



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของจีน cDNA ที่สร้างโปรตีน
ในกลุ่มเดียวกับ molt-inhibiting hormone จากกิ้งกูดดำ

โดย

ผศ.ดร. อภินันท์ อุดมกิจ

กรกฎาคม 2543



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของชิ้น cDNA ที่สร้างโปรตีน
ในกลุ่มเดียวกับ molt-inhibiting hormone จากกิ้งกูดดำ

โดย

ผศ.ดร. อภินันท์ อุดมกิจ

กรกฎาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของชิ้น cDNA ที่สร้างโปรตีน
ในกลุ่มเดียวกับ molt-inhibiting hormone จากกิ้งกูดดำ

ผู้วิจัย

ผศ.ดร. อภินันท์ อุดมกิจ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์สกล พันธุ์ยิ้ม ผู้อำนวยการสถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในฐานะนักวิจัยที่ปรึกษาโครงการ และคณาจารย์ของสถาบันฯ สำหรับคำปรึกษา ความคิดเห็น และคำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างยิ่งตลอดการดำเนินงานวิจัย และช่วยให้โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จด้วยดี ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนันท์ อังคชนสมบัติ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนใน *E. coli*

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่พิจารณาให้ทุนวิจัย หลังปริญญาเอกแก่ผู้วิจัย และให้การสนับสนุนอย่างต่อเนื่องมาตลอดระยะเวลาของโครงการ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของฝ่ายสนับสนุนการวิจัยเชิงวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่อำนวยความสะดวกในด้านต่างๆมาโดยตลอด

อภิรักษ์ อุดมกิจ

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่: PDF/60/2540

ชื่อโครงการ: การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของชิ้น cDNA ที่สร้างโปรตีนในกลุ่มเดียวกับ molt-inhibiting hormone จากกิ้งกูดดำ

ผู้ดำเนินงานวิจัย: อภินันท์ อุดมกิจ

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

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

ระยะเวลา: 1 สิงหาคม 2540 ถึง 31 กรกฎาคม 2543

วัตถุประสงค์: 1. โคลนและศึกษาลักษณะของ cDNA ที่สร้างฮอร์โมนในกลุ่มเดียวกับ molt-inhibiting hormone (Pem-CMG) จาก กิ้งกูดดำ
2. ทำการแสดงออกของ เปปไทด์ Pem-CMG จาก cDNA ที่โคลนได้ใน *Escherichia coli*

วิธีการทดลอง: ใช้เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) ในการโคลนชิ้น cDNA และทำการแสดงออกของชิ้น cDNA ใน *E. coli* โดยใช้ pET3a เป็น expression vector หลังจากนั้นจึงทำการละลาย และแยกบริสุทธิ์โปรตีนโดย reverse-phase HPLC

ผลการทดลอง: ทำการโคลนชิ้น cDNA สำหรับเปปไทด์ 3 ชนิดคือ Pem-CMG1 Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 ลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทั้ง 3 ชนิด ในส่วนของ mature peptide มีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 93% การแสดงออกของชิ้น cDNA ส่วนที่เก็บรหัสทั้งสายและส่วนที่เก็บรหัสเฉพาะ mature peptide สำหรับ Pem-CMG1 พบว่าให้โปรตีนที่อยู่ในรูปของ inclusion เมื่อตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N ของโปรตีนที่แสดงออกจากชิ้น cDNA ทั้งสองพบว่ามีลำดับกรดอะมิโนตรงกับที่ถอดรหัสได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ในส่วนที่เก็บรหัสเฉพาะ mature peptide ของ Pem-CMG1 สามารถละลายได้ใน 6M urea การแยกบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยใช้ JUPITER 5u C18 column (250 x 6.6 mm, Phenomenex) สามารถกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนส่วนใหญ่ออกได้

วิจารณ์ผล: ชิ้น cDNA สำหรับเปปไทด์ 3 ชนิดคือ Pem-CMG1 Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 ที่โคลนได้จากงานวิจัยนี้ สามารถถอดรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงและมีลักษณะที่สำคัญของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH โปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ของ Pem-CMG1 อยู่ในรูปของ inclusion ซึ่งต้องผ่านขั้นตอนในการละลายและการทำ refolding เพื่อให้ได้โปรตีนที่อยู่ใน conformation ที่ถูกต้องและทำหน้าที่ได้ การแยกบริสุทธิ์โดย reverse-phase HPLC เพียงหนึ่งขั้นตอนในการทดลองนี้สามารถกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนส่วนใหญ่ออกไปได้ อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ได้มาอาจจะต้องผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับนำไปใช้ทดสอบหน้าที่ของโปรตีนนั้น

ข้อเสนอแนะ: เปปไทด์ Pem-CMG1 ที่แสดงออกใน *E. coli* ต้องผ่านกระบวนการต่างๆเช่น การละลาย การทำ refolding และการแยกบริสุทธิ์อีกหลายขั้นตอน เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์

เพียงพอและอยู่ใน conformation ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปทดสอบหน้าที่ การแสดงออกของ Pem-CMG1 ใน expression system ของ eukaryote เช่น yeast จะช่วยให้โปรตีนที่มีการ fold อยู่ใน conformation ที่เหมาะสม และเมื่อใช้ expression system ที่มีการหลั่งโปรตีนที่แสดงออก ออกมานอกเซลล์ ก็จะช่วยลดขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ให้น้อยลงอีกด้วย

Abstract

Project Code: PDF/60/2540

Project Title: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding molt inhibiting hormone-like peptide from *Penaeus monodon*

Investigators: Apinunt Udomkit

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University

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

Project Period: 1st August 1997 – 31st July 2000

Objectives:

1. To clone and characterize cDNAs that encode molt-inhibiting hormone related peptides (Pem-CMG peptides) from *Penaeus monodon*.
2. To express the Pem-CMG peptide from the cloned cDNA in *Escherichia coli*.

Methodology:

cDNAs encoding Pem-CMG peptides were cloned from *P. monodon*'s eyestalk RNA using Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) strategy. The coding region for Pem-CMG1 peptide was subcloned into pET3a expression vector, and expressed in *Escherichia coli*. The expressed product was solubilized and was purified by reversed phase HPLC.

Results:

Three cDNAs coding for Pem-CMG1, Pem-CMG2 and Pem-CMG3 peptides were cloned. The translated amino acid sequences in the mature peptide region of the three Pem-CMG peptides were more than 93% identical. A coding sequence for the full-length and the mature peptide region of Pem-CMG1 were expressed in *E. coli*. The amino acid sequence at the N-terminal of expressed peptides were determined and confirmed that they were expressed from Pem-CMG cDNA. The expressed products occurred as insoluble inclusion body. This inclusion could be solubilized with more than 50% solubility in 6M urea. The expressed Pem-CMG1 peptide was partially purified. After a single round of reverse phase HPLC using JUPITER 5u C18 column (250 x 6.6 mm, Phenomenex), most of the contaminated proteins were removed.

Discussion / Conclusion:

The cDNAs encoding peptide hormones in CHH/MIH/GIH family, so-called Pem-CMG peptides, were successfully cloned from *P. monodon*. The translated amino acid sequences from Pem-CMG1, Pem-CMG2 and Pem-CMG3 cDNA revealed that they were highly similar and possessed all characteristics of other peptides in the same family previously characterized in several crustacea. Since Pem-CMG1 peptide was expressed in

E. coli as insoluble inclusion body, appropriate solubilization and refolding methods would be needed in order for the Pem-CMG1 peptide to be in biologically active conformation. Single step purification of solubilized Pem-CMG1 peptide could get rid of most of the contaminated proteins. However, further purification steps should be conducted so as to get the Pem-CMG1 peptide with higher purity. The purified Pem-CMG1 protein could then be used in biological activity assay in order to determine the function of this peptide.

Suggestions / Further Implication / Implementation:

The Pem-CMG1 peptide expressed in *E. coli* needs several downstream processes for solubilization, refolding and purification before the assay for biological activity of the peptide could be done. Using expression system in eukaryotes such as yeast may help the expressed peptide to fold in the conformation that is appropriate for its function. The use of secretion expression system would also help improve both the yield and the purity of the expression product.

Executive summary

บทนำ

กลุ่มของเปปไทด์ฮอร์โมนซึ่งสร้างมาจาก X organ-sinus gland complex ในบริเวณก้านตาของสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชีย และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของรังไข่ประกอบด้วยฮอร์โมนสามชนิด ได้แก่ crustacean hyperglycemic hormone (CHH) ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด molt-inhibiting hormone (MIH) ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการลอกคราบ และ gonad-inhibiting hormone (GIH) ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ มีผู้ศึกษาฮอร์โมนในกลุ่มนี้ทั้งในระดับของเปปไทด์และระดับนิวคลีโอไทด์ในครัสเตเชียหลายชนิด พบว่าโครงสร้างของฮอร์โมนทั้งสามชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฮอร์โมนกลุ่มนี้ในกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย การศึกษาฮอร์โมนกลุ่มนี้ โดยการโคลนนิ่ง cDNA และทำการแสดงออกจาก recombinant cDNA ที่โคลนได้นั้น สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอนาคต เช่นการสร้าง antibody ต่อ GIH ที่แสดงออกใน system ที่เหมาะสม อาจนำไปใช้ในการเร่งให้แม่พันธุ์กุ้งมีการวางไข่แทนการตัดก้านตาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ทำให้สามารถใช้แม่พันธุ์กุ้งที่ต้องจับจากธรรมชาติและมีราคาแพง ได้อย่างคุ้มค่า เนื่องจากการตัดก้านตาเพื่อทำลายแหล่งผลิต GIH เพื่อที่จะกระตุ้นการวางไข่นั้นโดยทั่วไปจะทำเพียงครั้งเดียว แต่การใช้ antibody ที่จำเพาะ จะไม่ส่งผลกระทบต่อสมดุลของฮอร์โมนชนิดอื่น และอาจใช้กระตุ้นการวางไข่ได้หลายครั้งจากแม่กุ้งหนึ่งตัว

วิธีการทดลอง

1. โคลนนิ่ง cDNA ที่สร้างฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH (Pem-CMG) จากกุ้งกุลาดำ โดยใช้วิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่พบในฮอร์โมนกลุ่มนี้
2. นำชิ้น cDNA ที่โคลนได้เข้าสู่ pUC18 เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่โคลนได้
3. นำชิ้น cDNA ที่โคลนได้เข้าสู่ pET3a expression vector เพื่อทำการแสดงออกใน *Escherichia coli*
4. วิเคราะห์โปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ของ Pem-CMG โดย SDS-PAGE และตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N โดยการหาลำดับ N-terminal sequencing
5. ศึกษาการละลายของ inclusion ของโปรตีนที่แสดงออก และทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี reverse-phase HPLC

ผลการทดลอง

1. สามารถโคลนขึ้น cDNA ได้สามชนิดจากงููกูลาดำ (Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3)
2. ลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 มีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 93% และมีความคล้ายคลึงกับฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH ของครัสเตเชียชนิดอื่นๆ ระหว่าง 35-50%
3. ขึ้น cDNA ส่วนที่เก็บรหัสทั้งสายและขึ้น cDNA เฉพาะส่วนที่เก็บรหัสสำหรับ mature peptide ของ Pem-CMG1 ถูกนำเข้าสู่ pET3a expression vector และแสดงออกใน *E. coli*
4. โปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ของ Pem-CMG1 ทั้งสองชิ้น อยู่ในรูปของ inclusion และมีลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้น cDNA ทั้งสองชิ้นของ Pem-CMG1
5. inclusion ของโปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ในส่วน mature peptide ของ Pem-CMG1 สามารถละลายได้ใน 6M urea และการแยกบริสุทธิ์โดย reverse-phase HPLC หนึ่งครั้ง สามารถกำจัดโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนออกมาได้

บทวิจารณ์

เทคนิค RACE ที่อาศัยการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากครัสเตเชียชนิดต่างๆ สามารถนำมาใช้ในการโคลน cDNA ของฮอร์โมนในกลุ่มดังกล่าวจากงููกูลาดำได้เป็นผลสำเร็จ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของ Pem-CMG ทั้งสามชนิดของงููกูลาดำ กับลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากครัสเตเชียชนิดต่างๆ พบว่า Pem-CMG ทั้งสามชนิดอยู่ในกลุ่มของ CHH MIH และ GIH โดยมีความคล้ายกับ CHH มากกว่า MIH และ GIH อย่างไรก็ตามการที่จะสรุปหน้าที่ที่ชัดเจนของ Pem-CMG ทั้งสามชนิดจะต้องทำการตรวจสอบหน้าที่ของโปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ของ Pem-CMG โดยตรงอีกครั้ง

