



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาระดับอนุชีววิทยาของ lectin ในเลือดของกุ้งกุลาดำ (Peneaus monodon, Fabricius)

ณรงค์ศักดิ์ พวงลาภ

พฤศจิกายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาระดับอนุชีววิทยาของ lectin ในเลือดของกุ้งกุลาดำ (Peneaus monodon, Fabricius)

ผู้วิจัย ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ

สังกัด ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล,
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่สนับสนุนทุนวิจัยหลังปริญญาเอก ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติให้เงินสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนและเครื่องมือ ขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ศ.ดร. มนตรี จุฬาววัฒนทล อาจารย์วิจัยพี่เลี้ยง ศ.ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต รศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวรกุล ผู้อำนวยการศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ขอขอบคุณ ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ดร. กัลยา แดงดีป ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณนิธิศ ภัทรกุลชัย คุณสุชาติ เทพนวล ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างกุ้งกุลาดำเพื่องานวิจัย

บทคัดย่อ

การเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นเป็นอุตสาหกรรมการเกษตรที่สร้างรายได้ให้กับประเทศที่มีมูลค่าสูงอันดับต้นๆ ของไทย แต่การเลี้ยงกุ้งทะเลโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำไม่สามารถขยายกำลังการผลิตให้มากขึ้นได้ ทั้งๆ ที่เกษตรกรมีศักยภาพที่ดีที่จะดำเนินการได้ ทั้งนี้เนื่องจากประสบปัญหาโรคระบาดในกุ้งกุลาดำอย่างหนัก การแก้ไขทำได้ไม่เต็มที่เนื่องจาก ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกุ้งกุลาดำมีอยู่อย่างจำกัด โดยเฉพาะในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันซึ่งมีความสำคัญต่อความทนทานต่อโรคร้ายที่มากคุกคาม ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาในระดับโมเลกุลของ lectin ในกุ้งกุลาดำ โดยเน้นไปที่ lectin ที่เป็น sialic acid binding protein ซึ่งในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าในกุ้งกุลาดำมี monodinin ซึ่งเป็น lectin ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำได้ โดยการวิจัยจะเริ่มจากการแยกสกัด sialic acid binding protein จาก haemolymph ของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ fetuin agarose column chromatography ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติ haemagglutinating activity และเมื่อแยกด้วย SDS-PAGE พบว่าประกอบไปด้วย peptide หลายขนาด ตั้งแต่ 23.7 ถึง 60 kDa จากนั้นจึงนำ peptide 3 ชิ้นที่ขนาด 31.2, 26.3, และ 23.7 kDa ไปทำการหาลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ N-terminal ด้วยเทคนิค automated Edman degradation เมื่อนำผลกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณ N-terminal ของโปรตีนที่มีรายงานใน database ด้วยวิธี BLAST พบว่า peptide ทั้ง 3 ชิ้นไม่มีความคล้ายคลึงกับ lectin หรือโปรตีนอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อน จากนั้นทำการออกแบบ degenerate primer จาก peptide ทั้งสามเพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุม peptide ทั้งสาม ผลที่ได้คือมีผลผลิต DNA เกิดขึ้นหลายขนาดในแต่ละ primer combination และแต่ละเนื้อเยื่อของกุ้งแต่ละผลจากการ BLAST พบว่า DNA ที่ได้ยังไม่ใช่ส่วนหนึ่งของยีนที่ควบคุม peptide ทั้งสาม นอกจากนี้ได้สร้าง cDNA library จาก haemocyte ของกุ้งกุลาดำโดยใช้ λ gt11 phage และผลิต polyclonal antibody ที่จำเพาะกับ sialic acid binding protein ที่สกัดได้และใช้ antibody นี้ในการ probe หา phage จาก library ที่สร้างขึ้น แต่ผลที่ได้ไม่ประสบความสำเร็จอาจจะเนื่องจากยีนเป้าหมายอาจมีขนาดใหญ่หรือไม่สามารถผลิตโปรตีนได้อย่างเหมาะสม ใน λ gt11 phage ผลที่ได้จากการทดลองนี้จะเป็นแนวทางในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง sialic acid binding lectin ในกุ้งกุลาดำนี้อีกต่อไป

Abstract

Shrimp culture is one of the top agricultural industries in Thailand. It creates high economic value for the country. However, shrimp farming has not achieved its full production potential due to a number of problems. The most important one is a pandemic disease that causes a massive loss of shrimp production in Thailand and many countries in the region. This problem cannot be solved easily since the basic knowledge on the immunity or defense mechanisms of the shrimp that are important for confronting with pathogenic invasion are still limited. This study focused on the determination and characterization of lectin, sialic acid binding lectin in particular, in the molecular level. Earlier report indicated the existence of sialic acid binding lectin, named monodin, in *P.monodon* and it contained agglutination activity that was crucial for the growth inhibition of shrimp pathogens. This study was conducted on the isolation and identification of sialic acid binding protein in the haemolymph of *P.monodon* using fetuin agarose column chromatography. The result was purified protein that contained high haemagglutination activity. After SDS-PAGE analysis, it revealed a number of peptides ranging from 23.7 to 60 kDa. Three of these peptides at the sizes of 31.2, 26.3, and 23.7 kDa were subjected to peptide sequencing using automated Edman degradation. The obtained N-terminal sequences were then compared to other reported sequences using BLAST analysis. The result revealed no match on the sequences of all 3 peptides with any of the peptide sequences in database. Furthermore, various pairs of degenerate primers were designed from the peptide sequences and PCRs were conducted in order to amplify partial fragments of the genes encoding these target peptides. These also provided negative results on the sequences. cDNA library was constructed from haemocyte of the shrimp and polyclonal antibody against the purified sialic acid binding protein was also produced. After probing the library with the antibody, the results also revealed no positive phage. These unsuccessful attempts were probably due to the possible large size of the encoding genes which made it so difficult to amplify the gene using PCR and the target protein might not be easily produced in λ gt11 phage. Finally, the results from this study will be valuable for further investigation and determination on sialic acid binding protein in *P.monodon* and other penaeid shrimp.

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

ปัจจุบันระบบภูมิคุ้มกันของ invertebrate ได้รับความสนใจมากขึ้นโดยเฉพาะในสัตว์จำพวก marine invertebrate ซึ่งต้องอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เต็มไปด้วยสิ่งคุกคามจากภายนอกจำนวนมาก อย่างไรก็ตามร่างกายของสัตว์เหล่านี้มีระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายที่มีประสิทธิภาพมากเพียงพอที่จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่สามารถล่องล้าผ่านโครงสร้างทางกายภาพภายนอก (exoskeleton) เข้าไปสู่ร่างกายได้ จากการศึกษายังพบว่าระบบภูมิคุ้มกันของ invertebrate สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือด (cellular response) และระบบภูมิคุ้มกันจากน้ำเลือด (humoral defense) โดยทั้ง 2 ระบบมีการทำงานที่ค่อนข้างแตกต่างจากระบบภูมิคุ้มกันใน vertebrate ทั่วไป ประการแรกคือ เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันยังไม่สามารถแยกประเภทได้ชัดเจน นอกจากนี้ไม่ปรากฏว่ามีการสร้าง antibody เหมือนอย่างที่พบในสัตว์ชั้นสูงอีกด้วย อย่างไรก็ตาม invertebrate ก็มีสารหลายอย่างในระบบเลือดที่ทำหน้าที่คล้ายคลึงกันมาทดแทน เช่น lysins, agglutinins, lymphokine-like substances และ anti-microbial factors สารเหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก immunoglobulins ที่พบใน vertebrates แต่หน้าที่ที่แท้จริงของสารแต่ละชนิดดังกล่าวยังไม่มีการพิสูจน์ที่แน่ชัดออกมาเนื่องจากมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากใน invertebrates แต่ละชนิด

Lectins คือโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่ไม่ใช่ enzyme และ ไม่ใช่ immune แต่มีลักษณะพิเศษคือสามารถสร้างพันธะแบบที่ไม่ใช่ covalent bond กับสารประกอบพวก carbohydrates ได้ เริ่มมีการค้นพบและศึกษาในพืชก่อน ต่อมาก็มีการค้นพบในสิ่งมีชีวิตอย่างอื่นเพิ่มมากขึ้นทั้งในสัตว์และ microorganisms ใน lectin แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะในการจับกับ carbohydrate ที่แตกต่างกันออกไป คุณสมบัติที่สำคัญนี้จึงทำให้ lectin มีความสามารถในการ agglutinate เซลล์เม็ดเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลัง, bacteria และ malignant cells ตลอดจนการตกตะกอนสารที่มีองค์ประกอบของ carbohydrate เช่น glycoproteins และ glycolipids ปฏิกริยาเหล่านี้จะถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลซึ่งมีลักษณะโครงสร้างแบบเดียวกันหรือคล้ายกันกับโครงสร้างของ carbohydrates ที่ lectin นั้นๆ มีความเฉพาะเจาะจงด้วย (Lis and Sharon, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่า lectin ยังมีหน้าที่เป็นตัวกลางในการจดจำของเซลล์ ในกระบวนการที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตในหลายๆ ระบบ (Sharon and Lis, 1989 ; Sharon and Lis, 1993 and Lasky, 1992) ความสามารถในการจับกับ carbohydrate ชนิดเดียวกันถึงแม้จะไม่แตกต่างกันมากนักในการเกิดปฏิกิริยาใน lectin แต่โครงสร้างทางโมเลกุลของ lectin จะมีความแตกต่างกันได้ซึ่งคุณสมบัติหลายประการได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกประเภทของ lectin เช่น ความจำเพาะต่อชนิดของ carbohydrate, รูปแบบในการเกิดปฏิกิริยาตกตะกอน, ตำแหน่งที่พบในเซลล์, ลักษณะทางกายภาพ, และความต้องการ metal co-factors (Drickamer, 1994) ในสัตว์ทั้ง vertebrates และ invertebrates ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากหน้าที่สำคัญที่มีในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น มีการแบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ lectin ที่อยู่บน membrane (integral membrane lectins) และ

lectin ที่เป็นสารละลาย (soluble lectins) (Lis and Sharon, 1986) lectins ใน invertebrates ได้รับการยอมรับว่ามีความสำคัญกับระบบภูมิคุ้มกันซึ่งคล้ายคลึงกับ immunoglobulins ใน vertebrates มีการค้นพบและได้รับการแยกสกัดจาก marine invertebrates หลายชนิดรวมทั้ง giant clams (Baldo et al., 1978), sea urchin (Giga et al., 1987), acorn barnacle (Muramoto and Kamiya, 1990), และ tunicate (Suzuki et al., 1990) lectin ที่อยู่บน membrane ของเซลล์ในสัตว์นั้นมีความเชื่อว่าเป็น mediator ระหว่างเซลล์และไกลโคโปรตีน โดยที่ soluble lectin จะมีหน้าที่ในการจับกับสารประกอบ carbohydrate บนผิวสัมผัสของเซลล์ (Barondes, 1984) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงว่า lectin ใน haemolymph มีคุณสมบัติคล้ายกับ opsonins (Renwrentz and Stahmer, 1983; Chu, 1988)

