

2.3 Quantitative expression analysis of ATP synthase beta subunit transcript using real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from the dissected lymphoid organ of *V. harveyi* infected *P. monodon* at 0, 6, 24 and 48 hpi using TRI Reagent[®] (Molecular Research Center, Inc) following the manufacturer's protocol. An equal amount of the total RNA from three individual shrimp was pooled and 1 μ g of the pooled total RNA was used for cDNA synthesis using RevertAID[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Subsequently, quantitative real-time RT-PCR was performed using iCycler iQ[™] Real-Time Detection System (Bio-Rad). The ATP synthase beta subunit gene was amplified by the gene specific primers. The forward primer sequence was AGGCTCACGGTGGTTACTCT and the reverse primer sequence was CCTTGGAGGTGTCATCCTTCAG. The reaction contained 1 μ l of 10 fold diluted cDNA, 300 nM of forward and reverse primers and 1X Maxima[™] SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) in 20 μ l of total reaction volume. At each time point, the expression levels of the gene were normalized to the reference gene, elongation factor 1-

alpha (EF1- α) as described by Somboonwiwat et al. (2006) (Somboonwiwat et al., 2006). The amplification of the target gene was done in triplicate. The relative gene expression ratios of 6, 24 and 48 hpi were compared to that of zero time point so as to calculate the gene expression fold changes. One Way Analysis of Variance (ANOVA) and Post Hoc test (Duncan's new multiple range test) were eventually used to examine the significant changes in the data set with criteria of *P* value less than 0.05.

2.4 Amino acid sequence analysis of ATP synthase beta subunit

Amino acid fragments of the highest up-regulated protein derived from the nano-LC-ESI-MS/MS mass spectrometry were analyzed by MASCOT MS/MS Ions Search program (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS) and the best matched amino acid sequence was later searched against the *Penaeus monodon* EST database (<http://pmonodon.biotech.or.th/home.jsp>). Using the Genetyx program and the online SignalP3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen J.D. et al., 2004), an open reading frame (ORF), deduced amino acid sequences and the predicted signal peptide were analyzed. The deduced amino acid sequence was subsequently searched against the GenBank database using the BLASTx program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul and Lipman, 1990). According to the blast result, amino acid sequences of six best hit proteins were selected for multiple alignment analysis by the online ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Larkin et al., 2007). Signature motifs of those sequences were finally identified by the NCBI Conserved Domain Database website (Marchler Bauer et al., 2010) and the ExPASy Proteomics Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

2.5 Phylogenetic analysis

Obtained from the GenBank database, ATP synthase beta subunit amino acid sequences among various organisms were firstly aligned using the ClustalX program (Chenna et al., 2003). An evolutionary tree called phylogenetic tree was later produced by the PHYLIP (Phylogeny Inference Package) program with default settings of the neighbor-joining distance algorithm as described by Felsenstein J. (1993) (Felsenstein J., 1993).

2.6 Tissue distribution analysis

In order to investigate the mRNA expression of ATP synthase beta subunit in various shrimp tissues, semi-quantitative RT-PCR was performed. The first strand cDNA was firstly synthesized from DNaseI-treated total RNA of different tissues collected from unchallenged shrimp (n = 3) such as antennal gland, epipodite, eye stalk, gills, heart, hemocyte, hepatopancreas, intestine, lymphoid organ, stomach and hematopoietic tissue. The primer pair specific to ATP synthase beta subunit was used to amplify a 235 bp gene fragment. The EF1- α was used as the internal control. The PCR reactions contained 2 (for ATP synthase beta subunit gene) or 1 (for EF1- α) μ l of 10 folds diluted cDNA template, 100 nM dNTP, 100 nM of each gene specific primer, 1X RBC buffer and 1.25 unit of *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience) in a 25 μ l final volume. The gene amplification was carried out at 94°C for 5 min, 30 cycles of 94 °C for 30 sec, 57°C for 30 sec (for ATP synthase beta subunit) or 55 °C for 30 sec (for EF1- α) and 72°C for 30 sec, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were finally verified by running on a TBE-1.5% agarose gel electrophoresis and visualized by UV-transillumination after staining the gel with ethidium bromide.

2.7 In vivo ATP synthase beta subunit gene silencing

The *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotec.or.th/home.jsp>) was searched for the gene corresponded to the interesting protein, ATP synthase beta subunit. The primers

specific to the ATP synthase beta subunit were designed (Table 1) and used for amplification of the gene fragment from the unchallenged shrimp cDNA. The resulting gene fragment was cloned into T&A cloning vector (RBC Bioscience) and confirmed for the expected sequences by DNA sequencing. The recombinant plasmid was then used as a template for *in vitro* transcription to synthesize double-stranded RNA (dsRNA) using T7 RibomaxTM Express RNAi System (Promega) following the manufacture's instruction. The two PCR reactions for amplification of sense and anti-sense RNA strand templates amplification were separately performed using gene specific primers containing the T7 promotor sequences at the 5' end as shown in Table 1. On the other hand, a control dsRNA of the green fluorescent protein (GFP), was prepared as described by Amparyap et al. (Amparyup et al., 2009). The reaction was subsequently treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) to remove the DNA templates. Prior to use, the dsRNA was quantitated and verified for the integrity by running on TBE-1.5% agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometry, respectively.

The juvenile shrimp (about 3 grams body weight) were divided into 3 groups which were injected with ATP synthase beta subunit dsRNA, GFP dsRNA or sterile 0.85% NaCl. Ten micrograms per gram shrimp of dsRNA was intramuscularly injected at the second abdominal segment of juvenile shrimp. After 24 hours, shrimp hemocyte was individually collected in each experiment. Subsequently, the ATP synthase beta subunit transcript levels were determined by semi-quantitative RT-PCR. The relative expression ratios of the ATP synthase beta subunit transcripts were calculated by normalization its expression level to that of EF1- α .

To determine the cumulative mortality of ATP synthase beta subunit knock down shrimp, 10 shrimp from each experimental group were monitored for 5 consecutive days after dsRNA injection. The number of death shrimp was recorded. The experiment was done in triplicate and the data was represented by mean $\pm$ SD.

