

Abstract

Project Code: PDF/39/2544

Project Title: Characterization of a Putative Serotonin Receptor from *Penaeus monodon*

Investigators:

Project Head: Chalernporn Ongvarrasopone, Ph.D.

Project Mentor: Sakol Panyim, Ph.D. Prof.

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Mahidol University (Salaya Campus), Nakhorn Pathom,
Thailand

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

Project Period: 1 July 2001-30 June 2003

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a neurotransmitter that has various physiological functions in both vertebrates and invertebrates. In crustacean, it has been proposed to stimulate the release of gonad stimulating hormone from brain and thoracic ganglia and results in an induction of ovarian maturation and spawning. Serotonin modulates its various physiological functions by interacting with different 5-HT receptors which most of them are members of a G-protein coupled receptor family. **Objective:** In this study, we isolated the full-length cDNA sequences encoding a putative 5-HT receptor from a black tiger prawn (*Penaeus monodon*). **Methods:** Total RNAs isolated from an ovary (stage III) of a wild broodstock prawn, was reverse transcribed by using an oligo(dT) primer and ImProm-IITM reverse transcriptase. The double stranded cDNAs were amplified by using two degenerate primers corresponding to the conserved amino acid sequences in the third (TM III) and seventh (TM VII) transmembrane domains of 5-HT₁ receptors from invertebrates species. The 3' and 5' end cDNAs of this gene were amplified by 3' and 5' Rapid Amplification of cDNA Ends. **Results:** The full-length nucleotide sequences contained 2281-2288 nucleotides varying in the GGC tandem repeat (7-10 repeat) in the third intracellular loop. It encoded a protein (5-HT_{1Pm} receptor) of 589-591 amino acids. Deduced amino acid sequences were blasted in GENBANK database and showed high amino acid sequence identities with invertebrates and vertebrates 5-HT₁ receptors. **Discussion:** The sequence analysis showed that 5-HT_{1Pm} receptor contained seven transmembrane domains, a characteristic of G-protein coupled receptors. In addition, it presented a large third intracellular loop, a short carboxy tail and several conserved amino acids which were characteristics of 5-HT₁ receptor family. Sequence comparisons revealed that this receptor shared amino acid sequence identity up to 76% to the invertebrate 5-HT receptors. It is possible that 5-HT_{1Pm} receptor is a 5-HT₁-like receptor. **Suggestion:** Characterization of the pharmacological binding properties and the signal transduction pathway of this cloned receptor will be essential to identify its functionality in the future.

Keywords: cloning, 5-HT receptor, ovary, black tiger shrimp, RT-PCR

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF 44-เฉลิมพร องค์กรโสมณ

ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของตัวตอบรับซีโรโตนินในกึ่งกลาดำ

ชื่อนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ : ดร. เฉลิมพร องค์กรโสมณ (mbcov@mahidol.ac.th)

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ที่ปรึกษาโครงการ : ศ. สกล พันธุ์ยิ้ม

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2544 – 30 มิถุนายน 2546

ซีโรโตนิน (5-HT) เป็นสารสื่อประสาทซึ่งมีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยาหลายอย่างทั้งในสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง ในสัตว์จำพวกครึ่งเตี๊ยะเซียน ซีโรโตนินมีบทบาทในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์ จากปมประสาทส่วนสมองและส่วนอก และมีผลทำให้มีการพัฒนาการของรังไข่และเกิดการตกไข่ ซีโรโตนินสามารถออกฤทธิ์ทางสรีรวิทยาได้หลายอย่าง โดยการจับกับตัวตอบรับซีโรโตนินชนิดต่าง ๆ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้ว จัดอยู่ในกลุ่มตัวตอบรับ G-protein ในการทดลองนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลน cDNA สายสมบูรณ์ที่ถอดรหัสได้ตัวตอบรับซีโรโตนินของกึ่งกลาดำ วิธีการทดลอง : RNA ที่ถูกสกัดจากรังไข่ของกึ่งแม่พันธุ์ที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีพัฒนาการอยู่ในระยะที่ 3 จะถูกนำมาสร้างสาย cDNA โดยใช้ Oligo (dT) primer และเอนไซม์ Impromil™ reverse transcriptase DNA สายคู่จะถูกสร้างขึ้นโดยใช้ degenerate primers ซึ่งออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับตัวตอบรับซีโรโตนินชนิดที่ 1 ของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังในบริเวณ transmembrane ที่ 3 และ 7 ลำดับ cDNA ที่ได้จะถูกนำมาออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อตัวตอบรับซีโรโตนินในกึ่งกลาดำ และทำการโคลนในส่วนปลาย 3' และ 5' โดยใช้วิธี Rapid Amplification of cDNA Ends ผลการทดลอง : cDNA สายสมบูรณ์ ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 2281-2288 ตัว ซึ่งมีความแตกต่างที่รหัส GGC (7-10 รหัส) ในบริเวณ loop ที่ 3 ที่อยู่ภายในเซลล์ ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ ถอดรหัสโปรตีนตัวตอบรับ (5-HT_{pm1}) ได้กรดอะมิโนจำนวน 589-591 ตัว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GENBANK พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของตัวตอบรับซีโรโตนินในกึ่งกลาดำมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของตัวตอบรับซีโรโตนินชนิดที่ 1 ของสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง วิเคราะห์ผลการทดลอง : การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของตัวตอบรับซีโรโตนินในกึ่งกลาดำ พบว่าประกอบด้วยบริเวณ transmembrane 7 สาย ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของตัวตอบรับในกลุ่ม G-protein มี loop ที่ 3 ที่อยู่ภายในเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และมีส่วนปลายคาร์บอกซิลีตัน นอกจากนี้ ยังมีกรดอะมิโนอนุรักษ์ซึ่งพบเฉพาะในตัวตอบรับซีโรโตนินชนิดที่ 1 และมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ มากถึง 76% ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ตัวตอบรับซีโรโตนินที่โคลนได้ในกึ่งกลาดำ จัดอยู่ในกลุ่มตัวตอบรับซีโรโตนินชนิดที่ 1 ข้อเสนอแนะ : การศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของการแสดงออกของโปรตีนของตัวตอบรับซีโรโตนินที่โคลนได้ในกึ่งกลาดำ มีความสำคัญในการทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงกลไกทางสรีรวิทยาของสารสื่อประสาทซีโรโตนินและตัวตอบรับซีโรโตนินของกึ่งกลาดำในช่วงที่พัฒนาการของรังไข่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาแม่พันธุ์กึ่งที่ให้ผลผลิตสูงต่อไป

คำหลัก: ตัวตอบรับ 5-HT, รังไข่, กึ่งกลาดำ, RT-PCR