Agglutinins เป็นชื่อที่ใช้เรียก lectin ชนิดที่มีคุณสมบัติในการจับและตกตะกอน (agglutinate) สิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกายหลายประเภทได้แก่ bacteria, protozoans, lymphocytes และ metazoan parasites (Pistole, 1982a; Ingram et al., 1983; Cohen, 1980; Lackie, 1981) คุณสมบัติของ agglutinin ในการจับและตกตะกอน เซลล์เม็ดเลือดแดงของ vertebrate ได้รับการยอมรับและถูกใช้เป็นวิธีหลักในการศึกษา agglutinin ใน invertebrate จึงทำให้บางครั้งถูกเรียกว่า haemagglutinin คุณสมบัติของ agglutinins ใน invertebrate ที่แตกต่างจาก immunoglobulins ใน vertebrates คือ agglutinins จะมีความจดจำและมีปฏิกิริยาที่เฉพาะกับ carbohydrates หรือสารประกอบ carbohydrates (carbohydrate specific recognition) เท่านั้น สัตว์พวก invertebrates ในแต่ละชนิดอาจมี agglutinin ได้หลายชนิดและแต่ละชนิดอาจมีปฏิกิริยาเฉพาะกับ carbohydrates ที่ต่างกันด้วย อย่างไรก็ตาม agglutinin ที่มีทั้งหมดไม่จำเป็นต้องเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน (opsonic factor) เสมอไป agglutinins ส่วนใหญ่จะมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ Ca^{2+} เป็นส่วนประกอบสำคัญในการทำปฏิกิริยา จากการศึกษาไม่พบว่า haemagglutinins จะสามารถถูกกระตุ้นด้วย antigen ได้เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นกับ immunoglobulin

ระบบภูมิคุ้มกันใน Decapod crustaceans โดยเฉพาะในกลุ่ม Penaeid ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นและเมื่อกล่าวถึงระบบที่เกี่ยวข้องกับการจดจำ (recognition system) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของระบบภูมิคุ้มกัน lectins จะได้รับความสนใจและมีการศึกษากันมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นที่พบในกระแสเลือด มีการแยกสกัดตลอดจนศึกษาลักษณะพิเศษของ lectin ในเลือดของกุ้งทะเลหลายชนิดและมีคุณสมบัติในการจับเกาะกับ carbohydrates ที่แตกต่างกันไป lectin ที่พบใน Brown shrimp, (*Penaeus californiensis*) เป็น Lipopolysaccharide-binding proteins โดยมีความสามารถในการจับกับ lipopolysaccharide ที่พบอยู่บริเวณผิวด้านนอกของ bacteria หลายชนิด (Vargas-Albores et al., 1993) lectin อีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมากคือ β -1,3-glycan binding protein ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับ β -1,3-glycan ที่พบใน Fungi ได้ดี (Duvic and Soderhall, 1992; Cerenius et al., 1994; และ Vargas-Albores et al., 1997) ในเลือดของ giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) พบว่ามี sialic acid-specific lectin (monodin) ซึ่งมีความสามารถในการจับและ

ตกตะกอน *Vibrio vulnificus* ซึ่งเป็น bacteria ที่ทำให้เกิดโรคและพบได้มากในกุ้งกุลาดำ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; 1992)

การศึกษาเกี่ยวกับ lectin ในแง่ที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นทุกขณะ มีการแยกและสกัดในกุ้งทะเลหลายชนิด (Alpuche et al., 2005; Ma et al., 2007; Liu et al., 2007; Sun et al., 2008; Zhao et al., 2008; Zhang et al., 2009a; Wang et al., 2009a; Xu et al., 2010; Song et al., 2010; และ Rattanaporn, et al., 2010) โดยพบว่ามีความแตกต่างที่หลากหลายแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดของสัตว์ที่ใช้ในการวิจัย จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจมากที่ในสัตว์ที่ต่างชนิดกันมี lectin ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันหลายชนิดและมีความสามารถในการต่อต้านกับสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงหน้าที่ที่แท้จริงยังไม่ได้รับการพิสูจน์อย่างถ่องแท้รวมทั้งความรู้ในระดับอนุชีววิทยาของ lectin ในกุ้งทะเลโดยเฉพาะชนิดที่มีในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นความรู้ที่ได้จากการศึกษาในระดับอนุชีววิทยารวมทั้งการตรวจหาเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้าง lectin จึงมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษากลไกและหน้าที่ของ lectin ในกุ้งทะเลและ invertebrates อื่นๆ ด้วย

สาร Monodin เป็น sialic acid-specific lectin ชนิดหนึ่งที่พบได้ในเลือดของกุ้งกุลาดำและมีความสัมพันธ์ที่สำคัญเช่นเดียวกับ lectin ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่พบในเลือดของ invertebrate ชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด (Ratanapo และ Chulavalnatol 1990) ดังนั้นจึงทำให้เชื่อได้ว่า monodin จะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบป้องกันตัวของกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามข้อมูลการวิจัยในระดับ molecule ตลอดจนหน้าที่หรือกลไกการทำงานของ lectin เหล่านี้ยังมีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ lectin ชนิดนี้ในกุ้งทะเลชนิดอื่นๆ ที่พบได้ในประเทศไทยนอกเหนือจากกุ้งกุลาดำนั้นยังไม่มีรายงาน ดังนั้นความรู้ที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาและกลไกการทำงานของ lectin ในกุ้งทะเลในการวิจัยนี้จะสามารถอธิบายถึงกลไกการทำงานของ lectin ได้ และจะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน ตลอดจนกลไกการจดจำและแยกแยะระหว่างสิ่งที่เป็นตัวเองกับสิ่งแปลกปลอมภายนอกของกุ้งทะเล ตลอดจนเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านโรคที่เกิดขึ้นกับกุ้งทะเลชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษา Monodinin และ sialic acid specific lectin จากเลือดของกิ้งกูดดำ
2. เพื่อตรวจหาเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ sialic acid specific lectin ในกิ้งกูด
3. เพื่อหาลำดับ nucleotide ของ lectin gene จาก cDNA library ที่สร้างขึ้นโดยใช้ mRNA จากเนื้อเยื่อที่มีการสังเคราะห์ lectin ในกิ้งกูดดำ
4. เพื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะที่สำคัญทางอนุชีววิทยาของ lectin ในระหว่างกิ้งกูดชนิดต่างๆ

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกิ้งกูดดำ

ทำการเก็บเลือดกิ้งกูดจากตัวอย่างกิ้งกูดที่มีขนาดประมาณ 20-30 กรัมจากฟาร์มเลี้ยงกิ้งกูดในจังหวัดราชบุรี และชลบุรี ตัวอย่างเลือดของกิ้งกูดเก็บโดยใช้เข็มและหลอดฉีดยาดูดเลือดจากแองโกลบบริเวณขาเดินคู่สุดท้าย เลือดกิ้งกูดที่ได้จะถูกผสมกับสารป้องกันการแข็งตัว (10% sodium citrate, pH 7.0) ในอัตราส่วน 3 : 1 จากนั้นทำการแยกน้ำเลือดออกจากเม็ดเลือดด้วยวิธี centrifugation โดยใช้ความเร็ว 5000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บ supernatant ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หรือใช้ในส่วนของการทดลองอื่นต่อไป ส่วน pellet จะนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อทำการสกัด RNA ต่อไป

2. การแยกสกัด sialic acid binding lectin จากเลือดของกิ้งกูดดำ

นำ serum ของกิ้งกูดที่เก็บได้มาผ่านขั้นตอน dialysis เพื่อกำจัด anticoagulant ออกไปโดย dialyse เลือดของกิ้งกูดใน TBS buffer จากนั้นจึงนำเลือดกิ้งกูดที่ได้ไปผ่านขั้นตอน affinity chromatography โดยใช้ fetuin-agarose column เพื่อแยก sialic acid binding protein ออกจากส่วนอื่นของ serum ตามวิธีของ Ratanapo and Chulavatanatol (1990) โดยนำ serum ที่เตรียมได้ (150 mL) มาผ่าน fetuin-agarose column (5 mL) ซึ่งได้รับการ equilibrate ด้วย TBS (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 300mM NaCl และ 10mM CaCl₂) และตามด้วย TBS จนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์แล้ว จากนั้น lectin ซึ่งเกาะกับ medium ใน column จะถูก elute ออกมาโดยใช้ TBS ซึ่งมีส่วนผสมของ 20mM EDTA หรือ 20 mM N-acetyl-galactosamine (GalNAc) ที่ flow rate เท่ากับ 0.2 mL/min จากนั้นทำการเก็บ fraction ของตัวอย่างทั้งก่อนและหลัง elution (fraction size = 1 mL) แล้วนำ eluant ที่ได้ไปวัดค่า absorbance ที่ 280 nm เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีน นอกจากนี้ได้ทำการตรวจวัดตัวอย่างโปรตีนด้วยวิธี Protein assay ของ Bradford (1975) และ SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ตามลำดับ

3. การทำ haemagglutination assay ของ sialic acid binding lectin ที่สกัดได้จากกิ้งกูดดำ

การทดสอบ haemagglutination activity ทำโดยการนำ protein fraction ที่ elute ได้จาก fetuin-agarose column และผ่านการทำ dialysis เพื่อกำจัด EDTA ออกแล้ว (50 µL) มาผสมกับ TBS เพื่อให้เป็น 2 fold serial dilution ใน round bottom 96 well microtiter plate โดยให้หลุมในแถวสุดท้ายไม่มีสารละลาย

โปรตีนที่จะทดสอบเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม จากนั้นจึงเติม 2% RBC suspension (50 μ L) ลงไปผสมในทุกหลุมของ microtiter plate สำหรับการเตรียม 2% RBC suspension นั้นทำโดยใช้เม็ดเลือดแดงของคนที่ยกออกจาก serum และล้างด้วย TBS จำนวน 3 ครั้งก่อนเตรียมให้มีความเข้มข้นที่ 2% ใน TBS (v/v) ทำการตรวจวัดผลการเกิด haemagglutination โดยสังเกตการเกาะกันระหว่าง lectin และเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับ การเกิดจุดสีแดงบริเวณกลางหลุมของ microtiter plate ซึ่งเป็นการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีการเกิด haemagglutination

4. การสร้าง Polyclonal antibody สำหรับ lectin ที่สกัดได้จากกุ่มกลาดำ

ทำการสร้าง polyclonal antibody ที่จำเพาะกับ sialic acid-binding lectin ที่สกัดได้จากกุ่มกลาดำโดยนำ sialic acid-binding lectin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 0.5 ml ผสมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปฉีดที่บริเวณกล้ามเนื้อขาหลังของกระต่ายพันธุ์ New Zealand white หลังจากนั้นเป็นเวลา 15 วันจึงทำการฉีดซ้ำอีกครั้ง ด้วย sialic acid-binding lectin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 0.5 ml ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant หลังจากนั้นเป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บเลือดกระต่ายและตรวจสอบความจำเพาะของ antibody โดยการทำ Western blot analysis จากนั้นทำการแยก antibody ที่ได้โดยการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แล้วใช้ DEAE Sephacel column แยก antibody ออกจากโปรตีนชนิดอื่นตามวิธีของ Harlow and Lane (1988).

5. การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ทำการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยนำโปรตีนตัวอย่างมาผสมกับ reducing buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol และ 10% β -mercaptoethanol) (1:1) แล้วต้มนาน 5 นาที จากนั้นจึงนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 10, 12, หรือ 15 % (acrylamide:bis solution เท่ากับ 29:1) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ ใน running buffer (25mM Tris, 200mM Glycine และ 0.1% SDS) นาน 50-60 นาทีหรือจนกระทั่ง bromophenol blue จาก dye หลุดไปจากเจล จากนั้นนำแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot หรือนำไปย้อมด้วยสีย้อมคูเมสซีบีแอล (0.1% Coomassie Blue R-250, 45% Methanol และ 5% acetic acid) เพื่อดูแถบของโปรตีนที่แยกได้

6. การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต (Western Blot)

วิธีการนี้เป็นการจำแนกชนิดของโปรตีนหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) โดยถ่ายโอนโปรตีนที่อยู่บนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลลงบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส และติดตามหาโปรตีนที่

เราสนใจด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับโปรตีนนั้นๆ โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ นำตัวอย่างสารละลายโปรตีนมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) จากนั้นถ่ายโอนโปรตีนที่แยกได้ลงบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสโดยใช้เครื่อง Mini Trans-Blot Cell (BioRad) แฉแผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจล เมมเบรน ไนโตรเซลลูโลสขนาด 7x8.5 cm กระดาษกรองขนาด 7.5x10.5 cm ในสารละลายทรานสเฟอร์บัฟเฟอร์ (Tris ความเข้มข้น 25 mM ไกลซีนความเข้มข้น 192 mM เมทานอลความเข้มข้น 20 % และ โซเดียมโดเดซิลล์ ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 %) นาน 15-30 นาที จากนั้นนำมาวางเรียงกันจากซ้ายไปขวาด้วย กระดาษกรอง แผ่นเจล เมมเบรนไนโตรเซลลูโลส กระดาษกรอง ตามลำดับ โดยระวังอย่าให้ระหว่างชั้นมีฟองอากาศ จากนั้นนำไปต่อเข้ากับกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้า 350 มิลลิแอมแปร์ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาแล้ว นำแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate-buffered Saline, PBS) นาน 2 นาที แล้วนำเมมเบรนไปแช่ในสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) เข้มข้น 1 % เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำไปแช่ในแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่เราสนใจซึ่งถูกทำให้เจือจางในสารละลาย BSA 1 ส่วน ใน 1000 ส่วน เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แฉแผ่นเมมเบรนในแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติบอดีของกระต่ายและเชื่อมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งถูกทำให้เจือจางในสารละลาย 1% BSA 1 ส่วน ใน 1000 ส่วน เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS ที่มี Tween20 ผสมอยู่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (PBST) 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปแช่ในสารละลายไดอะมิโนเบนซีน (Diaminobenzidine, DAB) จนเกิดแถบสีน้ำตาล ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ตรวจสอบบริเวณที่ติดสีน้ำตาลเทียบกับแถบโปรตีนบนแผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจล

7. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ N-terminal ของ sialic acid binding lectin ของกุ้งกุลาดำ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อการหาลำดับกรดอะมิโนทำโดยนำตัวอย่าง lectin ที่สกัดได้ไปแยกใน Tris-Tricine peptide separating gel โดยผสมตัวอย่าง (5-10 μ l) กับ sample buffer (2x Sample buffer (10 mL) contained 1 ml 1M Tris-Cl pH 6.8, 0.4 g SDS, 2 ml glycerol, 0.02 g bromophenol blue, และ 0.31 g DTT) แล้วต้มนาน 5 นาที ก่อนนำไป load บน 12% Tris-Tricine peptide separating gel โดยใช้ anode buffer (0.2 M Tris pH 8.9) และ cathode buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M Tricine, และ 0.1% SDS) และกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100-150 V จนกระทั่ง dye พ้นออกจากเจล จากนั้นจึงทำการย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่ ProBlott membrane (Applied Biosystems) โดยการ blotting ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 25 V นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำการย้อม membrane ด้วย ProBlott staining solution (0.1% Coomassie Blue R250, 45%

Methanol, และ 5% acetic acid) นาน 1 นาที แล้วจึง destain ด้วย ProBlott destaining solution (45% Methanol, และ 5% acetic acid) และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งก่อนนำไปฝังให้แห้ง แบนด์ของเปปไทด์ที่ปรากฏจะถูกนำไปหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี automated Edman degradation โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ Department of Biological Sciences, Protein & Proteomics Centre, The National University of Singapore.

8. การแยกสกัด RNA จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของกิ้งกูดดำ

ทำการสกัด total RNA จาก haemocyte, hepatopancreas, muscle และ gill ของกิ้งกูดดำโดยนำเนื้อเยื่อหรือเซลล์ (~1 กรัม) ซึ่งได้ทำการแยกส่วนเก็บไว้มาแช่ในไนโตรเจนเหลวและบดให้ละเอียดแล้วนำไปผสมกับสารละลาย Phenol/Guanidinium isothiocyanate (GIT) เมื่อแยกส่วนของของเหลวที่มี total RNA อยู่ออกจากส่วนอื่นแล้วนำไปสกัด mRNA โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ oligo(dT) cellulose เพื่อแยก poly(A) mRNA ทำการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอวัดได้โดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 1 คือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวมีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และวัดความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอโดยดูค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร ซึ่งควรอยู่ในช่วง 1.6 – 1.9 จากนั้นจึงนำ RNA ที่สกัดได้ไปเก็บรักษาไว้ที่ -80°C

9. การตรวจวิเคราะห์ DNA และ RNA ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยชั่งผงอะกาโรสเจล ละลายในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นของอะกาโรสเท่าที่ต้องการ (ประมาณ 1-2 %) นำไปหลอมในไมโครเวฟ ตั้งสารละลายอะกาโรสไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเทในถาดเตรียมเจลที่มีหัวเสียบ (comb) ลงตรงปลายด้านหนึ่งไว้แล้ว เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้ว ดึงหัวเสียบออก จากนั้นนำถาดเจลที่เตรียมไว้ไปวางในอ่าง อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีหลุมอยู่ด้านซ้ายลง เทบัฟเฟอร์ TAE ลงในอ่างให้ท่วมเจล นำ DNA หรือ RNA ที่ต้องการตรวจสอบมาผสมกับสียติดตาม (ประกอบด้วยสียบรอมฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์ และไฟคอลล์ 25 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ) แล้วนำไปหยอดในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80-100 โวลต์ จนกระทั่งสียบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 2 ใน 3 ของความยาว จากนั้นนำแผ่นอะกาโรสเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม นาน 15 นาที แล้วนำอะกาโรสเจลไปแช่ในน้ำ เป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นอะกาโรสเจลมาส่องดูภายใต้แสงยูวี (UV transilluminator) โดยเปรียบเทียบกับขนาดกับ DNA มาตรฐาน

10. การสร้าง cDNA library จาก RNA ที่สกัดจาก haemocyte ของกิ้งกูดดำ

ทำการสร้าง cDNA library โดยใช้ mRNA ที่สกัดจาก haemocyte เป็น template ในการสร้าง cDNA ด้วยวิธี reverse transcription โดยใช้ TimeSaver cDNA synthesis kit และชุด Lambda Packaging kit (Amersham Pharmacia biotech) แบคทีเรีย host cell ที่ใช้คือ *E.coli* strain Y1090 โดยมีการดำเนินการตามขั้นตอนที่แนะนำโดยบริษัทผู้จำหน่ายดังนี้

นำ mRNA ที่สกัดจาก haemocyte ของกิ้งกูดจำนวน 5 µg มาผสมกับ 0.5 µg ของ oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer ก่อนนำไปให้ความร้อนที่ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปผสมกับ First-strand reaction mix และ DTT solution (1 µL) แล้วบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปผสมกับ Second strand reaction mix แล้วบ่มที่ 12°C นาน 1 ชั่วโมง และ 22°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Klenow fragment (1 µL) ก่อนบ่มที่ 37°C นาน 30 นาทีและ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวไปสกัดด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) จากนั้นนำส่วนใสด้านบนไปผ่าน Pharmacia SizeSep 400 spun column นำส่วน cDNA ที่แยกได้ (100 µL) ไปผสมกับ EcoRI/NotI Adaptor solution (5µL) ตามด้วย PEG buffer (30 µL), 1/5 diluted ATP solution (1µL) และ T4 DNA ligase (1µL) จากนั้นบ่มที่ 16°C นาน 1 ชั่วโมง และ 65°C นาน 10 นาที เมื่อส่วนผสมถูกทำให้เย็นโดยน้ำแข็งแล้วจึงผสมด้วย ATP solution (1.5µL) และ T4 polynucleotide kinase (1µL) บ่มที่ 37°C นาน 30 นาทีและ 65°C นาน 10 นาที ทำการสกัดด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) และตามด้วย Pharmacia SizeSep 400 spun column จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไป ligate เข้าสู่ λgt 11 (2µg) โดยการตกตะกอนร่วมกันเมื่อเติม 3 M โซเดียมอะซิเตด (1 µL) และ ethanol (50 µL) ที่ -70°C นาน 1 ชั่วโมง นำตะกอนมาละลายด้วย ligation buffer (8 µL), 1 mM ATP solution (1 µL), และ T4 DNA ligase (1 µL) ที่ 16°C นาน 12 ชั่วโมง นำ λDNA ที่ได้ไปทำ in vitro packaging โดยใช้ Pharmacia in vitro packaging module ตามขั้นตอนที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต โดยการนำ λDNA ที่ได้ไปผสมกับ Extract A (จาก *E.coli* BHB2688) และ B (*E.coli* BHB2690) ก่อนนำไปบ่มที่ 20°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วเติม SM buffer (100mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl และ 0.001% gelatin pH 7.5) (470 µL) และเติม chloroform (1µL) เพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย สุดท้ายนำ phage ที่ได้นี้ไปหาไตเตอร์และสามารถเก็บไว้ได้ที่ 4°C หรือที่ -70°C เมื่อผสม DMSO

11. การหาไตเตอร์ของ cDNA library

นำ phage ที่ได้มาทำ serial dilution (10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ dilution) โดยใช้ SM buffer จากนั้นนำสารละลาย phage ในแต่ละ dilution (100 µL) ผสมกับ Y1090 plating cell (100 µL) แล้วบ่มที่ 37°C นาน 15 นาที ก่อนนำไปผสมกับ 4 mL ของ molten M-top agar (0.8% agar ใน L-broth ที่มีส่วนผสม maltose 0.4%) แล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี LB/ampicillin agar รอจนส่วนผสมแข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่ 42°C นาน 12 ชั่วโมง ทำการนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นในแต่ละ dilution ไตเตอร์ของ library มีหน่วยเป็น plaque forming unit (pfu/mL) คำนวณจากการคูณจำนวน plaque ด้วยจำนวน dilution ถ้าไตเตอร์ที่ได้จะใช้ในการคำนวณปริมาณ plaque ที่ต้องการในการตรวจหาชิ้นจาก library ต่อไป

12. การตรวจหาชิ้นจาก cDNA library โดยใช้ antibody

นำ phage ที่ได้มาเท plate ดังอธิบายในหัวข้อข้างต้น โดยให้มีจำนวน plaque บน plate ประมาณ 500 plaque ต่อ 1 plate นำ plate ไปบ่มที่ 42°C จนกระทั่ง plaque มีขนาดประมาณ 1 mm จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose filter ซึ่งได้มีการแช่ด้วย 10 mM IPTG ไว้ล่วงหน้าแล้ว มาวางทับผิวหน้าของ agar ใน plate แล้วทิ้งไว้ที่ 37°C นาน 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose filter ออกมาล้างด้วย PBS จากนั้นจึงทำ Western Blotting ด้วยวิธีที่อธิบายในหัวข้อ 6 โดยใช้ polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อ sialic acid binding lectin ที่ได้ผลิตขึ้นตามวิธีในข้อ 4 เป็น primary antibody ผลการทดลองที่เป็นบวกจะเกิดสีน้ำตาลเข้มที่ plaque ที่มี DNA ที่ต้องการเกิดขึ้น จากนั้นนำตำแหน่งที่พบใน nitrocellulose filter ไปเปรียบเทียบกับตำแหน่ง plaque บน plate แล้วจึงนำ phage ที่อยู่ในตำแหน่งนั้นไปขยายและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

13. การสกัด DNA จาก recombinant phage

Phage ที่อยู่บน plaque ที่มีผลเป็นบวกจะได้รับการแยกออกจาก plate โดยใช้ปลายของ Pasteur pipette เจาะบน agar แล้วนำไปแช่ใน 100 μ L ของ phage buffer (20mM Tris-HCl pH 7.4, 100mM NaCl, และ 10mM $MgSO_4$) ที่ 4°C นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเติม Y1090 ที่เลี้ยงใน LB/ampicillin/10mM $MgSO_4$ นาน 12 ชั่วโมง จำนวน 300 μ L บ่มที่ 37°C นาน 20 นาที แล้วจึงนำไปผสมกับ LB/ampicillin/10mM $MgSO_4$ จำนวน 25 mL ใน 125 mL flask แล้วบ่มต่อที่ 37°C จนเกิด lysis (ประมาณ 3-4 ชั่วโมง) นำไป centrifuge ที่ 8000 g, 4°C นาน 10 นาที แล้วนำ supernatant ไปผสมกับ RNase A และ DNase I (อย่างละ 1 μ g/mL) บ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ก่อนเติม SM buffer ที่มีส่วนผสม polyethylene glycol (MW 8000) และ 2 M NaCl ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 1 ชั่วโมง และ centrifuge ที่ 10,000 g 4°C นาน 20 นาที แล้วนำ ตะกอนที่ได้ไปละลายใน SM buffer (0.5 mL) นำ supernatant ไปสกัดด้วย phenol, phenol/chloroform, และ chloroform ตามลำดับ นำส่วน aqueous phase ไปตกตะกอนด้วย isopropanol แล้วละลายใน TE buffer

14. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน sialic acid binding lectin ในกิ้งกูด้าด้วยเทคนิค Degenerate PCR และ RACE-PCR

14.1 Degenerate PCR

นำผลของ peptide sequence ที่ได้จากการทำ automated Edman degradation มาใช้ในการออกแบบ degenerate primers (ตารางที่ 1) เพื่อใช้ในการทำ PCR โดยมี condition ดังนี้

สร้าง cDNA สายแรกเพื่อใช้เป็น template สำหรับการทำให้ PCR ด้วยการให้ Access RT-PCR system (Promega) โดยในปฏิกิริยาปริมาตร 50 μ L ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอต้นแบบ 50 ng, บัฟเฟอร์ AMV/*Tfl* เข้มข้น 1 เท่า, dNTPs เข้มข้น 0.2 mM, ไพรมเมอร์ forward เข้มข้น 1 μ M, ไพรมเมอร์ reverse เข้มข้น 1 μ M, เอนไซม์ AMV Reverse Transcriptase ปริมาณ 1 หน่วย (unit) และเอนไซม์ *Tfl* DNA

polymerase ปริมาณ 1 หน่วย จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) สายแรก

48 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 1 รอบ

ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA สายที่สองและการเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น

94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

40 รอบ

และ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

1 รอบ

เมื่อทำปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว นำผลผลิตจากการทำอาร์ทีพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ degenerate PCR และ RACE PCR.

Gene	Sequence	Length (bp)
Forward primer		
1. SBL-A1	5' GAY CAR CAY TTY CCN TGY AAY AC 3'	23
2. SBL-A2	5' TGY AAY CCN CCN TGY AAY AC 3'	20
3. SBL-B1	5' TGY YTN CRY CGN TGY CRY AC 3'	20
4.SBL-C1	5' CCN AAY CCN AAY TTY TTY GC 3'	20
Reverse primer		
1. SBL-CR	5' GCR AAR AAR TTN GGR TTN GG 3'	20
2. SBL-R	5' CCN CCC ATR TTY TGR CAR AA 3'	20

14.2 RACE-PCR

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทาง 3' และ 5' ของยีนเป้าหมายจะทำโดยใช้เทคนิค RACE-PCR 2 วิธี โดยในวิธีแรกนั้นจะสร้าง cDNA สายแรกจาก mRNA ที่สกัดจาก haemocyte ของกิ้งตามวิธี Timesaver cDNA synthesis kit และมี oligo dT Sal I (GACTCGAGTCGACATCGA(T)₁₅) และ oligo dT Not I (GAATTCGCGGCCGC(T)₁₅) เป็นไพรเมอร์ในการจับกับ poly A tail และมี overhang sequence เพื่อจับกับ reverse primer Sal I (TCGATGTCGACTCGAGTC) และ Not I (AGCGGCCGCGAATTC) เมื่อได้ cDNA สายแรกแล้วจึงนำมาใช้เป็น template ในการทำ PCR โดยใช้ forward primer (ตารางที่ 1) ที่ออกแบบจาก N-terminal sequence ของโปรตีนที่ได้จากการทดลองในหัวข้อที่ 7 มาจับคู่กับ reverse primer (Sal I และ Not I primer) เพื่อหา 3' end ของยีน ส่วนวิธีที่ 2 จะใช้ BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit โดยทำ

การทดลองตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิต คือ สร้าง 3' และ 5' RACE template โดยการนำ mRNA (1 µg) มาผสมกับ 5' CDS primer (1 µl) และ 10 µM SMART II A oligonucleotide (1 µl) สำหรับการทำให้ 5' RACE-PCR หรือนำ mRNA มาผสมกับ 3' CDS primer A oligonucleotide (1 µl) สำหรับการทำให้ 3' RACE-PCR. จากนั้นนำส่วนผสมไปต้มที่ 70 °C นาน 2 นาที จากนั้นเติม 5X first strand buffer (2 µl), 20 mM DTT (1 µl), dNTP Mix (10 mM each) (1 µl) และ PowerScript Reverse Transcriptase (1 µl) นำส่วนผสมไปต้มที่ 42 °C นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วเจือจางด้วย Tricine-EDTA buffer (125 µl) ก่อนนำไปต้มที่ 72 °C นาน 7 นาที primer ที่ใช้ในการทำ RACE-PCR แสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ RACE PCR

Primer	Sequence
SMART II Oligonucleotide	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'
3' RACE CDS Primer A	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ V N 3' (N=A,C,G, or T; V=A, C, or G)
5' RACE CDS Primer	5' (T) ₂₅ V N 3' (N=A,C,G, or T; V=A, C, or G)
10X Universal Primer A Mix (UPM)	Long: 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3' (0.4 µM) Short: 5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' (2 µM)
Nested Universal Primer A (NUP)	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3' (10 µM)

เมื่อได้ template สำหรับ 5' และ 3' RACE PCR แล้วจึงนำไปใช้ในการทำ PCR โดยมีส่วนประกอบดังนี้ คือ ผสม master mix ที่ปริมาตร 42.75 µl โดยมีส่วนประกอบของ 10X Advantage 2 PCR buffer (5 µl), dNTP mix (10 µM each) (1 µl), 50X Advantage 2 polymerase mix (1 µl) จากนั้นนำ master mix ไปประกอบเป็นส่วนผสมของ RACE-PCR ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมี condition ของ PCR คือ เมื่อ Tm ของ GSP >70 °C, การทำ PCR จะเริ่มที่การทำ PCR จำนวน 5 รอบที่มีอุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาทีและ 72 °C นาน 2 นาที ตามด้วย 5 รอบของ 94 °C นาน 30 วินาที, 70 °C นาน 1 นาที และ 72 °C นาน 2 นาที จากนั้นจึงเป็น 20 รอบที่ 94 °C นาน 30 วินาที, 68 °C นาน 1 นาที และ 72 °C นาน 2 นาที ส่วนรอบสุดท้ายจะเป็น 72 °C นาน 7 นาที

ตารางที่ 3 ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทำ RACE-PCR

Component	5' RACE-Sample (µl)	3' RACE-Sample (µl)
5' RACE-Ready cDNA	1.25	-
5' GSP (10 µM)	1	-
3' RACE-Ready cDNA	-	1.25
3' GSP (10 µM)	-	1
UPM	0.5	0.5

Component	5' RACE-Sample (μl)	3' RACE-Sample (μl)
H ₂ O	1	1
Master mix	42.75	42.75
Final volume	50	50

15. การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

DNA หรือผลผลิตจาก PCR จะถูกแยกโดย agarose gel electrophoresis แล้วตัดชิ้นของ agarose ที่มี DNA เป้าหมายออกมาเพื่อทำการแยกสกัดด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction kit (RBC; Real Biotech Corporation) โดยการเติม DF buffer (0.5 ml) ลงไปที่ชิ้นเจลที่ตัดออกมาแล้วนำไปบ่มที่ 55 °C นาน 10-15 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายแล้ว จึงนำสารละลายที่ได้ไปผ่าน DF column ด้วยการ centrifuge ที่ 8,000 rpm นาน 30 วินาที แล้วล้างด้วย wash buffer ก่อน centrifuge อีกครั้ง จากนั้นจึงชะ DNA ออกจากคอลัมน์โดยการเติม elution buffer หรือน้ำแล้ว centrifuge ที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที

เมื่อได้ชิ้น DNA เป้าหมายแล้วจึงนำไปโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy vector (Promega, USA) โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 10 μl ที่ประกอบด้วย DNA เป้าหมาย (3 μl), pGEM-T easy vector (25 ng), 2x rapid ligation buffer (60 mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM DTT, 2 mM ATP and 10% PEG 8000) (5 μl) และ T4 DNA ligase (3 Weiss unit) นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่ 4 °C นาน 12 ชั่วโมง

Recombinant Vector ที่ได้จะถูก transform เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* strain JM109 โดยการผสม competent cell (200 μl) กับ recombinant vector ข้างต้น (5 μl) ก่อนแช่ในน้ำแข็งประมาณ 30 นาที แล้วช็อคที่ 42 °C นาน 45 วินาที แล้วนำกลับไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นนำส่วนผสมไปใส่ใน SOC medium (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glucose) (1 mL) แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี LB agar ที่มีส่วนผสมของ ampicillin (50 μg/ml), IPTG (25 μg/ml), และ X-gal (20 μg/ml) ที่ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง ผลที่ได้จะตรวจสอบโดยดูจากโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวจะมี recombinant plasmid อยู่ส่วนโคโลนีสีฟ้าจะเป็นแบคทีเรียที่ plasmid ไม่มี DNA insertion

ทำการแยกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงใน LB/ampicillin broth (1% tryotone, 0.5% yeast extract, 1.0 % NaCl, 50 μg/ml ampicillin) เพื่อเพิ่มจำนวนแล้วทำการแยกสกัด plasmid โดยใช้ HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC; Real Biotech Corporation) โดยนำเซลล์ที่ถูกปั่นตกตะกอนมาผสมกับ PD1 buffer (200 μl) และตามด้วย PD2 buffer (200 μl) หลังจากผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วเติม PD3 buffer (300 μl) เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้วจึง centrifuge ที่ 14,000 rpm นาน 1 นาที แยก supernatant มาผ่าน PD column และ centrifuge ที่ 6,000 g นาน 1 นาที จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย W1 buffer (400 μl) และ ethano-added Wash buffer (600 μl) แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm นาน 2 นาทีเพื่อกำจัด Wash buffer

จากนั้นทำการชะลอด้วย elute buffer หรือน้ำ (30-50 μ l) หลังจาก centrifuge ที่ 14,000 rpm นาน 2 นาที plasmid DNA ที่ได้จะถูกนำไปหาความเข้มข้นและนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-T easy vector ที่มีชิ้น DNA เป้าหมายอยู่จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย automated DNA sequencer โดยใช้ M13 forward primer และ/หรือ M13 reverse primer ในการเริ่มต้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์โดย Bioservice unit (BSU, สวทช) และ บริษัท MACROGEN (Korea) ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจาก GenBank ด้วยวิธี BLAST (NCBI) เพื่อระบุชื่อยีนโดยการเปรียบเทียบ

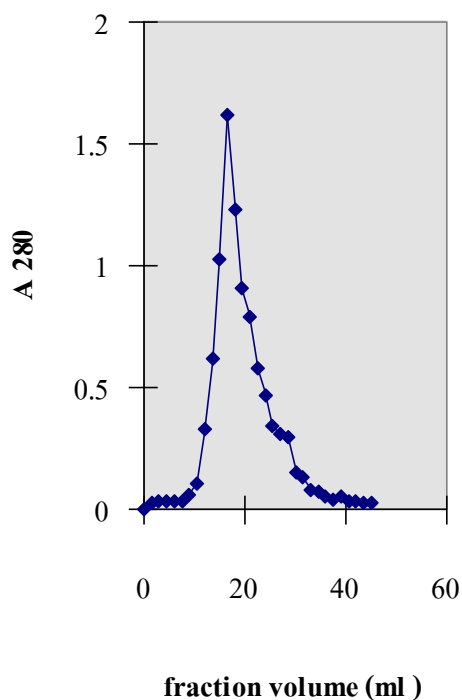
ผลการทดลอง

1. การเก็บ haemolymph จากกิ้งกูดาคำ

ทำการเก็บเลือดกิ้งจากตัวอย่างกิ้งที่มีขนาดประมาณ 20-30 กรัมจากฟาร์มเลี้ยงกิ้งในจังหวัดราชบุรี และชลบุรี โดยเลือดที่เก็บได้มีปริมาตรรวมประมาณ 300 ml จากนั้นทำการแยกน้ำเลือดออกจากเม็ดเลือดด้วย เก็บ supernatant ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ส่วน pellet นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อทำการสกัด RNA ต่อไป