2.8 Total hemocyte counting of *ATP synthase beta subunit* knockdown shrimp

Hemolymph of sterile 0.85% NaCl, *ATP synthase beta subunit* dsRNA-injected shrimp or GFP dsRNA-injected shrimp was individually collected using 10% sodium citrate solution as an anticoagulant at 12 and 24 hpi. Total hemocyte number was later counted using hemocytometer. In each group, the data was represented by mean $\pm$ SD of the total hemocyte count calculated from three individuals.

3. Results

3.1 Up-regulation of *ATP synthase beta subunit* in *V. harveyi* infected *P. monodon* determined by two dimensional electrophoresis analysis and mass spectrometry

To better understand the shrimp immune system against bacterial infection, the protein expression profile of lymphoid organ of the shrimp, *P. monodon*, infected with *V. harveyi* was resolved. The lymphoid organ was collected from shrimp challenged with either 0.85% NaCl or 10^5 CFU *V. harveyi* at 6 hpi. During the infection period, the shrimp mortality was obviously high in the *V. harveyi* injected group while the control shrimp remained healthy. The appropriate quantity of proteins for 2-DE analysis visualized by colloidal coomassie blue staining was preliminary tested. Seven hundred micrograms proteins were found to be the minimum amount required for the analysis. Three strips of 700 μ g of total proteins pooled from seven individual shrimp at each time point tested were run. Therefore, a total of 21 individuals were used as representative for the analyses. Up to approximately 1,000 protein spots were detected but there were only 48 eligible protein spots, with the acceptable statistic criteria. They were divided into three groups comprising of up-regulated proteins with significant expression increase more than 3 fold compared to the control, down-regulated proteins with significant expression decrease less than 3 fold compared to the control and the others were constantly expressed proteins. Subsequently, a total of 17 eligible

protein spots which were constantly and highly altered expressed (Fig. 1), were selected for further analysis by LC-nano ESI-MS/MS. Of those, 13 spots were down regulated protein. The derived peptide sequences were then searched against the database and annotated (Table 2). Yet, 4 spots remained unknown.

Of those identified protein spots, cytoskeleton proteins (actin, actin2 and beta-tubulin) were quite prominent (Table 2). The rest of them were varied in biological functions which can be grouped as followed; energy balance (ATP synthase beta subunit), carbohydrate metabolism (triosephosphate isomerase), immune defense mechanism (transglutaminase), stress response (heat shock protein), chaperone function (protein disulfide isomerase), serine protease inhibitor (alpha-2-macroglobulin) and transcriptional regulation (calreticulin and tat-binding protein). Considering the changes in expression of those proteins, the proteins from lymphoid organ with the highest alteration upon *V. harveyi* infection were ATP synthase beta subunit (5.50 fold increase) and actin 2 (16.75 fold decrease). Because ATP synthase beta subunit was the highest up-regulated protein spot observed in the study; therefore, it was interesting to elucidate its involvement in shrimp immune response against *V. harveyi*.

3.2 Time-course mRNA expression analysis of *P.monodon* ATP synthase beta subunit

P.monodon ATP synthase beta subunit was analyzed at the level of gene expression after *V. harveyi* infection. The quantitative realtime RT-PCR analyses of this gene were performed in which EF1- α was served as an internal control. The changes in transcript expression level were monitored at various time points; 0, 6, 24 and 48 hpi. It was found that there was only a slight up-regulation of ATP synthase beta subunit transcript expression observed at 6 hpi (Fig. 2). According to the above results, it appeared that the response of *P.monodon* ATP synthase beta subunit was more significantly controlled at the translational level.

3.3 Sequence analysis of ATP synthase beta subunit

Searching against the *P. monodon* EST database using the best matched amino acid sequence obtained from the GenBank and amino acid fragments from the nano-LC-ESI-MS/MS mass spectrometry of the ATP synthase beta subunit as a query identified contig number 494 (CT494) as the best matched. Sequence analysis revealed that the ORF of *P. monodon* ATP synthase beta subunit contained 1578 bp encoding for 525 amino acid residues. Searching against NCBI Conserved Domain Database identified 5 conserved domains such as the walker motifs A and B of nucleotide binding domains, DELSEED motif and the carboxy and amino terminal domains. The ATPase alpha/beta signature domain was further identified by the ExPASy Proteomics Motif Scan (Fig. 3A). Also, *P. monodon* ATP synthase beta subunit showed the highest sequence similarity to that of *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis* accounting for 99.0% homology while *Procambarus clarkii* and *Pacifastacus leniusculus* had 92.0% and 91.0% sequence similarity, respectively. Amino acid alignment of *P. monodon* ATP synthase beta subunit with those of *P. leniusculus*, *P. clarkii*, *L. vannamei*, *M. Japonicus* and *F. chinensis*, the best match sequences obtained from the blast result, revealed that all predicted domains of ATP synthase beta subunit except the carboxy and amino terminus domains were highly conserved indicating their importance for the functions.

3.4 Phylogenetic analysis

ATP synthase beta subunit amino acid sequences of various organisms from the GenBank database were used to construct a phylogenetic tree. The phylogenetic tree (Fig. 3B) apparently illustrated that the ATP synthase beta subunit of crustaceans, including that of shrimp and mollusca, shared close ancestors and high similarity because they were grouped

in the same cluster. There were, in addition, two major groups of ATP synthase beta subunit, the insect and vertebrate groups shown in the tree.

3.5 Tissue distribution of P. monodon ATP synthase beta subunit transcript

The expressions of ATP synthase beta subunit gene in various shrimp tissues; antennal gland, epipodite, eye stalk, gills, heart, hemocyte, hepatopancreas, intestine, lymphoid organ, stomach and hematopoietic tissue, were examined. The tissue distribution shown in Fig. 4 revealed that the gene was expressed in all tissues tested.