การแสดงออกของโปรตีนจาก cDNA ของ Pem-CMG1 ใน *E. coli* ประสบความสำเร็จ โดยโปรตีนที่แสดงออกมีลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N ที่ถูกต้อง แต่การที่โปรตีนถูกแสดงออกในรูปของ inclusion ทำให้ต้องผ่านขั้นตอนต่างๆในการทำละลาย การ refold ให้อยู่ใน conformation ที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อการทำหน้าที่ และการแยกบริสุทธิ์ ก่อนที่จะสามารถนำมาใช้ทดสอบหน้าที่ได้

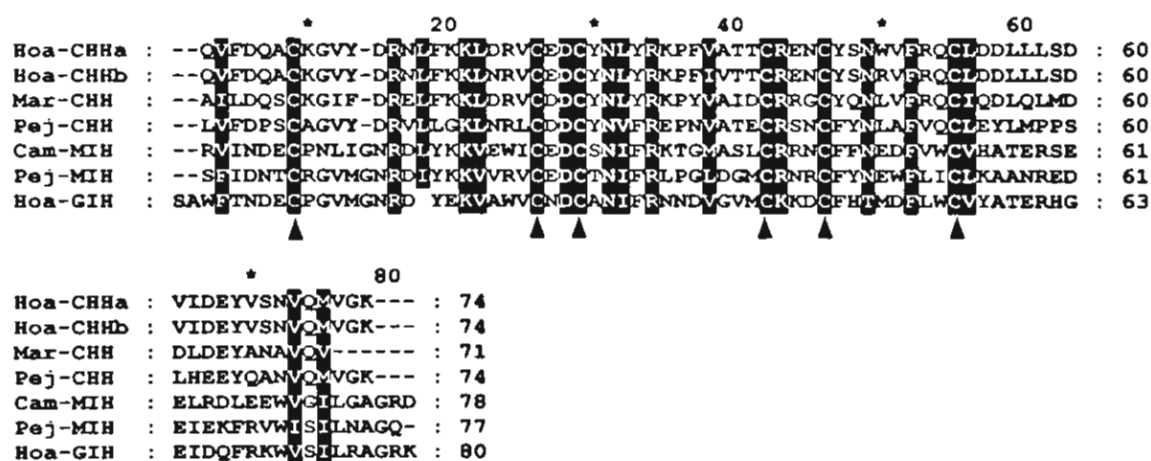
expression system ของ eukaryote เช่น yeast จะช่วยให้โปรตีนที่แสดงออกอยู่ใน conformation ที่เหมาะสม รวมถึงการเลือกให้โปรตีนมีการแสดงออกในรูปที่หลั่งออกนอกเซลล์ ก็จะทำให้โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ช่วยลดขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ได้ ดังนั้น

การเลือกใช้ yeast expression system จึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ของ Pem-CMG ทั้งสามชนิดต่อไป

บทนำ

กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของรังไข่ของสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชีย (crustacea) ถูกควบคุมด้วยกลุ่มของเปปไทด์ฮอร์โมนที่สร้างจาก neurosecretory system ภายในบริเวณก้านดา ที่มีชื่อเรียกว่า X-organ sinus gland complex (1) ฮอร์โมนที่สำคัญในกลุ่มนี้มีสามชนิดคือ crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) และ gonad-inhibiting hormone (GIH) (2) ฮอร์โมน CHH ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (3, 4) ฮอร์โมน MIH ควบคุมการลอกคราบ โดยทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างฮอร์โมนที่จำเป็นสำหรับการลอกคราบ (ecdystriod) จากอวัยวะที่เรียกว่า Y organ (5) และฮอร์โมน GIH ควบคุมการพัฒนาของรังไข่ โดยยับยั้งกระบวนการ vitellogenesis (6.)

ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีผู้ศึกษาฮอร์โมน CHH, MIH และ GIH ในครัสเตเชียชนิดต่างๆ และพบว่าฮอร์โมนทั้งสามชนิดมีโครงสร้างปฐมภูมิที่ใกล้เคียงกัน (7-18) ฮอร์โมนทั้งสามชนิดมีส่วนประกอบที่เป็น signal peptide และ mature peptide โดย CHH จะมีส่วนที่เรียกว่า CHH precursor related peptide (CPRP) แทรกอยู่ระหว่าง signal peptide และ mature peptide (19) ลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ mature peptide ของฮอร์โมนทั้งสามชนิดมีความคล้ายคลึงกันระหว่าง 28-50% และมีส่วนประกอบที่เป็นกรดอะมิโน cysteine 6 ตัวอยู่ในตำแหน่งที่ตรงกันในฮอร์โมนทุกชนิด (2, 19) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CHH, MIH และ GIH จากครัสเตเชียชนิดต่างๆ ตัวอักษรที่ระบายสีดำแสดงกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ในฮอร์โมนทุกชนิด และลูกศรแสดงตำแหน่งกรดอะมิโน cysteine 6 ตัวที่พบในตำแหน่งตรงกันในฮอร์โมนทุกชนิด (Hoa = *Homarus americanus*, Mar = *Macrobrachium rosenbergii*, Pej = *Penaeus japonicus*, Cam = *Carcinus maenas*)

งานวิจัยเกี่ยวกับฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH ยังได้มีการศึกษาลงไปถึงระดับนิวคลีโอไทด์อีกด้วย (20-28) โดยอาศัยข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมน เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ในการโคลนนิ่ง cDNA ของฮอร์โมนนั้น ทั้งจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน และจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น cDNA ของ CHH จาก *Procambarus bouvieri* ถูกโคลนโดยใช้ข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโนของ CHH ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (29) ในขณะที่ cDNA ของ MIH-like peptide ถูกโคลนจาก *Penaeus vannameii* โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโนของ MIH ของ *Homarus americanus* (30)

ถึงแม้จะมีการศึกษาฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH ใน crustacean หลายชนิด แต่ยังไม่มีความรู้เกี่ยวกับการศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนกลุ่มนี้ในกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยที่ทำรายได้ให้กับประเทศมากกว่าปลาน้ำจืดชนิดอื่น (ที่มา: ฝ่ายการค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH ของกุ้งกุลาดำ โดยการโคลนนิ่ง cDNA ที่สร้างฮอร์โมนในกลุ่มนี้ และทำการแสดงออกเพื่อให้ได้ฮอร์โมนที่ต้องการสำหรับนำไปทดสอบว่าฮอร์โมนเหล่านั้นทำหน้าที่อะไร ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ในอนาคต เช่นหากสามารถทำให้มีการแสดงออกของ GIH ในปริมาณที่มากพอสำหรับนำไปสร้าง antibody ได้ ก็อาจจะเป็นแนวทางในการนำ antibody ต่อ GIH มาใช้ในการเร่งให้แม่พันธุ์กุ้งวางไข่แทนการฉีดก้านดาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้ วิธีนี้จะทำให้มีการใช้แม่พันธุ์กุ้งที่ต้องจับจากธรรมชาติและมีราคาแพง ได้อย่างคุ้มค่า เนื่องจากการฉีดก้านดาเพื่อทำลายแหล่งผลิต GIH เพื่อที่จะกระตุ้นการวางไข่นั้น โดยทั่วไปจะทำเพียงครั้งเดียว แต่การใช้ antibody ที่จำเพาะ จะไม่ส่งผลกระทบต่อสมดุลของฮอร์โมนชนิดอื่น และอาจใช้กระตุ้นการวางไข่ได้หลายครั้งจากแม่กุ้งหนึ่งตัว

วิธีการทดลอง

1. การโคลนชิ้น cDNA สำหรับ Pem-CMG เปปไทด์

วิธีวิจัยในขั้นตอนนี้ ตั้งแต่การสกัดแยก RNA จากก้านตาของกุ้งกุลาดำ การโคลนชิ้น cDNA โดยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) การหาลำดับและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ระบุไว้โดยละเอียดในผลงานตีพิมพ์เรื่อง Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure (เอกสารแนบหมายเลข 1)

2. การแสดงออกของ Pem-CMG1 cDNA ใน *Escherichia coli*

2.1 การเพิ่มจำนวนชิ้น cDNA ส่วนที่เป็น coding region สำหรับ Pem-CMG1 เปปไทด์

ชิ้น cDNA ส่วนที่เก็บรหัสทั้งสายของ Pem-CMG1 เปปไทด์ ถูกนำออกจาก pCMG plasmid ที่มีชิ้น cDNA ของ Pem-CMG1 แทรกอยู่ใน pUC18 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *BamHI*

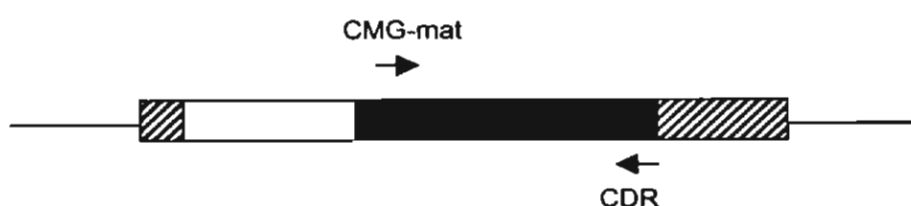
ชิ้น cDNA เฉพาะส่วนที่เก็บรหัสสำหรับ mature peptide ของ Pem-CMG1 ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ทำโดยใช้ pCMG1 plasmid ที่มีชิ้น cDNA ของ Pem-CMG1 แทรกอยู่ใน pUC18 เป็น template และใช้ไพรเมอร์จำเพาะ CMG-mat ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับปลาย N ของ mature peptide และ CDR ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์จาก stop codon ของ Pem-CMG1 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2 ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1 mg/ml nuclease-free BSA, 0.1% Triton[®] X-100, 200 nM CMG-mat และ CDR primer, 200 μM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP และ 2.5 units *Pfu* DNA polymerase (Promega). ขั้นตอนของการทำปฏิกริยา PCR เริ่มด้วย denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงเริ่ม PCR cycle ที่ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที, 55°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 2.5 นาที เป็นจำนวน 25 รอบ แล้วตามด้วย 72°C เป็นเวลา 7 นาที

2.2 การนำชิ้น cDNA เข้าสู่ pET3a expression vector

ชิ้น cDNA ส่วนที่เก็บรหัสทั้งสาย (CMG cDNA) และ ชิ้น cDNA เฉพาะส่วนที่เก็บรหัสสำหรับ mature peptide (CMG-mat cDNA) ของ Pem-CMG1 ถูกนำเข้าสู่ pET3a expression vector ที่ site ของ *NdeI* และ *BamHI* ดังแสดงในรูปที่ 3 หลังจากนั้นจึงนำ pET3a ที่มีชิ้น cDNA insert เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS โดยวิธี CaCl_2 transformation

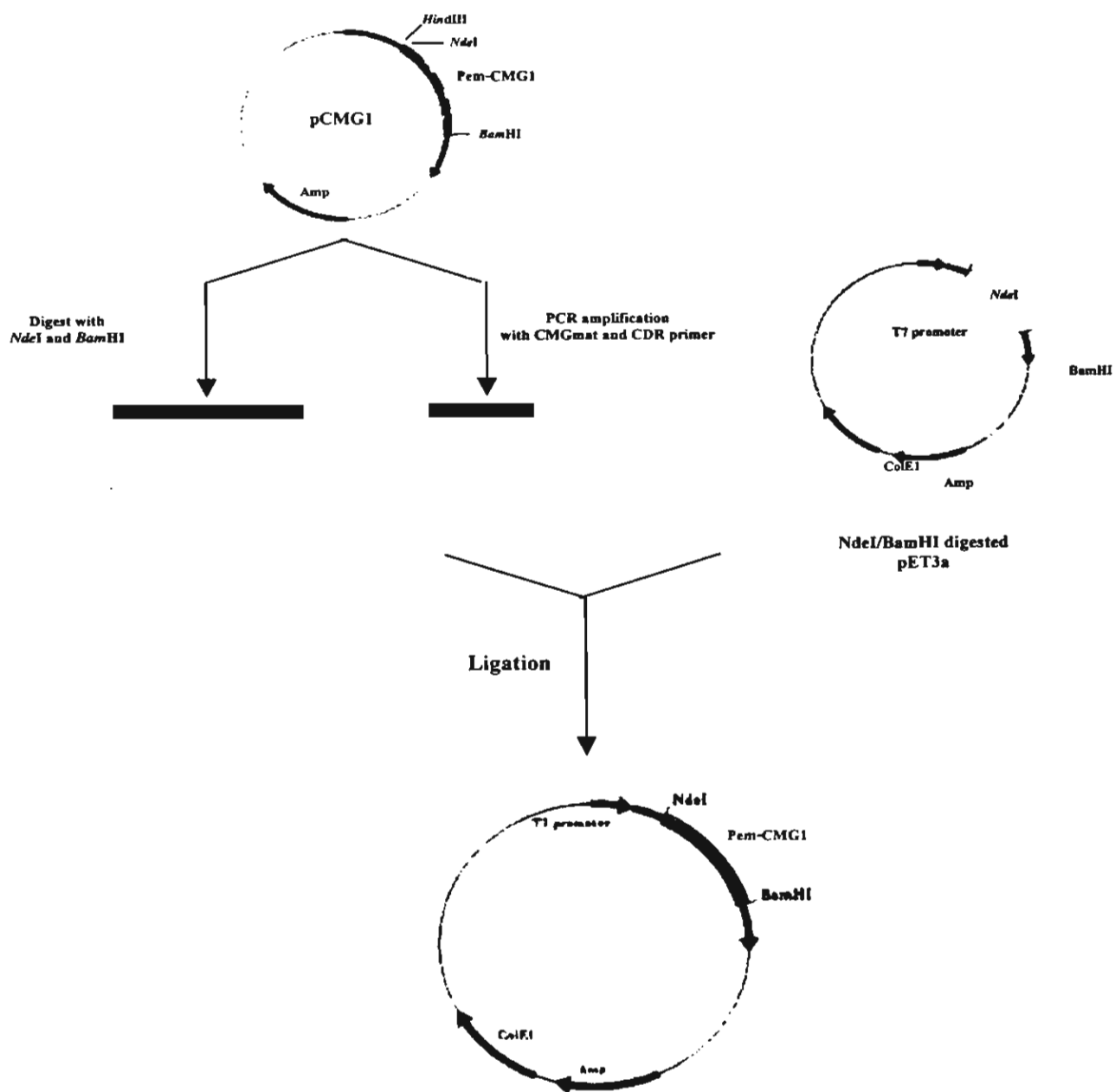
2.3 การแสดงออกของ CMG และ CMG-mat ใน *E. coli*