2. การแยกสกัด sialic acid binding lectin จากเลือดของกิ้งกูดาคำ

นำ haemolymph ของกิ้งที่ได้แยก haemocyte ออกแล้ว มาผ่านขั้นตอน dialysis เพื่อกำจัด anticoagulant ออกไปโดย dialyse เลือดของกิ้งใน TBS buffer จากนั้นจึงนำเลือดกิ้งที่ได้ไปผ่านขั้นตอน affinity chromatography โดยใช้ fetuin-agarose column เพื่อแยก sialic acid binding protein ออกจากส่วนอื่นของ haemolymph โดยจะทำการแยกสกัดโดยใช้ elution buffer ต่างกัน 2 ชนิด คือ TBS ซึ่งมีส่วนผสมของ 20mM EDTA และ TBS ซึ่งมีส่วนผสมของ 20 mM N-acetyl-galactosamine ผลการแยกสกัดโดยใช้ eluter ต่างกันให้ผลที่เหมือนกันคือจะเห็นว่าจะมี peak หลักอยู่ 1 peak หลังจาก elution (รูปที่ 1)



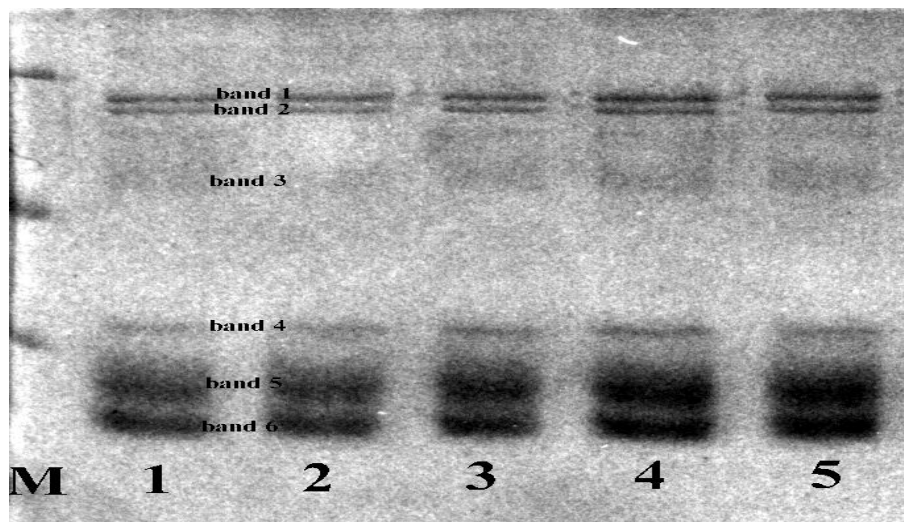
รูปที่ 1 แสดงค่า absorbance ที่ 280 nm ของ lectin ที่ผ่านขบวนการแยกสกัดด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ fetuin-agarose column

3. การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของ sialic acid binding protein จากเลือดกิ้งกูด้า

โปรตีนที่ผ่านการแยกโดย fetuin-agarose column ได้รับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนและคุณสมบัติด้วยวิธี haemagglutination activity assay และ SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ crude haemolymph และโปรตีนส่วนอื่นจากการแยกสกัด ดังในตารางที่ 4 เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณและขนาดของโปรตีนที่แยกสกัดด้วย 20 mM EDTA ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามี band ของโปรตีนจำนวน 6 band ซึ่งมี molecular weight ต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2 และ ตารางที่ 5 ส่วนผล SDS-PAGE ของโปรตีนที่แยกสกัดด้วย 20 mM N-acetyl-galactosamine ดังแสดงในรูปที่ 3 และ ตารางที่ 6 พบว่ามี Band ปรากฏจำนวน 4 band โดย 2 band ที่มีขนาด 60 และ 57 kDa นั้นจะมีขนาดและปริมาณใกล้เคียงกับ Band 1 และ Band 2 ของโปรตีนที่แยกสกัดด้วย 20 mM EDTA แต่มีปริมาณน้อยมาก ส่วนอีก 2 band ซึ่งมีขนาดประมาณ 42 และ 31.2 kDa นั้นจะปรากฏเป็น Band หลัก เมื่อทำการ elute คอลัมน์ด้วย 20 mM EDTA อีกครั้ง หลังจาก elute ด้วย 20 mM N-acetyl-galactosamine พบว่ามี band หลัก 2 band ที่มีขนาดประมาณ 31 และ 25 kDa (รูปที่ 3)

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณโปรตีนและ haemagglutination activity ของ lectin ที่แยกได้เปรียบเทียบกับในเลือดของกุ้ง

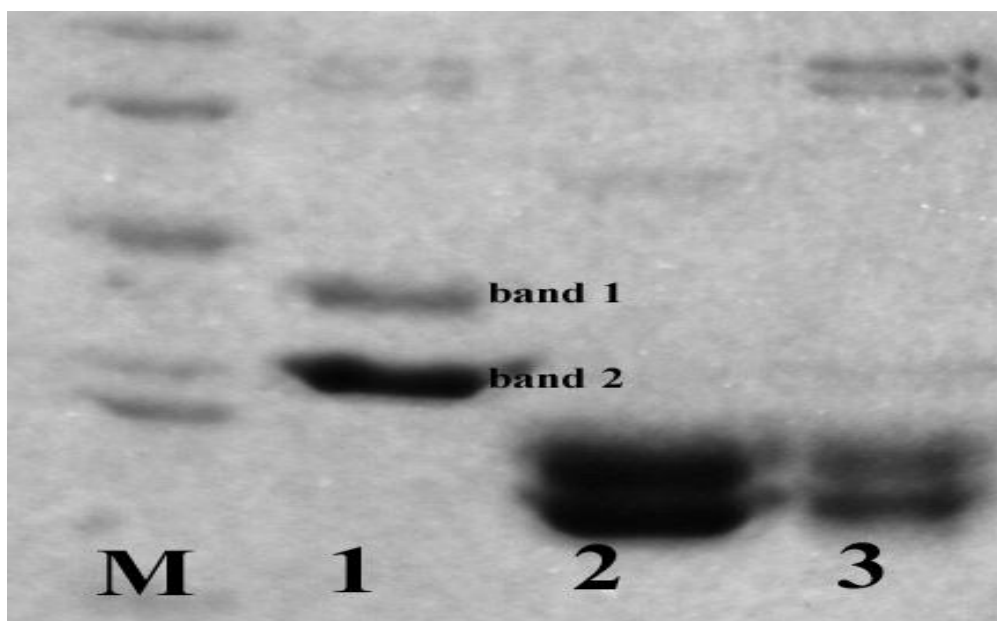
Fraction	Volume (ml)	Protein concentration (mg/ml)	Protein (mg)	Specific HA activity (U/mg)	Recovery (%)
Crude haemolymph	150	3.8	570	336	100
Serum pass through column	50	4.5	225	2,560	39.47
EDTA eluted protein	12	0.5	6	40,960	1.32
GalNAc eluted protein	12	0.15	1.8	102,400	0.32
GalNAc-EDTA eluted protein	12	0.34	4.1	1,280	0.72



รูปที่ 2 แสดง purified lectin บน 12% gel SDS-PAGE ที่ได้จากการสกัดโดยใช้ fetuin-agarose column โดยมี N-acetylgalactosamine เป็นส่วนประกอบของ elution buffer

ตารางที่ 5 แสดง molecular weight ของ purified lectin ที่ ได้

Sample	Molecular weight (Dalton)
Band 1	60,000
Band 2	57,600
Band 3	47,600
Band 4	31,200
Band 5	26,300
Band 6	23,700



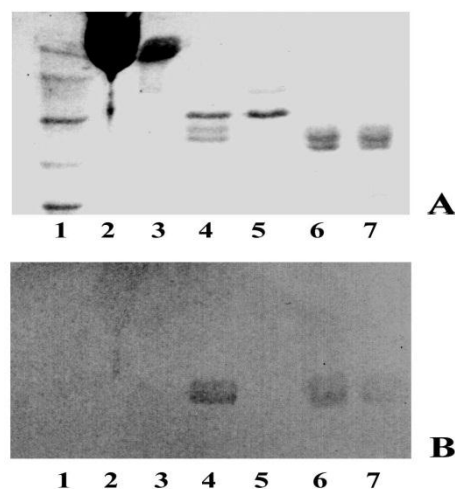
รูปที่ 3 แสดง purified lectin บน 12% gel SDS-PAGE ที่ได้จากการสกัดโดยใช้ fetuin-agarose column และมี N-acetylgalactosamine เป็นส่วนประกอบของ elution buffer ในครั้งแรก ((lane 1) ตามด้วย elution ในครั้งที่ 2 โดยใช้ 20mM EDTA เป็น eluter (lane ที่2 และ 3)

ตารางที่ 6 แสดง molecular weight ของ purified lectin ที่ ได้จากการ elute ด้วย N-acetylgalactosamine

sample	Molecular weight (Dalton)
Band 1	42,000
Band 2	31,200

4. การสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western Blot

โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างขึ้นโดยการฉีดโปรตีนที่จำเพาะกับ sialic acid ที่สกัดจากเลือดของ กุ้งกุลาดำ ได้รับการทดสอบความจำเพาะและความไวด้วยวิธี Western blotting โดยมีผลวิเคราะห์แสดงใน รูปที่ 4 โดยโปรตีนที่ elute ด้วย 20mM EDTA จะปรากฏ band จำนวน 3 band และในโปรตีนที่ elute ด้วย 20mM EDTA หลังจาก elute ด้วย GalNAc จะพบ 2 band ที่จำเพาะกับแอนติบอดี ส่วน โปรตีนจากการ elute ด้วย GalNAc นั้นไม่พบว่ามีโปรตีนที่จำเพาะกับแอนติบอดี



รูปที่ 4 แสดง ผลของ SDS-PAGE (A) และตรวจสอบด้วย polyclonal antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนที่ elute ด้วย 20 mM EDTA ด้วยวิธี Western Blot (B) โดยจะแสดงผลของ molecular weight standard (lane1), crude haemolymph (lane 2), eluted haemolymph ที่ผ่าน fetuin-agarose column (lane 3), lectin ที่ elute ด้วย EDTA (lane 4), lectin ที่ elute ด้วย GalNAc (lane 5), และ eluant หลังจาก GalNAc แล้ว elute ซ้ำด้วย EDTA (lane 6 และ 7)

5. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ N-terminal ของ sialic acid binding lectin ของกิ้งกูดาคำ

N-terminal sequence ของ sialic acid binding protein ของกิ้งกูดาคำที่ elute ด้วย EDTA จำนวน 3 band ที่ขนาด 31.2, 26.3 และ 23.7 kDa (band 4, 5, และ 6) ได้รับการวิเคราะห์ด้วยวิธี automated Edman degradation และผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 7 โดยลำดับกรดอะมิโนในส่วนต้นของ Band A และ B มีความคล้ายคลึงกัน ส่วน band C จะมีความแตกต่างจาก band อื่นอย่างชัดเจน เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 3 band กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีบันทึกใน GenBank database ด้วยวิธี BLAST ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 8 จากผล BLAST 5 อันดับแรกที่ได้พบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีความเหมือนกับโปรตีนอื่น ๆ ที่มีการรายงานไว้ใน database ก่อนข้างตำแหน่งและชนิดของโปรตีนที่ระบุมีความหลากหลายทำให้ไม่สามารถระบุชื่อขึ้นได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 7 ลำดับกรดอะมิโนของ N-terminal end ของ sialic acid binding protein ที่สกัดได้จากเลือดของกิ้งกูดาคำโดยใช้ fetuin agarose column และ elute ด้วย 20 mM EDTA

