



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

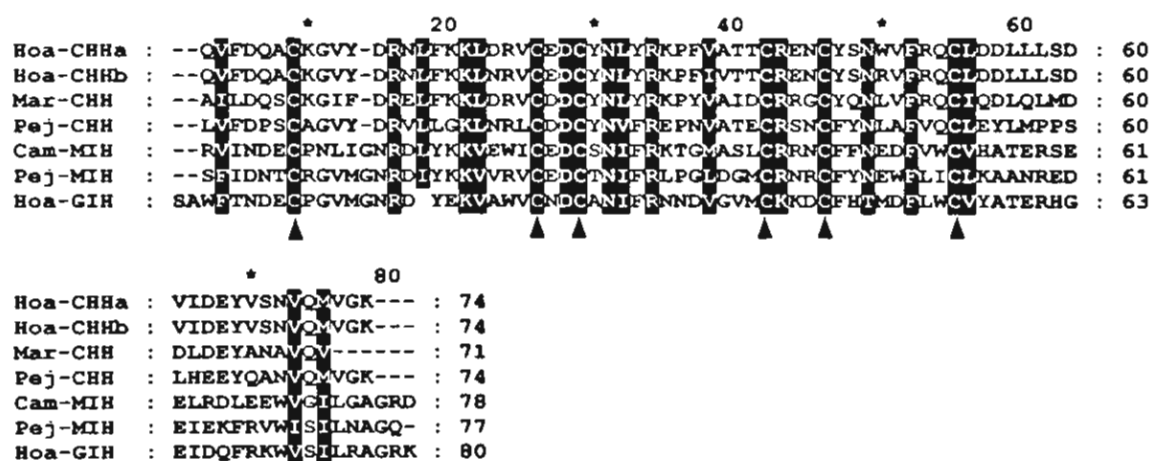
expression system ของ eukaryote เช่น yeast จะช่วยให้โปรตีนที่แสดงออกอยู่ใน conformation ที่เหมาะสม รวมถึงการเลือกให้โปรตีนมีการแสดงออกในรูปที่หลั่งออกนอกเซลล์ ก็จะทำให้โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ช่วยลดขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ได้ ดังนั้น

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 ตัวอักษรที่ระบายสีแดงแสดงกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ในฮอร์โมนทุกชนิด 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 มาใช้ในการเร่งให้แม่พันธุ์กุ้งวางไข่แทนการดัดกันดาที่ใช้ในปัจจุบันได้ วิธีนี้จะทำให้มีการใช้แม่พันธุ์กุ้งที่ต้องจับจากธรรมชาติและมีราคาแพง ได้อย่างคุ้มค่า เนื่องจากการดัดกันดาเพื่อทำลายแหล่งผลิต 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*

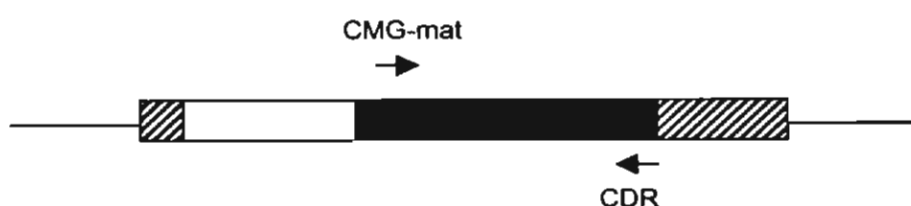
ชิ้น cDNA เฉพาะส่วนที่เก็บรหัสสำหรับ mature peptide ของ Pem-CMG1 ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ทำโดยใช้ pCMG1 plasmid ที่มีชิ้น cDNA ของ Pem-CMG1 แทรกอยู่ใน pUC18 เป็น template และใช้ไพรเมอร์จำเพาะ CMG-mat ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับปลาย N ของ mature peptide และ CDR ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 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

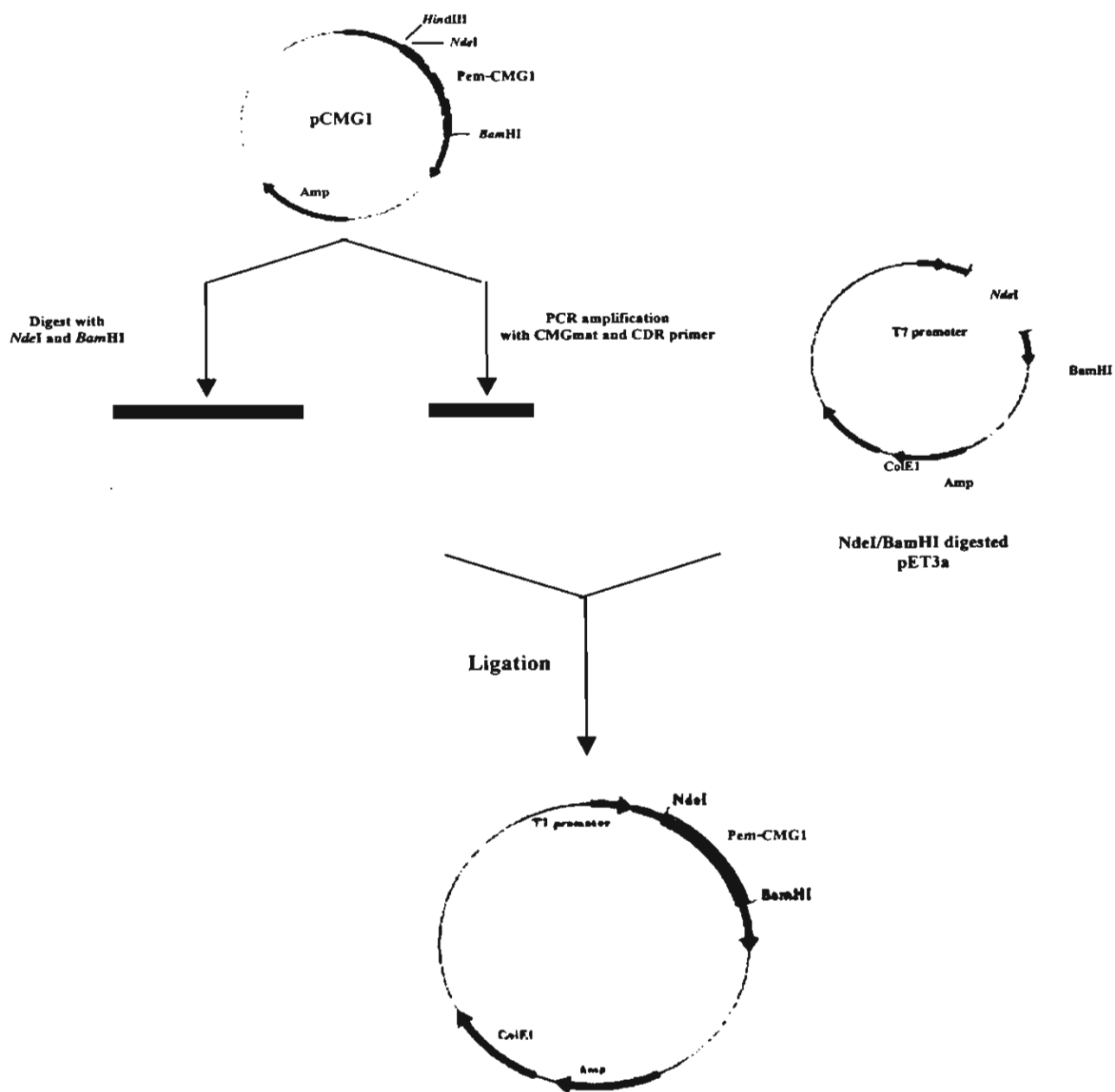
2.3 การแสดงออกของ CMG และ CMG-mat ใน *E. coli*

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 ของคริสต์เขียชนิดอื่นๆที่มีผู้รายงานไว้ 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 จากคริสต์เขียชนิดอื่นเช่นเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 พบว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วน of signal peptide มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโน 74 ตัวในส่วน of mature peptide มีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 93% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ CHH, MIH และ GIH ของคริสต์เขียชนิดอื่นๆ 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

```

-tcagtgcagagggagagcctggaagttgctgaccgtcgcctcccgatctgcctctacactaaagat : 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: 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: 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: CGCGAACTCCTTGTAAAGGCTCGACCGCGTGTGCGAAGACTGCTACAACGTGTACCGCGACGTGGA : 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: TCAGAAGACCAAGCATAAGCAAACGCTCTATATGGTTCATTCCTTGCACGGGCGTCTACGACCGC : 265
    S E D Q S I S K R S I W F N S C T G V Y D R
266: GAACTTCTTGTAAAGGCTCGACCGCGTGTGCGAAGACTGCTACAACCTCTACCGCGACGTGAGTG : 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: gtatcctaagttagaaacggataacatattgacgtcgaggtatttcattgtacagtgcttccataaa : 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: ACACGAGAACAAGCATAAGCAAACGCACCATGTCGTTTCAGTTCTTGACGGGTGTCTACGACCGC : 266
    T R E Q S I S K R T M S F S S C T G V Y D R
267: GAACTCCTTGTAAAGCTCGACCGCGTGTGCGAAGACTGCTACAACCTCTACCGCGACGTGGAGTG : 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: cggttgctctgtatcctaagttagaagctgacacatattgacgccgaggtgtttcatgtgtaat : 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 : --SLSERSCTGAY--DRELLVRLDRVCEDCYNLYRDVGVAAECRSNCFHNEVFLYQVDYMFRP : 59
Pem-CMG2 : --SIWFNSCTGVY--DRELLVRLDRVCEDCYNLYRDVGVAAECRSNCFHNEVFLYQVDYMFRP : 59
Pem-CMG3 : --TMSFSSCTGVY--DRELLVRLDRVCEDCYNLYRDVGVAAECRSNCFHNEVFLYQVDYMFRP : 59
Pej-CHH : --AAFDPSCTGVY--DRELLGRLSRLCDDCYNVEREPKVAEERSNCFENPAFVQCLEYLIPA : 59
Cam-CHH : --QIYDTSCKGVY--DRALFNDLEHVCDCCYNLYRTSYVASACRSNCYSNLVFRQCDDLLMM : 59
Hoa-CHHa : --QVFDOACKGVY--DRNLFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVATTCRENCYSNWFRQCDDLLLS : 59
Hoa-CHHb : --QVFDOACKGVY--DRNLFKKLDRVCEDCYNLYRKPFIVTTCRENCYSNWFRQCDDLLMI : 59
Orl-CHH2 : --QVFDOACKGVY--DRALFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVATTCRENCYANSVFRQCDDLLLI : 59
Hoa-MIH : --EVFDQACKGVY--DRNLFKKLDRVCEDCYNLYRKPFVATTCRENCYSNWFRQCDDLLLS : 59
Pev-MIH : --DTFDHSCKGVY--DRELFKKLDRVCEDCYNVEREPKVATECKSNCFVNKRNVQVADLRHD : 59
Pej-MIH : SASFIDNTCRGVMGNRDIYKKVVRVCEDCYNLIRPLGLDGMCRNRCFYNEWELICLKAAARE : 62
Hoa-GIH : SAWFTNDECPGVMGNRDLYEKVAVVCNDCANIERNDVGMCKKDCFHTMDPLWCYATERH : 62