3.6 Gene silencing of ATP synthase beta subunit and the effect on shrimp survival

To determine whether ATP synthase beta subunit was involved in shrimp immunity, RNAi-mediated gene silencing of the ATP synthase beta subunit was conducted. The intramuscular injection of 10 µg of ATP synthase beta subunit dsRNA into juvenile shrimp (approximately 3 g) resulted in the inhibition of ATP synthase beta subunit transcript expression by 86.86% as compared to that of control shrimp (Fig. 5A) and the gene suppression lasted for 5 days long (data not shown). The knockdown shrimp appeared weak and displayed a high mortality compared to the control shrimp. The percentage of the cumulative mortality of ATP synthase beta subunit gene-knockdown shrimp sharply rose to about 60% within a day and slightly increased to 73.33% over the 5 day studied period (Fig. 5B). On the contrary, more or less 10% cumulative mortality was noted in the control groups.

To further examine the effect of ATP synthase beta subunit on shrimp survival, the total hemocyte number of ATP synthase beta subunit-knockdown shrimp was counted at 0 and 12 h after dsRNA injection (Fig. 5C). The numbers of total hemocyte of the ATP synthase beta subunit knockdown shrimp was 8.63 and 1.47 million cells per milliliter as observed at 0 and 12 h after dsRNA injection, respectively while those of the GFP dsRNA

320 injected shrimp were 8.75 and 7.58 million cells per milliliter, respectively. The results
321 illustrated that the total hemocyte number of the silenced shrimp was considerable less than
322 those of the control shrimp by 5.2 fold. According to the result, a factor that might contribute
323 to the cause of the death of ATP synthase beta subunit-knockdown shrimp was the significant
324 loss of hemocytes. Taken together, these implied the prime importance of ATP synthase beta
325 subunit in shrimp survival.

327 **Discussion**

328 To investigate responses to *V. harveyi* challenge in shrimp, the proteomic approaches
329 based on two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectroscopy (MS) were applied.
330 Our previous study identified several hemocyte proteins involved in immune responses
331 against *V. harveyi* infection (Somboonwiwat et al., 2010). Here, we analyzed the protein
332 expression profiling of the lymphoid organ of *V. harveyi* infected shrimp at 6 hpi, an early
333 phase of infection. Highly altered proteins (more than 3 fold) after infection were selected
334 and identified. As described previously, most of interested protein spots were successfully
335 identified whilst the remaining proteins were still unknown. Some examined proteins
336 remained anonymous owing to information lacking of shrimp genome sequences. The known
337 proteins were varied in biological functions such as metabolism and biogenesis, immune
338 related proteins, chaperone function, serine protease inhibitor and transcriptional regulator
339 and cellular structure.

340 According to the 2-DE result, cytoskeleton proteins such as actin (spot no. 13), actin 2
341 (spot no. 5), beta-tubulin (spot no. 10 and 12) were found to be significantly down-regulated
342 after bacterial infection. The decline in cytoskeleton protein expression, particularly actin,
343 resulted in destabilization of microfilament network in the cell during apoptosis (Guenal et
344 al., 1997). It was evidenced that at the early phase of apoptosis, depolymerization of

microtubules, which are polymers of tubulins, is rapidly occurred (Moss et al., 2006). Bacterial invasion through the type III secretion system (T3SS), a type of pathological mechanisms, can trigger programmed cell death in the host cell (Grassmé et al., 2001). Likewise, *Vibrio cholerae* also exhibited effectors of the T3SS for penetrating the cell by alteration host actin cytoskeleton affecting to the cellular structure (Tam et al., 2007). In accordance with our observation, the mortality rate of the *V. harveyi* infected shrimp reached 50% at 6 hpi, likely indicated that the major reason of shrimp death is the widespread occurrence of *V. harveyi*. Our results implied that pathogenicity of *V. harveyi* might cause the rearrangement of structural components which affected the stability of cellular structures eventually mediating apoptosis.

Interestingly, an enzyme related to aerobic respiration, ATP synthase beta subunit (spot no. 6), was the highest up-regulated protein up to 5.5 fold among other identified proteins indicating the likely important function of the protein at the early phase against the bacterial infection. ATP synthase beta subunit, additionally, was always identified as a highly altered protein at translational expression level in response to various severe shrimp pathogens (Bourchookarn et al., 2008; Chongsatja et al., 2007; Liang et al., 2010; Somboonwiwat et al., 2010; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2010). These suggested not only the involvement of the protein in the respiration system but also in immune response against pathogen infections in which further investigation is still needed.

ATP synthases, found in the cell membrane of some bacteria, chloroplast thylakoid membrane and the inner membrane of mitochondria, play crucial roles in ATP operation in the cell (Devenish et al., 2008). Yet, most recently, other location and function of ATP synthase have been concerned as the external ATP synthase (eAS) which is resided on the surface of several cell types acting as cell-surface receptors. The subunit arrangement of eAS

might be distinct depending on cell types related to their specific biological roles (Champagne et al., 2006; Chi and Pizzo, 2006).

Found in the *P. monodon* EST database, the deduced amino acid sequence of a contig 494 (CT494) had three well conserved regions; nucleotide binding domains, DELSEED motif and the ATPase alpha/beta signature domain. Herein, ATP synthase beta subunit of the black tiger shrimp was firstly disclosed. The nucleotide binding domain consisted of 2 important domains called the motif A (GXXXXGKT/S) and the motif B (LLFID) serving a crucial role in ATP synthesis and hydrolysis (Wiese et al., 2006). According to crystal structure studies of the motif A, this motif forms a loop structure named P-loop around nucleotides. Utilizing lysine (K) and threonine (T) residues inside the motif, the loop will be able to interact with phosphate-oxygen atoms of the nucleotide (Ramakrishnan et al., 2002). This structure is stabilized by hydrogen bonds formed between the motif A and a highly conserved aspartate (D) residue within the motif B with a bound water molecule (Wiese et al., 2006). At the carboxyl terminal domain of the beta subunit, DELSEED motif was observed with a highly conserved figure among crustaceans. This motif was vastly supposed to be responsible for the binding to the gamma subunit (γ) causing the mechanical rotation of F_1 portion synthesizing ATP but several recent studies suggested new finding on its biological mechanisms (Hara et al., 2000; Noji et al., 1997). Because of a cluster of acidic and negatively charged amino acids within the motif, the DELSEED motif typically forms a bridge with the epsilon subunit (ϵ) making the enzyme inactive. Whenever the bridge is broken due to the ATP binding inside the beta subunit (β), the enzyme then becomes active (Hara et al., 2001). The ATPase alpha/beta signature sequences (P-S/A/P-L/I/V-D/N/Hx-{F}-{S}-S-x-S) also found at the carboxyl-terminus (Liu et al., 2007). In accordance with the phylogenetic tree, most of node values calculated from the neighbor-joining distance

algorithm were quite less indicating that primary amino acid sequences of ATP synthase beta subunit shared high conservation through genetic evolution.