Peptide	Size (kDa)	N-terminal sequence
Band A	31.2	DQHFPXNPPXNTNTLSDLLNL
Band B	26.3	DQHFXLHPXHTQS
Band C	23.7	TPTEAPNPNFFAS

ตารางที่ 8 แสดงผล BLAST ของ N-terminal sequence ของ sialic acid binding lectin ที่สกัดจาก haemolymph ของกิ้งกูดาคำ

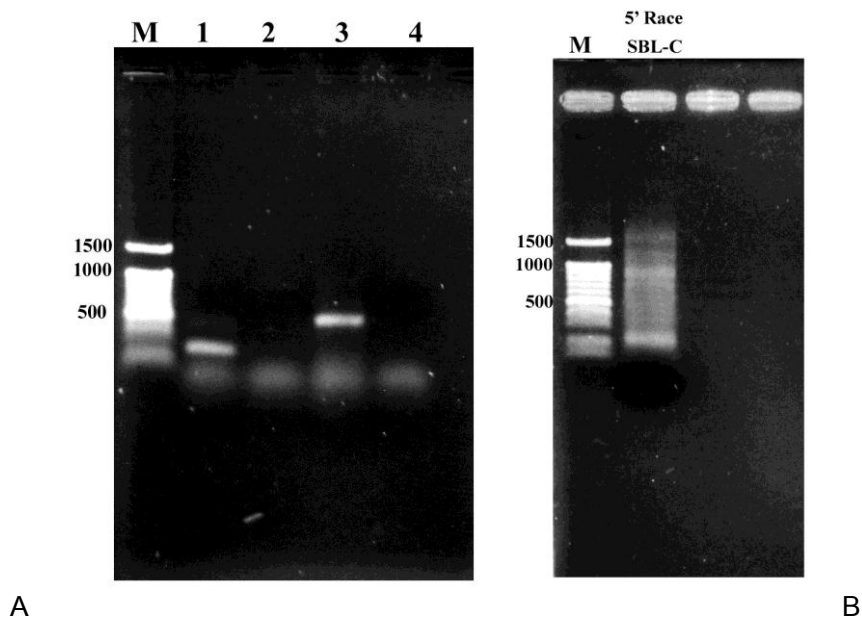
Accession No.	Description	Total score	Query coverage	E value
Band A				
CAN68872.1	hypothetical protein [Vitis vinifera]	32.9	66%	5.2
CAN66651.1	hypothetical protein [Vitis vinifera]	32.9	66%	5.2
CAN69162.1	hypothetical protein [Vitis vinifera]	54.3	66%	5.2
CAN67571.1	hypothetical protein [Vitis vinifera]	32.9	66%	5.2
CAN75928.1	hypothetical protein [Vitis vinifera]	32.9	66%	5.2
Band B				
XP_569073.1	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]	27.4	57%	243
YP_002485805.1	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIB [Cyanotheca sp. PCC 7425]	27.4	64%	243
ZP_01472158.1	RecJ exonuclease [Synechococcus sp. RS9916]	26.9	78%	325
XP_001966677.1	GF17143 [Drosophila ananassae]	26.5	64%	437
ZP_03542380.1	Vanillate monooxygenase [Comamonas testosteroni KF-1]	29.9	85%	42
Band C				
XP_001936112.1	WD repeat containing protein 44 [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]	28.2	69%	135
XP_001613779.1	hypothetical protein [Plasmodium vivax Sal-1]	27.8	69%	181
YP_366779.1	hypothetical protein Bcep18194_C7091 [Burkholderia sp. 383]	27.8	84%	181
CAE53096.1	alpha-5 collagen [Paracentrotus lividus]	50.5	69%	181
XP_002817203.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: midasin-like [Pongo abelii]	27.4	76%	243

6. การสร้าง cDNA library จาก RNA ที่สกัดจาก haemocyte ของกิ้งกูดดำ

ทำการสร้าง cDNA library โดยใช้ mRNA ที่สกัดจาก haemocyte ของกิ้งกูดดำเป็น template ในการสร้าง cDNA ผล packaging efficiency ของ library คือ 10^4 pfu/ μ L และจากการตรวจหาชิ้นเป้าหมายจาก cDNA library โดยใช้ polyclonal antibody ที่สร้างได้ผลปรากฏว่าไม่พบผลบวกกับ plaque ที่ทำการวิเคราะห์จำนวน 5000 plaque (10 plate)

7. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน sialic acid binding lectin ในกิ้งกูดดำด้วยเทคนิค Degenerate PCR และ RACE-PCR

ทำการ amplify ยีนด้วยวิธี degenerate PCR โดยใช้การจับคู่ระหว่าง forward และ reverse primer ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ N-terminal sequence ของ band A, B, และ C ผล PCR แสดงดังรูปที่ 5 พบว่ามี PCR product เกิดขึ้นเมื่อใช้ไพรเมอร์ SBL-A1 ร่วมกับ SBL-R, SBL-B1 ร่วมกับ SBL-R, และ SBL-A1 ร่วมกับ SBL-CR เมื่อนำ PCR product ทั้ง 3 band มาโคลน, sequence (รูปที่ 6), และ BLAST ผลปรากฏว่า Sequence ทั้ง 2 ไม่ตรงกับ peptide sequence ของ Band A, B, และ C (ตารางที่ 9) ที่ได้ในตอนแรก จึงน่าจะเกิดจาก non specific binding ของ primer



รูปที่ 5 ผล PCR จาก cDNA template สร้างจาก mRNA ของ haemocyte ของกิ้งกูดดำโดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจาก peptide sequence ของ band A, B, และ C ในรูป A แสดง molecular Marker 100 bp (M), ผลผลิต PCR จากการใช้ primer ร่วมกันของ SBL-A1 และ SBL-R (1), SBL-A2 และ SBL-R (2), SBL-B1 และ SBL-R (3), และ SBL-A1 และ SBL-CR (4) ส่วนในรูป B แสดง molecular Marker 100 bp (M) และผลผลิต PCR จากการใช้ primer ร่วมกันของ SBL-A1 และ SBL-CR

A. SBL-A1+SBL-R

AAACNNACTTNATTGNTGGNTTNAATCCACGGGCTCTTCAGCCCCAAAATACGCGGGATCCAAGCAATGCCTACCCGGCTTCT
GACCACTCCGCTATCATTTTTACGTAGATCCTGAGGATTCTCGGGAGCCTTACACGGATTTGCACCGTTGTTCTGACACCACT
GTTTACTAACGTGCAGTGGACCGTGAGGTGAATGCAGGTAATTCTGAACACCACAAAAATTTACAAAATGATTACTGGAGGTT
AACACAGCTTGTAAGGCAACTGCTGATCCAACCTCATGACTTCAGCAAGTTTAACACAGGAAACAAGGAAACATTGGATACA
ATTCTAAAGAGAAAGGCGTAAATGTCCGATATGCTCTGCTGGACTTTGACAAAAGATGGTACTCTTTCACATTGTGGACTTAT
TGTCTGAGCAAAGAAAGTTTAGACAAGCTGCGTTCACTGCTGCTGGAATTTTTTCTGACGTTGAGAATAAAAATGTGACCTT
ACCTGAGTGGAAGAGTTACCCCTTTGGCCCTGAAAGGGGTCTTAATATGGATTTGTTGTGTCTGTGAAGGATATTCCGAAC TA
GGCAAATTACATTTCCGATCCCAGATCTTGACGCGCGATTATAAGACAGCCTCCAGGCCCTATGTGGGGCATCTCATCTGGC
ATGAAGGG

B. SBL-B1+SBL-R

TGCCTACACCCCTGCCACACGTGCTGAAGTGTCTGATGTTGGTAATGCTATTCTTGATGGTGCTGACTGTGTCATGCTGTCTGG
TGAAACTGCTAAGGGAGACTACCCCTCTTGTGTGTGTGCGAACCATGGCCAATATTGCACGTGAAGCTGAAGCTGCAATTTGGC
ACAAGCAACTCTTCACTGAGCTGTCTCAGCAGGTCCAACCTGCCCCTGACTCAACACACACCACAGCCATTGCTGCTGTTGAA
GCTTCATTCAAAGCAATGGCCACAGCCATTATTGTTATTACCACCACTGGTCGCTCTGCTCATTGTTGTTCAAAGTACAGGCCCT
CGCTGCCCAATTGTGGCTGTAACTCGATTCCACAGGTGGCCAGACAGTGCCATCTCTACCGTGGTATTATTCCCATCCACTAC
ACTGTGTAACGTATTGAAGACTGGATGAATGATGTCAATGCTCGCGTAGACTATGCTGTTCAGTATGGCATGGGTGCAGGCAA

C. SBL-A1+SBL-CR

GCAAAAAAGTTTGATTTGGTGGCGAGCTTCTGCCTTGTAACATAGGTTGGTCTCTTGGTGAAGGGGAATCTCTCAGCAATA
TTAAGGAGTGCATATCTTTTGTGCCCTATATATGCTTAGTCACATTTCTGCTAGAGCACTTCATGCACTGGCTCCTTGAAGCA
AAGTTCAGAAAATTGCAGTCACTGCATTCCCAGTCACCAGGTCTAGCACGACCACCCTCTCTGGGGACTTTGCACCTGTAGCA
GAAACCACGGTGTGCATAGTTGCTAAATGAACAATGTGGGCAATCCAATCTCCAGGCCTGCTGCCGCCTCCGCCACCACCAC
CACCACGAGGGCTAGAGAAGTCACCCCTGCAACATCTCTGGGGCAAGGACACTTGTTGCAAATCCACGCGAAGAGAAAGTT
ATGGTATTTGCACTCGGGGCAAATCCAGTCCCCGGGTGCGATATCACGGATCCACCTCCGCCACCACCTACTCGTCTCCAGA
GCCAAAGGAGTCCATATCCTTTGGGATTTCGGCACTTCAAACAAGCTGTGCGAGATGCATAGTTGATGAATTTGCAGCTTGGGC
AGTCCCAATCTCCAGGCTTTCTGCTGTTCCGACCACCACTGGAGTAACGGTCCCTGCCGAGTCCTTGTCTGAATAACGGTCCC
ATCCTCCAGCATCTGCTCGCTCGCACCTCCCAATCATCTCGTCCAGAATCCTCCATTTGTCTTCAGGACCTCAAGCAAGCA
AGCACGAGAGGAATACTATAAAGCACAGAGCCGGTGTCAACGTGTCTCTCGGCCTCTCCCCCGCGTACTCTGCGTTGAT
ACCACTGCTTA

รูปที่ 6 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ PCR product ที่ใช้ไพรเมอร์ SBL-A1+SBL-R (A) และ SBL-B1+SBL-R (B)

ตารางที่ 9 ผล BLAST ของ PCR product ที่ใช้ไพรเมอร์ SBL-A1+SBL-R (A) และ SBL-B1+SBL-R (B)