```

% identity

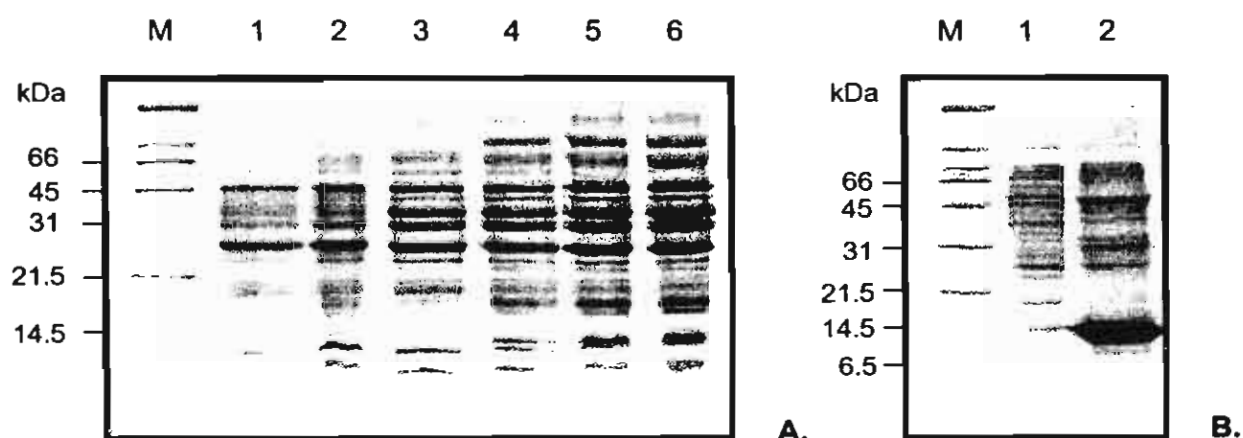
```

      *
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 : NVIDEYVSNVQM----- : 71 44
Pev-MIH : VSRFLKMANSA----- : 72 44
Pej-MIH : DEIEKFRVWISILNAQO : 79 31
Hoa-GIH : GEIDQFRKQWSILRA-- : 77 31

```

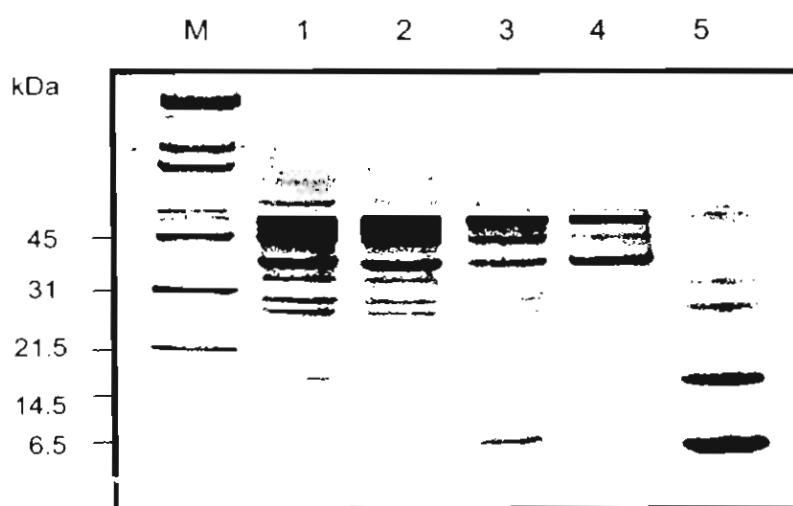
รูปที่ 5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจาก Pem-CMG1, Pem-CMG2 และ Pem-CMG3 กับลำดับกรดอะมิโนของฮอริโมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น กรดอะมิโน cysteine ทั้ง 6 ตัวที่พบในตำแหน่งเดียวกันในฮอริโมนทุกชนิดระบายด้วยสีเทา และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมือนกับกรดอะมิโนของ Pem-CMG อย่างน้อย 2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

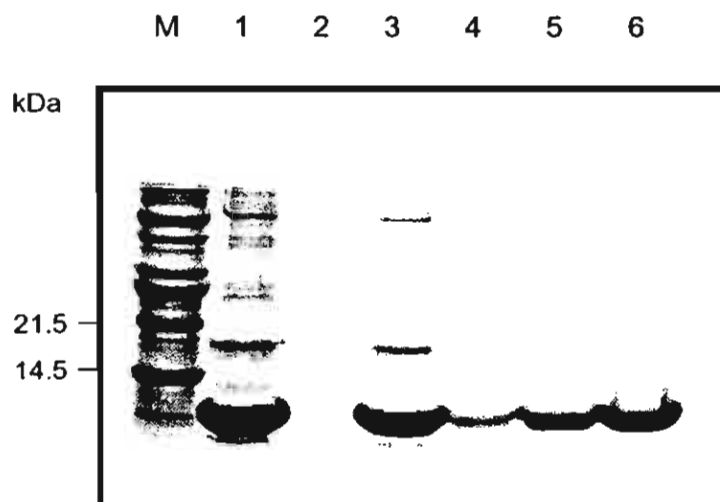
4.1 ทดสอบการละลายของ Pem-CMG1 peptide

ทำการละลายโปรตีน Pem-CMG1 ที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ซึ่งอยู่ในรูปของ inclusion โดยทดสอบความสามารถในการละลายของ inclusion ในสารละลาย urea ที่มีความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 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

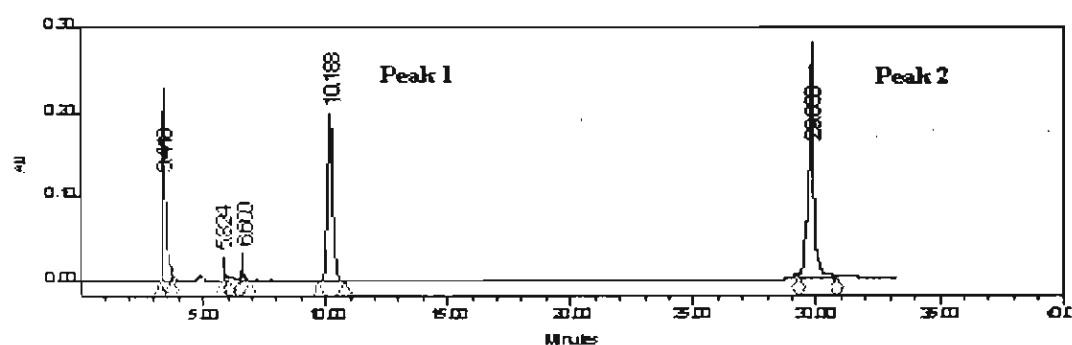
นำ Pem-CMG1 peptide ที่ละลายใน 6M urea มาแยกบริสุทธิ์ด้วย JUPITER 5u C18 HPLC column (250 x 6.6 mm, Phenomenex) โดยมีรายละเอียดของสภาวะที่ใช้ในการแยกโปรตีนตามที่กล่าวในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 4 พบว่ามี elution profile ดังแสดงในรูปที่ 9

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

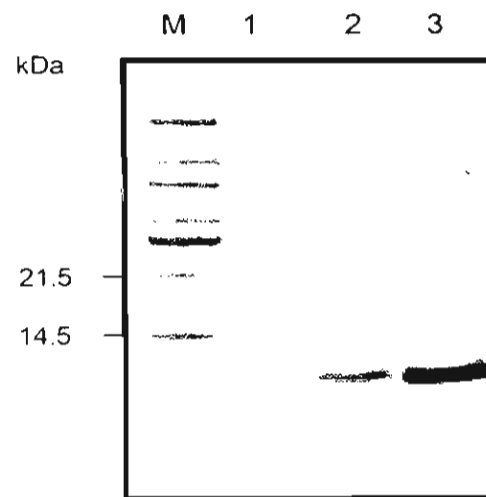


รูปที่ 8 16.5% tricine-SDS-PAGE แสดงการละลายของโปรตีนที่แสดงออกจาก CMG-mat cDNA ของ Pem-CMG1

- 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 เช่น ใช้สารละลาย 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.