In our study, ATP synthase beta subunit was the highest responsive protein in the shrimp *P. monodon* upon the bacterial infection. According to quantitative realtime RT-PCR, the mRNA levels of ATP synthase beta subunit was only slightly upregulated indicated the response to *V. harveyi* was controlled at the transcriptional level. Recently, Liang et al. (2010) reported the binding of white spot syndrome virus (WSSV) to ATP synthase beta subunit and showed that the recombinant protein could attenuate WSSV infection in the shrimp *L. vannamei*. To further elucidate the function of ATP synthase beta subunit in which its transcripts was found in all tissues examined, its transcripts were knocked down. The mass mortality of ATP synthase beta subunit knockdown shrimp was observed within 24 hours. These results implied that ATP synthase beta subunit is important for shrimp survival not only for responses to pathogen infection.

In the fresh water crayfish, *P. leniusculus*, ATP synthase beta subunit was identified as a receptor for astakine 1 exposed on the plasma membrane of hematopoietic tissue (Lin et al., 2009). Also, injection of *P. monodon* astakine, phylogenitically resembled to crayfish astakine 1, can induce cell proliferation in hematopoietic tissues (Hsiao and Song, 2010). Our results in the shrimp *P. monodon* also indicated that ATP synthase beta subunit might be essential in hemocyte production as the suppression of ATP synthase beta subunit caused a significant reduction of hemocyte and resulted in shrimp death.

In conclusions, we have successfully disclosed altered proteins in the lymphoid organ upon *V. harveyi* infection. Of those proteins, ATP synthase beta subunit was of interest. Gene silencing revealed that the presence of ATP synthase beta subunit was important to shrimp survival due to its possible involvement in hemocyte production.

Acknowledgements

This work was supported by the National Research University Project of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (FW643A), and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture. We also acknowledge the support from the Thailand Research Fund (TRF) to Kunlaya Somboonwiwat (Grant No. MRG5280119) as well as the support from Chulalongkorn University, through the Ratchadaphisek Somphot Endowment Grants for Development of New Faculty Staff, the Faculty of Science, Chulalongkorn University (Grant No. RESA1B1-11). Vorrapon Chaikerasak expresses his gratitude to the TRF for the fellowship under the Royal Golden Jubilee Ph.D. program.

458 **References**

- 459 Altschul, S.F., Lipman D.J., 1990. Protein database searches for multiple alignments. Proc.
460 Natl. Acad. Sci. U S A. 87, 5509-5513.
- 461 Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A., 2009. Two prophenoloxidasases are
462 important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. Dev.
463 Comp. Immunol. 33, 247-256.
- 464 Bourchoukarn, A., Havanapan, P., Thongboonkerd, V., Krittanai, C., 2008. Proteomic
465 analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus*
466 *monodon*. Biochim. Biophys. Acta. 1784, 504-511.
- 467 Bургентс, J.E., Burnett, L.E., Stabb, E.V., Burnett, K.G., 2005. Localization and
468 bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Dev.
469 Comp. Immunol. 29, 681-691.
- 470 Champagne, E., Martinez, L.O., Collet, X., Barbaras, R., 2006. Ecto-F₁F₀ ATP synthase/F1
471 ATPase: metabolic and immunological functions. Curr. Opin. Lipidol. 17, 279-284.
- 472 Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson,
473 J.D., 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic. Acids.
474 Res. 31, 3497-3500.
- 475 Chi, S.L., Pizzo, S.V., 2006. Cell surface F₁F₀ ATP synthase: a new paradigm? Ann. Med.
476 38, 429-438.
- 477 Chongsatja, P.O., Bourchoukarn, A., Chu, F.L., Thongboonkerd, V., Krittanai, C., 2007.
478 Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon
479 Taura syndrome virus infection. Proteomics. 7, 3592-3601.
- 480 Devenish, R.J., Prescott, M., Rodgers, A.J.W., Kwang, W.J., 2008. The Structure and
481 Function of Mitochondrial F₁F₀-ATP Synthases. Int. Rev. Cytol. 267, 1-58.
- 482 Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S.R., 2004. Improved Prediction of
483 Signal Peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol. 340, 783-795.
- 484 Flegel, T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical
485 perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture. 258, 1-33.
- 486 Grassmé, H., Jendrossek, V., Gulbins, E., 2001. Molecular mechanisms of bacteria induced
487 apoptosis. Apoptosis. 6, 441-445.
- 488 Guenal, I., Risler, Y., Mignotte, B., 1997. Down-regulation of actin genes precedes
489 microfilament network disruption and actin cleavage during p53-mediated apoptosis. J. Cell.
490 Sci. 110, 489-495.

491 Hara, K.Y., Kato Yamada, Y., Kikuchi, Y., Hisabori, T., Yoshida, M., 2001. The role of the
 492 betaDELSEED motif of F₁-ATPase: propagation of the inhibitory effect of the epsilon
 493 subunit. J. Biol. Chem. 276, 23969-23973.

494 Hara, K.Y., Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Kinosita, K.Jr., Yoshida, M., 2000. The role of
 495 the DELSEED motif of the beta subunit in rotation of F₁-ATPase. J. Biol. Chem. 275, 14260-
 496 14263.

497 Hsiao, C.Y., Song, Y.L., 2010. A long form of shrimp astakine transcript: Molecular cloning,
 498 characterization and functional elucidation in promoting hematopoiesis. Fish. Shellfish.
 499 Immunol. 28, 77-86.

500 Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) version 3.5c. Distributed by
 501 the author, Department of Genetics. Seattle: University of Washington

502 Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H.,
 503 Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins
 504 D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23, 2947-2948.