Accession No.	Description	Total score	Query coverage	E value
SBL-A1+SBL-R				
XP_001194830.1	similar to Insulin-degrading enzyme [Strongylocentrotus purpuratus]	155	80%	6e-30
XP_795975.2	similar to Insulin-degrading enzyme, partial [Strongylocentrotus purpuratus]	155	80%	6e-30
XP_001603463.1	similar to metalloprotease [Nasonia vitripennis]	152	79%	7e-29
XP_396981.2	similar to Insulin-degrading enzyme (Insulysin) (Insulinase) (Insulin protease) [Apis mellifera]	147	63%	3e-27
EFN82364.1	Insulin-degrading enzyme [Harpegnathos saltator]	146	82%	5e-27
SBL-B1+SBL-R				
ABY66597.1	pyruvate kinase 2 [Litopenaeus vannamei]	286	96%	5e-76
ABY66598.1	pyruvate kinase 3 [Litopenaeus vannamei]	281	96%	3e-74
ABO21408.1	pyruvate kinase [Litopenaeus vannamei]	281	96%	3e-74
XP_001600651.1	similar to pyruvate kinase [Nasonia vitripennis]	218	97%	2e-55
XP_966698.1	similar to pyruvate kinase isoform 1 [Tribolium castaneum] >gb EEZ97193.1 hypothetical protein TcasGA2_TC004380 [Tribolium castaneum]	213	96%	5e-54
SBL-A1+SBL-CR				
CBI15580.1	unnamed protein product [Vitis vinifera]	204	55%	4e-26
CAN69472.1	hypothetical protein [Vitis vinifera]	225	55%	9e-20
NP_175290.1	zinc finger (Ran-binding) family protein [Arabidopsis thaliana]	145	64%	9e-20
XP_002321514.1	predicted protein [Populus trichocarpa]	345	57%	8e-18
XP_002318517.1	predicted protein [Populus trichocarpa]	542	57%	1e-17

ผลการหา 3' end ด้วย PCR โดยใช้ primer SBL-A1 ร่วมกับ Not I, SBL-A1 ร่วมกับ Sal I, และ SBL-A2 ร่วมกับ Not I ได้ DNA product ขนาดประมาณ 1400, 400, และ 500 bp ตามลำดับ (รูปที่ 7) หลังจากหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ DNA ทั้ง 3 ชิ้น ผล BLAST ที่ได้แสดงให้เห็นว่า DNA ทั้ง 3 ชิ้นไม่ใช่นิวคลีโอไทด์ที่ encode โปรตีนเป้าหมาย ส่วนการทำ RACE-PCR นั้นไม่มี product ที่ชัดเจนเกิดขึ้นในทุก primer combination ของการทำ PCR และ nested PCR

A. SBL-A1+Not I

GAATTTCGCGGCCGCTGGAGATTTGCTTATTTACATCCATGTCCAGCAACACTCTCGCTTTGCATCGTCATTTGCA
TAGATAACGGAAAGGGGACCCCTGNTCGCTCTGACAGGCGAATGGGTATCGAGCGGATCCATCTGTCTAGACGTC
GGATGACGGGCTTCTCGGTCCGTGTACGCAAAGCTGATGAGACCATCGACTCCGTAGTGTGACAATAGAGAATAT
TTAGCTAGCTGAGATTGGTCCACCTCTCTAAAACCTCTGACCGCTAATCGCTCGAAGGGTTCCTGCGTTCTCGCT
CTTATTCCTTCGAGAGTAGTGGTCACGTTATCGCCTTGCGGCGATTTGGAAAAAGGATGATACCACGCTTCTATT
CCTCGGGTTAGCATACCTTCGGCGGGAGTCTGTCCGCATTCGAAACCGCCATATAAGGAATATTTATACCGTAA
GTGTGTATCATTCTCATCGGGTGGAGGAGGGGGTTCGTTCTTCGTCTTTCTTGTCTTGGCGGTTCTGTCTGTC
GTGTATCGTTCTATTGCTATTCTTGCCCGTGGACTGTTTTATCGACATTGATATTACCCATAACAGGTGTTCCGT
ACATGGNCACGATNCCCTTGGGGGCCCTTCGNGCCANNCAGAAAAGGTNTTATCCGCATACCNCAATTAGGGGAAAA
CTCTGCAACNGGATTTCGTACAAATCGACGANTCGNNTCNTGAATNAACGNCCNTTTGCTTCTCTTATGAGTANGT
GTGAANGTGGGCCNATATCCGTNGTTTCCCANNGNTNCNCGNAAANNANCCNGTNAATCTCNGGCCCCGGTCCAC
GGGCNACAGGGCNTCNANGNAGGACAGGTNTTGNAAAACGNTNANGCGNTNNTTGGGGTGAACNAGGGGTGGAN
TCCGNCNCTCCCCGTTNAANTACTCCCTCNGNCGGGGNGNTTNNNNNAANATNNGAGNTGGNTACAACGTNA
NN

B. SBL-A1+SalI

GACCAGCACTTCCCATGTAATCCACGTGCCACCACCCCCGAGCAATAACATCATTATCAAATGAATTTGAGTAAC
TTTAACCTCCCGATAGAACATGTAAAGGAAATATTTACTTGACAACTTTGAGACTAGAATGTATCTGGATAATTG
TATAGATGTGTTCCGGGAATGAATGATTATGTTAGTGTGTGTGTAAGGACTGATTTGATTTTCAGGCTGTTATTT
TTCTACAAAGGAGTACTCAAATTGGTTTTTATGTTCTATGTAGTGTGTTTGGTGTGTTTAGTAAAGCATGTCAGTGA
CGTATAACCAAATGAAAACCTCAAATAAAAGAGGAAAATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAATCGATGTCGACTCGAGT
C

C. SBL-A2+Not I

GAATTCGCGGCCGCTGATAGGTCTGGGATGCCCCCTATAGCGAGGTCACCGAGGGCTTTCAAAGGAGATTTTGTG
AGGTCGTCTTGGGTCGGTGTGCGGTCGTAGGTGTGGAATCCGGGTCGTCTTGNCTTCCGTACCGTGTGCTGGAT
GTTTAATCCGGGTCGTTTTGTTTTTCGATGTTGTGTGTCGTGATGTTTATCCCGGTCGTGTTATCGATATTGTGTC
GTCTGCTTAAATTGTGGGTCGTTCTTGCCCTACATACCGGGTCGTCTTGTTTTTCGATGTTGTGTGTCGTGATGTTTA
TTCCGGGTCGTGTTATCGACATGTGTGCGGTGTTGCATGGTGGGTTGCAAACTACTAGTGAATTCGCGGCCGCTG
CAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGC
TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCC
GCTTNCAGTCGGGAAACCTGTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGANAGGCGGTTGCGTATT
GGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGANCNCTGCNCCGGNCGTCGGCTGCGCNACGGANCACTACCAAGGCGT
ANCGGTANCNAAATNGGGATACCAGAAAANTNNANCAAGNCACAAAGCAAACCTAAAGCGGTGTGNTTTCNAGNCN
CCNANACTAAATACCATAAGGGACCNAGANAAACNGTCCGAACCNCCCTTCACGCTCGAAGCCTCNGNAGGCCNA
CCNNTANGNNCCAGGTCACCCCCCCCCGANTNCAATCNCNAAAATGGATGNCAATCCNATNNCGNAAANNNNAAAA
ACCCNC

รูปที่ 7 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' โดยเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ SBL-A1+Not I (A), SBL-A1+Sal I (B) และ SBL-A2+Not I (B)

ได้ทำการ amplify ยีนด้วยวิธี degenerate PCR โดยใช้การจับคู่ระหว่าง forward และ reverse primer จากอวัยวะอื่นๆ ของกุ้งนอกเหนือจาก haemocyte ผลการทดลองที่ได้ส่วนใหญ่ไม่ปรากฏว่ามีผลผลิต DNA เกิดขึ้นจากการ amplify ในอวัยวะอื่นๆ ยกเว้นในกล้ามเนื้อซึ่งพบ band ขนาดประมาณ 600 bp จากผลรวมของ primer SBL-B1+SBL-R (รูปที่ 8) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ band ดังกล่าวพบว่าผล sequence ที่ได้เหมือนกับที่ได้จากการ amplify จาก haemocyte โดยใช้ primer คู่เดียวกัน(รูปที่ 8B)



รูปที่ ผล PCR จาก cDNA template สร้างจากอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งกูด้า ได้แก่ hepatopancreas (HP), epidermis (EP), testis (TI), intestine (IN), lymphoid organ (LP), stomach (ST), muscle (MU), และ heart (HT) โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจาก peptide sequence ของ band A, B, และ C ในรูป A แสดงผลจากการใช้ SBL-A1 และ SBL-R ส่วนในรูป B เป็นแสดงผลจากการใช้ SBL-B1 และ SBL-R

บทวิจารณ์

การแยกสกัด sialic acid binding lectin โดยใช้ fetuin agarose column จาก haemolymph ของกิ้งกูด้า โดยใช้ eluter 2 แบบ คือ EDTA และ N-acetyl-galactosamine จากผลการทดลองที่ได้พบว่าโปรตีนที่ได้จะมี haemagglutination activity ที่สูงมากเมื่อเทียบกับ crude haemolymph หรือโปรตีนส่วนๆ อื่นที่แยกออกไป ก็แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่แยกได้นี้มีความเป็น haemagglutinin สูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของ lectin อย่างชัดเจน ดังนั้นผลที่ได้จึงยืนยันความเป็น lectin ของโปรตีนที่สกัดได้จาก haemolymph ของกิ้งกูด้า เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนประกอบด้วย peptide หลายขนาด โดยเฉพาะเมื่อใช้ eluter ที่ต่างกันก็จะให้ผลลัพธ์ ที่ต่างกัน คือ ถ้าใช้ 20 mM EDTA เป็น eluter จะได้ peptide 6 band ที่มีขนาด 60.0, 57.6, 47.6, 31.2, 26.3, และ 23.7 kDa ตามลำดับในขณะที่ใช้ GalNAc เป็น eluter จะได้ peptide band หลักจำนวน 2 band ที่ต่างออกไปคือมีขนาด 42.0 และ 31.2 kDa การใช้ eluter ที่ต่างกันทำให้บ่งชี้คุณสมบัติของโปรตีนที่ต่างกันได้ คือ EDTA จะทำหน้าที่เป็น chelater คือจะยับยั้งพันธะที่มีโลหะหนักเป็นปัจจัยในการสร้างพันธะ ดังนั้นโปรตีนที่สามารถถูกชะได้เมื่อได้รับ EDTA จึงสามารถบอกได้ว่าโปรตีนดังกล่าวมีโลหะหนักเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างพันธะกับ sialic acid ในการทดลองนี้คือแคลเซียม ซึ่งการเป็น calcium-dependent protein นั้นจึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของ C-type lectin จากผลการทดลองที่ได้จึงสามารถบอกได้ว่า sialic acid binding protein ที่ได้จากการ elute ด้วย EDTA

คือ องค์ประกอบของ C-type lectin ในขณะที่การใช้ GalNAc เป็น eluter นั้นจะยับยั้งพันธะที่จำเพาะต่อ GalNAc ซึ่งอาจต้องการหรือไม่ต้องการ calcium ในการสร้างพันธะก็ได้ ดังนั้นโปรตีนที่ถูกชะด้วย GalNAc จึงเป็นโปรตีนอาจไม่จำเป็นต้องใช้ calcium ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งความแตกต่างของโปรตีนจากการใช้ eluter ทั้ง 2 ชนิดแสดงผลยืนยันได้จากผลของการทำ Western blot analysis ซึ่งพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากโปรตีนที่สกัดโดยใช้ EDTA เป็น eluter ไม่สามารถจับแบบจำเพาะกับโปรตีนที่ใช้ GalNAc เป็น eluter ได้ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า sialic acid binding lectin ใน haemolymph ของกิ้งกูดำนั้นมีมากกว่าหนึ่งชนิดและมีลักษณะสมบัติในการเกิดพันธะที่แตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ต่างจากการศึกษาของ Ratanapo and Chulavatanatol (1990) ที่พบว่าเลือดของกิ้งกูดำนี้อาจมีโปรตีนซึ่งมีความสามารถในการเกาะกับ fetuin-agarose column ได้เพียงชนิดเดียวคือ monodin ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากการใช้วิธีการเตรียม haemolymph ที่ต่างกันคือในวิธีของ Ratanapo and Chulavatanatol (1990) จะปล่อยให้ haemolymph เกิดการแข็งตัว (clotting) แล้วจึงนำส่วนที่ยังคงเป็นของเหลวไปผ่านขั้นตอนการแยกสกัด ส่วนในการทดลองนี้จะใช้วิธีผสม haemolymph สาร anticoagulant แล้วทำการแยกเม็ดเลือดออกแล้วจึงทำ dialysis เพื่อกำจัดสาร anticoagulant ก่อนนำไปแยกสกัด จึงทำให้ผลการแยกสกัด sialic acid binding protein ที่ได้มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองยังสังเกตได้ว่าโปรตีนที่ได้จากการใช้ eluter ต่างกันนั้นจะมี peptide ที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 30 kDa ซึ่งพบได้ในการใช้ eluter แต่ละแบบซึ่งสอดคล้องกับในงานวิจัยของ Ratanapo และ Chulavatanatol (1990) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า monodin มีขนาด subunit ประมาณ 27 kDa และมี native MW เท่ากับ 420 kDa ซึ่งน่าจะมีหน้าที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดำนั่นเอง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือก peptide จำนวน 3 ชิ้นที่มีขนาด 31.2, 26.3 และ 23.7 kDa มาทำการหาลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย N-terminal ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกันซึ่งยืนยันความหลากหลายของ peptide ที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อ sialic acid ในกิ้งกูดำน