เลี้ยง *E. coli* ที่มี ชิ้น cDNA สำหรับการแสดงออกของ CMG และ CMG-mat ใน LB broth ที่มี ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ที่ 37°C จนกระทั่ง OD_{600} อยู่ประมาณ 0.5-0.7 แล้วจึงเติม IPTG ลงไปเพื่อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 mM หลังจากนั้นเลี้ยงต่อไปอีก 4 ชั่วโมง ที่ 37°C แล้วเก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ 2 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้น cDNA ส่วนที่เก็บรหัสสำหรับ mature peptide ของ Pem-CMG1 ส่วนที่แสดงด้วยเส้นเอียง คือส่วนของ 5' และ 3' UTR ส่วนที่ไม่ได้ระบายสีคือ ส่วนที่เป็น leader peptide ของ Pem-CMG1 และส่วนที่ระบายสีดำคือส่วนที่เป็น mature peptide ของ Pem-CMG1 ลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของไพรเมอร์ CMG-mat และ CDR

	<i>HindIII</i> <i>NdeI</i>
CMG-mat	: 5'- <u>GGAATTC</u> <u>CATATGAGCCTATCCTTCAG</u> -3'
	<i>BamHI</i>
CDR	: 5'- <u>CGGGATCC</u> CTACTTGCCGAGCCTCTA -3'



รูปที่ 3 แสดงการนำชิ้น CMG และ CMG-mat cDNA ของ Pem-CMG1 เข้าสู่ pET3a expression vector ชิ้น CMG cDNA ถูกนำออกจาก pCMG plasmid โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *BamHI* ขณะที่ชิ้น CMG-mat cDNA ถูกเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ CMG-mat และ CDR ดังแสดงในรูปที่ 2 หลังจากนั้นจึงตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *BamHI* ก่อนที่จะนำมาเชื่อมต่อกับ pET3a ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *BamHI* เช่นกัน

2.4 การเตรียม inclusion protein

หลังจากเก็บเซลล์ที่ถูก induced ด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมงด้วยวิธีที่อธิบายในข้อ 2.3 แล้ว จึง resuspend เซลล์ในน้ำกลั่นและทำให้เซลล์แตกโดย French press ที่ 900 psi หลังจากนั้นจึงเก็บ inclusion protein โดยการปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้าง inclusion ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3 การตรวจสอบโปรตีนที่แสดงออก

ทำการวิเคราะห์โปรตีน Pem-CMG1 ในรูปที่แสดงออกจาก CMG และ CMG-mat cDNA ด้วยวิธี SDS-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ ตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N โดยการทำให้ N-terminal amino acid sequencing

3.1 การ transfer โปรตีนไปยัง PVDF membrane

วิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE โดยเติม thioglycolic acid ใน upper buffer ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.015% หลังจากการทำ SDS-PAGE แชนจ์ gel ใน 10 mM 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid และ 10% methyl alcohol เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นโปรตีนจะถูกย้ายผ่านไปยัง PVDF membrane ด้วยเครื่อง Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 volt เป็นเวลา 100 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วย้อมโปรตีนที่อยู่บน membrane ด้วย coomassie brilliant blue R250 ความเข้มข้น 0.25% ใน methyl alcohol 20% และ กรดอะซิติก 7% แล้วล้างออกด้วย methyl alcohol 50% จากนั้นจึงตัดแถบของโปรตีนที่ต้องการ เพื่อทำการวิเคราะห์โดยการทำให้ N-terminal amino acid sequencing

4 การแยกบริสุทธิ์โปรตีน Pem-CMG1

ทำการทดลองแยกบริสุทธิ์โปรตีน Pem-CMG1 ที่แสดงออกจาก cDNA สำหรับส่วนของ mature peptide เพื่อนำไปใช้ในการ assay หา biological activity ของ Pem-CMG1 เปปไทด์ต่อไป โดยเริ่มจากการละลาย inclusion ของโปรตีน Pem-CMG1 ที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ด้วยสารละลาย 6 M urea แล้วปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนของ supernatant มาแยกบริสุทธิ์โดยวิธี reverse-phase HPLC โดยใช้ JUPITER 5u C18 column(250 x 6.6 mm, Phenomenex) ขั้นตอนในการแยกเริ่มจาก การเพิ่มความเข้มข้นของ acetonitrile ใน 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) จาก 0-10% ในเวลา 1 นาที แล้วคงที่ที่ความเข้มข้น 10% ของ acetonitrile เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเพิ่มจาก 10% เป็น 60% ในเวลา 30 นาที ติดตามโปรตีนที่แยกออกมาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm นำโปรตีนที่เก็บได้จาก fraction ต่างๆมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

ผลการทดลอง

1. การโคลน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pem-CMG cDNA 3 ชนิด

จากการทำ 3' RACE และ 5' RACE โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ (CEDCYN) ของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ สามารถโคลน cDNA ได้ 3 ชนิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับฮอร์โมนในกลุ่มนี้ (เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม Blastn) ให้ชื่อว่า Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล)

2. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pem-CMG ทั้ง 3 ชนิด

ทำการถอดรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 cDNA ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม six frame translation (BCM) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 แล้วนำลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจาก Pem-CMG cDNA ทั้ง 3 ชนิดมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ CHH, MIH และ GIH ของคริสต์เชียนชนิดอื่นๆที่มีผู้รายงานไว้ ด้วยโปรแกรม ClustalX ผลของการเปรียบเทียบแสดงในรูปที่ 5

ลำดับกรดอะมิโนของ Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 127 ตัว (Pem-CMG1) และ 128 ตัว (Pem-CMG2 และ 3) โดยมีลำดับกรดอะมิโน lysine-arginine (KR) เป็น putative processing site ที่จะแยกส่วนของเปปไทด์ ออกเป็น signal peptide และ mature peptide ลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ใน CHH จากคริสต์เชียนชนิดอื่นเช่นเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 พบว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ signal peptide มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโน 74 ตัวในส่วนของ mature peptide มีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 93% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ CHH, MIH และ GIH ของคริสต์เชียนชนิดอื่นๆ พบว่า Pem-CMG เปปไทด์ทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะสำคัญของฮอร์โมนในกลุ่มนี้ ได้แก่ มีความยาวของ mature peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 72-80 ตัว มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ CEDCYN และประกอบด้วยกรดอะมิโน cysteine 6 ตัวที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับฮอร์โมนอื่นในกลุ่มนี้ และมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง 35-50%

3. การแสดงออกของ Pem-CMG1 ใน *E. coli*

เฉพาะ Pem-CMG1 cDNA เท่านั้นที่มีการนำมาศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* พบว่าโปรตีน Pem-CMG1 ที่แสดงออกจาก CMG cDNA มีขนาดประมาณ 14 kDa ส่วนโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA มีขนาดประมาณ 8-9 kDa โดยที่โปรตีนทั้งสองแสดงออกในรูปของ inclusion ซึ่งตรวจพบได้ในส่วนของ insoluble fraction หลังจากที่ทำให้เซลล์แตก ดังแสดงในรูปที่ 6 และ รูปที่ 7 นอกจากโปรตีนที่มีขนาดตามต้องการแล้ว ใน inclusion ยังพบโปรตีนชนิดอื่นปนออกมาด้วย

Pem-CMG1

```

-tcagtgcagagggagagcctggaagttgctgacgctcgcctcccgatctgcctctacactaaagat : 65
66 : ATGGTTGCCGTTGGACCGATGCGGACAGCTGTCTGGTGTCCCTGCTGTTGGCAATCCCGGCTCT : 131
    M V A V G P M R T A V L V S L L L A I P A S
132: GCCACCACCTTCGGAGACGGAAATGACATTCCAACGTTCTCCGTTCTTCCCCAGAAGCCTCTCCT : 197
    A T T F G D G N D I P T F L R S S P E A S P
198: GTGACTTCCCTTCACACCTCAGACAAACGCAGCCTATCCTTCAGGTCTTGACGGGCGCCTACGAC : 263
    V T S L H T S D K R S L S F R S C T G A Y D
264: CGCGAACTCCTTGTAAGGCTCGACCGCGTGTGCGAAGACTGCTACAACGTGTACCGCGACGTGCGA : 329
    R E L L V R L D R V C E D C Y N V Y R D V G
330: GTGGCAGCCGAATGCAGGAGTAAGTGTTCACAACGAGGTGTTCTCTACTGTGTGGACTACATG : 395
    V A A E C R S N C F H N E V F L Y C V D Y M
396: TTCCGGCCTCGTCAAAGGAACAGTACCGGGCCGCCCTACAGAGGCTCGGCAAGTAGgtggttcct : 461
    F R P R Q R N Q Y R A A L Q R L G K *
462: cttcagccagacctcgccatgcgactcccaagacgaccagactcttattaggttgctttcgtatcc : 527
528: tgatttaaaaggtaaaataagagcctgtacaacaagcctcctgtctaataaaaataaagagaaatat : 593

```

Pem-CMG2

```

t : 1
2 : cagtgcagagggagagcctcgaagtcggtggtccttggttccttctgctcctgtcgcagtcagcgaa : 67
68: ATGGTTGCGGTCCGATTGGTGCAGTCAGCTGTTCTTGTGTCTTGCTGGTGGCACTTCCGGCCTGT :
    M V A V R L V Q S A V L V S L L V A L P A C
134: GTCACAACTTCTGAAAACACGAATGAAATACCGGCGTCCATTCTTTCTCCCTGGGGATTCCCTT : 199
    V T T S E N T N E I P A S I L S S P G D S L
200: TCAGAAGACCAAGCATAAGCAAACGCTCTATATGGTTCATTCTTGCACGGGCGTCTACGACCGC : 265
    S E D Q S I S K R S I W F N S C T G V Y D R
266: GAACTTCTTGTAAGGCTCGACCGCGTGTGCGAAGACTGCTACAACCTCTACCGCGACGTGCGAGTG : 331
    E L L V R L D R V C E D C Y N L Y R D V G V
332: GCGGCCGAATGCAGGAGTAAGTGTTCACAACGAGGTGTTCTGTACTGCGTGGACTACATGTTT : 397
    A A E C R S N C F H N E V F L Y C V D Y M F
398: CGGCCTCGCCAGAGGAACAGTACCGGGCCGCCCTCCAGAGGCTCGGCAAGTAGgcggttcgtctt : 463
    R P R Q R N Q Y R A A L Q R L G K *
464: cggtcaacccttctcgcggggacgctcgccgtgagatttttctaggctctccttcggttgcttct : 529
530: gtatcctaagttagaaacggataacatattgacgtcgaggtatttcattgtacagtgtcttccataaa : 595
596: gcagaaatatat : 607

```

Pem-CMG3

```

Tc : 2
3 : agtgcagggggagagcctcgaagtcggtggtccttggttcccgcctgatctgttgcgagtcagcgaa : 68
69: ATGATTGCGGTCCGACTGGTGCAGTCAGCTGTTCTGGTGTCCCTGCTGGTGGCATTTCGGGCTGT : 134
    M I A V R L V Q S A V L V S L L V A F P A C
135: GTCACGACTTCTGAAAACACGAATGAAATGCGGTCCATTCTTTCTCCCTGGGGATTCCCTT : 200
    V T T S E N T N E I L A S I L S S P G D S L
201: ACACGAGAACAAGCATAAGCAAACGCACCATGTCGTTTCAGTTCTTGCACGGGTGTCTACGACCGC : 266
    T R E Q S I S K R T M S F S S C T G V Y D R
267: GAACTCCTTGTAAGCTCGACCGCGTGTGCGAAGACTGCTACAACCTCTACCGCGACGTGCGAGTG : 332
    E L L V K L D R V C E D C Y N L Y R D V G V
333: GCGGCCGAATGTAGGAGTAAGTGTTCACAACGAGGTGTTCTGTACTGCGTGGACTACATGTTT : 398
    A A E C R S N C F H N E V F L Y C V D Y M F
399: CGGCCTCGCCAAAGGAATCAGTACCGGGCCGCCCTGCAGAGGCTCGGCAAGTAGgcggttcctatc : 464
    R P R Q R N Q Y R A A L Q R L G K *
465: cgccagctcttccgcagggcgctcgctgtgagactttctgaatgaccagactctaggctctcct : 530
531: cggttgctctgtatcctaagttagaagctgacacatattgacgccgaggtgtttcatgtgtaaat : 596
597: gtcttcataaagcataaaaaacaaa : 621

```

รูปที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เขียนด้วยตัวอักษรเล็กคือส่วนที่เป็น 5' และ 3' UTR ลำดับกรดอะมิโนแสดงด้วย one-letter code และกรดอะมิโนที่ระบายสีแดง putative processing site, KR,

```

      *           20           *           40           *           60
Pem-CMG : --SLSFRSCTGAY--DRELLVRLDRVCEDCYNLYRDVGVAAECRSNCFHNEVFLYQVDYMFRLP : 59
Pem-CMG2 : --SIWFNSCTGVY--DRELLVRLDRVCEDCYNLYRDVGVAAECRSNCFHNEVFLYQVDYMFRLP : 59
Pem-CMG3 : --TMSFSSCTGVY--DRELLVRLDRVCEDCYNLYRDVGVAAECRSNCFHNEVFLYQVDYMFRLP : 59
Pej-CHH : --AAFDPSCTGVY--DRELLGRLSRLCDDCYNLYRTPKVAEERSNCFHNPAPVQCLEYLIPA : 59
Cam-CHH : --QIYDTSCKGVY--DRALFNDLEHVCDCCYNLYRTSYVASACRSNCYSNLVFRQCDDLLMM : 59
Hoa-CHHa : --QVFDOACKGVY--DRNLFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVATTCRENCYSNHWFRQCDDLLLS : 59
Hoa-CHHb : --QVFDOACKGVY--DRNLFKKLDRVCEDCYNLYRKPFIVTTCRENCYSNHWFRQCDDLLMI : 59
Orl-CHH2 : --QVFDOACKGVY--DRALFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVATTCRENCYSNHWFRQCDDLLLI : 59
Hoa-MIH : --EVFDQACKGVY--DRNLFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVATTCRENCYSNHWFRQCDDLLLS : 59
Pev-MIH : --DTFDHSCKGVY--DRELFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVATECKSNCFVNRKRENVQVADLRHD : 59
Pej-MIH : SASFIDNTCRGVMGNRDIYKKVVRVCEDCYNLYRPLGLDGMCRNRCFYNEWELICLKAAARE : 62
Hoa-GIH : SAWFTNDECPGVMGNRDLYEKVAVVCNDCANIERNDVGMCKKDCFHTMDPLWCYATERH : 62

```

% identity

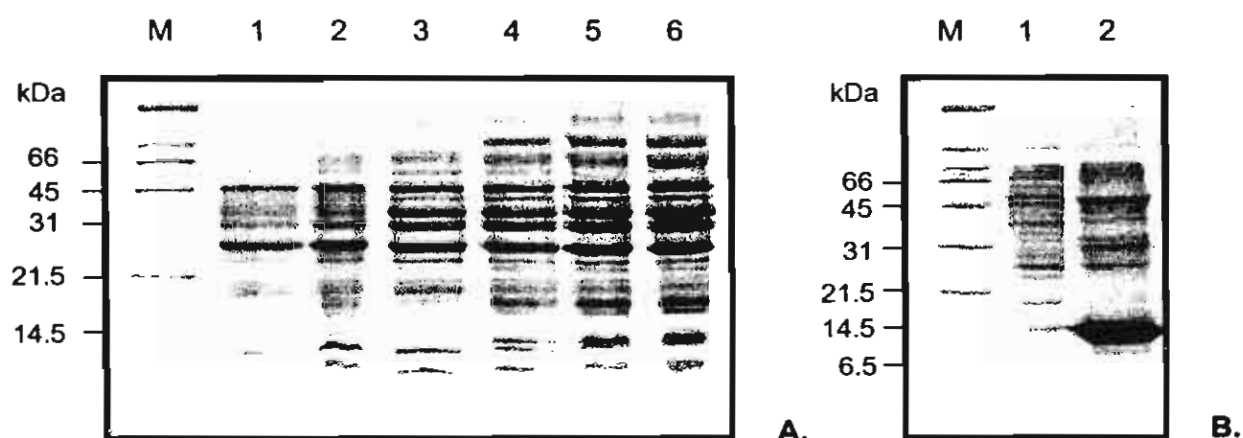
```

      *
Pem-CMG : RQRNQYRAALQRLGK-- : 74 : 100
Pem-CMG2 : RQRNQYRAALQRLGK-- : 74 : 93
Pem-CMG3 : RQRNQYRAALQRLGK-- : 74 : 93
Pej-CHH : ELHEEYCALVQTVGK-- : 74 : 51
Cam-CHH : DEFDQYARKVQMVGRKK : 76 : 44
Hoa-CHHa : DVIDEYVSNVQMVGK-- : 74 : 47
Hoa-CHHb : DVIDEYVSNVQMVGK-- : 74 : 43
Orl-CHH2 : DVLDEYISGVQTVGK-- : 74 : 44
Hoa-MIH : NVIDEYVSNVQMVGK-- : 71 : 44
Pev-MIH : VSRFLKMANSAALS---- : 72 : 44
Pej-MIH : DEIEKFRVWISILNAGQ : 79 : 31
Hoa-GIH : GEIDQFRKQWSILRA-- : 77 : 31

```

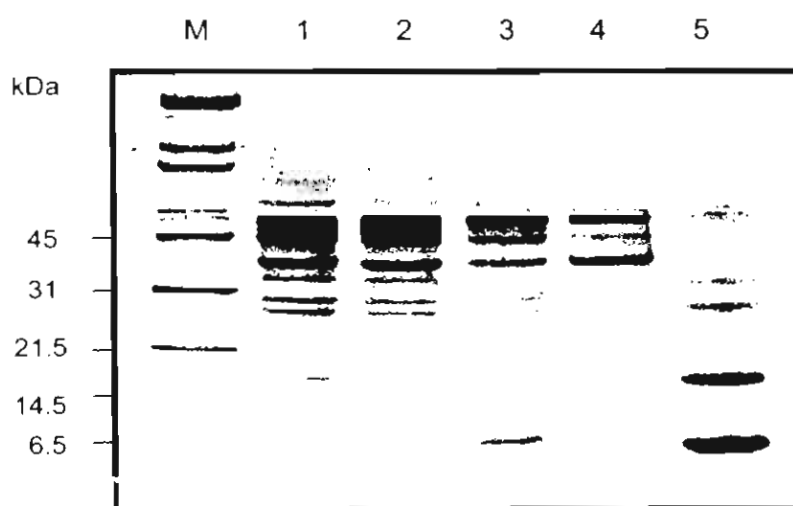
รูปที่ 5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจาก Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 กับลำดับกรดอะมิโนของฮอริโมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น กรดอะมิโน cysteine ทั้ง 6 ตัวที่พบในตำแหน่งเดียวกันในฮอริโมนทุกชนิดระบายด้วยสีเทา และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมือนกับกรดอะมิโนของ Pem-CMG อย่างน้อย 2 ชนิดระบายด้วยสีดำ

Pem : *Penaeus monodon* Pej : *Penaeus japonicus*
Pev : *Penaeus vannamei* Hoa : *Homarus americanus*
Cam : *Carcinus maenas* Orl : *Orconectes limosus*



รูปที่ 6 16.5% tricine-SDS-PAGE แสดงโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG cDNA ของ Pem-CMG1

- A.
- lane M = Dalton standard protein marker
 - lane 1 = Total lysate of BL21(DE3)pLysS (non-induced)
 - lane 2 = Total lysate of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a (non-induced)
 - lane 3 = Total lysate of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG cDNA of Pem-CMG1 (non-induced)
 - lane 4-6 = Total lysate of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG cDNA of Pem-CMG1 (induced for 3, 4 and 5 hours, respectively)
- B.
- lane M = Broad range standard protein marker
 - lane 1 = Soluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG cDNA of Pem-CMG1 (4 hour-induction)
 - lane 2 = Insoluble fraction (inclusion) of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG cDNA of Pem-CMG1 (4 hour-induction)



รูปที่ 7 16.5% tricine-SDS-PAGE แสดงโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ของ Pem-CMG1

- lane M = Broad range standard protein marker
- lane 1 = Total lysate of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a (non-induced)
- lane 2 = Total lysate of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 (non-induced)
- lane 3 = Total lysate of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 (4 hour--induced)
- lane 4 = Soluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 (4 hour--induced)
- lane 5 = Insoluble fraction (inclusion) of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 (4 hour—induced)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N ของโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG cDNA พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนห้าตัวแรกทางปลาย N เป็น MVAVG และ การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางปลาย N ของโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนห้าตัวแรกทางปลาย N เป็น SLSFR (ไม่ได้แสดงผล) ซึ่งตรงกับ ลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CMG และ CMG-mat cDNA ของ Pem-CMG1 ตามลำดับ

4. การแยกบริสุทธิ์ ของ Pem-CMG1 peptide

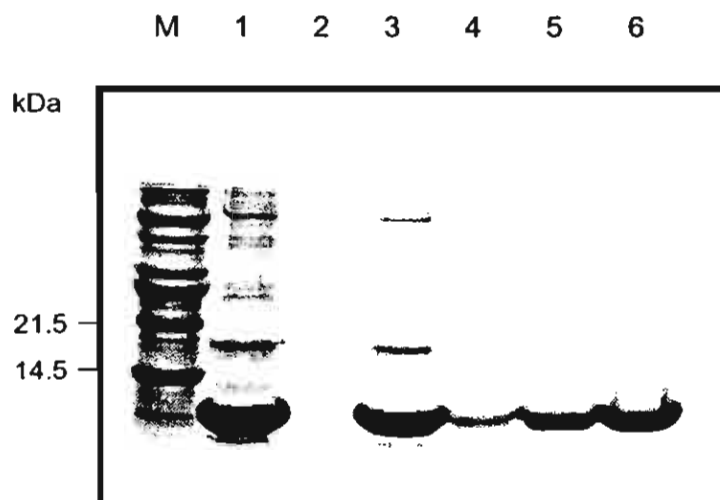
4.1 ทดสอบการละลายของ Pem-CMG1 peptide

ทำการละลายโปรตีน Pem-CMG1 ที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ซึ่งอยู่ในรูปของ inclusion โดยทดสอบความสามารถในการละลายของ inclusion ในสารละลาย urea ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2, 4, และ 6 M พบว่า inclusion protein สามารถละลายได้มากกว่า 50% ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ urea เป็น 6 M ดังแสดงในรูปที่ 8

4.2 แยกบริสุทธิ์ Pem-CMG1 peptide โดยวิธี reverse phase HPLC

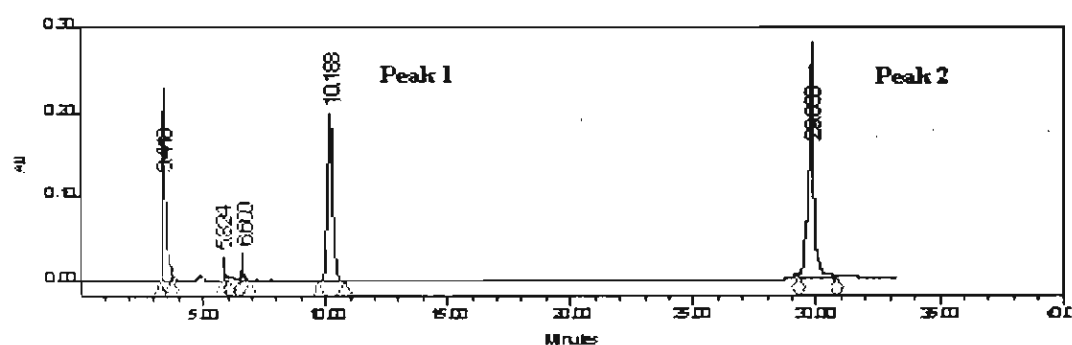
นำ Pem-CMG1 peptide ที่ละลายใน 6M urea มาแยกบริสุทธิ์ด้วย JUPITER 5u C18 HPLC column (250 x 6.6 mm, Phenomenex) โดยมีรายละเอียดของสภาวะที่ใช้ในการแยกโปรตีนตามที่กล่าวในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 4 พบว่ามี elution profile ดังแสดงในรูปที่ 9

นำโปรตีนที่ออกมาใน peak ที่ 1 และ 2 มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 8-9 kDa ออกมาใน peak ที่ 2 โดยมีโปรตีนขนาดอื่นปนออกมาเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนออกมาได้

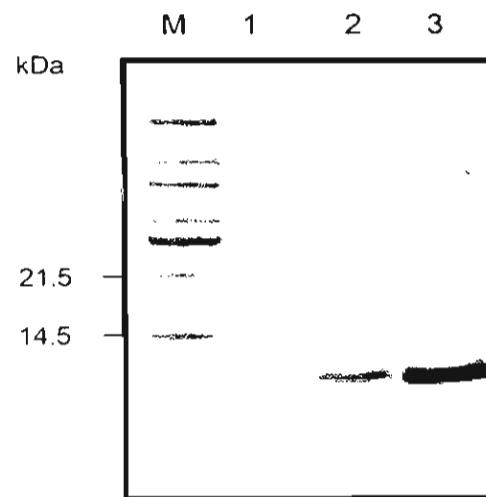


รูปที่ 8 16.5% tricine-SDS-PAGE แสดงการละลายของโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ของ Pem-CMG1

- lane M = Dalton standard protein marker
- lane 1 = Insoluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 after solubilization in 2M urea
- lane 2 = Soluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 after solubilization in 2M urea
- lane 3 = Insoluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 after solubilization in 4M urea
- lane 4 = Soluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 after solubilization in 4M urea
- lane 5 = Insoluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 after solubilization in 6M urea
- lane 6 = Soluble fraction of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 after solubilization in 6M urea



รูปที่ 9 Elution profile ของ soluble fraction จากการละลาย inclusion ที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ของ Pem-CMG1 ด้วย 6M urea หลังจากการแยกบริสุทธิ์ด้วย JUPITER 5u C18 HPLC column (250 x 6.6 mm, Phenomenex) โดยใช้สภาวะที่แสดงรายละเอียดไว้ในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 4 แกนนอนแสดงเวลาในหน่วยนาที แกนตั้งแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm



รูปที่ 10 16.5% tricine-SDS-PAGE แสดงผลการแยกบริสุทธิ์ของโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ของ Pem-CMG1 ด้วย JUPITER 5u C18 HPLC column (250 x 6.6 mm, Phenomenex)

- lane M = Dalton standard protein marker
- lane 1 = Protein content of peak 1 after HPLC purification
- lane 2 = Protein content of peak 2 after HPLC purification
- lane 3 = Insoluble fraction (inclusion) of BL21(DE3)pLysS carrying pET3a that contains CMG-mat cDNA of Pem-CMG1 before HPLC purification

บทวิจารณ์

งานวิจัยนี้เป็นการโคลนชิ้น cDNA ที่สร้างฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากก้านดาของ กุ้งกุลาดำ และดูการแสดงออกของชิ้น cDNA ดังกล่าวใน *E. coli* ซึ่งพบว่าการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนของลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของฮอร์โมนในกลุ่มนี้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ สามารถนำมาใช้เพิ่มจำนวนของ cDNA ที่มีรหัสสำหรับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับฮอร์โมนในกลุ่มนี้ได้เป็นผลสำเร็จด้วยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) ในที่นี้สามารถโคลนชิ้น cDNA ได้ถึง 3 ชนิด เรียกชื่อว่า Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 ซึ่ง cDNA แต่ละชนิดเก็บรหัสสำหรับเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันมากกว่า 93%

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล พบว่าเปปไทด์ทั้งสามชนิดของกุ้งกุลาดำมีความคล้ายคลึงกับ CHH, MIH และ GIH ของครัสเตเชียชนิดอื่น ประมาณ 30-50% โดยมีความคล้ายคลึงกับ CHH ในระดับที่สูงกว่า MIH และ GIH (รูปที่ 5) และมีข้อน่าสังเกตคือที่ปลาย C ของ Pem-CMG ทั้งสามชนิดประกอบด้วยกรดอะมิโน Glycine และ Lysine (GK) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิด amidation และพบได้ใน CHH ทุกชนิด (19, 31) แต่ไม่มีรายงานว่าพบใน MIH หรือ GIH ความคล้ายคลึงทางโครงสร้างนี้จึงบ่งบอกว่า Pem-CMG ทั้ง 3 ชนิดของกุ้งกุลาดำน่าจะทำหน้าที่เป็น CHH อย่างไรก็ตามจะต้องยืนยันโดยการวิเคราะห์หน้าที่ของฮอร์โมนโดยตรงอีกครั้ง จากโปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ของ Pem-CMG ทั้งสามชนิด

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ฮอร์โมนที่แยกบริสุทธิ์มาจากก้านดาของครัสเตเชียบางชนิดสามารถทำหน้าที่ได้มากกว่าหนึ่งอย่าง เช่น ฮอร์โมน CHH-A ของ *Homarus americanus* ทำหน้าที่ทั้งการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และควบคุมการลอกคราบ (32) ในขณะที่ฮอร์โมน CHH-B ของ *H. americanus* นอกจากจะทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดแล้วยังเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้รังไข่เจริญซึ่งเป็นหน้าที่ของฮอร์โมน GIH อีกด้วย (24) อย่างไรก็ตามการที่พบว่าฮอร์โมนที่แยกบริสุทธิ์จากก้านดาของครัสเตเชียทำหน้าที่ได้มากกว่าหนึ่งอย่างนั้น อาจเป็นเพราะขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ยังไม่ดีพอ ทำให้มีการปนเปื้อนของฮอร์โมนที่ทำหน้าที่คนละอย่างแต่มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีคล้ายกัน (31) ดังนั้นเพื่อที่จะทราบหน้าที่ของ Pem-CMG1 เปปไทด์ที่สร้างมาจาก CMG-mat cDNA จึงทำการแสดงออกของ Pem-CMG1 เปปไทด์ ใน *E. coli* และพยายามแยกบริสุทธิ์โปรตีนที่แสดงออก เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบหน้าที่ของโปรตีนนั้นต่อไป การทดสอบหน้าที่ของโปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA โดยตรง มีข้อดีคือจะทำให้ทราบหน้าที่ที่แท้จริงของ Pem-CMG1 ว่าทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนใด และสามารถทำหน้าที่ของฮอร์โมนได้มากกว่าหนึ่งอย่างหรือไม่

pET3a expression system ที่ใช้ในการแสดงออกของ Pem-CMG1 ใน *E. coli* นั้นใช้โปรโมเตอร์ของ T7 ซึ่งสามารถทำการแสดงออกได้ในปริมาณสูง (33) อย่างไรก็ตามการที่โปรตีนแสดงออกในปริมาณสูงทำให้มีการจับตัวกันเป็น inclusion ซึ่งก่อนที่จะนำไปใช้ศึกษาคุณสมบัติต่อไป จะต้องผ่านขั้นตอนอื่นๆอีกเช่น การละลาย และ การแยกบริสุทธิ์ ซึ่งหากจำเป็นต้องใช้สภาวะที่รุนแรงในการละลาย เช่นใช้สารละลาย urea หรือ guanidine-HCl ก็อาจจะไป unfold โปรตีนให้อยู่ในรูปที่

ไม่เหมาะสมต่อการทำหน้าที่ได้ และจะต้องทำการ refold ให้โปรตีนกลับมาอยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อไป

มีผู้รายงานการแสดงออกของ MIH จาก *P. japonicus* ใน *E. coli* โดยใช้ pET system เช่นกัน (34) โปรตีนที่แสดงออกอยู่ในรูปของ inclusion และสามารถละลายได้ใน 6M guanidine-HCl/10 mM Tris-HCl (pH 8.0) เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์โดย reverse-phase HPLC พบว่ามีโปรตีนใน 4 fractions ที่มี activity ของ MIH แต่จากการทดสอบหลายครั้งพบว่า MIH activity ใน fraction ต่างๆเหล่านี้ไม่เสถียร สามารถตรวจพบ MIH activity เป็นบางครั้งเท่านั้น สาเหตุอาจมาจากการที่โปรตีนเหล่านี้มีการสร้าง disulfide bond ระหว่างกรดอะมิโน cysteine ทั้ง 6 ตัวได้หลายแบบ และไม่ได้อยู่ในรูปที่มีความเสถียร แต่หลังจากการที่นำโปรตีนใน fraction ทั้ง 4 ที่มี MIH activity มารวมกันแล้วทำ refolding ของโปรตีน และแยกบริสุทธิ์ ด้วย reverse-phase HPLC อีกครั้งหนึ่ง สามารถตรวจพบโปรตีนที่มี MIH activity เพียง Fraction เดียวและมีความเสถียร แสดงให้เห็นว่าหลังจากการทำ refolding แล้ว โปรตีนสามารถกลับมาอยู่ใน conformation ที่เหมาะสมและทำหน้าที่ได้ นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของ CHH จาก *Metapenaeus ensis* ใน *E. coli* โดยใช้ pProEX™HTb เป็น expression vector และละลายโปรตีนด้วย 0.1% triton X-100 หลังจากการทำ refolding และการแยกบริสุทธิ์ พบว่าโปรตีน มี CHH activity แต่อยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการที่ โปรตีนสามารถสร้าง disulfide bond ได้หลายแบบ ในขั้นตอนของการทำ refolding แต่มีเพียงโปรตีนที่มีการสร้าง disulfide bond แบบเดียวเท่านั้นที่เหมาะสมต่อการทำหน้าที่ของ CHH (35)

จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของโปรตีนจาก eukaryote ใน *E. coli* ต้องผ่านการทำละลายและการแยกบริสุทธิ์หลายขั้นตอนจึงจะได้โปรตีนที่มี conformation ที่เหมาะสม สามารถทำหน้าที่ได้ แต่ก็ยังมีโปรตีนที่อยู่ใน conformation อื่นที่ไม่สามารถทำงานได้ปนเปื้อนอยู่ด้วย ดังนั้นการเลือกใช้ expression system ของ eukaryote จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการแสดงออกของ โปรตีนจาก eukaryote เพื่อจะนำโปรตีนที่แสดงออกมาทดสอบหน้าที่ เพราะโปรตีนที่แสดงออกใน expression system ของ eukaryote จะผ่านขั้นตอนในการ folding ที่เหมาะสม รวมทั้งยังมี post-translational modification ซึ่งอาจจำเป็นสำหรับการทำหน้าที่ของโปรตีนบางชนิดอีกด้วย เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนา expression system ใน ยีสต์ *Pichia pastoris* ซึ่งสามารถทำการแสดงออกของโปรตีนจาก eukaryote ได้ในปริมาณสูงและอยู่ใน conformation ที่เหมาะสมสำหรับการทำงาน นอกจากนี้ยังสามารถทำให้โปรตีนแสดงออกในรูปที่หลั่งออกมานอกเซลล์ได้ด้วย ซึ่งจะทำให้การแยกบริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น เนื่องจากจะมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนออกมาในระดับที่ค่อนข้างต่ำ (36)

ดังนั้น หากต้องการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA ของ Pem-CMG ทั้ง 3 ชนิดของกุ้งกุลาดำต่อไป จึงควรเลือกใช้ expression system ของ *P. pastoris* จะทำให้สร้างโปรตีนได้ในปริมาณสูง อยู่ใน conformation ที่เหมาะสม และสามารถแยกบริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบหน้าที่ได้ง่ายขึ้นอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Keller R. (1992) Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia*. 48(5):439-448.
2. De Kleijn DP, Van Herp F. (1995) Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 112(4):573-9.
3. Sedlmeier D. (1982) The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). II. Involvement of glycogen synthase. *Gen Comp Endocrinol*. 47(4):426-432.
4. Sedlmeier D, Keller R. (1981) The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen Comp Endocrinol*. 45(1):82-90.
5. Chang ES. (1993) Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. *Annu Rev Entomol*. 38:161-180.
6. Eastman-Reks S, Fingerman M. (1984) Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp Biochem Physiol*. 39B:291-297.
7. Sithigorngul W, Jaideechoey S, Saraithongkum W, Longyant S, Sithigorngul P. (1999) Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *J Exp Zool*. 284(2):217-224.
8. Marco HG, Brandt W, Gade G. (1998) Elucidation of the amino acid sequence of a crustacean hyperglycaemic hormone from the spiny lobster, *Jasus lalandii*. *Biochem Biophys Res Commun*. 248(3):578-583.
9. Chung JS, Wilkinson MC, Webster SG. (1998) Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus*. *Regul Pept*. 77(1-3):17-24
10. Yasuda A, Yasuda Y, Fujita T, Naya Y. (1994) Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *Gen Comp Endocrinol*. 95(3):387-398.
11. Huberman A, Aguilar MB, Brew K, Shabanowitz J, Hunt DF. (1993) Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): interspecies comparison. *Peptides*. 14(1):7-16.

12. Kegel G, Reichwein B, Tensen CP, Keller R. (1991) Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: emergence of a novel neuropeptide family. *Peptides*. 12(5):909-913.
13. Kegel G, Reichwein B, Weese S, Gaus G, Peter-Katalinic J, Keller R. (1989) Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Lett*. 255(1):10-14.
14. Nagasawa H, Yang WJ, Shimizu H, Aida K, Tsutsumi H, Terauchi A, Sonobe H. (1996) Isolation and amino acid sequence of a molt-inhibiting hormone from the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 60(3):554-556.
15. Chung JS, Wilkinson MC, Webster SG. (1996) Determination of the amino acid sequence of the moult-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus*. *Neuropeptides*. 30(1):95-101.
16. Aguilar MB, Falchetto R, Shabanowitz J, Hunt DF, Huberman A. (1996) Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Peptides*. 17(3):367-374.
17. Webster SG. (1991) Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 244(1311):247-252.
18. Soyeux D, Le Caer JP, Noel PY, Rossier J. (1991) Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides*. 20(1):25-32.
19. Chang ES. (1997) Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: Fungerman M, Nagabhushanam R, Thompson M-F (Eds.), *Endocrinology and reproduction, Recent Advanced in Marine Biotechnology*, vol. 1, Science Publishers Inc, New Hampshire, USA, pp. 163-178.
20. Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, Aida K. (1997) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 6(1):59-63.
21. de Kleijn DP, de Leeuw EP, van den Berg MC, Martens GJ, van Herp F. (1995) Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochim Biophys Acta*. 1260(1):62-66.

22. De Kleijn DP, Janssen KP, Martens GJ, Van Herp F. (1994) Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. Eur J Biochem. 224(2):623-629.
23. Weidemann W, Gromoll J, Keller R (1989) Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. FEBS Lett. 257(1):31-34.
24. Umphrey HR, Lee KJ, Watson RD, Spaziani E. (1998) Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer magister*. Mol Cell Endocrinol. 136 (2):145-149.
25. Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, Aida K. (1997) Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Zoolog Sci. 14 (5):785-789.
26. Lee KJ, Elton TS, Bej AK, Watts SA, Watson RD. (1995) Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biochem Biophys Res Commun. 209(3):1126-1131.
27. Klein JM, Mangerich S, de Kleijn DP, Keller R, Weidemann WM. (1993) Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor. FEBS Lett. 334 (1):139-142.
28. de Kleijn DP, Sleutels FJ, Martens GJ, Van Herp F. (1994) Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. FEBS Lett. 353(3):255-258.
29. Aguilar-Gaytan R, Cerbon MA, Cevallos MA, Lizano M, Huberman A. (1997) Sequence of a cDNA encoding the molt-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Crustacean, Decapoda). As Pac J Mol Biol Biotechnol. 5:51-55.
30. Sun PS. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone from the white shrimp *Penaeus vannamei*. Mol Mar Biol Biotechnol. 3:1-6.
31. Tensen CP, De Kleijn DP, Van Herp F. (1991) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster *Homarus americanus*. Eur J Biochem. 200(1):103-106.
32. Chang ES, Prestwich GD, Bruce MJ. (1990) Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. Biochem Biophys Res Commun. 171(2):818-826.
33. Studier FW, Moffatt BA. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. 189(1):113-130.

34. Ohira T, Nishimura T, Sonobe H, Okuno A, Watanabe T, Nagasawa H, Kawazoe I, Aida K. (1999) Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem. 63(9):1576-1581.
35. Gu P-L, Yu KL, Chan SM. (2000) Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. FEBS Letts 472:122-128.

Output

มีผลงานวิจัยตีพิมพ์จากงานวิจัยนี้ 1 เรื่อง คือ

Udomkit A, Chooluck S, Sonthayanon B, Panyim S. (2000) Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. J Exp Mar Biol Ecol. 244:145-156.

Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure

Apinunt Udomkit*, Sunthorn Chooluck, Burachai Sonthayanon, Sakol Panyim

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Received 10 July 1999; accepted 28 August 1999

Abstract

We report the nucleotide and deduced amino acid sequences of Pem-CMG peptide, a member of crustacean CHH/MIH/GIH peptide family, in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). The 5' and 3' fragments of *Pem-CMG* cDNA were cloned by the method of rapid amplification of cDNA ends (RACE). The two fragments constitute a combined cDNA length of 593 bp with a 77 bp overlapping region. Sequence analysis reveals the presence of a 384 bp open reading frame which was subsequently cloned. The open reading frame encodes a precursor peptide that is comprised of 128 amino acids, with a putative processing site, KR. The mature peptide consists of 74 amino acid residues, the sequence of which is significantly homologous to those of the CHH/MIH/GIH family known from other crustaceans. Analysis of a genomic fragment of *Pem-CMG* reveals a single intron of 314 bp interrupting the coding sequence for the mature peptide. The presence of only one intron in *Pem-CMG* gene suggests that this gene is structurally different from the previously reported *MIH* gene of *Charybdis feriatus* and *CHH*-like gene of *Metapenaeus ensis* which possess two introns in their coding sequences. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Eyestalk; Neuropeptide; Penaeid shrimp; Rapid amplification of cDNA ends

1. Introduction

A number of physiological processes in decapod crustaceans are known to be regulated by diverse neuropeptides synthesized by a neurosecretory system called

*Corresponding author. Tel.: + 66-24-419-003 ext: 1237; fax: + 66-24-419-906.

E-mail address: staud@mahidol.ac.th (A. Udomkit)

X-organ-sinus gland complex (XOSG) located in the optic ganglia of the eyestalks (De Kleijn and Van Herp, 1995; Charmantier et al., 1997). Most of the peptide hormones isolated from the XOSG complex e.g. pigment dispersing hormone (PDH) and crustacean cardioactive peptide (CCAP) have also been identified in some other arthropods such as insects. Recently, a group of related peptides from XOSG complex that constitutes a novel hormone family has been described and thus far has been found only in crustaceans (Keller, 1992). This family includes crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and gonad inhibiting hormone (GIH) that are involved in blood sugar regulation, inhibition of ecdysteroid synthesis, and regulation of reproduction, respectively (Cooke and Sullivan, 1982; Chang, 1993).

Direct amino acid sequencing of the hormones in this CHH/MIH/GIH family from several crustaceans has been conducted (Kegel et al., 1989; Chang et al., 1990; Webster, 1991; De Kleijn et al., 1994a,b). Comparison of the amino acid sequences of these hormones revealed significant degrees of similarity (Keller, 1992; Sun, 1994; Chang, 1997) suggesting that they constitute an authentic peptide family across species boundaries. In addition to several similarities in their structure, some hormones in the CHH/MIH/GIH family are multifunctional i.e. exhibit more than one biological activity (Chang et al., 1990; Tensen et al., 1991; Lee et al., 1995). However, the certainty concerning the primary physiological functions of different peptides still needs to be clarified.

In recent years, the cDNA coding for CHH, MIH and GIH in a number of crustaceans has been cloned based on the information of available amino acid sequences (Weideman et al., 1989; Tensen et al., 1991; Klein et al., 1993; De Kleijn et al., 1994a,b; Sun, 1994; Lee et al., 1995; Aguilar-Gaytan et al., 1997). Despite this increasing number of reports on cDNA cloning and nucleotide sequence analysis of neuropeptides in CHH/MIH/GIH family, the hormones in several crustaceans still await complete characterization, especially at the molecular level.

We report here the molecular cloning of a cDNA encoding Pem-CMG, a peptide in the family of CHH/MIH/GIH, from black tiger prawn, *Penaeus monodon*. An open reading frame encoding Pem-CMG peptide was cloned from a cDNA of a single pair of the eyestalks. A primary structure of the gene for Pem-CMG was also analyzed and revealed that *Pem-CMG* gene of *P. monodon* has different structure from the genes encoding MIH and CHH-like peptide that have been recently reported in *Charybdis feriatius* and *Metapenaeus ensis*, respectively (Chan et al., 1998; Gu and Chan, 1998)

2. Material and methods

2.1. Animals

Black tiger prawns, *P. monodon*, were purchased from Shrimp Culture Research Center, Charoen Pokphand Group, Thailand and were kept alive in aerated seawater at room temperature until used.

2.2. Oligonucleotide primers

Abridged anchor primer (AAP) and abridged universal amplification primer (AUAP) were provided with the 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (GIBCO BRL). Other custom oligonucleotides were purchased from Bio-Synthesis, USA.

2.3. RNA isolation

A total of 100 eyestalks were collected from *P. monodon* immediately after anesthetizing the live shrimp with crushed ice. After the cuticle and non-neural tissues were removed, the dissected eyestalks were ground to fine powder in liquid nitrogen by means of mortar and pestle. Total RNA was extracted using TRIZOL[®] Reagent (GIBCO BRL). Poly (A)⁺ RNA was isolated using Dynabeads mRNA purification kit (DYNAL) and was quantified by measuring the absorbency at 260 nm.

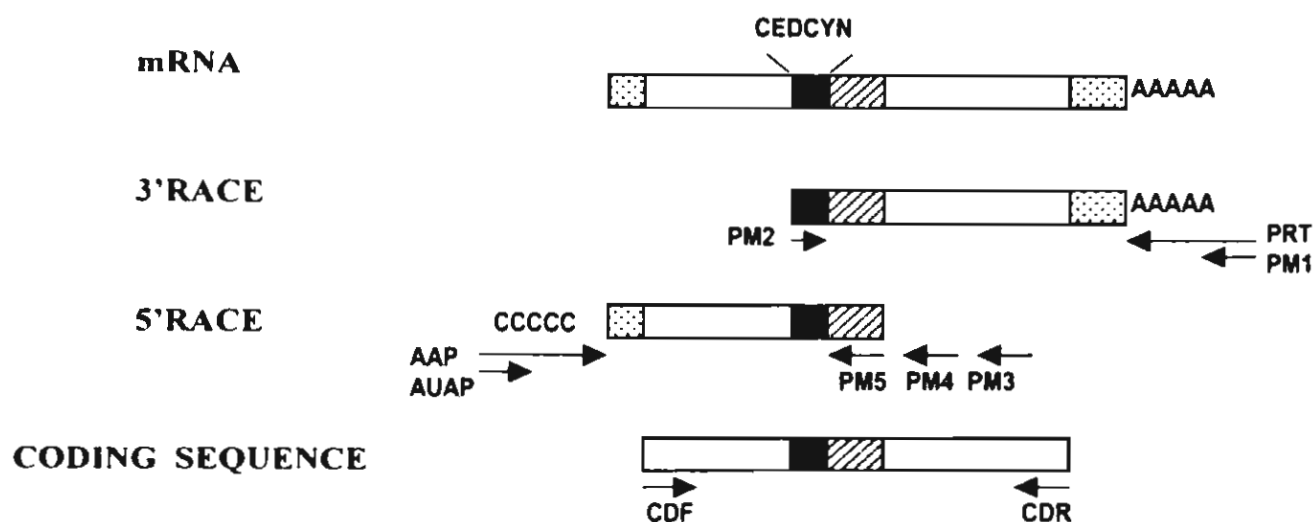
2.4. Amplification of the 3' ends of cDNA

The reaction was carried out according to the protocol of the 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (GIBCO BRL). First strand cDNA was synthesized from 75 ng of poly (A)⁺ RNA in a total volume of 20 µl containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 nM PRT primer, 500 µM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP and 200 units of SuperScript II Reverse Transcriptase. The reaction was incubated at 50°C for 50 minutes and then terminated at 70°C for 15 minutes. The RNA template was degraded with RNaseH before proceeding to amplification step. A 2 µl aliquot of cDNA was amplified with primers PM1 and PM2 (see Fig. 1) in a reaction containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 nM each primer, 200 µM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP and 2.5 units of AmpliTaq DNA polymerase (PE Applied Biosystems). Amplification was performed in a DNA Thermal Cycler (GeneAmp System 2400, PE Applied Biosystems) with 35 cycles of 94°C for 1 minute, 50°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes following with 7 minutes incubation at 72°C as a final extension.

2.5. Amplification of the 5' ends of cDNA

The detailed protocol of the 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 (GIBCO BRL) was as follows. First strand cDNA synthesis was carried out as described in Section 2.4, except that 100 nM of primer PM3 was substituted for primer PRT. The cDNA synthesized was then purified using a GlassMax DNA isolation spin cartridge (GIBCO BRL).

A 10 µl aliquot of purified cDNA was tailed with dCTP in 25 µl of 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dCTP and 1 µl of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). The reaction was incubated at 37°C for 10 minutes and TdT was heat inactivated at 65°C for 10 minutes. The PCR amplification of 5 µl of the dC-tailed cDNA was performed as described for the 3' RACE using 200 µM of



Oligonucleotide primers

3'RACE primers

PRT : 5' – CCGGAATTCAAGCTTCTAGAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT – 3'
 PM1 : 5' – CCGGAATTCAAGCTTCTAGAGGATCC – 3'
 PM2 : 5' – CCGGAATTCTGYGAAGAYTGYTACAAC – 3'

5'RACE primers

AAP : 5' – GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGIIGGGIIGGGIIG – 3'
 AUAP : 5' – GGCCACGCGTCGACTAGTAC – 3'
 PM3 : 5' – CCGGAATTCCCTTTGACGAGGCCGGAAC – 3'
 PM4 : 5' – CCGAAGCTTGTCCACGCAGTAGAG – 3'
 PM5 : 5' – CCGGAATTCACCTCGTTGTGGAACAG – 3'

coding sequence

CDF : 5' – CCGAAGCTTCATATGGTTGCCGTTGGAC – 3'
 CDR : 5' – CGGGATCCCTACTTGCCGAGCCTCTA – 3'

Fig. 1. Schematic diagram showing the 3' and 5' RACE products and the primers used in cDNA synthesis and PCR. Filled boxes represent the CEDCYN conserved amino acid sequence and shaded areas represent the overlapping region between the products of 3' and 5' RACE. Dotted boxes represent 5' and 3' untranslated regions. Detail of the primers used in 3' RACE, 5' RACE and amplification of a complete coding region is given below. 3'RACE: PRT primer contains oligo(dT)₁₆ linked to adapter sequences. PM1 is adapter sequences homologous to that of PRT containing restriction sites for *EcoRI*, *HindIII*, *Xba I* and *BamH I*. PM2 is a degenerated primer derived from the CEDCYN conserved amino acid sequence. 5'RACE: Abridged anchor primer (AAP) contains 3' sequence complementary to the dC-tail and additional 5' sequence that is composed of restriction sites for *Not I*, *Mlu I*, *Sal I* and *Spe I*. Abridged universal amplification primer (AUAP) contains a restriction site sequence homologous to that of AAP. PM3, PM4 and PM5 are gene specific primers derived from the nucleotide sequences of the 3'RACE product. Coding sequence: Gene specific primers derived from the nucleotide sequences extended from the start codon (CDF) and the stop codon (CDR) of *Pem-CMG* sequences. CDF and CDR contain restriction sites for *Hind III* and *BamH I* at their 5' termini, respectively.

primer PM4 and abridged anchor primer (AAP). The second round PCR was performed using primer PM5 and abridged universal amplification primer (AUAP) to obtain specific amplified product.

2.6. Amplification of an open reading frame of *Pem*-CMG peptide

Total RNA extracted from a single pair of the eyestalks was used to synthesize a cDNA template for amplification of the open reading frame of *Pem*-CMG peptide. The condition for PCR was the same as described earlier in Sections 2.4 and 2.5. The primers used were CDF and CDR, the sequences of which are given in Fig. 1.

2.7. Amplification of a genomic fragment of *Pem*-CMG gene

Genomic DNA was prepared from abdominal muscle tissues of *P. monodon* by phenol/chloroform extraction method (Sambrook et al., 1989). About 150 ng of genomic DNA was used as a template for PCR amplification of the *Pem*-CMG sequence with the primers CMG-F and CMG-R (Fig. 2) designed from the most 5' and 3' ends of the *Pem*-CMG cDNA. The PCR reaction mixture (150 ng of genomic DNA template, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 nM each primer, 200 μM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP) was heated to 95°C for 5 minutes, then 2.5 units of AmpliTaq was added. Amplification was achieved by 35 successive cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 50°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes, followed by a 10 minute final extension at 72°C.

2.8. Cloning and sequencing

PCR Amplification products were purified using GeneClean II kit (Bio101). The



Oligonucleotide primers

CMG-F : 5' – CGGAATTCTCAGTGCAGAGGGAGAGCC – 3'

CMG-R : 5' – CGGAATTCATTCTCTTATTTTATTAGACAGG – 3'

Fig. 2. Schematic diagram showing the strategy used for amplification of *Pem*-CMG genomic fragment and the primers used. Dotted area represents 5' and 3' untranslated regions. Exons are presented in white boxes and intron is presented in black box. Detail of the primers used is given below. CMG-F primer: contains 19 nucleotides at the most 5' region of *Pem*-CMG cDNA linked to restriction site for *EcoR* I at the 5' end. CMG-R primer: contains 25 nucleotides complementary to the most 3' region of *Pem*-CMG cDNA linked to restriction site for *EcoR* I at the 5' end.

purified DNA fragments were digested with appropriate restriction before being ligated to pUC18 vector predigested with corresponding enzymes. The ligation products were used to transform *E. coli* JM109 and the recombinants were screened by restriction enzyme digestion. The nucleotide sequences of the recombinants were determined by the method of ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle using ABI PRISM Model 377 automated DNA Sequencer (PE Applied Biosystems).

3. Results

3.1. 3'RACE cloning of the cDNA encoding Pem-CMG peptide

Nine individual recombinants, obtained by cloning of 3' RACE products into pUC18, that contain cDNA insert of different sizes ranging from 163 bp to 450 bp were selected for nucleotide sequence analysis. One of the clones harbors a 324 bp cDNA insert (including poly (A) tail), the nucleotide sequence of which exhibits more than 60% identity to those of mRNA encoding CHH and MIH from other crustaceans (data not shown).

3.2. 5' RACE cloning of the cDNA encoding Pem-CMG peptide

Using three specific primers generated from the nucleotide sequence of the 3' RACE fragment, a single band of amplification product of 370 bp (excluding G-rich tail) was obtained from 5' RACE and was subsequently cloned into pUC18. The nucleotide sequence analysis of three individual clones revealed that they contain cDNA insert homologous to the mRNA of CHH/MIH/GIH peptide family (data not shown). No variation in the nucleotide sequences was detected among the three clones.

3.3. Nucleotide sequence of Pem-CMG cDNA and its deduced amino acid sequence

The combination of nucleotide sequences of the 3' and 5' fragments of the *Pem-CMG* cDNA revealed a 593 bp cDNA containing a 384 bp open reading frame, 65 bp 5' untranslated region and 141 bp 3' untranslated region, with a potential polyadenylation signal AATAAA located 14 bp upstream from the poly (A) sequence (Fig. 3). The two fragments shared a 77 bp overlapping region (nucleotides 294 to 370) that exhibited identical nucleotide sequences. Using a cDNA that was synthesized from the total RNA of a single pair of the eyestalks, a fragment of 384 bp starting from a start codon to a stop codon of the open reading frame was cloned by PCR.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of a 384 bp open reading frame of *Pem-CMG* cDNA from nine individual recombinant clones are shown in Fig. 3. The change in amino acids at position 37 (Arginine to Cysteine) and position 115 (Glutamine to Arginine) was observed, each was due to a single nucleotide change in two different clones. The other seven clones showed identical nucleotide and amino acid sequences. The mature peptide was composed of 74 amino acids and was separated from a 52 amino acid propeptide region by a potential processing site, KR. The propeptide region

```

-tcagtgcagagggagagcctggaagttgctgaccgtcgctcccgatctgcctctacactaaagat : 65
66 : ATGGTTGCCGTTGGACCGATGCGGACAGCTGTCCTGGTGTCCCTGCTGTTGGCAATCCCGGCCTCT :131
    M V A V G P M R T A V L V S L L L A I P A S
132: GCCACCACCTTCGGAGACGGAATGACATTCCAACGTTCTCCGTTCTTCCCCAGAAGCCTCTCCT :197
    A T T F G D G N D I P T F L R S S P E A S P
198: GTGACTTCCCTTCACACCTCAGACAAACGCAGCCTATCCTTCAGGTCTTGCACGGGCGCCTACGAC :263
    V T S L H T S D K R S L S F R S C T G A Y D
264: CGCGAACTCCTTGTAAGGCTCGACCGCGTGTGCGAAGACTGCTACAACGTGTACCGCGACGTCGGA :329
    R E L L V R L D R V C E D C Y N V Y R D V G
330: GTGGCAGCCGAATGCAGGAGTAACTGTTTCCACAACGAGGTGTTTCCTCTACTGTGTGGACTACATG :395
    V A A E C R S N C F H N E V F L Y C V D Y M
396: TTCCGGCCTCGTCAAAGGAACAGTACCGGGCCGCCCTACAGAGGCTCGGCAAGTAGgtggttctct :461
    F R P R Q R N Q Y R A A L Q R L G K *
462: cttcagccagacctcgccatgcgactcccaagacgaccagactcttattaggttgcttttcgtatcc :527
528: tgatttaaaaggtaaaataagagcctgtacaacaagcctcctgtcttaataaaaataagagaaatat :593
(a)n

```

Fig. 3. Nucleotide sequence of *Pem*-CMG cDNA derived from the sequences of 5' and 3' RACE fragments. The 77 bp overlapping sequence is shaded. The 384 bp open reading frame is depicted by capital letters. The potential processing site, KR, is boxed. The deduced amino acids are written in one-letter symbols. The putative polyadenylation site is underlined.

contains several hydrophobic amino acid residues suggesting a possible role as a signal sequence.

3.4. Comparison of the amino acid sequence of *Pem*-CMG peptide with those of the peptides in CHH/MIH/GIH family from other crustaceans

The deduced amino acid sequence of *Pem*-CMG peptide of *P. monodon* was compared with those in the CHH/MIH/GIH family from several crustaceans. The result of this comparison (Fig. 4) revealed that *Pem*-CMG possessed a significant degree of homology to the peptides in this family (30%–50% identity). The *Pem*-CMG peptide contains six conserved cysteine residues which were found located at identical positions in all other members of CHH/MIH/GIH family. Most of the conserved amino acid residues were found in the N-terminal region whereas less homology was found in the C-terminal area.

3.5. Primary structure of *Pem*-CMG gene

A specific DNA fragment, about 900 bp, was amplified from genomic DNA of *P. monodon* with primers CMG-F and CMG-R. This fragment, designated as *g*-CMG, contained nucleotide sequence from the first start codon (ATG) to the stop codon (TAG) of *Pem*-CMG gene. Analysis of the nucleotide sequence of *g*-CMG fragment cloned in pUC18 revealed that this fragment contains one intron. An exon–intron boundary was detected using Gene Finder program of Baylor College of Medicine (BCM) on the WWW. The splice junction conformed to the splice donor and acceptor consensus sequence (Mounts, 1986).

The *g*-CMG fragment was subcloned by restriction enzyme *Hinc* II (Fig. 2), the recognition site of which lies within the intron sequence. The entire sequence of the intron was then determined from this subcloned fragment. The result showed that the

		*	20	*	40	
Pem-CMG	:	---	SLSFRSCTGAY	-	DRELLVRLDRVCEDCYNVYRDVGVA	: 36
Hoa-CHH-a	:	---	QVFDQACKGVY	-	DRNLFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVA	: 36
Hoa-CHH-b	:	---	QVFDQACKGVY	-	DRNLFKKLNRVCEDCYNLYRKPFIV	: 36
Cam-CHH	:	---	QIYDTSCCKGVY	-	DRALFNDLEHVCDDCYNLYRTSYVA	: 36
Prb-CHH	:	---	QVFDQACKGIY	-	DRAIFKKLDRVCEDCYNLYRKPYVA	: 36
Pej-CHH	:	---	SLFDPACTGIY	-	DRQLLRKLGRLCDDCYNVFERPKVA	: 36
Cam-MIH	:	---	VINDECPNLIGNRDLYKKVEWICEDCSNIFRKTGMA	:		: 36
Prb-MIH	:	---	QVFDQACKGIY	-	DRAIFKKLELVCDDCYNLYRKPKVA	: 36
Pej-MIH	:	---	SFIDNTCRGVMGNRDYNKKVVRVCEDCTNIFRLPGLD	:		: 37
Hoa-GIH	:	---	ASAWFTNDECPGVMGNRDLYEKVAWVCNDCANIFRNNDVG	:		: 40

		*	60	*	80	
Pem-CMG	:	AE	CRSNCFHNEVFLYCVDMFRPRQRNQYRAALQRLGK	---		: 74
Hoa-CHH-a	:	TT	CRENCYSNWVFRQCLDDLLLSDDVIDEYVSNVQMVGK	---		: 74
Hoa-CHH-b	:	TT	CRENCYSNRVFRQCLDDLLLSDDVIDEYVSNVQMVGK	---		: 74
Cam-CHH	:	SAC	RSNCYSNLVFRQCMDDLLMDEFDQYARKVQMVGRKK	-		: 76
Prb-CHH	:	TT	CRQNCYANSVFRQCLDDLLLDVDEYISGVQTV	----		: 72
Pej-CHH	:	TG	CRSNCYHNLIFLDCLEVLIPSHLQEEHMAAMQTVGK	---		: 74
Cam-MIH	:	SL	CRRNCFNEDFVWCVHATERSEELRDLEEWVGILGAGR	D		: 77
Prb-MIH	:	TT	CRENCYANSVFRQCLDDLLLDVDEYISGVQIVGK	---		: 74
Pej-MIH	:	GM	CRNRCFYNEWELICLKAANREDEIEKFRVWISILNAGQ	-		: 77
Hoa-GIH	:	VM	CKKDCFHTMDFLWCVYATERHGEIDQFRKWVSILRAGR	K		: 81

Fig. 4. Comparison of the amino acid sequence of Pem-CMG peptide with those of *H. americanus* CHH-A and CHH-B (Hoa-CHH-A and Hoa-CHH-B, Tensen et al., 1991), *C. maenas* CHH (Cam-CHH, Kegel et al., 1989), *P. bouvieri* CHH (Prb-CHH, Huberman et al., 1993), *P. japonicus* CHH (Pej-CHH, Yang et al., 1995), *C. maenas* MIH (Cam-MIH, Webster, 1991), *P. bouvieri* MIH (Prb-MIH, Aguilar-Gaytan et al., 1997), *P. japonicus* MIH (Pej-MIH, Ohira et al., 1997) and *H. americanus* GIH (Hoa-GIH, De Kleijn et al., 1994b). The amino acid residues that are identical to Pem-CMG peptide are highlighted.

intron is 314 bp long. This intron separates the two exons in the coding region for the mature Pem-CMG peptide between the second and the third codons of ⁹⁴Arg (Fig. 5).

4. Discussion

The 3' and 5' RACE strategy (Frohman et al., 1988) was employed in order to clone a Pem-CMG cDNA due to the lack of information on amino acid sequences of the peptides in CHH/MIH/GIH family in *P. monodon*. This technique requires only a single oligonucleotide primer which, in our case, was generated from the conserved amino acid sequence CEDCYN that is found conserved among the peptides in CHH/MIH/GIH family from a number of crustaceans (De Kleijn and Van Herp, 1995).

The open reading frame of Pem-CMG peptide from *P. monodon* was successfully cloned. The deduced amino acid sequence reveals a putative mature peptide comprising 74 amino acid residues. Amino acid change at two positions was observed when the deduced amino acid sequences from nine individual clones were compared. Since these sequences were cloned from the sinus gland of a single shrimp, the differences due to

```

-TCAGTGCAGAGGGAGAGCCTGGAAGTTGCTGACCGTCGCTCCCGATCTGCCTCTACTCTAAAGAT : 65
66 : ATGGTTGCCGTTGGACCGATGCGGGCAGCTGTCCTGGTGTCCCTGCTGTTGGCAATCCCGGCTCT : 131
    M V A V G P M R A A V L V S L L L A I P A S
132: GCCACCACCTTCGGAGACGGAAATGACATTCCAACGTTCTCCGTTCTTCCCCAGAAGCCTCTCCT : 197
    A T T F G D G N D I P T F L R S S P E A S P
198: GTGACTTCCCTTCACACCTCAGACAAACGCAGCCTATCCTTCAGGTCTTGACGGGCGCCTACGAC : 263
    V T S L H T S D K R S L S F R S C T G A Y D
264: CGCGAACTCCTTGTAAGGCTCGACCGGTGTGCGAAGACTGCTACAACGTGTACCGCGACGTCGGA : 329
    R E L L V R L D R V C E D C Y N V Y R D V G
330: GTGGCAGCCGAATGCAGGTAACCTTATTACTTTGCAGTAACCCACCCAGTTGTGTTGTGATTAAAGA : 395
    V A A E C R-----INTRON-----
396: CTATTGTAGAAGCGTATTAGTATACCATCTATTACTTTAGTATATCATCTATTACTATCATCTATC : 461
    -----INTRON-----
462: GGACAATGATTTCATACTGAGTTTGTATCCATGGAGCTTTCGTTAACATCGCCTGTTGCCTAAAA : 527
    -----INTRON-----
528: AGCCTCAATAATTATAAAATGTATAAACAGAATATACTTTATTCCTTATATCTCTTTATTACATA : 593
    -----INTRON-----
594: GTTATTTTTTTCACATTTCTCCTGTACGACCTACCAGTGGAACACATAACATTATTCTTCCTTCA : 659
    -----INTRON-----
660: GGAGTAAGTGTTCACACAACGAGGTGTTCTCTACTGTGTGGACTACATGTTCCGGCCTCGTCAAA : 725
    - S N C F H N E V F L Y C V D Y M F R P R Q
726: GGAACCAGTACCGGGCCGCCCTACAGAGGCTCGGCAAGTAGGTGGTTCCTCTTCAGCCAGACCTCG : 791
    R N Q Y R A A L Q R L G K *
792: CCATGCGACTCCCAAGACGACCAGACTCTTATTAGGTGCTTTTCGTATCCTGATTTAAAAGGTAAA : 857
858: ATAAGAGCCTGTACAACAAGCCTCCTGTCTAATAAAAATAAGAGAAATAT : 907

```

Fig. 5. Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of *Pem-CMG* gene. The gene consists of two exons that are separated by an intron of 314 bp (dashed line). Exon one harbors coding sequence for signal peptide and part of the coding sequence for the first 40 amino acids of Pem-CMG peptide. The second exon consists of the coding sequence for the rest 34 amino acids of the peptide. The deduced amino acids are written in one-letter symbols. The nucleotide G at position 90 is substituted for an A in the cDNA which changes the corresponding amino acid from threonine (in Fig. 3) to alanine in the genomic sequences (highlighted).

polymorphism can be excluded. Therefore it is likely that these differences represent gene isoforms or could be an error introduced during PCR amplification. The Pem-CMG peptide of *P. monodon* shared the highest degree of identity with CHH of *P. japonicus* (50%). Significant degrees of identity were also observed between Pem-CMG and CHH of *Homarus americanus* (45% for CHHa and 41% for CHHb), *Carcinus maenas* (42%) and *Procambarus bouvieri* (41%). These values were close to that between Pem-CMG and the MIH reported for *P. bouvieri* (39%), whereas lower degrees of identity are found between Pem-CMG sequence and MIH of *C. maenas* and *P. japonicus* (32% and 34%, respectively). The GIH of *H. americanus* also shows comparable degree of identity (30%) with Pem-CMG of *P. monodon*.

Since the peptides in the CHH/MIH/GIH family are structurally related, it is not surprising that some of them also possess overlapping activities. Chang et al. (1990) reported that MIH from *H. americanus* also exhibits hyperglycemic activity. This is consistent with the fact that *H. americanus* MIH is nearly identical to CHH peptide from the same species (Tensen et al., 1991). However, MIH peptide of *P. bouvieri* that share 90% identity in the amino acid sequence with its own CHH does not present any hyperglycemic activity (Huberman et al., 1993; Aguilar-Gaytan et al., 1997). *C. maenas* CHH, on the other hand, has been demonstrated to possess MIH activity i.e. inhibition of

ecdysteroid secretion by the Y-organ in vitro, albeit at low level, (Webster and Keller, 1986) despite the low degree of identity (28%) it shares with MIH peptide from the same species. In addition, the MIH of *H. americanus* also seems to be involved in the regulation of methylfarnesoate synthesis by mandibular organ in this species (Chang et al., 1990). Methylfarnesoate has been proposed to play a role in controlling vitellogenesis in crustaceans (Laufer et al., 1987), therefore, *H. americanus* MIH is probably involved in the control of vitellogenesis, the function previously assigned to GIH, as well. Thus, it is unlikely to distinguish crustacean peptides in CHH/MIH/GIH family from each other by homology in their amino acid sequences.

The amino acid sequence deduced from the genomic copy of *Pem-CMG* differs from the sequence deduced from cDNA at one position in the signal peptide region (Fig. 5). This difference may reflect polymorphism as the genomic DNA and the cDNA used for amplification of *Pem-CMG* gene and cDNA were obtained from different individual shrimp. The gene for *Pem-CMG* of *P. monodon* contains only one intron that separates the coding sequence for the mature peptide. This is in contrast to the primary structure of the genes encoding MIH in *Charybdis feriatatus* and CHH-like peptide in *Metapenaeus ensis* that have recently been characterized (Chan et al., 1998; Gu and Chan, 1998). The *MIH* gene of *C. feriatatus* contains two introns, intron 1 interrupts the sequence coding for signal peptide and the second intron separates the mature peptide sequence. Two introns were also found in *CHH*-like gene of *M. ensis*. They interrupt homologous regions to those of *C. feriatatus* *MIH*, one in the signal peptide sequence and the other in the mature peptide sequence. The differences in the structure of genes in the same family among different species is not uncommon and may reflect their evolutionary pathway. It is, however, too early to draw any conclusion concerning gene structure of the member of CHH/MIH/GIH family because only little information has been obtained from a few species so far. The structure of the genes coding for neuropeptides in CHH/MIH/GIH family from other crustaceans needs to be explored. This would give a clue to answer the question of how these structurally different genes have evolved from related gene families.

The sequence information from several members of CHH/MIH/GIH family together with their biological activities suggest that the neuroendocrine regulation of related physiological activities in crustaceans is more complicated than previously thought. A complete understanding of these regulatory processes requires further information from molecular studies as well as physiological studies to define more clearly the roles of individual peptides in this family.

Acknowledgements

We thank Ms. Chanikarn Boonchuoy (Central Equipment Laboratory, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University) for her help in automated DNA sequencing. This work was supported by Thailand Research Fund (TRF) [SS].

References

- Aguilar-Gaytan, R., Cerbon, M.A., Cevallos, M.A., Lizano, M., Huberman, A., 1997. Sequence of a cDNA encoding the molt-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Crustacean, Decapoda). *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5, 51–55.
- Chan, S.-M., Chen, X.-G., Gu, P.L., 1998. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatatus*). *Gene* 224, 23–33.
- Chang, E.S., 1993. Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. *Annu. Rev. Entomol.* 38, 161–180.
- Chang, E.S., 1997. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.-F. (Eds.), *Endocrinology and Reproduction, Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1, Science Publishers Inc, New Hampshire, USA, pp. 163–178.
- Chang, E.S., Prestwich, G.D., Bruce, M.J., 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 818–826.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Van Herp, F., 1997. Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.-F. (Eds.), *Endocrinology and Reproduction, Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1, Science Publishers Inc, New Hampshire, USA, pp. 109–161.
- Cooke, J.M., Sullivan, R.E., 1982. Hormones and neurosecretion. In: Bliss, D.E. (Ed.), *The Biology of Crustacea*, Vol. 3, Academic Press, New York, USA, pp. 205–290.
- De Kleijn, D.P.V., Van Herp, F., 1995. Molecular biology of neurohormonal precursors in the eyestalks of crustacean. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B, 573–579.
- De Kleijn, D.P.V., Janssen, K.P., Mortens, G.J., Van Herp, F., 1994a. Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 224, 623–629.
- De Kleijn, D.P.V., Sleutels, F.J., Martens, G.J., Van Herp, F., 1994b. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Lett.* 353, 255–258.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8998–9002.
- Gu, P.-L., Chan, S.-M., 1998. The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple copies of genes arranged in a cluster. *FEBS Letts.* 441, 397–403.
- Huberman, A., Aguilar, M.B., Brew, K., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., 1993. Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortman): interspecies comparison. *Peptides* 14, 7–16.
- Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J., Keller, R., 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*. *FEBS Lett.* 255, 10–14.
- Keller, R., 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48, 439–448.
- Klein, J.M., Mangerich, S., De Kleijn, D.P.V., Keller, R., Wiedeman, W.M., 1993. Molecular cloning of crustacean putative molt-inhibiting hormone (MIH) precursor. *FEBS Lett.* 334, 139–142.
- Laufer, H., Brost, D., Baker, F.C., Carrasco, C., Sinkus, M., Reuter, C.C., Tsai, L.W., Schooley, D.A., 1987. Identification of a juvenile-hormone like compound in a crustacean. *Science* 235, 202–205.
- Lee, K.J., Elton, T.S., Bej, A.K., Watts, S.A., Watson, R.D., 1995. Molecular cloning of a cDNA encoding putative moult-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 1126–1131.
- Mounts, S.M., 1986. A catalogue of splice junction sequence. *Nucleic Acids Res.* 10, 459–472.
- Ohira, T., Watanabe, T., Nagasawa, H., Aida, K., 1997. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 14, 785–789.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

- Sun, P.S., 1994. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 1–6.
- Tensen, C.P., De Kleijn, D.P.V., Van Herp, F., 1991. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormone from the lobster *Homarus americanus*. Eur. J. Biochem. 200, 103–106.
- Webster, S.G., 1991. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. B. 244, 247–252.
- Webster, S.G., Keller, R., 1986. Purification, characterization and amino acid comparison of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacean Decapoda). J. Comp. Physiol. B. 156, 617–624.
- Weideman, W., Gromoll, J., Keller, R., 1989. Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. FEBS Lett. 257, 31–34.
- Yang, W.-J., Aida, K., Nagasawa, H., 1995. Amino acid sequences of a hyperglycemic hormone and its related peptides from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture 135, 205–212.