505 Liang, Y., Cheng, J.J., Yang, B., Huang, J., 2010. The role of F₁ ATP synthase beta subunit
 506 in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Virol. J. 7, 144.

507 Lin, X., Kim, Y.A., Lee, B.L., Söderhäll, K., Söderhäll, I., 2009. Identification and properties
 508 of a receptor for the invertebrate cytokine astakine, involved in hematopoiesis. Exp. Cell.
 509 Res. 315, 1171-1180.

510 Liu, L., Xie, L., Xiong, X., Fan, W., Chen, L., Zhang, R., 2007. Cloning and Characterization
 511 of an mRNA encoding F₁-ATPase beta-subunit abundant in epithelial cells of mantle and gill
 512 of pearl oyster, *Pinctada fucata*. Tsinghua. Sci. Technol. 12, 381-388.

513 Marchler Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott,
 514 C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson,
 515 J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V.,
 516 Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C.,
 517 Bryant, S.H., 2010. CDD: a Conserved domain database for the functional annotation of
 518 proteins. Nucleic. Acids. Res. 1-5.

519 Moss, D.K., Betin, V.M., Malesinski, S.D., Lane, J.D., 2006. A novel role for microtubules in
 520 apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. J. Cell. Sci. 119, 2362-2374.

521 Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K., 1997. Direct observation of the rotation of
 522 F₁-ATPase. Nature. 386, 299-302.

523 Ponprateep, S., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A., 2009. Recombinant anti-
 524 lipopolysaccharide factor isoform 3 and the prevention of vibriosis in the black tiger shrimp,
 525 *Penaeus monodon*. Aquaculture. 289, 219-224.

- Ramakrishnan, C., Dani, V.S., Ramasarma, T., 2002. A conformational analysis of walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein. Eng.* 15, 783-798.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish. Dis.* 2, 3-23.
- Somboonwiwat, K., Chaikheeratisak, V., Wang, H.C., Lo, C.F., Tassanakajon, A., 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. *Proteome. Sci.* 8, 39.
- Somboonwiwat, K., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A., 2006. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 26-36.
- Tam, V.C., Serruto, D., Dziejman, M., Briher, W., Mekalanos, J.J., 2007. A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell. Host. Microbe.* 1, 95-107.
- Walker, J.E., Dickson, V.K., 2006. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757, 286-296.
- Wang, H.C., Leu, J.H., Kou, G.H., Wang, A.H., Lo, C.F., 2007. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 672-686.
- Wiese, C., Hinz, J.M., Tebbs, R.S., Nham, P.B., Urbin, S.S., Collins, D.W., Thompson, L.H., Schild, D., 2006. Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination. *Nucleic. Acids. Res.* 34, 2833-2843.
- Zhang, J., Li, F., Jiang, H., Yu, Y., Liu, C., Li, S., Wang, B., Xiang, J., 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in lymphoid organ of *Fenneropenaeus chinensis* response to *Vibrio anguillarum* stimulation. *Fish. Shellfish. Immunol.* 29, 186-194.

Table 1 List of gene specific primers used for RNA interference (RNAi)

Primer name	Sequence (5'-3')
GFP_F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
GFP_R	TTACTTGTACAGCTCGTCCA
GFPT7_F	TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
GFPT7_R	TAATACGACTCACTATAGGTTACTTGTACAGCTCGTCCA
ATP_F	AGGCTCACGGTGGTTACTCT
ATP_R	CCTTGGAGGTGTCATCCTTCAG
ATPT7_F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGGCTCACGGTGGTTACTCT
ATPT7_R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCTTGGAGGTGTCATCCTTCAG

602 **Table 2** The lymphoid protein of *V. harveyi*- infected *P. monodon* identified by 2D-GE and
603 LC-nano ESI-MS/MS at 6 hpi
604

Spot no.	Predicted MW (Da)	Predicted pI	Protein hit	Mowse Score/no. of match peptides	Accession no.	Fold change
Up-regulated protein spots						
1	47598	5.06	PREDICTED : similar to Tat-binding protein-1 [<i>Apis mellifera</i>]	362/6	XP_392722	2.98
6	46181	4.90	ATP synthase beta subunit [<i>Haliotis rufescens</i>]	427/6	AAZ30686	5.50
Down-regulated protein spots						
2	46778	4.30	Calreticulin precursor [<i>Fenneropenaeus chinensis</i>]	378/11	ABC50166	-3.46
4	58480	4.70	PREDICTED : similar to heat shock protein 1, beta isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]	171/2	XP_392456	-3.13
5	41822	5.11	Actin 2 [<i>Penaeus monodon</i>]	664/27	AAC78682	-16.75
7	84660	5.51	Transglutaminase [<i>Penaeus monodon</i>]	213/6	AAL78166	-3.43
9	32431	5.04	Alpha-2-macroglobulin [<i>Penaeus monodon</i>]	252/2	AAX24130	-4.55
10	29673	8.24	Beta tubulin [<i>Penaeus monodon</i>]	588/4	ABU49604	-4.00
11	-	-	Unknown	-	-	-3.58
12	41475	5.67	Beta-tubulin [<i>Cryptocercus punctulatus</i>]	160/7	ABL11314	-4.05
13	41513	5.30	Actin	339/5	1101351C	-3.72
14	-	-	Unknown	-	-	-3.73
15	-	-	Unknown	-	-	-4.23
16	27484	5.55	Triosephosphate isomerase [<i>Fenneropenaeus chinensis</i>]	161/4	ABB81879	-8.65
17	-	-	Unknown	-	-	-3.65
Constant protein spots						
3	55049	4.64	Protein disulfide isomerase [<i>Litopenaeus vannamei</i>]	1194/33	ACN89260	1.38
8	41847	5.29	Actin, cytoskeleton 2 (LPC2)	442/7	P53466	1.45

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

Figure legends

Fig. 1. The 2D gel protein profiles representing differentially expressed proteins of the lymphoid organ of *P. monodon*. The protein expression profiles of *V. harveyi* challenged shrimp at 6 hours (A) was compared to that of sterile 0.85% (w/v) NaCl solution injected shrimp, control samples, at 6 hours (B). The labeled numbers on protein spots are corresponded with the numbers presented in Table 2.

Fig. 2. Time course analysis of ATP synthase beta subunit transcript in *P. monodon* after *V. harveyi* challenge. Lymphoid organ of shrimp infected with *V. harveyi* or injected with 0.85% NaCl was collected at 0, 6, 24 and 48 hpi. The mRNA expression levels of ATP synthase beta subunit were determined by quantitative real-time RT-PCR. The elongation factor 1 alpha gene (EF1- α) was used as an internal control. The data represents fold changes in ATP synthase beta subunit transcript levels of infected shrimp compared to the control shrimp. Means with different letters are significant different ($P < 0.05$).

Fig. 3. ATP synthase beta subunit sequence analysis. Amino acid sequence alignment of ATP synthase beta subunit from *P. monodon* with other crustaceans (A). The nucleotide-binding domains (a), the DELSEED motif (b) and the ATPase alpha (c)/beta (d) signature domain were shown in grey boxes. The carboxyl (I) and amino (II) terminal domains were shown in open boxes. Phylogenetic analysis of ATP synthase beta subunit (B). (highlighted in grey) *P. monodon* ATP synthase beta subunit and those from various related organisms; *Hydra magnipapillata* (Hm), *Bursaphelenchus xylophilus* (Bx), *Strongylocentrotus purpuratus* (Sp), *Glossina morsitans morsitans* (Gmm), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Drosophila yakuba* (Dy), *Acyrtosiphon pisum* (Ap), *Pediculus humanus corporis* (Phc),

Aedes aegypti (Aa), *Culex quinquefasciatus* (Cq), *Pinctada fucata* (Pf), *Pacifastacus leniusculus* (Pl), *Procambarus clarkii* (Pc), *Litopenaeus vannamei* (Lv), *Marsupenaeus japonicus* (Mj), *Fenneropenaeus chinensis* (Fc), *Gillichthys seta* (Gs), *Gillichthys mirabilis* (Gm), *Rattus norvegicus* (Rn), *Mus musculus* (Mm) and *Homo sapiens* (Hs) were analyzed. Out of total 1000 times produced by bootstrapping the original deduced amino acid sequences, the number of times occurring specific nodes with more than 500 times were present on those nodes. The GenBank accession number of the ATP synthase beta subunit nucleotide sequence is JF303646.

Fig. 4. Tissue distribution analysis of ATP synthase beta subunit transcripts. Various shrimp tissues comprising antennal gland, epipodite, eye stalk, gills, heart, hemocyte, hepatopancreas, intestine, lymphoid organ, stomach and hematopoietic tissue from unchallenged shrimp were analyzed for the expression of ATP synthase beta subunit mRNA using EF1- α as an internal control.

Fig. 5. Analysis of ATP synthase beta subunit knockdown shrimp. A) *In vivo* gene silencing of the ATP synthase beta subunit transcript levels in hemocyte of shrimp. Shrimp (approximately 2 grams fresh weight) were injected with 10 μ g of ATP synthase beta subunit dsRNA or 10 μ g of GFP dsRNA for 24 hours. The mRNA expression level of this gene was determined by semi-quantitative RT-PCR using gene specific primers. The EF1- α gene was used as an internal control. Each lane is representative of individual shrimp. B) The cumulative mortality assay of ATP synthase beta subunit-knockdown shrimp. The experimental shrimp was monitored for 5 days after injected with sterile 0.85% (w/v) NaCl solution or 10 μ g of GFP dsRNA for the control groups, and 10 μ g of ATP synthase beta subunit dsRNA for the gene silencing group. The assays of cumulative mortality of each

group (10 shrimp) were independently done in triplicate representing as the mean $\pm$ standard deviation. C) Total hemocyte number of ATP synthase beta subunit-knockdown shrimp after sterile 0.85% (w/v) NaCl, 10 μ g of GFP dsRNA or 10 μ g of ATP synthase beta subunit dsRNA injection for 0 and 12 hours. The total hemocyte count was done for three individual shrimp using hemacytometer. The data represents the mean $\pm$ standard deviation.

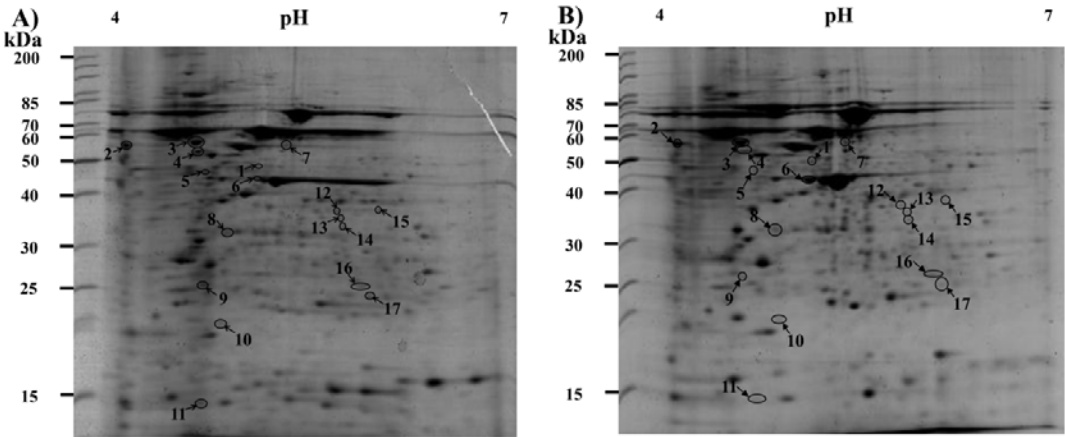


Fig.1.

ATP synthase beta subunit

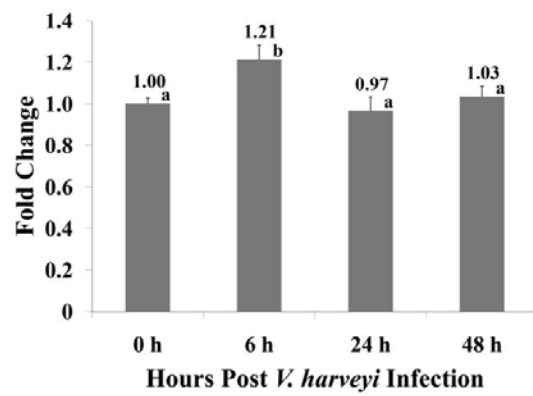


Fig. 2.

A)

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

I

```

MLGAAQRACSTILKAAKPAVVSKGLQNVGSKTLPALYTSQRNYAAKAEAAATQTGVPNGSV 60
MLGAAQRACSTILKAAKPAVVSKGLQNVGSKTVPALYTCQRNYAAKAEAAATQTGVPNGSV 60
MLGAAQRACSTILKAAKPAVVSKGLQNVGSKTVPALYTCQRNYAAKAEAAATQTGVPNGSV 60
MLGAAQRACSTILKAAKPAVVSKGLQNVGSKTLPALYTCQRNYAAKAEAAATQTGVPNGSV 60
MLGAAARACSSVLKAAKPAVASLSLQHGGAARTIPAVYAAQRNYAAKAEAAATQTGVPNGSV 60
MLGAAARACSSVLKAAKPAVASLSLQHGGAARTIPAVYTAHRNYAAKAEAAATQTGVPNGSV 60
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

```

VAVIGAVVDVQFDGELPPIILNALEVANRSPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLIRGN 120
VAVIGAVVDVQFDGELPPIILNALEVANRSPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLIRGN 120
VAVIGAVVDVQFDGELPPIILNALEVANRSPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLIRGN 120
VAVIGAVVDVQFDGELPPIILNALEVANRSPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLIRGN 120
VAVIGAVVDVQFDGELPPIILNSLEVENRTPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLIRGN 120
VAVIGAVVDVQFEGELPPIILNSLEVENRTPRLVLEVAQHLGENTVRTIAMDGTEGLIRGN 120
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

```

AVVDTGSPISIPVGPGLTGRININVIGEPIDERGPITPEHFSAIHAEAPDFVMSVEQEIL 180
AVVDTGSPISIPVGPGLTGRININVIGEPIDERGPITPEHFSAIHAEAPDFVMSVEQEIL 180
AVVDTGSPISIPVGPGLTGRININVIGEPIDERGPITPEHFSAIHAEAPDFVMSVEQEIL 180
AVVDTGSPISIPVGPGLTGRININVIGEPIDERGPITPEHFSAIHAEAPDFVMSVEQEIL 180
VVRDTGSPISIPVGPGLTGRININVIGEPIDERGPVPTFEFYSTHAEAPDFVMSVEQEIL 180
AVRDTGSPISIPVGPGLTGRININVIGEPIDERGPVPTFEFYSTHAEAPDFVMSVEQEIL 180
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

a

```

VTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREG 240
VTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREG 240
VTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREG 240
VTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREG 240
VTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREG 240
VTGIKVVDLLAPYSKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERTREG 240
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

b

```

NDLYHEMIESGVISLKDDTSKVS LVYGQMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQDVL 300
NDLYHEMIESGVISLKDDTSKVS LVYGQMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQDVL 300
NDLYHEMIESGVISLKDDTSKVS LVYGQMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQDVL 300
NDLYHEMIESGVISLKDDTSKVS LVYGQMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQDVL 300
NDLYHEMIESGVISLKDDTSKVS LVYGQMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQDVL 300
NDLYHEMIESGVISLKDDTSKVS LVYGQMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQDVL 300
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

```

FIDNIFRFTAQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKGSITSVQAIYVP 360
FIDNIFRFTAQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKGSITSVQAIYVP 360
FIDNIFRFTAQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKGSITSVQAIYVP 360
FIDNIFRFTAQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKGSITSVQAIYVP 360
FIDNIFRFTAQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKGSITSVQAIYVP 360
FIDNIFRFTAQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGSMQERITTTKKGSITSVQAIYVP 360
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

c

II

```

ADDLTDPA PATTFAHL DATTVLSRGIAELGIYPAVDPLDSISRIMDANIIGHEHYNVARS 420
ADDLTDPA PATTFAHL DATTVLSRGIAELGIYPAVDPLDSISRIMDANIIGHEHYNVARS 420
ADDLTDPA PATTFAHL DATTVLSRGIAELGIYPAVDPLDSISRIMDANIIGHEHYNVARS 420
ADDLTDPA PATTFAHL DATTVLSRGIAELGIYPAVDPLDSISRIMDANIIGHEHYNVARS 420
ADDLTDPA PATTFAHL DATTVLSRGIAELGIYPAVDPLDSISRIMDPNIIGAEHYNVARA 420
ADDLTDPA PATTFAHL DATTVLSRGIAELGIYPAVDPLDSISRIMDPNIIGAEHYNVARA 420
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

d

```

VQKILQDHKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYSGKFVS 480
VQKILQDHKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYSGKFVS 480
VQKILQDHKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYSGKFVS 480
VQKILQDHKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYSGKFVS 480
VQKILQDHKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYSGKFVS 480
VQKILQDHKSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARARKIQKFLSQPFQVAEVFTGYSGKFVS 480
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Mj ATP synthase β subunit
Fc ATP synthase β subunit
Pm ATP synthase β subunit
Lv ATP synthase β subunit
Pc ATP synthase β subunit
Pl ATP synthase β subunit

```

LPDTIKSFKEILAGKYDDLPEAAFYMQGSIEDVVEKAEQLAAQAS 525
LPDTIKSFKEILAGKYDDLPEAAFYMQGSIEDVVEKAEQLAAQAS 525
LPDTIKSFKEILAGKYDDLPEAAFYMQGSIEDVVEKAEQLAAQAS 525
LPDTIKSFKEILAGKYDDLPEAAFYMQGSIEDVVEKAEQLAAQAS 525
LEKTIASFKEILAGKYDYLPEAAFYMQGDIQDVLEKAEQLATQGS 525
LEKTIASFKEILAGKYDYLPEAAFYMQGDIQDVLEKAEQLATQGS 525
*****:*****.*.***:*.***:*****:*****.*.***

```

Fig. 3.

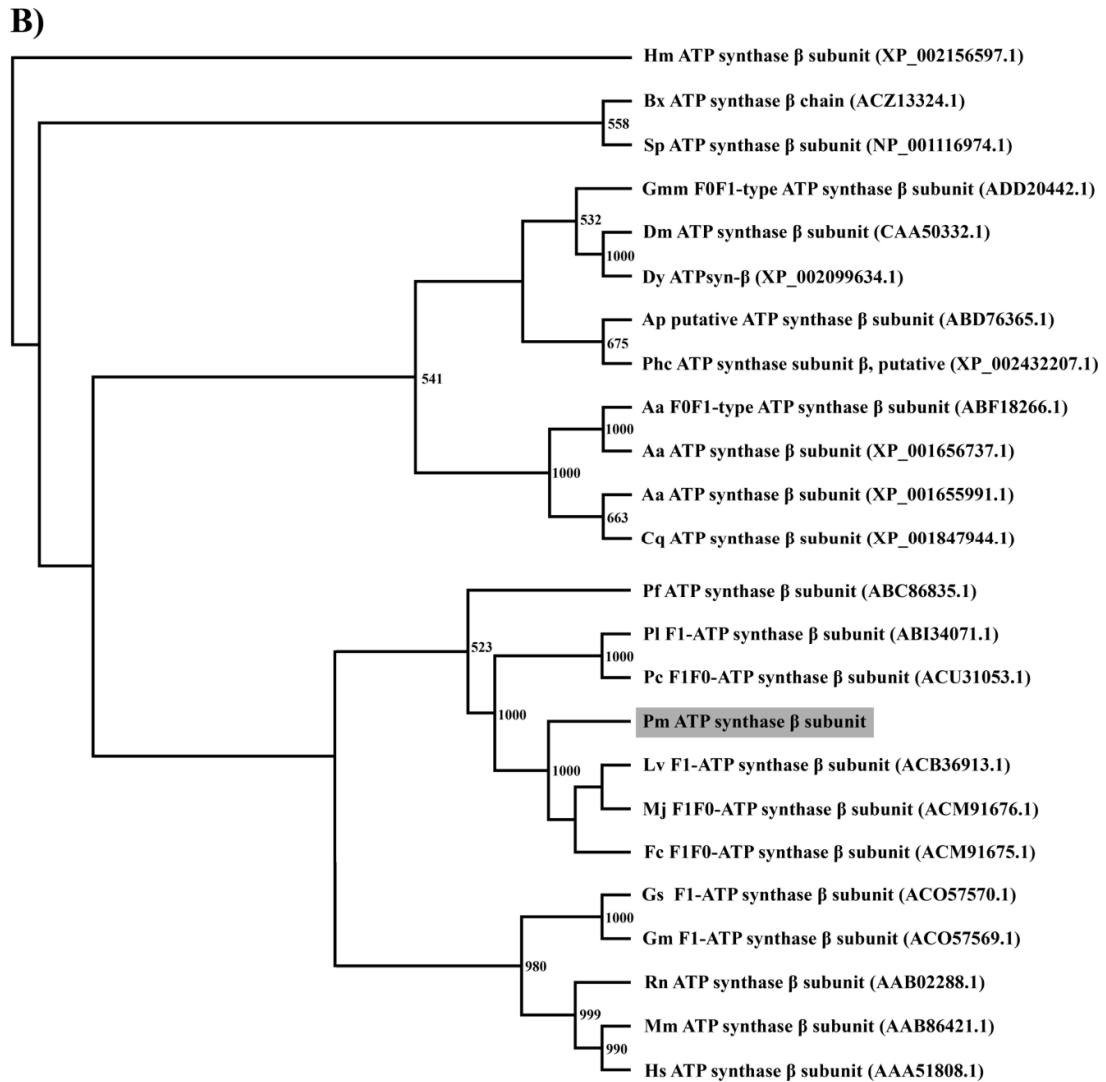


Fig. 3.

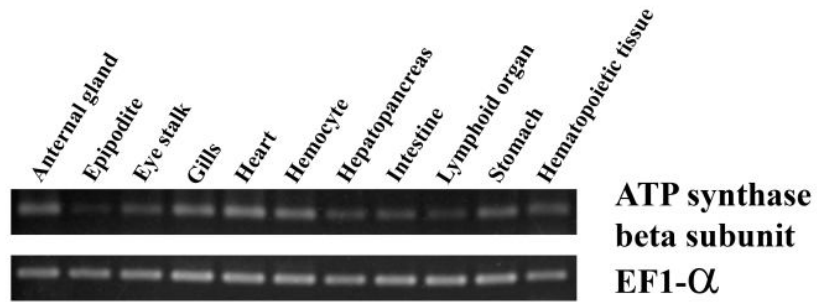


Fig. 4.

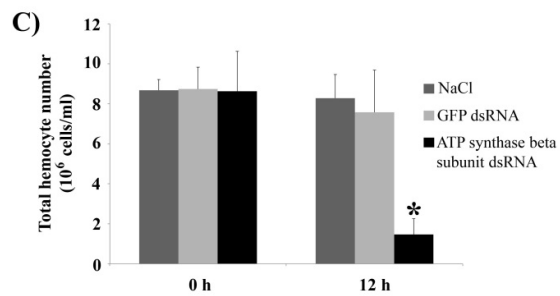
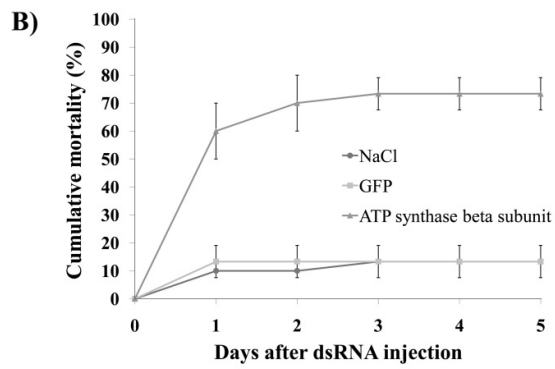
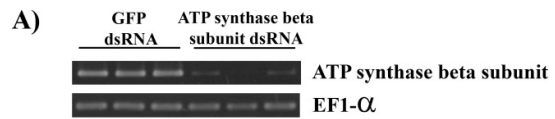


Fig. 5.