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ N-terminal ทั้ง 3 ชิ้นกับของโปรตีนอื่น ๆ ที่มีรายงานใน GenBank database พบว่า peptide ทั้ง 3 ชิ้นมีความแตกต่างกับโปรตีนอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อนและอาจเป็นเพราะลำดับกรดอะมิโนมีขนาดที่สั้นจึงทำให้การกำหนดชนิดของ peptide ทั้ง 3 ชิ้นจึงไม่สามารถทำได้ ดังนั้นจึงต้องออกแบบ primer จากลำดับกรดอะมิโนของ N-terminal ทั้ง 3 ชิ้น เพื่อใช้ในการทำ PCR ซึ่งผลการทำ degenerate PCR โดยการใช้ combination ของ forward และ reverse primer ที่สร้างขึ้นจำนวน 6 combination และ amplify ใน 9 อวัยวะได้แก่ haemocyte, hepatopancreas, epidermis, IT, intestine, lymphoid organ, stomach, muscle, และ heart ผลที่ได้ยังไม่พบ DNA ที่ encode เป็น peptide ทั้ง 3 ชิ้น เช่นเดียวกับผลการหาลำดับจาก cDNA library โดยใช้ antibody ซึ่งผลที่ได้คือไม่พบ plaque ที่ผลิตโปรตีนที่จำเพาะกับ antibody ที่สร้างไว้

ตารางที่ 10 แสดง C-type lectin ที่มีการศึกษาวิจัยในกุ้งทะเล

Species	Lectin name	Agglutinating activity	References
<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	FmLC,	<i>V.harveyi</i>	Rattanaporn, et al., 2010
	FmL	<i>V.harveyi</i>	Rittidach et al., 2007
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Fclectin	gram-negative bacteria gram-positive bacteria WSSV	Liu et al., 2007
	FchsL	gram-negative bacteria gram-positive bacteria WSSV	Sun et al., 2008
	FcLec1	gram-negative bacteria gram-negative bacteria WSSV	Sun et al., 2008
	FcLec2	gram-negative bacteria WSSV	Zhang et al., 2009a
	FcLec3	Vibrio, WSSV	Wang et al., 2009a
	FcLec4	Vibrio, WSSV	Wang et al., 2009b
	FcLec5	Vibrio, WSSV	Xu et al., 2010
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	MjLecA	WSSV	Song et al., 2010
	MjLecB	WSSV	Song et al., 2010
	MjLecC	WSSV	Song et al., 2010
<i>Litopenaeus vannamei</i>	LvLec	WSSV	Zhang et al., 2009b
	LvCTL1	WSSV	Zhao et al., 2008
	LvLT	<i>E.coli</i>	Ma et al., 2007
<i>Litopenaeus setiferus</i>	LsL	gram-negative bacteria gram-positive bacteria	Alpuche et al., 2005
<i>Penaeus monodon</i>	PmLT	WSSV	Ma et al., 2008
	PmAV	WSSV	Liu et al., 2003

ณ ปัจจุบันมีงานวิจัยและศึกษาลักษณะสมบัติของโปรตีน lectin ในกุ้งทะเลขึ้น (ตารางที่ 10) รวมถึง lectin ในกุ้งกุลาดำด้วย เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sialic acid binding protein ที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ lectin ในกุ้งทะเลอื่น ๆ เท่าที่มีรายงานก็ยังไม่พบว่ามีชนิดใดที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่คล้ายกัน นอกจากนี้มีการสร้าง EST cDNA libraries จากอวัยวะของกุ้งกุลาดำเกือบจะครอบคลุมอวัยวะและสถานะที่สำคัญของกุ้งทั้งหมด โดย Tassanakajon และคณะ (2006) ได้ทำการ

สร้าง EST libraries จำนวน 15 libraries โดยครอบคลุม 6 อวัยวะของกุ้งกุลาดำได้แก่ eyestalk, hepatopancrease, haematopoietic tissue, haemocyte, lymphoid organ, และ ovary จากกุ้งที่อยู่ในสถานะต่าง ๆ กัน ได้แก่ กุ้งปกติ กุ้งที่ได้รับความเครียดจากอุณหภูมิ การติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส โดยมีจำนวนรวมของ transcript ที่ได้รับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วทั้งหมดประมาณ 10,100 โคลน สามารถระบุว่าเป็นยีนของ lectin ได้ประมาณ 123 โคลน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ N-terminal จาก sialic acid binding protein ทั้ง 3 ส่วนที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปเปรียบเทียบกับ transcript ทั้งหมดรวมถึงที่เป็น lectin ทั้งหมดด้วย ผลที่ได้ก็ยังไม่มียีนใดที่มีความคล้ายคลึงกับ sialic acid binding protein ทั้ง 3 ส่วน จากผลลัพธ์ที่ได้นี้ทำให้ประเมินได้ว่าโปรตีนที่ได้จากงานวิจัยนี้น่าจะมีเอกลักษณ์ทางโครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างจากโปรตีนอื่นๆ มาก และยีนที่ encode โปรตีนในการศึกษาครั้งนี้อาจมีขนาดที่ใหญ่มากทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี PCR และการตรวจวัด library ด้วย antibody จะทำได้ยาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแนวทางอื่นๆ เพิ่มขึ้น โดยอาจทำการศึกษาทาง proteomics เพิ่มขึ้นโดยการทำ internal peptide sequencing และ เทคนิค mass spectrometry ให้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Alpuche J, Pereyra A, Agundis C, Rosas C, Pascual C, Slomianny MC, Vázquez L, Zenteno E. 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim Biophys Acta*. 1724(1-2):86-93.
- Baldo, B. A., W. H. Sawyer, R. V. Stick, and G. Uhlenbruck. 1978. Purification and characterization of a galactan-reactive agglutinin from the clam *Tridacna maxima* (Röding) and a study of its combining site. *Biochem. J.* 175: 467-477.
- Barondes, S. H. 1984. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science* 223: 1259-1264.
- Bradford, M. M. 1975. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cerenius, L., Z. Liang, B. Duvic, P. Keyser, U. Hellman, E.T. Palva, S. Iwanaga, and K. Soderhall 1994. Structure and biological activity of a 1,3- β -D-glucan-binding protein in crustacean blood. *J. Biol. Chem.* 269: 29462-29467.

Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Chu, F. -L. E. 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. In Disease processes in marine bivalve molluscs. W. S. Fisher, ed. American Fisheries Society Special Publication 18, Maryland. 178-188.

Cohen, E. 1980. Human lymphocyte receptors detected by invertebrate agglutinins. *Ann.Clin. Lab. Sci.* 10: 258-262.

Drickamer, K. 1994. Molecular structure of animal lectins. In Molecular glycobiology. M. Fukuda and O. Hindsgaul, eds. IRL Press, New York. 53-87.

Duvic, B., and K. Soderhall 1992. Purification and partial characterization of a β -1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 207: 223-228.

Giga, Y., A. Ikai, and K. Takahashi. 1987. The complete amino acid sequence of echinodin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *J. Biol. Chem.* 262: 6197-6203.

Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Ingram, G.A. and D. H. Molyneux. 1983. The primary humoral immune response of European green lizards (*Lacerta vividis*) to *Leishmania agamae*. *Dev. comp. Immunol.* 7: 649-652.

Lackie, A.M. 1981. Immune recognition in insects. *Dev Comp. Immunol.* 5: 191-204.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lasky, L. A. 1992. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964-969.

Lis, H. and N. Sharon. 1986. Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 35-67.

Liu YC, Li FH, Dong B, Wang B, Luan W, Zhang XJ, Zhang LS, Xiang JH. 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Penaeus chinensis*. *Mol Immunol.* 44(4):598-607.

Luo T, Zhang X, Shao Z, Xu X. 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Lett.* 551(1-3):53-57.

Ma TH, Benzie JA, He JG, Chan SM. 2008. PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*. *J Invertebr Pathol.* 99(3):332-341.

Ma TH, Tiu SH, He JG, Chan SM. 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol.* 23(2):430-437.

Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, New York.

Muramoto, K. and H. Kamiya. 1990. The amino acid sequence of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lectins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1039: 42-51.

Pistole, T. G. 1982. In *Physiology and Biology of Horseshoe Crabs: Studies on Normal and Environmentally Stressed Animals*. J. Bonventura and C. Bonventura, eds. Liss, New York. 283-288.

Ratanapo, S. and M. Chulavalnatol. 1990. Monodin, A new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97B: 515-520.

Ratanapo, S. and M. Chulavalnatol. 1992. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97B: 515-520.

Ratcliffe, N. A., A. F. Rowley, S. W. Fitzgerald, and C. P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* 97: 183-351.

Rattanaporn, O. and Utarabhand, P. 2010. Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: Early gene up-regulation after *Vibrio harveyi* infection *Journal of Invertebrate Pathology*,. In press.

Renwrautz, L. and A. Stahmer. 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.* 149: 535-546.

Rittidach W, Pajit N, Utarabhand P. 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochim Biophys Acta.* 1770(1):106-114.

Sharon, N. and H. Lis. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science.* 446: 227-234.

Sharon, N. and H. Lis. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* January. 82-89.

Song KK, Li DF, Zhang MC, Yang HJ, Ruan LW, Xu X. 2010. Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 28(4):596-603.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Sun J, Wang L, Wang B, Guo Z, Liu M, Jiang K, Tao R, Zhang G. 2008a. Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 25(3):290-297.

Sun YD, Fu LD, Jia YP, Du XJ, Wang Q, Wang YH, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX. 2008b. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol Immunol.* 45(2):348-361.

Suzuki, T., T. Takagi, T. Furukohri, K. Kawamura, and M. Nakauchi. 1990. A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. *J. Biol. Chem.* 265: 1274-1281.

Towner, P. 1993. Purification of DNA. In *Essential molecular biology, A practical approach Vol I*. T.A. Brown, ed. IRL Press. Oxford, UK. 47-68.

Vargas-Albores, F., F. Jimenez-Vega, and G.M. Yepiz-Plascencia 1997. Purification and comparison of beta-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vanamei*). *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 116: 453-458.

Wang XW, Xu WT, Zhang XW, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX. 2009a. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 27(4):556-562.

Wang XW, Zhang XW, Xu WT, Zhao XF, Wang JX. 2009b. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. *Dev Comp Immunol.* 33(9):1039-1047.

Xu WT, Wang XW, Zhang XW, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX, 2010. A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Amino Acids*.39(5):1227-1239.

Zhang XW, Xu WT, Wang XW, Mu Y, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX. 2009a. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Mol Immunol.* 46(8-9):1626-1637.

Zhang Y, Qiu L, Song L, Zhang H, Zhao J, Wang L, Yu Y, Li C, Li F, Xing K, Huang B. 2009b. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 26(1):183-192.

Zhao ZY, Yin ZX, Xu XP, Weng SP, Rao XY, Dai ZX, Luo YW, Yang G, Li ZS, Guan HJ, Li SD, Chan SM, Yu XQ, He JG. 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol.* 83(1):347-356.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ยังไม่ได้ทำการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัย