



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์และวิเคราะห์หน้าที่ของฮอร์โมนในกลุ่ม
CHH/MIH/GIH ของกิ้งกูดดำ

โดย

นายอภิรักษ์ อุดมกิจ

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

30 พฤศจิกายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์และวิเคราะห์หน้าที่ของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH
ของกิ้งกูดดำ

อภิรักษ์ อุดมกิจ

สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์สกล พันธุ์ยิ้ม ศาสตราจารย์บุญเสริม วิทยชำนาญกุล และรองศาสตราจารย์ไพศาล สิทธิกรกุล สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ และความคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย ขอขอบคุณ ดร.วิฑูรย์ ถิรโสภณ และคุณสมศรี ศักดิ์ดี ที่ให้ความช่วยเหลือในการสร้าง antibody งานวิจัยในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกและการศึกษาหน้าที่ทางชีววิทยาของฮอร์โมน เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ของนางสาวสุพัตรา ตีรัตน์ตระกูล และนางสาวสุพรรณษา ยอดเมือง นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

งานวิจัยทั้งหมดได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทั้งในส่วนของค่าทำวิจัย ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ รวมถึงค่าใช้จ่ายในการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการทุกครั้ง

อภิรักษ์ อุดมกิจ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA/13/2544

ชื่อโครงการ: การสังเคราะห์และวิเคราะห์หน้าที่ของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH ของกิ้งกูดดำ

ชื่อนักวิจัย: นายอภิสิทธิ์ อุดมกิจ
สถาบันอนุชีววิทยาพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
อำเภอบางพลี กรุงเทพมหานคร
นครปฐม 73170

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

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม 2543 ถึง 30 พฤศจิกายน 2546

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการวางไข่ในกิ้งกูดดำ ได้แก่ crustacean hyperglycemic hormone (CHH) และ molt-inhibiting hormone (MIH) โดยได้ทำการแสดงออกของ cDNA ที่สร้าง CHH สามชนิด ของกิ้งกูดดำ (Pem-CHH1, Pem-CHH2 และ Pem-CHH3) ในยีสต์ *Pichia pastoris* โดยให้มีการหลั่งของฮอร์โมนที่สร้างจาก cDNA ออกมานอกเซลล์ จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีน Pem-CHH ทั้งสามชนิดด้วยวิธี reverse-phase HPLC หรือ gel filtration พบว่าทั้งสองวิธีสามารถแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนออกจาก Pem-CHH ได้ การทดสอบหน้าที่ของ Pem-CHH ทั้งสามชนิด โดยดูความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph พบว่ากิ้งกูดดำที่ได้รับการฉีดด้วย Pem-CHH1, 2 และ 3 มีระดับกลูโคสเพิ่มขึ้น 3.5, 3.58 และ 3.05 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ แสดงถึงความสามารถในการทำหน้าที่เป็น CHH ของฮอร์โมนทั้งสามชนิด ในส่วนของ MIH ได้ทำการโคลนนิ่ง cDNA ที่สร้าง Pem-MIH จากลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ระหว่าง MIH ของกิ้งกูดสองชนิด พบว่า Pem-MIH มีความคล้ายคลึงกับ MIH ของ *Penaeus japonicus* ถึง 97% ได้ทำการแสดงออกของ Pem-MIH ใน *P. pastoris* และแยกบริสุทธิ์โดยใช้หลักการเดียวกับ Pem-CHH การศึกษาหน้าที่ในกิ้งกูดดำ พบว่า Pem-MIH สามารถเพิ่มระยะเวลาระหว่างการลอกคราบ (molt duration) ของกิ้งกูดอย่างมีนัยสำคัญ (จาก 11.8 วัน เป็น 16.3 วัน) การศึกษาการแสดงออกของ CHH และ MIH ในส่วนต่างๆของกิ้งกูดดำโดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า CHH มีการแสดงออกในก้านตา หัวใจ และเหงือก ส่วน MIH มีการแสดงออกในก้านตา และ thoracic ganglia นอกจากนี้ได้ทำการสร้าง antibody โดยการกระตุ้นด้วย Pem-CHH1 ในหนู พบว่า anti-Pem-CHH1 antibody สามารถจับกับ Pem-CHH ได้ทั้งสามชนิด แต่ไม่จับกับ molt-inhibiting hormone ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มเดียวกัน เมื่อ incubate กับสารสกัดจากก้านตา antibody สามารถยับยั้งความสามารถในการเพิ่มระดับกลูโคสของ CHH ในสารสกัดก้านตาได้ประมาณ 45% และเมื่อฉีด antibody เข้าไปในกิ้งกูดโดยตรง พบว่ากิ้งกูดมีระดับกลูโคส

ใน haemolymph ลดลง ประมาณ 15-20% ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ช่วยให้เข้าใจถึงหน้าที่ของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการวางไข่ในกิ้งกูดดำ ข้อมูลเบื้องต้นในการยับยั้งการทำงานของ CHH โดยใช้ antibody จากงานวิจัยนี้ ยังเป็นแนวทางที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงการวางไข่ของกิ้งกูดเพื่อทดแทนการเร่งการวางไข่โดยวิธีตัดก้านตาของแม่พันธุ์กิ้งกูด ซึ่งจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดในอนาคต

คำหลัก: กิ้งกูดดำ ฮอร์โมนควบคุมระดับน้ำตาล (CHH) การลอกคราบ การแสดงออกในยีสต์

Abstract

Project Code : RSA/13/2544

Project Title : Expression and identification of growth-related peptides in the CHH/MIH/GIH family of *Penaeus monodon*

Investigator : Mr. Apinunt Udomkit
Institute of Molecular Biology and Genetics
Mahidol University, Salaya Campus
Nakhon Pathom 73170

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

Project Period : 1 December 2000 - 30 November 2003

This project is aimed at molecular as well as biological functional study of the hormones that play roles in growth and gonad maturation in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Three types of *P. monodon*'s crustacean hyperglycemic hormone (Pem-CHH1, Pem-CHH2 and Pem-CHH3) were expressed from their cDNA in yeast expression system using *Pichia pastoris* as the host strain. The recombinant Pem-CHHs were secreted from *P. pastoris* cells by the use of α -factor secretion signal of *Saccharomyces cerevisiae*. The proteins were further purified either by reverse-phase HPLC or by gel filtration. The purified recombinant Pem-CHH1, 2 and 3 were able to elevate the glucose level in the haemolymph of *P. monodon* to 3.5, 3.58 and 3.05 mg/dl, respectively. This demonstrated hyperglycemic function of all three Pem-CHHs in *P. monodon*. A cDNA encoding another hormone, molt-inhibiting hormone (MIH), was successfully cloned by the use of RACE technique from the primer designed from the conserved amino acids between MIH of two shrimp species. The cloned cDNA encoded MIH peptide that was 97% identical to MIH of *P. japonicus*. The Pem-MIH was expressed in *P. pastoris* and purified by the same strategy as Pem-CHH. The purified Pem-MIH could extend the molt duration of *P. monodon* from 11.8 days to 16.3 days, and thus demonstrated the property of molt-inhibiting hormone. RT-PCR with specific primers showed that Pem-CHH expressed in the eyestalk, heart and gill whereas Pem-MIH expressed in the eyestalk and thoracic ganglia. Moreover, polyclonal antibody was raised against Pem-CHH1. This antibody recognized all types of Pem-CHHs but did not cross-react with Pem-MIH. When incubated with anti-Pem-CHH1 antibody, the hyperglycemic activity of the eyestalk extract was depleted by 45% whereas the shrimp injected with the antibody showed 15-20% reduction in the glucose level. These

studies clearly demonstrated molecular structure and biological functions of two neuropeptide hormones that are involved in growth and gonad maturation of *P. monodon*. The inhibitory effect of anti-Pem-CHH antibody on CHH activity *in vivo* provides a promising implication to the modulation of growth and reproduction of economically important species such as *P. monodon* in the future.

Keywords : black tiger shrimp, crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molting, yeast expression system

บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งของประเทศไทย มูลค่าการส่งออกกุ้งโดยรวมทำรายได้ให้กับประเทศถึงประมาณปีละกว่า ห้าหมื่นล้านบาท โดยผลผลิตส่วนใหญ่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปัจจุบันยังมีความต้องการพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ และมีการเร่งให้แม่พันธุ์วางไข่โดยการบีบตาหรือตัดก้านตา อัตราการขยายตัวการเลี้ยงกุ้งอย่างรวดเร็วในช่วงหลายปีที่ผ่านมาทำให้มีการนำพ่อแม่พันธุ์กุ้งเข้ามาในระบบการผลิตปีหนึ่งเป็นจำนวนมาก เป็นเหตุให้แม่พันธุ์กุ้งในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง และเริ่มมีการขาดแคลนแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพ จึงมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดิน แต่ก็ยังต้องอาศัยการติดตามเพื่อช่วยเร่งให้มีการวางไข่

การตัดก้านตามีผลต่อการเร่งการวางไข่ เพราะกุ้งและสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชียน (crustacean) ชนิดต่างๆ จะมีส่วนของระบบประสาทที่เรียกว่า X-organ-sinus gland complex อยู่ในบริเวณก้านตา ซึ่งผลิตฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาหลายชนิด รวมถึงฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนาของไข่ที่มีชื่อเรียกว่า gonad-inhibiting hormone (GIH) หรือ vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) (De Kleijn et al., 1992) ดังนั้นการตัดก้านตาจึงเป็นการทำลายแหล่งผลิต GIH และทำให้การเจริญของไข่ไม่ถูกยับยั้งอีกต่อไป GIH จัดอยู่ในกลุ่มของฮอร์โมนที่พบในครัสเตเชียนเท่านั้น ฮอร์โมนสำคัญอีก 2 ชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ฮอร์โมนที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) และฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (molt-inhibiting hormone, MIH) รวมเรียกว่าฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH (Keller, 1992 และ Charmantier et al., 1997)

การศึกษาฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH ทั้งในระดับ DNA และระดับโปรตีน พบว่าฮอร์โมนกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันมาก โดยมีลักษณะสำคัญคือ ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 72-78 ตัว และมีกรดอะมิโน cysteine เป็นส่วนประกอบจำนวน 6 ตัว ซึ่งพบที่ตำแหน่งเดียวกันในฮอร์โมนทุกชนิดในกลุ่มนี้ (Chang, 1997)

ฮอร์โมนทั้งสามชนิดในกลุ่ม CHH/MIH/GIH นั้นนอกจากจะมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันแล้วยังอาจมี biological activity ได้มากกว่าหนึ่งอย่างเช่น MIH ของ *Homarus americanus* ที่สามารถทำหน้าที่เป็นทั้ง MIH และ CHH (Chang et al., 1990) เช่นเดียวกับ CHH ของ *Carcinus maenas* ซึ่งทำหน้าที่เป็น MIH ได้ด้วย (Webster, 1991) อย่างไรก็ตามการที่สามารถตรวจพบว่าฮอร์โมนหนึ่งชนิดมี biological activity ได้มากกว่าหนึ่งอย่างนั้น อาจเป็นผลมาจากการที่ฮอร์โมนในกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันมากและการแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนไม่ได้ใช้ขั้นตอนที่ละเอียดพอ จึงทำให้โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้มีการปนเปื้อนของฮอร์โมนมากกว่าหนึ่งชนิด ปัญหาของการทดสอบเพื่อให้ทราบ biological activity ที่ชัดเจนของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จึงขึ้นอยู่กับวิธีในการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถแยกฮอร์โมนได้เพียงชนิดเดียวและขึ้นอยู่กับปริมาณของฮอร์โมนที่แยกบริสุทธิ์ได้อีกด้วย วิธีแก้ปัญหในการแยกฮอร์โมนให้มีทั้งความบริสุทธิ์ และมีปริมาณมากพอสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบ biological

activity สามารถทำได้โดยการโคลนชิ้น cDNA ของฮอร์โมนที่ต้องการ และสร้างโปรตีนจากชิ้น cDNA ดังกล่าว โดยใช้ expression system ที่เหมาะสม เช่น ทำการสร้างโปรตีนในแบคทีเรียหรือยีสต์เป็นต้น วิธีนี้จะสามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณสูงและโปรตีนที่ได้จะเป็นโปรตีนที่สร้างมาจาก cDNA เพียงหนึ่งชนิด ทำให้การนำโปรตีนที่สร้างจาก expression system ดังกล่าวไปใช้ในการทดสอบ biological activity ได้ผลที่ชัดเจนมากขึ้น เพราะจะไม่มีกวนปนเปื้อนของโปรตีนอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน

ไม่นานมานี้ ได้มีการโคลนชิ้น cDNA สามชนิด ของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากกิ้งกูดดำ โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษของ cDNA ในกลุ่มนี้ ซึ่งฮอร์โมนที่สร้างจาก cDNA ดังกล่าว มีความคล้ายคลึงกับ CHH และเรียกชื่อว่า Pem-CHH1, 2 และ 3 (รูปที่ 1) (Udomkit et al., 2000 และ Udomkit et al., 2003) อย่างไรก็ตามการที่จะทราบว่าฮอร์โมนที่สร้างจาก cDNA ดังกล่าวทำหน้าที่เป็น CHH จริงหรือไม่ จะต้องทำการทดสอบหน้าที่ของฮอร์โมนดังกล่าวเสียก่อน โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบ biological activity ของโปรตีน Pem-CHH ทั้งสามชนิด โดยให้มีการแสดงออกของ Pem-CHH ใน expression system ของยีสต์ *Pichia pastoris* ซึ่งมีความเหมาะสมที่สามารถใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของ heterologous โปรตีนในปริมาณสูง (Cregg et al., 1993) นอกจากนี้โปรตีนที่แสดงออกใน *P. pastoris* ยังสามารถอยู่ในรูปที่หลั่งออกนอกเซลล์ (secreted protein) โดยอาศัย leader peptide ของ alpha-factor จาก *Saccharomyces cerevisiae* (Briand et al., 1999 และ Remaekers et al., 1999) ทำให้การแยกบริสุทธิ์โปรตีนที่ต้องการเพื่อนำไปทดสอบ biological activity มีความสะดวกมากขึ้น นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังมุ่งที่จะโคลน cDNA ที่สร้างฮอร์โมนชนิดอื่นในกลุ่ม CHH/MIH/GIH อีกด้วย

หากสามารถทดสอบ biological activity ของฮอร์โมนที่สร้างได้ ก็จะเป็นข้อมูลสำคัญเบื้องต้นที่จะนำไปสู่ความช่วยเหลือในการพัฒนาคุณภาพของกิ้งกูดดำแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกิ้งกูดต่อไป เช่น การสร้าง antibody ต่อฮอร์โมน GIH อาจนำมาใช้ในการกระตุ้นให้กิ้งกูดไขแหว่แทนการตัดตา ซึ่งจะมีข้อดีคือ สามารถใช้แม่พันธุ์กิ้งกูดได้หลายครั้ง และช่วยลดปริมาณการจับกิ้งกูดจากธรรมชาติ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการโคลนชิ้น cDNA ที่สร้างฮอร์โมน CHH, MIH และ GIH จากกิ้งกูดดำ และทำการแสดงออกของชิ้น cDNA ดังกล่าวในยีสต์ *Pichia pastoris*
2. ศึกษา biological activity ของโปรตีนที่ได้จากการแสดงออกในข้อ 1 เพื่อดูว่าโปรตีนที่ผลิตได้ทำหน้าที่อะไร
3. สร้าง antibody ต่อฮอร์โมนดังกล่าวและศึกษาผลของการใช้ antibody ต่อการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนนั้นเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในกิ้งกูดต่อไป

```

      *           20           *           40           *           60           *
Pem-CHH1 : MVAVGPMR-----TAVVSLLLAIPASATTFGDNNDIPTFRRSPEASPVTSLS-----HTSDKRSISFRS : 60
Pem-CHH2 : MVAVRLVQ-----SAVLSLLVALPACVTTSENTNEIPASLSLSPGDS-LSED-----QSIKRSWFNS : 59
Pem-CHH3 : MIAVRLVQ-----SAVLSLLVAFACVTTSENTNEIPASLSLSPGDS-LTRE-----QSIKRTSFSS : 59
Cam-CHH : -MYSKTIP--AMLAITAYLCALPHAHARSTQGYGRDRLLAALKTSFMEPSAALAVENGTHPLEKQYDTS : 72
Hoa-CHHa : MMACRTLCL--LVVVVSLGTS-GVGGRSVEGASREKLLSSNSPSSTPLGLFSLQD-----HSVNKRQFDQA : 66
Prc-CHH : MVSFRTMWSLVVVVVVVAASLGSS-GVHGRSVEGSSRRERLSSGSS-SSEPLSFLSQD---QSVNKRQFDQA : 69
Cam-MIH : -----SRANSRFSCQRTWLLSVVVAAWTFGVHR-----AAARINDE : 41
Cas-MIH : -----SLAHSKFSCQRTLLAVVLAAWSSSQD-----AAARINDD : 41
Pej-MIH : -----YRLA-----MRTWLA-IVIVVVGTSLLFDT-----ASASFIDNT : 34
Hoa-GIH : -----TRVGSGFSVQRVWLL-LVIVVVCGSVTQQ-----ASAWFTNDE : 40

      80           *           100           *           120           *           140
Pem-CHH1 : STTAY-DRELLVRLDRVCELTAVYFDVGVAAECRSNCHHEVELYCVDMFRPRQRNRAAALORLEK--- : 128
Pem-CHH2 : STTAY-DRELLVRLDRVCEDCYLYPDVGVAAECRSNCHHEVELYCVDMFRPRQRNRAAALORLEK--- : 127
Pem-CHH3 : STTAY-DRELLVRLDRVCEDCYLYPDVGVAAECRSNCHHEVELYCVDMFRPRQRNRAAALORLEK--- : 127
Cam-CHH : STTAY-DRAAFNDLEHVCDCCYLYPTSYVESACRSNCYSLLVRCQDDLLMDEFCDARKVQMVRRKK- : 142
Hoa-CHHa : STTAY-GRNIFKRLDRVCEDCYLYKPFVTTTCRENCYSWVFRCCDDLLLSVDIDVSNVQMVVK--- : 134
Prc-CHH : STTAY-DRAAFKRLDRVCEDCYLYKPYVTTTCRCYANSVRCCDDLLLDVVDVHISGVQTVVK--- : 137
Cam-MIH : SPNIGNEDLYKVEWICEDASLFRKTCASLORRCHFEDEFLWCVATERSEELRDLLEEWGILSAGRD : 113
Cas-MIH : SPNIGNEDLYKVEWICEDASLFRKTCASLORRCHFEDEFLWCVATERSEDLALKQWVTLISAGRI : 113
Pej-MIH : SPNIGNEDLYKVVVRVCEDCYLYLPGLDGMCHNRCHYEFLICIKAAANREDEIEKRVWISILNAGQ- : 105
Hoa-GIH : SPNMGNDLYEYVAVVNDGANLFRNNDVGMCKKCHTMDLWCYATERHGEIDSRKWISILRAGRK : 112

```

รูปที่ 1 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ ตัวอักษรขาวบนพื้นดำแสดงกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ในฮอร์โมนทุกชนิด ได้แก่ *P. monodon* CHH1 (Pem-CHH1; AAQ24525), *P. monodon* CHH2 (Pem-CHH2; AAQ24526), *P. monodon* CHH3 (Pem-CHH3; AAQ24527), *Carcinus maenas* CHH (Cam-CHH; S06630), *Homarus americanus* CHHa (Hoa-CHHa; S52117), *Procambarus clarkii* CHH (Prc-CHH; Q25683), *C. maenas* MIH (Cam-MIH; Q27225), *Callinectes sapidus* MIH (Cas-MIH; P55321), *P. japonicus* MIH (Pej-MIH; P55847) และ *H. americanus* GIH (Hoa-GIH; CAA60644)

วิธีการทดลอง

1. การนำชิ้น cDNA ที่สร้างฮอร์โมน Pem-CHH ของกึ่งกุลาดำ เข้าสู่เซลล์ *Pichia pastoris*

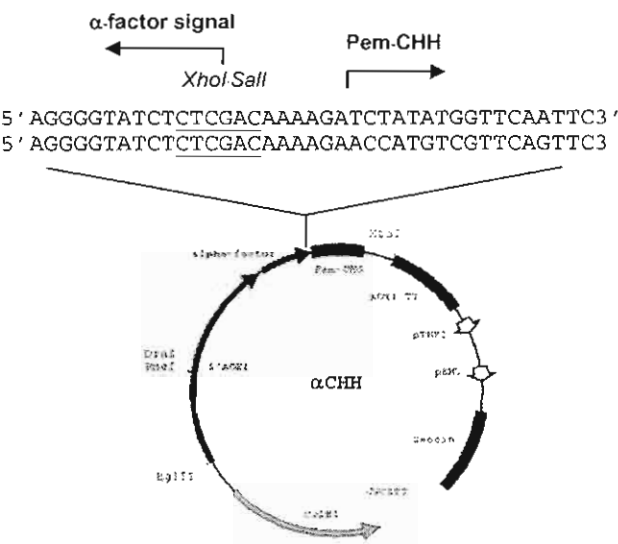
ทำการเพิ่มจำนวนชิ้น cDNA ที่สร้างฮอร์โมน Pem-CHH1-3 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโน 5 ตัวแรกที่ปลาย N ของ mature hormone ซึ่งมี restriction site ของเอนไซม์ *Xho* I เพื่อใช้ในการโคลนให้ชิ้น cDNA เชื่อมต่อใน frame ที่ถูกต้องกับ secretion signal ของ α -factor ใน expression vector ที่ใช้คือ pPICZ α A และมีลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับ cleavage site ของเอนไซม์ *kex2* เพื่อตัดส่วนของ secretion signal ภายหลังจากการแสดงออก ส่วน reverse primer ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโน 5 ตัวสุดท้าย (รวม stop codon) ที่ปลาย C ของ mature hormone และมี restriction site ของเอนไซม์ *Xba* I (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ของ Pem-CHH แต่ละชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 1)

ชิ้น cDNA ที่เพิ่มจำนวนได้จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Xba* I ก่อนนำมาเชื่อมต่อกับ pPICZ α A ที่ถูกตัดด้วย *Sal* I และ *Xba* I และนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ (รูปที่ 2) เข้าสู่เซลล์ของ *P. pastoris* ด้วยวิธี electroporation (1.5 kV, 25 μ F, 200 Ω) และเลี้ยงเซลล์ที่มีพลาสมิดลูกผสมให้โตบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ YEPD [2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose, 1% (w/v) yeast extract] ที่มี Zeocin ความเข้มข้น 100 mg/ml *P. pastoris* ที่โตในอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จะถูกนำมาสกัดแยก genomic DNA ด้วยวิธีของ Johnston, 1988 และทำการเพิ่ม

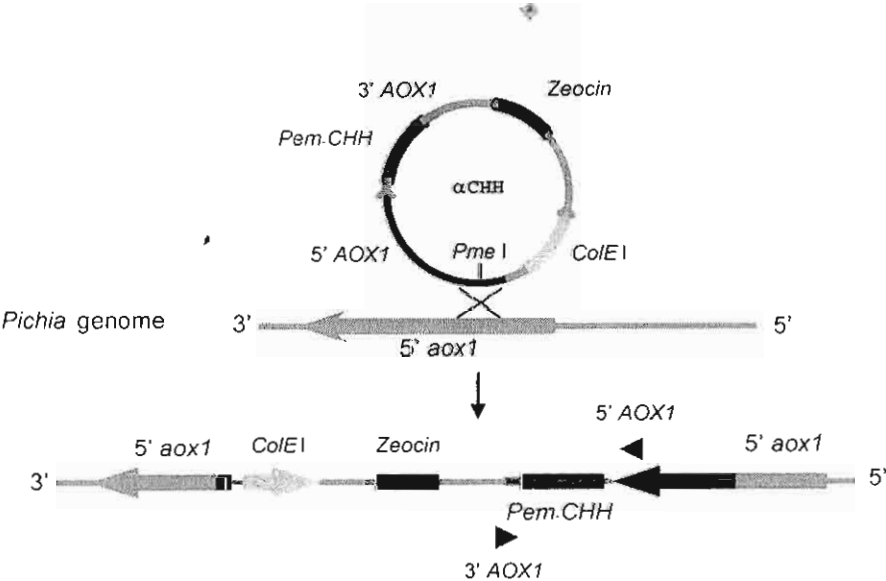
Primers	Nucleotide sequences
Pem-CHH1 expression CHH1-Ex CDR	5' AGGGGTATCTCGACAAAAGAAGCCTATCCTTCAGGTC 3' 5' CGGGATCCCTACTTGCCGAGCCTCTA 3'
Pem-CHH2 expression CHH2-Ex CDR-2	5' ATGAATTCGTCGACAAAAGATCTATATGGTTCAATTC 3' 5' GCTCTAGACTACTTGCCGAGCCTCTG 3'
Pem-CHH3 expression CHH3-Ex CDR-2	5' ATGAATTCGTCGACAAAAGAACCATGTCGTTCAAGTTC 3' 5' GCTCTAGACTACTTGCCGAGCCTCTG 3'
Pem-MIH expression MIH-F MIH-R	5' CTCGAATTCGTCGACAAAAGAAGTTTCATAGACGGCAC 3' 5' GCGTTCTAGATCACTGACCGGCGTTCAGGATG 3'
RT-PCR reverse transcription PRT Primary PCR CMG-F CHH2-R PM1	5' CCGGAATTCAAGC TTCTAGAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT 3' 5' CGGAATTCTCAGTG CAGAGGGAGAGCC 3' 5'-GCGGATCCCTGCTTTATGAAGACACTG-3' 5' CCGGAATTCAAGCTTCTAGAGGA TCC 3'

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง รายละเอียดของการทำปฏิกิริยา PCR ต่างๆ 'แสดงไว้ในวิธีทดลองและคำบรรยายได้รูปผลการทดลอง ตามความเหมาะสม

จำนวนชิ้น cDNA ของ Pem-CHH ที่แทรกเข้าไปใน genome ของ *P. pastoris* โดยการทำให้ PCR ด้วยไพรเมอร์ 5'AOX และ 3' AOX ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 Physical map ของพลาสมิดลูกผสม α CMG ชิ้น cDNA ที่สร้าง mature Pem-CMG1 ถูกนำเข้าสู่ pPICZXA โดยปลายด้าน 5' เชื่อมต่อกับ α -factor signal sequence เพื่อช่วยในการหลั่งโปรตีน Pem-CMG1 ออกนอกเซลล์ โดยมีโปรโมเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกคือ โปรโมเตอร์ AOX1 ที่อยู่ในส่วนของ 5'AOX1 และสามารถคัดเลือก *P. Pastoris* transformants ได้ โดยดูความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มี Zeocin



รูปที่ 3 Integration ของ expression cassette aCHH เข้าใน genome ของ *P. pastoris* และการคัดเลือก *P. pastoris* transformants ที่มี cDNA ของ Pem-CHH อยู่ใน genome ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 5'AOX และ 3'AOX

2. การแสดงออกและการหลั่งของฮอร์โมน Pem-CHH จากเซลล์ *P. pastoris*

เลี้ยงเซลล์ *P. pastoris* ที่มี cDNA ของ Pem-CHH แทรกอยู่ใน genome ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMGY [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 0.67% (w/v) YNB, 4 μ g/ml D-biotin, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0 and 1% (v/v) glycerol] ที่อุณหภูมิ 30°C จนกระทั่ง OD₆₀₀ = 5-6 แล้วปั่นแยกเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMMY [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 0.67% (w/v) YNB, 4 μ g/ml D-biotin, 100 mM potassium phosphate] ในปริมาณ 1/5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น เติมน้ำเมทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-5% และเลี้ยงเซลล์ที่ 30°C ต่อเป็นเวลา 1-7 วัน จึงปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์โปรตีนที่ต้องการด้วย Tricine SDS-PAGE (16.5%) และนำอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ ไปผ่านการแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3. การแยกบริสุทธิ์โปรตีน Pem-CHH

ตกตะกอนโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ammonium sulfate และนำ fraction ที่มีโปรตีนที่ต้องการไปแยกบริสุทธิ์ โดยทำการแยกบริสุทธิ์ Pem-CHH1 ด้วยวิธี reverse-phase HPLC โดยใช้ Phenomenex C18 column (Phenomenex, 5 μ particle, 300 Å pore size, 250 x 4.6 mm) และ elute ด้วย linear gradient ของ 0-10% acetonitrile ใน 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) เป็นเวลา 1 นาที และ 10% acetonitrile เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย linear gradient ของ 10-60% acetonitrile เป็นเวลา 40 นาที และ 60% acetonitrile เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้ flow rate ในอัตรา 1 มิลลิลิตร/นาที. ส่วน Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 นั้นถูกแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ Superdex 75 PC 3.2/30 column และ elute ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 นำโปรตีนแต่ละ fraction มาวิเคราะห์ด้วย tricine SDS-PAGE

4. การทดสอบหน้าที่ของฮอร์โมน CHH

นำกิ้งกูดดำ (น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม) มาตัดตาทั้งสองข้างและอดอาหารเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วดูด haemolymph ออกมาวัดระดับน้ำตาล glucose ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ glucose oxidase glucose diagnostic kit (Sigma, USA) จากนั้นจึงฉีดโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อของ *P. pastoris* ที่สร้าง Pem-CHH ปริมาณ 25 ไมโครกรัม หรือโปรตีน Pem-CHH ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ปริมาณ 5 ไมโครกรัม เข้าไปในกิ้งกูดทดลอง ส่วนกิ้งกูดควบคุมจะฉีดด้วย PBS (100 ไมโครลิตร) และกลุ่ม positive control ฉีดด้วยสารสกัดจากก้านตา (eyestalk extract) 1 คู่ ของกิ้งกูดดำ หลังจากนั้นจึงดูด haemolymph ทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เพื่อวัดระดับน้ำตาล glucose

5. การสร้าง antibody ต่อ Pem-CHH1 และทดสอบความไวและความจำเพาะของ antibody

ทำการแสดงออกของโปรตีน Pem-CHH1 ใน *E. coli* จากพลาสมิด Pem-CMG-Ex2.1 (S. Chooluck, 2000) ภายใต้การควบคุมของ โปรโมเตอร์ T7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG โดย Pem-CHH1 มีการแสดงออกในรูปของ inclusion ซึ่งต้องทำการละลายใน 8 M urea และแยกบริสุทธิ์ด้วย gel filtration จากนั้นจึงนำโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปใช้ในการสร้าง antibody ในหนู BALB/C โดยทำการฉีดหนู 3 ตัว เมื่อได้ antibody แล้ว จึงนำมาทดสอบความไวของ antibody ในการตรวจจับโปรตีน Pem-CHH1 โดยวิธี dot blot analysis นอกจากนี้ได้ทำ western blot analysis เพื่อดูความจำเพาะของ antibody ในการตรวจจับโปรตีน Pem-CHH1-3 และโปรตีนอื่นๆ

6. การทดสอบความสามารถของ antibody ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน CHH

ในขั้นแรกได้ทำการ incubate สารสกัดจากก้านตาของกึ่งกุลาดำ anti-Pem-CHH1 antibody (1:500 dilution) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปฉีดในกึ่งกุลาดำที่ตัดก้านตา และวัดระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ทุก 30 นาที เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกึ่งกลุ่มที่ฉีดสารสกัดจากก้านตาที่ไม่ได้ incubate กับ antibody

จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของ antibody ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน CHH ในกึ่งกุลาดำ โดยฉีด antibody (1:500 dilution) เข้าไปในกึ่งกุลาดำ และวัดระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ทุก 30 นาที เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เทียบกับระดับน้ำตาลใน haemolymph ของกึ่งในกลุ่ม control ที่ฉีดด้วย PBS

7. การโคลนชิ้น cDNA ที่สร้าง molt-inhibiting hormone ในกึ่งกุลาดำ (Pem-MIH)

ทำการสร้าง cDNA ของฮอร์โมน MIH โดยอาศัยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนในฮอร์โมน MIH ของกึ่ง *Penaeus japonicus* และ *Metapenaeus ensis* (รูปที่ 4) และตรวจหาโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับฮอร์โมน MIH จากนั้นทำการสร้างชิ้น cDNA ส่วนที่เก็บรหัสสำหรับโปรตีน Pem-MIH โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น 3' และ 5' cDNA

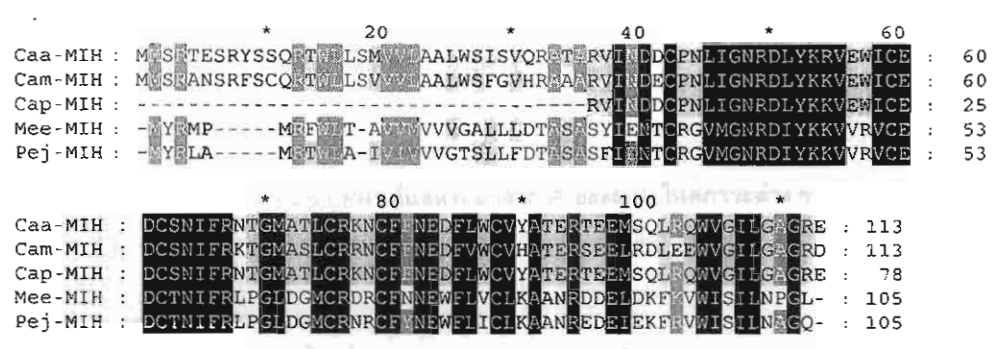
8. การแสดงออกและแยกบริสุทธิ์ Pem-MIH

ชิ้น cDNA ที่สร้าง Pem-MIH ถูกนำเข้าสู่ *P. pastoris* และแสดงออกในรูปที่หลั่งออกนอกเซลล์ตามขั้นตอนในวิธีทดลองที่ 1 และ 2 และทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี gel filtration เช่นเดียวกับการแยกบริสุทธิ์ Pem-CHH2 และ Pem-CHH3

9. การทดสอบหน้าที่ของ Pem-MIH ในการยับยั้งการลอกคราบของกึ่งกุลาดำ

ทำการทดสอบโดยใช้กึ่งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 12-13 กรัม แบ่งกึ่งเป็นสามกลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว เลี้ยงกึ่งในสภาวะเดียวกันจนกระทั่งกึ่งลอกคราบครั้งที่ 1 หลังจากลอกคราบเป็นเวลา

สามวัน ทำการฉีดกุ้งในกลุ่มควบคุมด้วย PBS และฉีดกุ้งในกลุ่ม positive control ด้วยสารสกัดจากก้านดา 1 คู่ ส่วนกุ้งในกลุ่มทดลองฉีดด้วย โปรตีน Pem-MIH ปริมาณ 5 ไมโครกรัม หลังจากนั้นจึงบันทึกเวลาที่กุ้งในแต่ละกลุ่มลอกคราบในครั้งต่อไป



รูปที่ 4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ MIH ตัวอักษรขาวบนพื้นดำแสดงกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ระหว่างกลุ่มของปู: *Cancer magister* (Caa-MIH; O61389, *Carcinus. maenas* (Cam-MIH; Q27225) และ *Cancer pagurus* (Cap-MIH; CAC05346) กับกลุ่มของกุ้ง: *Metapenaeus ensis* (Mee-MIH; O76534 และ *P. japonicus* (Pej-MIH; P55847) ลำดับกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ที่สร้าง MIH ในกุ้งกุลาดำ

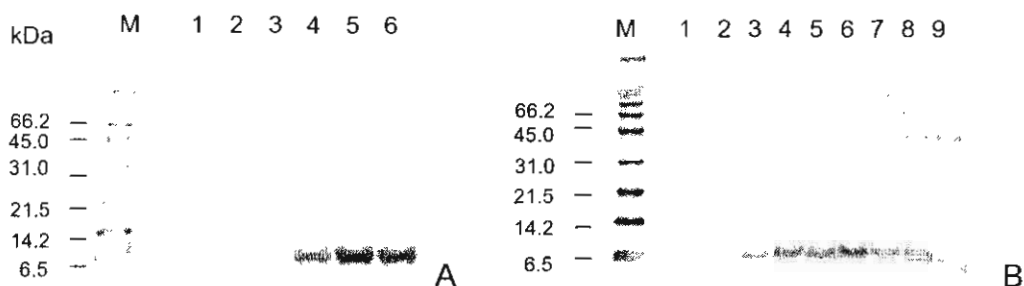
10. การแสดงออกของ Pem-CHH และ Pem-MIH ในส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ

สร้าง cDNA จาก total RNA ที่สกัดมาจากส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ eyestalk, heart, gill, muscle และ thoracic ganglia ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหา cDNA ของ Pem-CHH1-3 และ Pem-MIH1-2 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA แต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการทดลอง

1. การแสดงออกของ Pem-CHH ใน *Pichia pastoris*

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Pem-CHH1-3 ในรูปของการหลั่งออกนอกเซลล์โดยอาศัย secretion signal สำหรับ α -factor ของ *S. cerevisiae* ที่มีอยู่ใน pPICZ α A พบว่า Pem-CHH1 มีการแสดงออกในปริมาณสูงโดยมีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่นน้อยที่สุด เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 3% เป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 5) ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของ Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 ได้แก่ เหนี่ยวนำด้วย methanol 3% เป็นเวลา 2 วัน และเหนี่ยวนำด้วย methanol 4% เป็นเวลา 2 วัน ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล)



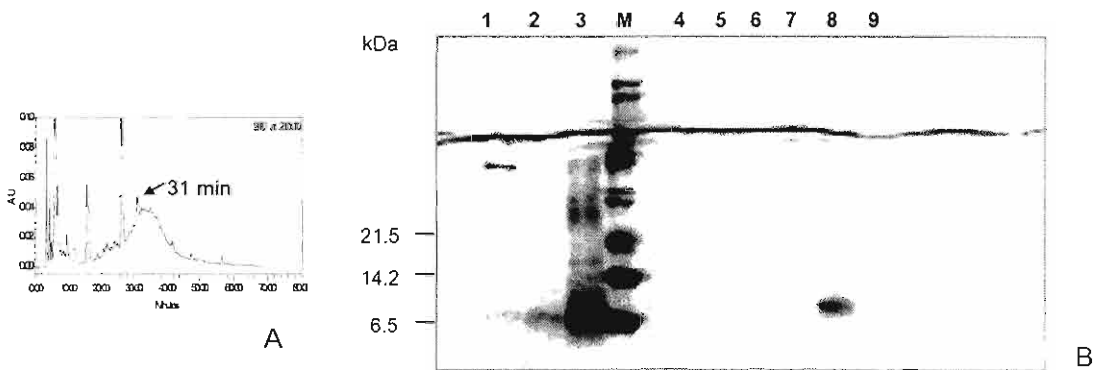
รูปที่ 5 Tricine SDS-PAGE ของโปรตีน Pem-CHH1 ที่แสดงออกจาก *P. pastoris* ในสภาวะต่าง ๆ

- A. โปรตีน Pem-CHH1 ที่แสดงออกจาก *P. pastoris* ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 4 วัน
lane M : Broad range protein marker (Bio-RAD, USA)
lane 1-6 : 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* transformants ที่มี α CHH1 อยู่ใน genome เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4% ตามลำดับ
- B. โปรตีน Pem-CHH1 ที่แสดงออกจาก *P. pastoris* ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 3% เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน
lane M : Broad range protein marker
lane 1 : 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* transformants ที่มีเฉพาะ pPICZXA อยู่ใน genome
lane 2-9 : 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* transformants ที่มี α CHH1 อยู่ใน genome เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 3% เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ตามลำดับ

การแยกบริสุทธิ์ของ Pem-CHH1 ด้วย reverse-phase HPLC สามารถแยกบริสุทธิ์ Pem-CHH1 จากโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนมาได้ โดย Pem-CHH1 ถูก elute จาก Phenomenex C18 column ที่เวลา 31 นาที (รูปที่ 6) ส่วน Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 ก็สามารถแยกบริสุทธิ์ได้โดยวิธี gel filtration (รูปที่ 7) โดยหลังจากแยกบริสุทธิ์ จะได้โปรตีน Pem-CHH1, 2 และ 3 ในปริมาณ 260, 270 และ 450 ไมโครกรัม/ลิตร ตามลำดับ

2. การทดสอบหน้าที่ของ Pem-CHH

เมื่อนำโปรตีน Pem-CHH1 ก่อนที่จะแยกบริสุทธิ์ มาตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph พบว่าสามารถเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูด้าที่ตัดก้านตาได้ถึงระดับ 3.5 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ในขณะที่โปรตีน Pem-CHH1 ที่แยกบริสุทธิ์แล้วมีความสามารถในการเพิ่มน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ได้ในระดับ 3.25 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากก้านตากิ้งกูด้า 1 คู่ เพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสได้ประมาณ 5-10 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ส่วนกึ่งที่ฉีดด้วยPBS ไม่มีการเพิ่มของระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph (รูปที่ 8) ส่วนโปรตีน Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสได้ในระดับ 3.58 และ 3.05 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 9)



รูปที่ 6 การแยกบริสุทธิ์ของโปรตีน Pem-CMG1

A: elution profile ของโปรตีนที่ elute ออกมาจาก reverse-phase HPLC column ลูกศรแสดง peak ของโปรตีนที่ elute ออกมาในเวลาที่ 31

B: SDS-PAGE แสดงโปรตีน Pem-CMG1 ในขั้นตอนต่างๆ

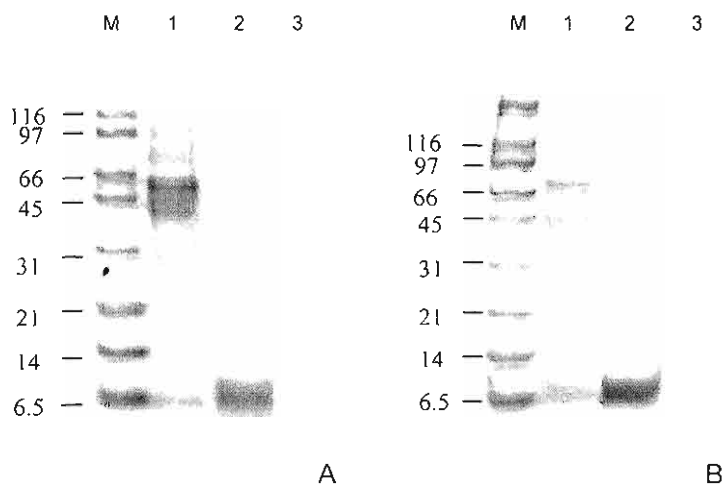
lane 1 : 3 ไมโครกรัมของโปรตีนใน culture supernatant ที่ใช้เลี้ยง *P. pastoris* ที่มี α CHH1 อยู่ใน genome

lane 2 : 3 ไมโครกรัมของโปรตีนหลังจากตกตะกอนด้วย ammonium sulfate 30-50%

lane 3 : 10 ไมโครกรัมของโปรตีนหลังจากทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

lane M : Broad range protein marker (Bio-Rad, USA)

lane 4-9 : โปรตีนที่ elute จาก column ในเวลาที่ 3, 6, 16, 26, 31 และ 35 ตามลำดับ

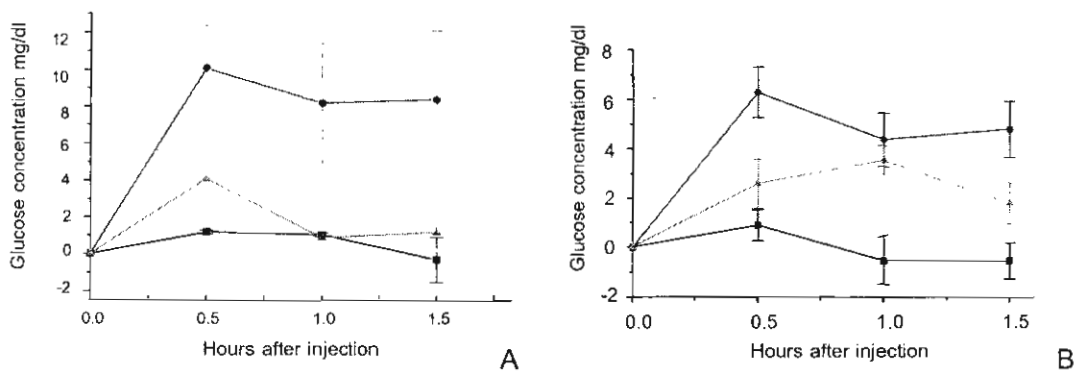


รูปที่ 7 SDS-PAGE แสดงโปรตีน Pem-CMG2 (A) และ Pem-CMG3 (B) ในขั้นตอนต่างๆของการแสดงออกและการแยกบริสุทธิ์

lane M : Broad range protein marker (Bio-Rad, USA)

lane 1 : 3 ไมโครกรัมของโปรตีนใน culture supernatant ที่ใช้เลี้ยง *P. pastoris* ที่มี Pem-CHH2 หรือ Pem-CHH3 อยู่ใน genome

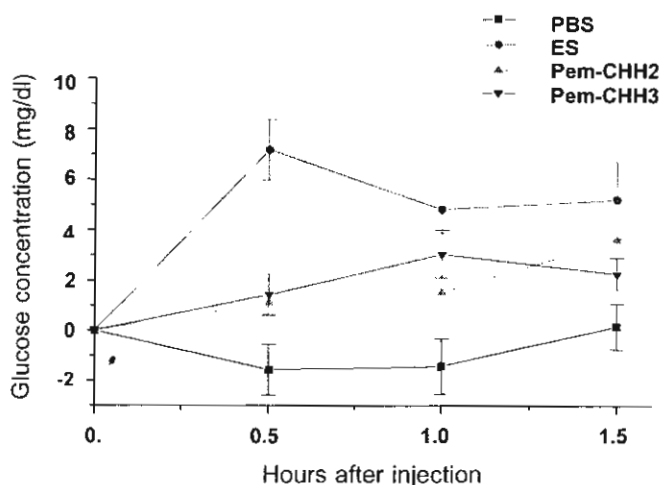
lane 2 : 3 ไมโครกรัมของโปรตีนหลังจากตกตะกอนด้วย ammonium sulfate 30-50%



รูปที่ 8 การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูดดำ

A. การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ตัดก้านตา หลังจากฉีดด้วย PBS (■) สารสกัดจากก้านตากลิ้งกูดดำ 1 คู่ (●) และ 25 มิลลิกรัมของโปรตีนจาก culture supernatant ที่ใช้เลี้ยง *P. pastoris* ที่มี α CHH1 อยู่ใน genome ก่อนแยกบริสุทธิ์ (▲) (เป็นค่าที่ได้หลังจากหักค่าการเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสของ culture supernatant ที่ใช้เลี้ยง *P. pastoris* ที่มีเฉพาะ pPICZXA อยู่ใน genome ออกแล้ว) จำนวนกิ้งที่ใช้ทดลองในแต่ละกลุ่ม = 5

B. การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ตัดก้านตา หลังจากฉีดด้วย PBS (■) สารสกัดจากก้านตากลิ้งกูดดำ 1 คู่ (●) และ 5 มิลลิกรัมของโปรตีน Pem-CMG1 หลังจากแยกบริสุทธิ์ (▲) จำนวนกิ้งที่ใช้ทดลองในแต่ละกลุ่ม = 6



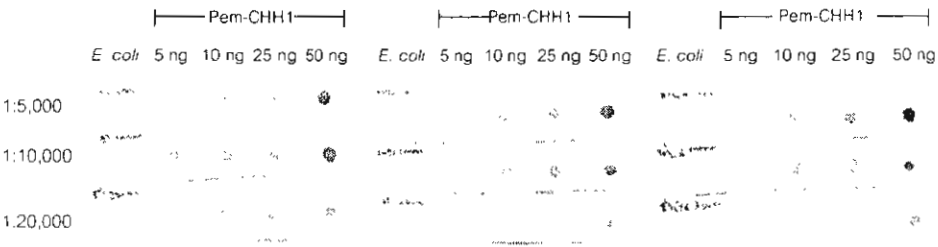
รูปที่ 9 การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูดดำ

การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ตัดก้านตา หลังจากฉีดด้วย PBS (■) สารสกัดจากก้านตากลิ้งกูดดำ 1 คู่ (●) และ 5 ไมโครกรัมของโปรตีน Pem-CHH2 (▲) และ Pem-CHH3 (▼) หลังจากแยกบริสุทธิ์ จำนวนกิ้งที่ใช้ทดลองในแต่ละกลุ่ม = 10

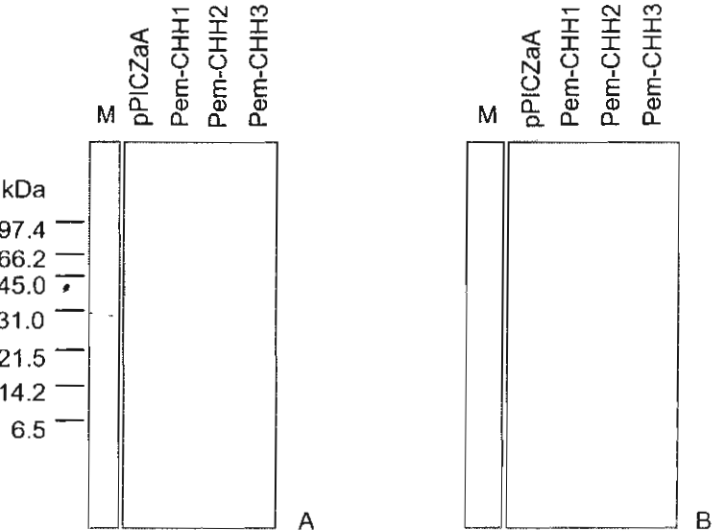
3. ความไวและความจำเพาะของ anti-Pem-CHH1 antibody

ทำการทดสอบความไวของ antibody ต่อ Pem-CHH1 ที่สร้างจากหนู 3 ตัว ในการตรวจจับ โปรตีน Pem-CHH1 ที่ปริมาณ 5 –50 นาโนกรัม โดยใช้ dilution ของ antibody เป็น

1:5,000, 1:10,000 และ 1:20,000 พบว่า antibody ที่ dilution 1:20,000 สามารถตรวจจับโปรตีน Pem-CHH1 ได้ในปริมาณน้อยที่สุดถึง 5 นาโนกรัม ดังแสดงโดย dot blot analysis ในรูปที่ 10 นอกจากนี้ผลการทดลองจาก western blot analysis แสดงให้เห็นว่า antibody ยังสามารถจับกับ Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 ได้ แต่ไม่จับกับ growth hormone ของมนุษย์ (hGH) นอกจากนี้ anti-Pem-CHH1 antibody ยังไม่สามารถจับกับ ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบของกิ้งกูดำ (Pem-MIH) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มเดียวกับ CHH (รูปที่ 11 และ 12)

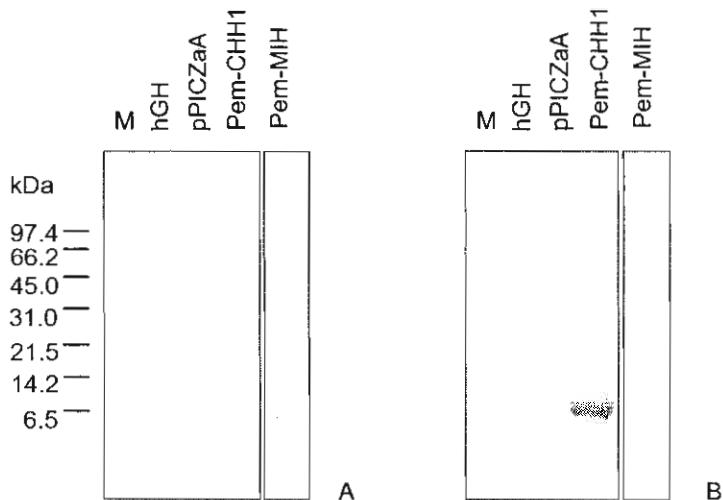


รูปที่ 10 การทดสอบความไวของ anti -Pem-CHH1 antibody ตัวเลข 1:5,000, 1:10,000 และ 1:20,000 แสดง dilution ของ anti-Pem-CHH1 antibody ที่ใช้ในการทดสอบความไวโดยการตรวจจับโปรตีน Pem-CHH1 ในปริมาณ 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัม โดยมี cell lysate ของ *E. Coli* เป็น negative control



รูปที่ 11 Western blot analysis โดยใช้ anti-Pem-CHH1 antibody

โปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่มี pPICZαA อยู่ใน genome (pPICZαA) และ อาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่มี cDNA ของ Pem-CHH1, Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 อยู่ใน genome (Pem-CHH1, Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 ตามลำดับ) ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดย SDS-PAGE ถูก transferred ไปบน nitrocellulose membrane และตรวจจับด้วย anti-Pem-CHH1 antibody โดยใช้ชุดตรวจสอบ Enhanced Chemiluminescence (Amersham Pharmacia) A. ย้อมด้วย Coomassie Blue B. ตรวจจับด้วย antibody



รูปที่ 12 Specificity ของ anti-Pem-CHH1 antibody

โปรตีน growth hormone ของมนุษย์ (hGH) โปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่มี pPICZαA อยู่ใน genome (pPICZαA) อาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่มี cDNA ของ Pem-CHH1 และ molt-inhibiting hormone ของกิ้งก่าตัว อยู่ใน genome (Pem-CHH1 และ Pem-MIH ตามลำดับ) ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดย SDS-PAGE ถูก transferred ไปบน nitrocellulose membrane และตรวจจับด้วย anti-Pem-CHH1 antibody โดยใช้ชุดตรวจสอบ Enhanced Chemiluminescence (Amersham Pharmacia) A. ย้อมด้วย Coomassie Blue B. ตรวจจับด้วย antibody

4. ผลของ anti-Pem-CHH1 antibody ต่อ การทำงานของ CHH ในกิ้งก่าตัว

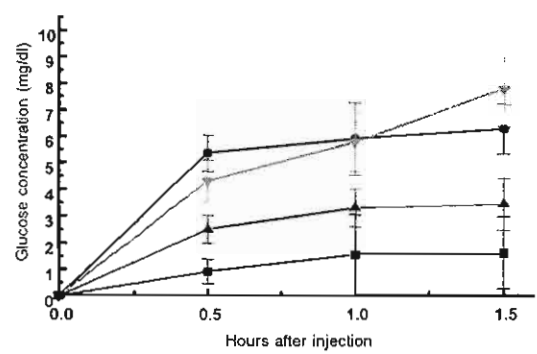
ในช่วงแรกได้ทำการ incubate สารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่าตัวกับ anti-Pem-CHH1 antibody (1:500 dilution) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปฉีดในกิ้งก่าตัวที่ตัดก้านตา พบว่า สารสกัดจากก้านตาที่ incubate กับ antibody ก่อนทำการฉีด มีความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ลดลงประมาณ 45 % เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากก้านตาที่ไม่ได้ incubate กับ antibody (รูปที่ 13)

จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของ antibody ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน CHH ในกิ้งก่าตัว โดยฉีด antibody (1:500 dilution) เข้าไปในกิ้งก่าตัว และวัดระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ที่เวลา 0.5 ชั่วโมงหลังการฉีด เทียบกับ ระดับน้ำตาลใน haemolymph ของกิ้งในกลุ่มควบคุม ที่ฉีดด้วย PBS พบว่า กิ้งที่ฉีดด้วย antibody มีระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ลดลงโดยเฉลี่ย 15-20 % เมื่อเทียบกับระดับน้ำตาลของกิ้งในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 14)

5. การโคลนนิ่ง cDNA ที่สร้างฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (Pem-MIH) จากกิ้งก่าตัว

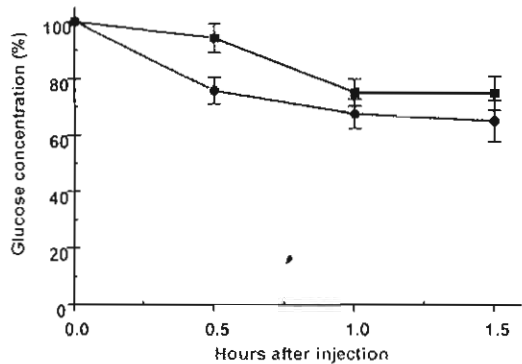
การค้นหาโคลนจากการเพิ่มจำนวนขึ้น cDNA ทางปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่พบเฉพาะในฮอร์โมน MIH ของ *P. japonicus* และ *M. ensis* (P/RGVMGN) โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น 3' cDNA ที่โคลนได้ พบว่ามี 1

โคลน (MG7) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสได้เป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับ MIH ของ *P. japonicus* ถึง 95% (รูปที่ 15)



รูปที่ 13 ความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของสารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่าที่ incubate กับ anti-Pem-CHH1 antibody

การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งก่าที่ตัดก้านตา หลังจากฉีดด้วย PBS (■) สารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่า 1 คู่ (●) สารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่าที่ incubate กับ anti-Pem-CHH antibody (▲) และ สารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่าที่ incubate กับ anti-hGH antibody (▼)



A

Time (h)	Inhibitory effect (%)
0	0
0.5	19.7
1	10
1.5	13.1

B

รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งก่าหลังจากได้รับ anti-Pem-CHH1 antibody

การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งก่า หลังจากฉีดด้วย PBS (■) และ anti-Pem-CHH1 antibody ที่ความเจือจาง 1:500 (●) ค่าของระดับน้ำตาลกลูโคสที่เวลาต่างๆหลังจากฉีด PBS และ antibody แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับระดับน้ำตาลกลูโคสในกิ้งก่าก่อนฉีด

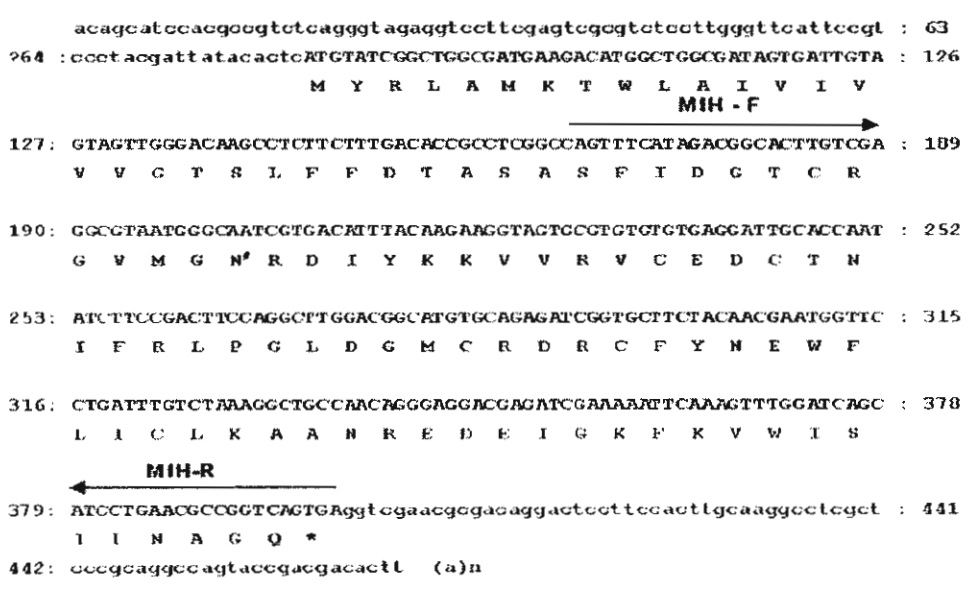
Query: 1 GVMGNRDIYKKVVRVCECTNIFRLPGLDGMCRDRCFYNEWFLICLKAANREDEIGKFKV 60
GVMGNRDIYKKVVRVCECTNIFRLPGLDGMCR RCFYNEWFLICLKAANREDEI KF+V
Sbjct: 37 GVMGNRDIYKKVVRVCECTNIFRLPGLDGMCRNRCFYNEWFLICLKAANREDEIEKFRV 96

Query: 61 WISILNAGQ 69
WISILNAGQ
Sbjct: 97 WISILNAGQ 105

รูปที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน MG7 (Query) กับลำดับกรดอะมิโนของ MIH ของ *P. japonicus* (Sbjct)

หลังจากที่ได้ขึ้นส่วนหาง ด้าน 3' ของ cDNA สำหรับ Pem-MIH แล้ว ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น cDNA ดังกล่าว เพื่อโคลน cDNA ทางด้าน 5' ของ Pem-MIH ด้วยเทคนิค 5' RACE โดยขึ้น cDNA ที่โคลนได้มีส่วนที่ overlap กับชิ้นทางด้าน 3' ของ Pem-MIH และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น 5' และ 3' มาเชื่อมต่อกันก็จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pem-MIH พบว่าประกอบด้วยส่วน 5'UTR ความยาว 81 นิวคลีโอไทด์ ส่วน 3'UTR ความยาว 68 นิวคลีโอไทด์ และส่วนที่เป็น open reading frame ความยาว 315 นิวคลีโอไทด์ ที่สามารถถอดรหัสได้เป็นลำดับกรดอะมิโนจำนวน 105 ตัว (รูปที่ 16) ที่มีความใกล้เคียงกับ MIH ของ *P. japonicus* ถึง 97% (รูปที่ 17)

จากนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำการเพิ่มชิ้นส่วนของ cDNA ในส่วนที่ถอดรหัสให้ mature Pem-MIH peptide (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ แสดงในรูปที่ 16)



รูปที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ Pem-MIH-like peptide

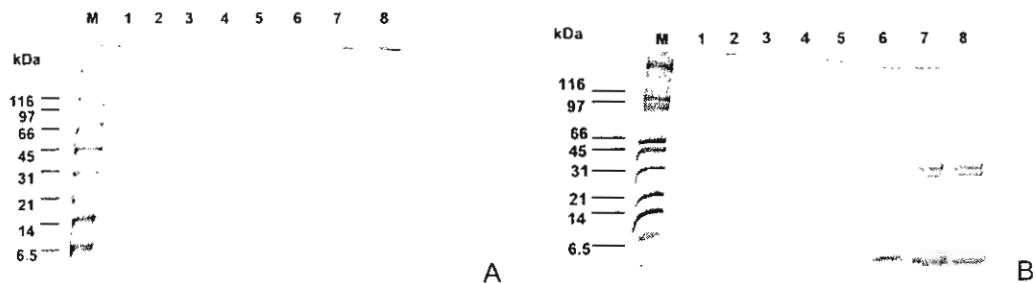
ตัวอักษรเล็กแสดงนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5' และ 3'UTR ตัวอักษรใหญ่แสดงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ open reading frame ที่ถอดรหัสได้เป็น MIH-like peptide จากกึ่งกลางลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงด้วยสัญลักษณ์ตัวอักษรหนึ่งตัว เครื่องหมาย * แสดง stop codon ลูกศรแสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ MIH-F และ MIH-R ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ในส่วนที่สร้าง mature ออร์โมนของ Pem-MIH

[illegible]

รูปที่ 17 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Pem-MIH กับ MIH จากคริสต์เขียวนชนิดต่าง ๆ

6. การแสดงออกและการแยกบริสุทธิ์ของ Pem-MIH

การแยกบริสุทธิ์โปรตีน MIH ที่ได้จากการแสดงออกในยีสต์ พบว่าการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 50-55% และการแยกบริสุทธิ์ด้วยหลักการของ size exclusion โดยใช้ Superdex 75 column สามารถแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมน MIH ได้ ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ 18 Tricine SDS-PAGE ของโปรตีน Pem-MIH ที่แสดงออกจาก *P. pastoris* ในสภาวะต่าง ๆ

A. โปรตีน Pem-MIH ที่แสดงออกจาก *P. pastoris* ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 วัน

lane M : Broad range protein marker (Bio-RAD, USA)

lane 1 : 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* transformants ที่มีเฉพาะ pPICZαA อยู่ใน genome

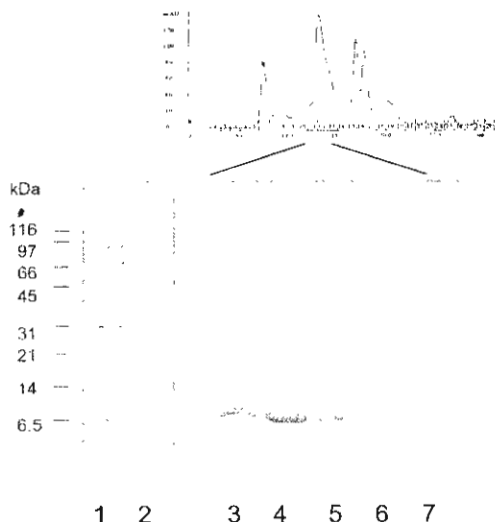
lane 2 : 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* transformants ที่มี αCHH1 อยู่ใน genome เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 3% เป็นเวลา 3 วัน

lane 3-8 : 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* transformants ที่มี cDNA ของ MIH อยู่ใน genome เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 0, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4% ตามลำดับ

B. โปรตีน Pem-MIH ที่แสดงออกจาก *P. pastoris* ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 3% เป็นระยะเวลา ต่าง ๆ กัน

lane M : Broad range protein marker

lane 1-8 : 100 ไมโครลิตรของ culture supernatant ที่ใช้เลี้ยง *P. pastoris* transformants ที่มี cDNA ของ MIH อยู่ใน genome เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 3% เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 19 การแยกบริสุทธิ์โปรตีน Pem-MIH

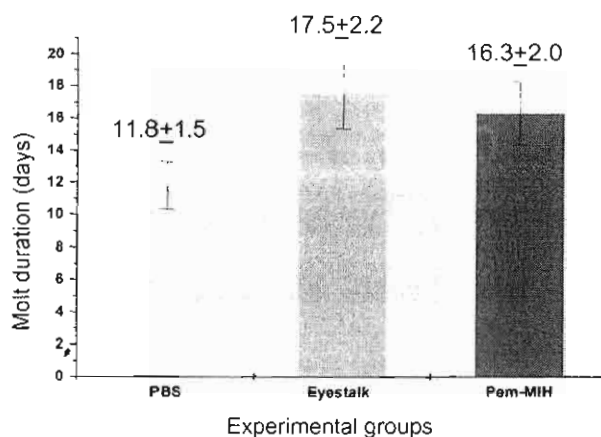
lane 1 : Broad range protein marker (Bio-RAD, USA)

lane 2 : โปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่มี cDNA ของ Pem-MIH อยู่ใน genome ก่อนการแยกบริสุทธิ์

lane 3-7 : โปรตีน Pem-MIH ที่อยู่ใน fraction ที่ 11-15 (รูปบน) หลังจากผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วย Superdex 75 column ตามลำดับ

7. การทดสอบหน้าที่ของ Pem-MIH

การทดสอบหน้าที่ของฮอร์โมน Pem-MIH ว่ามีความสามารถในการยับยั้งการลอกคราบหรือไม่ สามารถทำได้โดยวัดระยะเวลาระหว่างการลอกคราบครั้งที่ 1 และ 2 (molt duration) ของกิ้งก่าที่ได้รับฮอร์โมน ว่ามี molt duration ที่นานขึ้นหรือไม่ เมื่อเทียบกับกิ้งก่าในกลุ่มที่ฉีด PBS โดยก่อนที่จะทำการทดสอบหน้าที่ของ Pem-MIH ได้ทำการศึกษาการลอกคราบของกิ้งก่าสีดำ (น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 13-15 กรัม) ที่เลี้ยงในห้องทดลอง พบว่ามี molt duration โดยเฉลี่ย 12 วัน จากนั้นจึงทำการทดลอง โดยเลี้ยงกิ้งก่าให้ลอกคราบก่อนหนึ่งครั้ง หลังจากกิ้งก่าลอกคราบแล้วเป็นเวลา 3 วัน จึงแบ่งกิ้งก่าเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกซึ่งเป็นกลุ่มทดลองได้รับการฉีดโปรตีน Pem-MIH ที่แยกบริสุทธิ์ได้ปริมาณ 5 ไมโครกรัม (10 ตัว/กลุ่ม) กลุ่มที่สองฉีด สารสกัดจากก้านตา 1 คู่ (positive control) และกลุ่มที่สาม ฉีด PBS (negative control) หลังจากนั้นจึงบันทึกเวลาที่กิ้งก่าในแต่ละกลุ่มลอกคราบในครั้งต่อไป พบว่ากิ้งก่าในกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS มีระยะห่างระหว่างการลอกคราบทั้งสองครั้ง เป็นเวลาประมาณ 12 วัน ในขณะที่กิ้งก่าในกลุ่มที่ฉีดด้วย crude protein extract จากก้านตา และกลุ่มที่ฉีดด้วย โปรตีน Pem-MIH มีระยะห่างระหว่างการลอกคราบทั้งสองครั้งเฉลี่ย เป็นเวลาประมาณ 17 และ 16 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 20) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีน Pem-MIH ทำหน้าที่เป็น molt-inhibiting hormone ในกิ้งก่าสีดำ



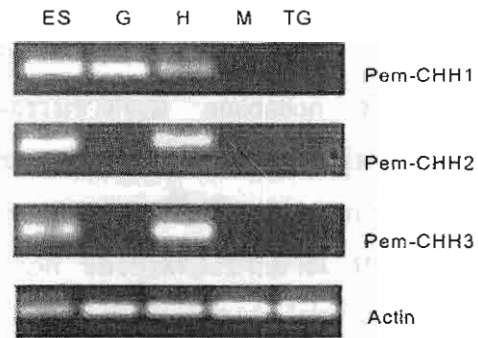
รูปที่ 20 ผลของ Pem-MIH ต่อ molt duration ของกิ้งก่าสีดำ

เปรียบเทียบระยะห่างระหว่างการลอกคราบ (molt duration) ของกิ้งก่าสีดำ (วัน) ในกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS, สารสกัดจากก้านตากิ้งก่าสีดำ 1 คู่ (eystalk) และ โปรตีน Pem-MIH ปริมาณ 5 ไมโครกรัม error bar แสดงในรูปของ SEM

8. การแสดงออกของ CHH และ MIH ในส่วนต่างๆของกิ้งก่าสีดำ

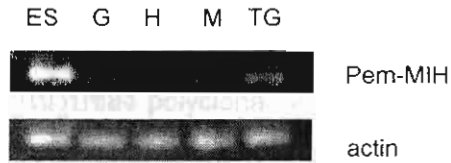
การทำ RT-PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ CHH และ MIH จากส่วนต่างๆของกิ้งก่าสีดำโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA ของฮอร์โมนแต่ละชนิด พบว่าการแสดงออกของ Pem-CHH1 ในก้านตา หัวใจ และเหงือก ในขณะที่ Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 แสดงออกใน

ก้านตาและหัวใจเท่านั้น (รูปที่ 21) ส่วน Pem-MIH สามารถตรวจพบ PCR product ได้ใน ก้านตา กล้ามเนื้อ (abdominal muscle) และ thoracic ganglia (รูปที่ 22)



รูปที่ 21 การแสดงออกของ Pem-CHH1-3 ในส่วนต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ

รูปแสดง RT-PCR product จาก RNA ที่ได้จาก ก้านตา (ES) เหงือก (G) หัวใจ (H) กล้ามเนื้อ (M) และ thoracic ganglia (TG) ของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ไพรเมอร์ CMG-F และ PM1 สำหรับการเพิ่มจำนวน cDNA ของ Pem-CHH1 และ Pem-CHH3 และไพรเมอร์ CMG-F และ CHH2-R สำหรับการเพิ่มจำนวน cDNA ของ Pem-CHH2 ในการทำปฏิกิริยา PCR รอบแรก จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR รอบที่สองโดยใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะต่อ Pem-CHH1 (α CMG และ CDR-2), Pem-CHH2 (CHH2-Ex และ CDR-2) และ Pem-CHH3 (CHH3-Ex และ CDR-2) ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ actin เป็นการเปรียบเทียบปริมาณของ RNA ที่ใช้เป็น template ในการทำ RT-PCR



รูปที่ 22 การแสดงออกของ Pem-MIH ในส่วนต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ

รูปแสดง RT-PCR product จาก RNA ที่ได้จาก ก้านตา (ES) เหงือก (G) หัวใจ (H) กล้ามเนื้อ (M) และ thoracic ganglia (TG) ของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ Pem-MIH (MIH-F MIH-R) ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ actin เป็นการเปรียบเทียบปริมาณของ RNA ที่ใช้เป็น template ในการทำ RT-PCR

บทวิจารณ์

โปรตีนที่สร้างจาก cDNA ของ crustacean hyperglycemic hormone (CHH) ของกุ้งกุลาดำ สามารถแสดงออกได้ในยีสต์ *P. pastoris* และสามารถหลั่งออกนอกเซลล์ของ *P. pastoris* ได้โดยใช้ secretion signal ของ α -factor ของ *S. cerevisiae* หลังจากผ่านการแยกบริสุทธิ์ แล้วนำโปรตีนมาทดสอบหน้าที่ทางชีววิทยา และพบว่าโปรตีนที่สร้างในยีสต์สามารถทำ

หน้าที่ได้ เช่นโปรตีน Pem-CHH สามารถเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูด้าได้ แสดงให้เห็นว่าระบบของการสร้างโปรตีนในยีสต์เป็นระบบที่มีความเหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนจากกิ้งกูด้า โดยโปรตีนที่ได้จากการแสดงออกมีการ folding ที่ถูกต้อง และอยู่ในรูปที่สามารถทำหน้าที่ได้ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ unfolding และ refolding เหมือนการแสดงออกของโปรตีนของกิ้ง ในระบบของ bacteria (Ohira et al., 1999)

ฮอร์โมน CHH ในธรรมชาติจะมี amidation ที่ปลาย C ซึ่งมีความสำคัญต่อความสามารถในการทำหน้าที่ของฮอร์โมน ในปี 2002 กลุ่มของ Katayama แสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสม MIH ของกิ้ง *P. japonicus* ที่ไม่มี amidation ที่ปลาย C มีความสามารถในการเพิ่มระดับกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งลดลงประมาณ 10 เท่าเมื่อเทียบกับโปรตีนลูกผสม MIH ที่มี amidation ที่ปลาย C นอกจากนี้ยังแสดงว่า โปรตีน MIH ที่สกัดจากกิ้ง *P. japonicus* ปริมาณ 100 พิโคโมล มีความสามารถในการเพิ่มระดับกลูโคสใน haemolymph ของกิ้ง เทียบเท่ากับโปรตีนในสารสกัดจากก้านตาของกิ้ง 1 คู่ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการฉีดกิ้งกูด้าด้วยโปรตีนลูกผสม Pem-CHH ปริมาณ 5 ไมโครกรัม (ประมาณ 60 พิโคโมล) ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลประมาณ 30% ของสารสกัดจากก้านตา 1 คู่ โดยโปรตีนลูกผสม Pem-CHH ทั้งสามชนิดได้จากการแสดงออกในยีสต์ซึ่งยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับ amidation มาก่อน ดังนั้นการที่ Pem-CHH1-3 มีความสามารถในการเพิ่มระดับกลูโคสต่ำกว่าโปรตีนในสารสกัดจากก้านตา อาจเป็นผลมาจากการที่ Pem-CHH ที่สร้างในยีสต์ไม่มี amidation ที่ปลาย C

Antibody ที่สร้างต่อ Pem-CHH1 มีความจำเพาะต่อ CHH เนื่องจาก antibody ไม่สามารถจับ growth hormone ของมนุษย์ และ MIH ของกิ้งกูด้าได้ อย่างไรก็ตาม antibody ที่สร้างได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Pem-CHH1, Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก antibody ที่สร้างอยู่ในรูปของ polyclonal antibody และ Pem-CHH ทั้งสามชนิดมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันประมาณ 93% ดังนั้นเมื่อ incubate สารสกัดจากก้านตาของกิ้งกับ antibody ก็จะทำให้ antibody สามารถจับกับ Pem-CHH ได้ทั้งสามชนิด และมีผลในการยับยั้งการทำหน้าที่ของ CHH โดยรวม

นอกจาก Pem-CHH1, 2 และ 3 แล้ว ยังมีรายงานถึงฮอร์โมนในกลุ่ม CHH ในกิ้งกูด้าอีก 5 ชนิด ได้แก่ pm-sgp1-5 (Davey et al., 2000) ฮอร์โมนในกลุ่มนี้จะมี ความคล้ายคลึงกับ Pem-CHH ทั้งสามชนิดเพียง 55% ทั้งนี้ยังไม่มี การทดสอบว่า anti-Pem-CHH1 antibody สามารถจับกับฮอร์โมนในกลุ่มของ pm-sgp ได้หรือไม่ อย่างไรก็ตามเนื่องจากฮอร์โมน Pem-CHH และ pm-sgp มีความคล้ายคลึงกันไม่มากนัก antibody ที่มีความจำเพาะต่อ Pem-CHH1 อาจจะไม่สามารถจับฮอร์โมนในกลุ่ม pm-sgp ได้ หรือจับได้ไม่ดี ทำให้ไม่มีผลต่อการทำงานของ pm-sgp ทั้งห้าชนิด ความสามารถในการเพิ่มระดับกลูโคสที่ตรวจวัดได้หลังจากฉีดกิ้งด้วยสารสกัดจากก้านตาที่ incubate กับ anti-Pem-CHH1 antibody มาก่อน จึงอาจเป็นผลมาจากการทำงานของฮอร์โมน pm-sgp ที่ไม่ถูกจับโดย antibody

การฉีด antibody เข้าไปในกุ้งกุลาดำสามารถยับยั้งการทำงานของ CHH ได้เพียง 10-20% นั้น อาจเป็นเพราะ antibody ที่จะไปจับกับฮอร์โมนที่เป็น target ได้ถูกเจือจางไปใน haemolymph เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ antibody ที่เจือจาง 1:500 และไม่ได้ทำการฉีดกุ้งด้วย antibody ในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อดูผลในการยับยั้งหน้าที่ของ CHH อย่างไรก็ตามได้มีการทดลองโดยฉีด antibody ที่สร้างต่อ CHH ของ *Nephrops norvegicus* (Norway lobster) ในความเจือจาง 1:20 เข้าไปใน lobster พบว่า antibody สามารถยับยั้งการทำงานของ CHH ได้โดยสมบูรณ์ (Giulianini et al., 2002) ดังนั้นการยับยั้งการทำหน้าที่ของ CHH จึงขึ้นกับปริมาณของ antibody ที่กุ้งได้รับ ถ้าหากใช้ anti-Pem-CHH1 antibody ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น เช่น 1:20 ก็อาจเห็นการยับยั้งหน้าที่ของ CHH ในกุ้งกุลาดำได้ดีขึ้น

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการโคลนชิ้น cDNA ที่สร้างฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบในกุ้งกุลาดำ (Pem-MIH) โดยฮอร์โมน MIH ของกุ้งกุลาดำมีความคล้ายคลึงกับ MIH ของ *P. japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis* และ *Metapenaeus ensis* ถึง 97, 95 และ 91% ตามลำดับ ขณะที่มีความคล้ายคลึงกับ MIH ในกลุ่มของปูเพียง 45% (รูปที่ 17) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของ MIH และลำดับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โปรตีนลูกผสม Pem-MIH สามารถสร้างให้อยู่ในรูปที่หลั่งออกนอกเซลล์ของยีสต์ได้เช่นเดียวกับ Pem-CHH และการทดสอบการทำหน้าที่ของโปรตีนลูกผสมดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยืดระยะเวลาระหว่างการลอกคราบ (molt duration) ของกุ้งกุลาดำได้ ดังนั้นโปรตีนลูกผสม Pem-MIH ที่สร้างจาก *P. pastoris* จึงอยู่ในรูปที่มี folding ที่ถูกต้องและทำหน้าที่ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนของการทำ unfolding และ refolding

การทำหน้าที่ของ MIH ในการยืดระยะของ molt duration นั้น ฮอร์โมน MIH จะไปยับยั้งการสร้างและการหลั่งของ ecdysone (ฮอร์โมนที่กระตุ้นการลอกคราบ) จาก Y-organ กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดสอบหน้าที่ของ Pem-MIH มี molt duration ประมาณ 12 วัน ในการทดสอบความสามารถในการยืดระยะเวลาของ molt duration ได้เลือกทำการฉีด Pem-MIH เข้าไปในกุ้งหลังจากที่กุ้งลอกคราบครั้งแรกเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งเป็นระยะที่กุ้งอยู่ในช่วง intermolt คือประมาณวันที่ 2-5 หลังการลอกคราบของกุ้งที่มี molt duration ประมาณ 12 วัน โดยเทียบจากข้อมูลของ molt interval ของกุ้ง *Natantia* (รวมถึงกุ้งกุลาดำ) (Drach, 1985) โดยในระยะนี้เป็นช่วงก่อนหน้าที่จะมีการหลั่ง ecdysone ออกมาจาก Y-organ โปรตีน MIH ที่ฉีดเข้าไปในช่วงนี้จะไปชะลอการหลั่ง ecdysone ทำให้กุ้งมีระยะเวลาระหว่างการลอกคราบนานขึ้น

การศึกษาการแสดงออกของ CHH โดยวิธี RT-PCR นั้นได้ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RT-PCR product ที่ได้ พบว่า CHH ที่แสดงออกใน ก้านดา หัวใจ และเหงือก มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน มีรายงานถึงการโคลน cDNA ที่สร้าง CHH จาก pericardial organ (PO) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ประสาทบริเวณหัวใจ ใน *C. maenas* (Dirksen et al., 2001) แต่ CHH ที่สร้างจาก PO ไม่มีความสามารถในการเพิ่มระดับกลูโคส ส่วน CHH ที่แสดงออกในเหงือกนั้นไม่เคยมีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม CHH สามารถทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ osmoregulation

ได้ (Charmantier-Daures et al., 1994 and Serrano, et al., 2003) ซึ่ง CHH ที่สร้างจากเหงือกอาจเป็น candidate ที่ดีสำหรับหน้าที่ดังกล่าว การที่จะทราบว่า CHH ที่สร้างจากแหล่งอื่นนอกจากก้านตาทำหน้าที่ควบคุมระดับกลูโคสหรือไม่ จะต้องทำการโคลน cDNA ของ CHH จากแหล่งดังกล่าว และศึกษาคุณสมบัติการทำหน้าที่ของโปรตีนที่แสดงออกจาก cDNA เหล่านี้

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของ MIH โดยวิธี RT-PCR นั้น พบว่า MIH ที่แสดงออกใน thoracic ganglia มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ MIH จากก้านตา ส่วน product ที่ได้จากกล้ามเนื้อนั้นมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ไม่ตรงกับ MIH ซึ่งน่าจะเป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่จำเพาะในการทำปฏิกิริยา PCR การแสดงออกของ MIH ใน thoracic ganglia นั้นมีรายงานใน *C. magister* มาก่อน (Umphrey et al., 1998) อย่างไรก็ตามถ้าต้องการทราบว่า MIH ที่สร้างจาก thoracic ganglia เกี่ยวข้องกับการลอกคราบหรือไม่ ก็จะต้องทำการศึกษาต่อไป นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าการควบคุมการแสดงออกของ CHH และ MIH จากแหล่งต่างๆ เพื่อดูว่าฮอร์โมนที่สร้างจากแต่ละแหล่ง มีการควบคุมการแสดงออกต่างกันอย่างไร จะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการทำงานของฮอร์โมนในกลุ่มนี้

CHH และ MIH เป็นฮอร์โมนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า CHH มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการวางไข่ของครัสเตเชียนอีกด้วย (Khayat et al., 1998) ดังนั้น การศึกษาฮอร์โมน CHH และ MIH ในกุ้งกุลาดำจึงให้ข้อมูลที่มีประโยชน์ ทำให้ทราบถึงลักษณะของฮอร์โมนเหล่านี้ในกุ้งกุลาดำ ฮอร์โมนที่ได้จากการแสดงออกของ cDNA ที่สร้าง CHH และ MIH ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของฮอร์โมนในกลุ่มนี้เพื่อให้เข้าใจถึงการทำงาน และเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศ ข้อมูลเบื้องต้นในการยับยั้งการทำงานของ CHH โดยใช้ antibody จากงานวิจัยนี้ อาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงการวางไข่ของกุ้งเพื่อทดแทนการเร่งการวางไข่โดยวิธีตัดก้านตาของแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งในอนาคต

หนังสืออ้างอิง

- Briand, L., Perez, V., Huet, J.C., Danty, E., Masson, C., Pernollet, J.C. 1999. Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 15, 362-369.
- Chang, E.S., Prestwich, G.D., Bruce, M.J. 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 14, 818-826.
- Chang, E.S., 1997. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M-F. (Eds), *Endocrinology and reproduction, Recent advances in marine biotechnology*, vol.1, Science Publishers Inc., New Hampshire, USA, pp.163-178.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Van Herp, F., 1997. Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M-F. (Eds), *Endocrinology and reproduction, Recent advances in marine biotechnology*, vol.1, Science Publishers Inc., New Hampshire, USA, pp.109-161.
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Jansen, K.P.C., Aiken, D.E., Van Herp, F., 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster, *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94, 281-293.
- Chooluck, S., Wongsombat, T., Udomkit, A., Sonthayanon, B., Panyim, S. 2000. Expression of Pem-CMG1, an eyestalk neuropeptide of *Penaeus monodon* in *Escherichia coli*. *Proceedings of the 2nd National Symposium on Marine Shrimp*, Phuket, Thailand. pp. 56-62.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology.* 11, 905-910
- Davey, M.L., Hall, M.R., Willis, R.H., Oliver, R.W., Thurn, M.J., Wilson, K.J., 2000. Five crustacean hyperglycemic family hormones of *Penaeus monodon*: complementary DNA sequence and identification in single sinus glands by electrospray ionization-fourier transform mass spectroscopy. *Mar. Biotechnol.* 2, 80-91.

- De Kleijn, D.P.V., Coenen, T., Laverdure, A.M., Tensen, C.P., Van Herp F. 1992. Localization of messenger RNAs encoding crustacean hyperglycemic hormone and gonad inhibiting hormone in the X-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus americanus*. *Neuroscience* 51, 121-128.
- Drach, P. 1985. Determination of stages of the intermolt cycle. In: Bliss, D.E. (Ed), *The biology of crustacean*, vol 9, Academic Press Inc., USA, pp. 16-22.
- Dirksen, H., Bocking, D., Heyn, U., Mandel, C., Chung, J.S., Baggerman, G., 2001. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem. J.* 356, 159-170.
- Giulianini, P.G., Pandolfelli, N., Lorenzon, S., Ferrero, E., Edomi, P., 2002. An antibody to recombinant crustacean hyperglycemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan Crustacea. *Cell Tissue Res.* 307, 243-254.
- Johnston, J. 1988. Yeast genetics, molecular aspect. In: Campbell, I., Duffus, J.H. (Eds), *Yeast: A practical approach*, IRL Press, Washington DC, USA, pp. 107-123.
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K., Nagasawa, H., 2002. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptide*. 23, 1537-1546.
- Keller, R., 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48, 439-448.
- Khayat, M., Yang, W-J., Aida, K., Nakasawa, H., Tiezt, A., Funkenstein, B., Lubzens, E., 1998. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in in vitro incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 307-318.
- Ohira, T., Nishimura, T., Sonobe, H., Okuno, A., Watanabe, T., Nagasawa, H., Kawazoe, I., Aida, K. 1999. Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1576-1581.
- Raemaekers, R.J., de Muro, L., Gatehouse, J.A., Fordham-Skelton, A.P. 1999. Functional *Phytohemagglutinin (PHA)* and *Galanthus nivalis agglutinin (GNA)* expressed in the PHA-E signal peptide. *Eur. J. Biochem.* 265, 394-403.

- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyeux, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Spanings-Pierrot, C., 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. J. Exp. Biol. 206, 979-988.
- Udomkit, A., Chooluck, S., Sonthayanon, B., Panyim, S., 2000. Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 244, 145-156.
- Udomkit A., Treerattrakool S., Panyim S. Crustacean hyperglycemic hormone of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (in press).
- Umphrey, H. R., Lee, K.J., Watson, R.D., Spaziani E. 1998. Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer magister*. Mol. Cell. Endocrinol. 136, 145-149.
- Webster, S.G. 1991. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 22, 247-252.

Output จากโครงการวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Treerattrakool, S., Eurwilaichitr, L., **Udomkit, A.**, Panyim, S. 2002. Secretion of Pem-CMG, a peptide in the CHH/MIH/GIH family of *Penaeus monodon*, in *Pichia pastoris* is directed by secretion signal of the α -mating factor from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biochem. Mol. Biol. 35, 476-481.
2. Treerattrakool, S., **Udomkit, A.**, Eurwilaichitr, L., Sonthayanon, B., Panyim S. 2003. Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*. Mar. Biotechnol. 5, 373-379.
3. **Udomkit, A.**, Treerattrakool, S., Panyim, S., Crustacean hyperglycemic hormone of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormone and their expression in various shrimp tissues. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (in press).

ผลงานวิจัยที่กำลังเตรียม manuscript เพื่อส่งพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. **Udomkit A.**, Treerattrakool S. and Panyim S. Anti-CHH antibody causes impaired hyperglycemia in *Penaeus monodon*.
2. Yodmuang S., **Udomkit A.**, Treerattrakool S. and Panyim S. Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*.

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Treerattrakool S., **Udomkit A.**, Eurwilaichitr L., Sonthayanon B. and Panyim S. Expression of growth-related peptide, Pem-CMG, of *Penaeus monodon* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Proceedings of the 3rd National Symposium on Marine Shrimp, November 8-9, 2001. Queen Sirikit Convention Center, Bangkok, Thailand.
2. Yodmuang, S., **Udomkit, A.**, Sonthayanon, B. and Panyim, S. Molecular cloning and expression of a putative molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. Proceedings of the 4th National Symposium on Marine Shrimp, November 18-19, 2002. Rayong Resort, Rayong, Thailand.
3. Treerattrakool, S., **Udomkit, A.** and Panyim, S. The inhibitory effect of anti-rPem-CHH1 antibody on the activity of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in

Penaeus monodon. The 29th Congress on Science and Technology of Thailand, October 20-23, 2003. Golden Jubilee Convention Hall, Khon Kean University. Khon Kean, Thailand.

4. Yodmuang, S., **Udomkit, A.** and Panyim, S. Molecular characterization and biological assay of a putative molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. The 29th Congress on Science and Technology of Thailand, October 20-23, 2003. Golden Jubilee Convention Hall, Khon Kean University. Khon Kean, Thailand.

ภาคผนวก

Reprint

1. Treerattrakool, S., Eurwilaichitr, L., Udomkit, A., Panyim, S. 2002. Secretion of Pem-CMG, a peptide in the CHH/MIH/GIH family of *Penaeus monodon*, in *Pichia pastoris* is directed by secretion signal of the α -mating factor from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biochem. Mol. Biol. 35, 476-481.
2. Treerattrakool, S., Udomkit, A., Eurwilaichitr, L., Sonthayanon, B., Panyim S. 2003. Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*. Mar. Biotechnol. 5, 373-379.

Article in press

1. Udomkit, A., Treerattrakool, S., Panyim, S., Crustacean hyperglycemic hormone of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormone and their expression in various shrimp tissues. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (Uncorrected proof)

Proceedings

1. Treerattrakool S., Udomkit A., Eurwilaichitr L., Sonthayanon B. and Panyim S.. Expression of growth-related peptide, Pem-CMG, of *Penaeus monodon* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Proceedings of the 3rd National Symposium on Marine Shrimp, November 8-9, 2001. Queen Sirikit Convention Center, Bangkok, Thailand.
2. Yodmuang, S., Udomkit, A., Sonthayanon, B. and Panyim, S. Molecular cloning and expression of a putative molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. Proceedings of the 4th National Symposium on Marine Shrimp, November 18-19, 2002. Rayong Resort, Rayong, Thailand.

Abstract และ Poster

1. Yodmuang, S., Udomkit, A. and Panyim, S. Molecular characterization and biological assay of a putative molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. The 29th Congress on Science and Technology of Thailand, October 20-23, 2003. Golden Jubilee Convention Hall, Khon Kean University. Khon Kean, Thailand.
2. Treerattrakool, S., Udomkit, A. and Panyim, S. The inhibitory effect of anti-rPem-CHH1 antibody on the activity of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in *Penaeus monodon*. The 29th Congress on Science and Technology of Thailand, October 20-23, 2003. Golden Jubilee Convention Hall, Khon Kean University. Khon Kean, Thailand.

Secretion of Pem-CMG, a Peptide in the CHH/MIH/GIH Family of *Penaeus monodon*, in *Pichia pastoris* Is Directed by Secretion Signal of the α -Mating Factor from *Saccharomyces cerevisiae*

Supattra Treerattrakool¹, Lily Eurwilaichitr^{1,*}, Apinunt Udomkit¹ and Sakol Panyim¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

¹BIOTEC Training Center of Genetic Engineering and Biotechnology at Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Received 10 June 2002, Accepted 5 August 2002

The CHH/MIH/GIH peptide family of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) is important in shrimp reproduction and growth enhancement. In this study, the cDNA that encodes the complete peptide that is related to the CHH/MIH/GIH family (so-called, Pem-CMG) in the eyestalk of *P. monodon* was successfully expressed in a methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under the control of an alcohol oxidase promoter. In order to obtain the secreted Pem-CMG, a secretion signal of either the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor or Pem-CMG was employed. The results demonstrated that α Pem-CMG, either with (α 2EACMG) or without (α CMG) the Glu-Ala repeats, was secreted into the medium, while Pem-CMG with its own secretion signal failed to be secreted. The total protein amount that was secreted from the transformant that contained either α 2EACMG or α CMG was approximately 60 mg/l and 150 mg/l, respectively. The N-terminus of the Pem-CMG peptide of both α 2EACMG and α CMG was correctly processed. This produced the mature Pem-CMG peptide.

Keywords: Glu-Ala repeats, α -Mating factor, *Penaeus monodon*, *Pichia pastoris*

Introduction

In recent years, novel peptides of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH), and gonad-inhibiting hormone (GIH) or CHH/MIH/GIH family were demonstrated to play important roles in controlling some physiological processes in several species in

crustacean, such as growth regulation and reproduction. These peptides were produced in a minute amount in the X-organ sinus gland (XOSG) complex that is located in the optic ganglia in the eyestalk of crustacean (De Kleijn and Van Herp, 1995; Charmantiner *et al.*, 1997). Thus, it would be labor-intensive to obtain sufficient peptides for purification. Recombinant technology was, therefore, employed to provide the hormone in a larger quantity for further investigation. In our previous study, cDNA from the eyestalk of the black tiger prawn or *Penaeus monodon* that related to the CHH/MIH/GIH family (so-called Pem-CMG) was cloned (Udomkit *et al.*, 2000) and expressed in *E. coli*. However, the protein product from this system was aggregated in an insoluble form. In order to avoid the problem that is associated with solubilization and renaturation that are needed to produce biologically active Pem-CMG, the Pem-CMG was instead expressed in an eukaryotic expression system.

The eukaryotic protein expression system is likely to be in its native form since the system provides the necessary processes, such as secretion and post-translational modifications (Gellissen, 2000). *Pichia pastoris* is one of the eukaryotic expression hosts that is capable of secretion of heterologous products using the α -mating factor (α -MF), the secretion signal from *Saccharomyces cerevisiae*. This signal is subsequently cleaved by an endogenous KEX2 protease. To facilitate the removal of the α -MF signal, the Glu-Ala repeats should be added immediately downstream of the Lys-Arg cleavage site (Clare *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1992; Cregg *et al.*, 1993; Van Nostrand *et al.*, 1994; Raemaekers *et al.*, 1999). However, various studies demonstrated that the Glu-Ala repeats were not efficiently removed, which resulted in an extra amino acid residue extension in some of the recombinant protein (Vedvick *et al.*, 1991; Briand *et al.*, 1999; Goda *et al.*, 2000). It was also suggested by several studies that the heterologous signal sequence can be successfully used to direct the secretion of its own protein in *P. pastoris*

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 66-2-4419003; Fax: 66-2-4419906

E-mail: lily@bioitec.or.th

(Tschopp *et al.*, 1987; Ferrari *et al.*, 1997; Morel and Massculie, 1997). It is, therefore, of interest to see if the secretion of the Pem-CMG peptide can be achieved using its own secretion signal or the signal of α -MF, and also to determine if the Glu-Ala repeats are necessary for the cleavage of the α -MF secretion signal.

This study, therefore, involves the construction and expression of plasmids that contain either α 2EACMG, α CMG or Pem-CMG with its own signal in *P. pastoris*. SDS-PAGE and N-terminal peptide sequencing analyzed secreted proteins that are produced from each transformant type.

Materials and Methods

Construction of *P. pastoris* expression vectors containing Pem-CMG cDNA The Pem-CMG cDNA with a different type of signal sequence was amplified using primers (Table 1). The template was from the recombinant plasmid clone Pem-CMG EX2.1 (Chooluck, 1999).

Plasmid p α CMG (α -MF + Pem-CMG) was constructed by cloning the PCR fragment of mature Pem-CMG that was directly fused to the α -MF signal without Glu-Ala into the pPICZ α A expression vector between the *Xho*I and *Xba*I sites.

The PCR product that harbors the mature Pem-CMG that is fused to the α -MF secretion signal with the double Glu-Ala repeats was cloned into the pPICZ α A expression vector between the *Xho*I and *Xba*I sites. This produced p α 2EACMG (α -MF + 2EA + Pem-CMG).

Plasmid pBCMG (Pem-CMG, including the native secretion signal) was constructed by ligating the PCR fragment of the entire Pem-CMG coding sequence with the pPICZB expression vector between the *Eco*RI and *Xba*I sites.

Automated DNA sequencing The nucleotide sequences were determined using an automated DNA sequencer (ABI PRISM™) that is based on the fluorescent-labeled terminator method (ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Smith *et al.*, 1986).

The PCR reaction was performed in a total volume of 20 μ l using 4 μ l of terminator premix (A-, T-, C- and G- dye terminator, dATP, dCTP, dTTP, dTTP, Tris-HCl, pH 9.0, MgCl₂, Amplitaq DNA polymerase), 300 ng of the plasmid template, and 10 pmol of the 5' AOX1 and 3' AOX1 primers. The amplification was carried out in

an automated thermal cycler GeneAmp PCR system model 2400 (Perkin Elmer Cetus, USA) with the following conditions: denaturing temperature at 96°C for 10 s, annealing temperature at 50°C for 5 s, and extension temperature at 60°C 4 min for 25 cycles. The dye-labeled PCR product was analyzed on the ABI PRISM Model 377 DNA sequencer. All of the constructs were sequenced twice in both directions.

Transformation of *P. pastoris* Yeast transformation was rendered using the electroporation method, as described in the manual (version F) of the *Pichia* expression kit (Invitrogen). The plasmids (p α CMG, p α 2EACMG, pBCMG) were linearized with *Pme*I and used for the transformation of the *P. pastoris* strain KM71 with the following condition: 1.5 kV, 25 μ F and 200 Ω . After addition with 1 M sorbitol, the cells were incubated at 30°C without shaking for 1 h, then YEPD (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) was added, and the incubation was continued with shaking at 30°C for 2 h. An amount of 200 μ l of yeast cells was spread on a YEPD plate that contained 100 μ g/ml Zeocin™, and incubated for 2-3 days until colonies formed. The transformants were screened for integration by PCR amplification using 5' AOX1 and 3' AOX1 primers.

Expression and optimization of Pem-CMG A single colony (showing the highest expression level from each construct) was grown in YEPD and incubated at 30°C with shaking at 250 rpm for 48 h. The cell culture was transferred into 100 ml of a fresh BMGY medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 0.67% (w/v) YNB, 4 μ g/ml D-biotin, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, and 1% (v/v) glycerol]. It was grown in the same condition until the OD₆₀₀ reached 5-6. The inoculum was then concentrated 5 times by transferring the cell pellet into 20 ml of a BMMY medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 0.67% (w/v) YNB, 4 μ g/ml D-biotin, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0 and various concentrations (0, 0.5, 1, 2, 3 and 4% (v/v)) of methanol]. One ml aliquot of the expression culture was collected at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days for a further analysis of the Pem-CMG expression.

SDS PAGE analysis The samples were mixed with a 5x loading-sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol, and 0.1% (w/v) Bromphenol Blue) and heated in boiling water for 10 min before loading onto Tricine-SDS/PAGE (16.5%). The bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250.

Table 1. Primers used in this study.

Expected PCR fragment	5' primer	3' primer
1. Mature Pem-CMG fused directly to the signal of α MF without Glu-Ala	5' ATGAATTCGTCGACAAAAGAAG CCTATCCTTCAGGTC 3'	5' GCTCTAGACTACTTGCCGAGCCTC TG 3'
2. Pem-CMG fused to the α -MF secretion signal with the double Glu-Ala repeats	5' ATGAATTCGTCGACAAAAGAGAG GCTGAAGCTAGCCTATCCTTCAGGTC 3'	Same as 1.
3. The entire coding sequence of Pem-CMG including the native secretion signal	5' GACTGGTTCAATTGACAAGC 3'	Same as 1.

Dot blot analysis Both the secreted and intracellular fractions were analyzed by a dot-blotting assay. The secreted product was concentrated by TCA precipitation (Bollag *et al.*, 1996); whereas, the cell from the intracellular fraction of 0.2 OD₆₀₀ was mixed with the 5x loading sample buffer without Bromphenol blue. The protein samples were applied to a nitrocellulose membrane. Immunodetection was carried out by using a mouse anti-CMG antibody (provided by Dr. Paisan Sitigorngul, Srinakharinwirot University, Thailand) at a dilution of 1 : 5,000, and an anti-mouse IgG that was conjugated with a horseradish peroxidase-link whole antibody from a donkey. The signal was detected using Enhanced Chemiluminescence (ECL) reagents (Amersham).

N-terminal peptide sequencing N-terminal sequencing was performed using protein bands that were blotted onto a sequiblot™PVDF membrane (BIO-RAD) after separation by tricine-SDS/PAGE. The protein bands of interest were excised from the membrane and further analyzed using an ABI 492 (Applied Biosystems) automated protein sequencer.

Results and Discussion

Construction of the *P. pastoris* expression vector containing Pem-CMG To determine if the Pem-CMG can be expressed and secreted by either the α -factor (with or without Glu-Ala) or its own native signal, three different constructs (p α CMG, p α 2EACMG, and pBCMG) were constructed. The PCR fragment of α CMG or α 2EACMG was inserted between the *Xho*I and *Xba*I sites at the downstream of the methanol inducible alcohol oxidase (AOX1) promoter of pPICZ α A (Fig. 1). This produced p α CMG or p α 2EACMG. For pBCMG, the entire coding sequence of Pem-CMG cDNA (including the native secretion signal and mature Pem-CMG), was inserted between the *Eco*RI and *Xba*I sites of pPICZB (Fig. 1). The nucleotide sequences of the inserted fragments were analyzed in both directions. The result revealed that no mutation was detected in the sequences of the α CMG, α 2EACMG and BCMG fragments. For α CMG and α 2EACMG, the fragments were also inserted in-frame with the α -factor signal sequence of *S. cerevisiae*.

All three of the constructs were linearized with *Pme*I, which is a unique restriction site within the 5' AOX1 region. The *P. pastoris* transformants were then screened for Zeocin™-resistance using a rich medium (YEPD) that contained 100 μ g/ml Zeocin™. Twenty transformants of each construct were chosen for further expression.

Pem-CMG was successfully expressed and secreted by the α -factor secretion signal of *S. cerevisiae* The *P. pastoris* transformants that produced the highest level of secreted Pem-CMG were chosen for further optimization. Two factors (methanol concentration and period of induction) that affect the production yield were investigated. The results (Figs. 2 A and B) suggested that the optimal condition for the expression of the α CMG transformant was induced with 3% methanol

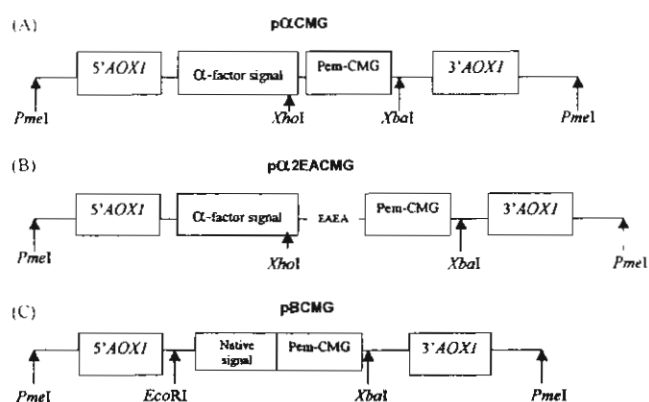


Fig. 1. Construction of the *Pichia* expression vector for secreted Pem-CMG. The linearized plasmids are consisted of the 5'AOX1 promoter, Pem-CMG cDNA and the 3'AOX1 sequence. (a) The cDNA encoding mature Pem-CMG peptide was cloned into the pPICZ α A expression vector at *Xho*I and *Xba*I sites in-frame with the α -factor secretion signal without the spacer peptide Glu-Ala repeats. (b) The mature Pem-CMG cDNA was cloned into pPICZ α A expression vector at *Xho*I and *Xba*I sites in-frame with the α -factor secretion signal with the spacer peptide Glu-Ala repeats. (c) The entire coding sequence of Pem-CMG cDNA that consists of its own native secretion signal and the mature of Pem-CMG cDNA was cloned into the pPICZB expression vector between *Eco*RI and *Xba*I sites.

for 3 days. For the α 2EACMG transformant, the results (Fig. 3A and B) showed that the optimal condition for CMG production was to induce with 4% methanol for 3 days. The secreted level of CMG from the α CMG transformant was approximately 150 mg/l, while that of the α 2EACMG transformants was approximately 60 mg/l (Table 2). N-terminal peptide sequences of recombinant Pem-CMG that was secreted from either α CMG or α 2EACMG were analyzed. The result revealed that the first five amino acid residues of the secreted Pem-CMG from both constructs were Ser-Lys-Ser-Phy-Arg, which was identical to that of the mature Pem-CMG. This indicated that the MF α -1 secretion signal was completely cleaved by the KEX2 protease at the Lys-Arg sites, and that the Glu-Ala repeats of the α 2EACMG construct were also completely removed by the Ste13 aminopeptidase.

Processing of the α -factor prepro-sequence in *S. cerevisiae* involved several distinct proteolytic cleavage steps. These are achieved by different enzymes. Further processing of the pro-sequence then involved the action of an endopeptidase that is encoded by the KEX2 gene, which cleaves C-terminally to a specific Lys-Arg sequence. A dipeptidyl aminopeptidase that is encoded by the STE13 gene removes N-terminal Glu-Ala repeats in the Golgi apparatus (Brake, 1981; Raemaekers *et al.*, 1999; Cereghino and Cregg, 2000). Although the presence of the Glu-Ala repeats enhances the activity of the Kex2 protease, subsequent processing of these repeats by the Ste13 aminopeptidase is inefficient in many cases (Brake,

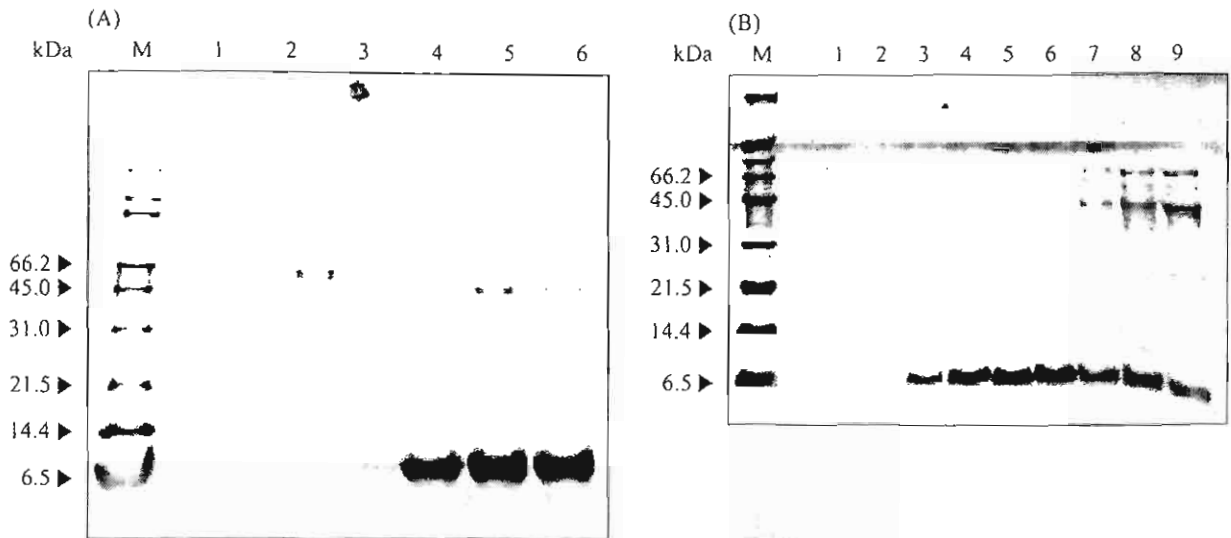


Fig. 2. Tricine-SDS analysis of the optimal expression condition from the α CMG *P. pastoris* transformant. (A) Determination of the optimal concentration of methanol. *P. pastoris* clone α CMG was induced in BM supplementing with 0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 % (v/v) of methanol. A total volume of 100 μ l of culture supernatant was collected at 4 days after induction, precipitated with TCA, and then loaded into each lane (Lanes 1-6), respectively. Lane M represents SDS-PAGE molecular weight standards, broad range protein marker (Bio-Rad, USA). (B) Determination of the optimal period of induction. α CMG was grown in BMGY and was induced in BM containing 3% (v/v) of methanol to induce the expression. A total volume of 100 μ l of culture supernatant was collected at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days, precipitated with TCA, and then loaded into each lane (Lanes 2-9), respectively. Lane 1 represents 100 μ l of culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing pPICZ α A vector precipitated with TCA.

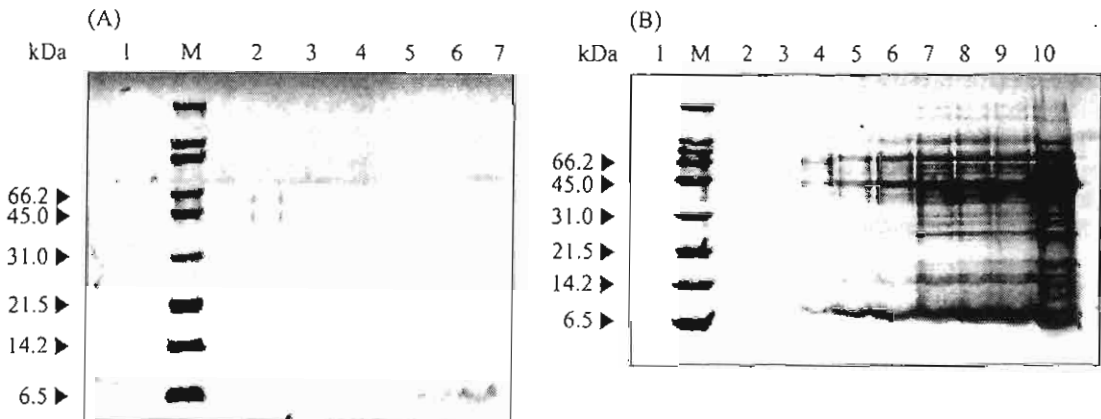


Fig. 3. Tricine-SDS analysis of the optimal expression condition from the α 2EACMG *P. pastoris* transformant. (A) Determination of the optimal concentration of methanol. *P. pastoris* clone α 2EACMG was grown in BMGY and was then induced in BM supplemented with 0, 0.5, 1, 2, 3 and 4% (v/v) of methanol. A total volume of 100 μ l of culture supernatant was collected at 3 days after induction, precipitated with TCA, and then loaded into each lane (Lanes 2-7), respectively. Lane M represents SDS-PAGE molecular weight standards, broad range protein marker (Bio-Rad, USA). Lane 1 represents 10 μ l of culture supernatant of α CMG *P. pastoris* transformant collected after induction with 3% (v/v) of methanol for 3 days. (B) Determination of the optimal period of induction. *P. pastoris* clone α 2EACMG was grown in BMGY and was then induced in BM containing 4% (v/v) of methanol. A total volume of 100 μ l of culture supernatant was collected at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days, and was precipitated with TCA, and then loaded into each lane (Lanes 3-10), respectively. Lane 2 represents 100 μ l of culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing pPICZ α A vector precipitated with TCA.

1981; Briand *et al.*, 1999; Raemaekers *et al.*, 1999). The efficiency of both the Kex2 and Ste13 proteins can be influenced by the close proximity of the proline residues. In addition, the tertiary structure that is formed by a foreign protein may protect the cleavage site from its respective

protease (Cereghino and Cregg, 2000). The complete processing of the α -factor prepro-sequence, either with (α 2EACMG) or without (α CMG) Glu-Ala repeats, indicated that the cleavage between the α -factor signal sequence and Pem-CMG at the KEX2 site did not necessarily require the

Table 2. Optimal condition for expression and yield of secreted CMG from *P. pastoris* transformants containing either α CMG, α 2EACMG or BCMG

Constructs	Expressed product	Optimal period of induction (days)	% (v/v) of methanol used for induction	Total protein secretion (mg/l)
α CMG	Secretion	3	3	150
α 2EACMG	Secretion	4	4	60
BCMG	Intracellular	4	3	-

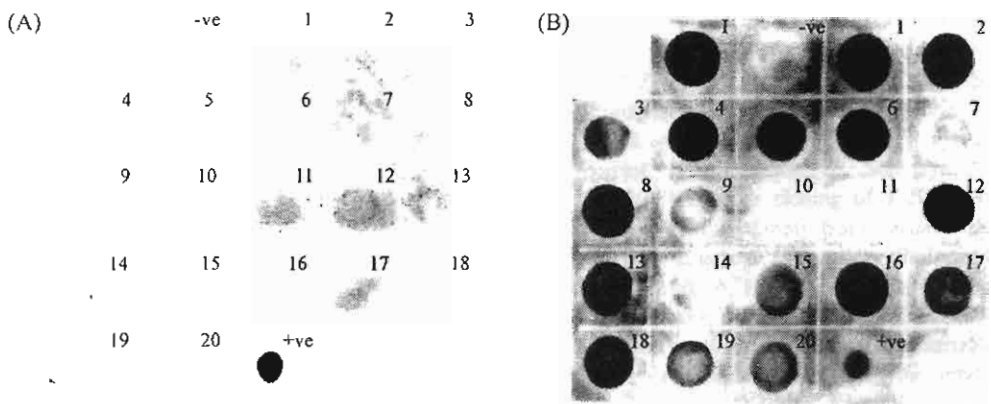


Fig. 4. Immuno-dot blotting analysis of the *P. pastoris* recombinant clones containing BCMG. Twenty BCMG *P. pastoris* transformants were grown in BMGY and were then induced in BM containing 3% (v/v) of methanol for 4 days. (A) dot blot analysis of 50 μ l of culture supernatant of clones no.1-20, and -ve represents 10 μ l of the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing pPICZB vector. (B) dot blot analysis of the intracellular fraction of 0.2 unit OD₆₀₀ from each transformant (no. 1-20, respectively), I represents the intracellular fraction of 0.2 unit OD₆₀₀ of α CMG *P. pastoris* transformant and -ve represents the intracellular fraction of 0.2 unit OD₆₀₀ of *P. pastoris* transformant containing pPICZB vector. +ve in A and B represents 10 μ l of the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing α CMG collected at 4 days after induction.

Glu-Ala repeats. In addition, the amount of the total secreted protein from the α CMG *P. pastoris* transformant was approximately twice as high as that from α 2EACMG. This still needs to be investigated in order to see if the difference in the CMG expression level between the two types of transformants is due to the difference in the level of the total protein expression, or if the difference is in the efficiency to secrete the product into the culture medium.

Pem-CMG cannot be secreted by its own signal peptide in *P. pastoris* Both the secreted and intracellular fractions from all twenty clones of BCMG were determined by a dot-blotting analysis with an anti-CMG antibody. The results (Fig. 4A and B) showed that for some clones the intracellular fraction produced a positive signal; whereas, no signal was detected from the culture supernatant from any of the other clones. This indicates that Pem-CMG was successfully expressed from the BCMG transformants, but it failed to be secreted into the culture medium by its own native signal. This may be because the prepro-sequence of Pem-CMG was not recognized and processed in the yeast secretory pathway, unlike the afactor secretion signal from *S. cerevisiae*.

Although the Pem-CMG yield from the *P. pastoris*

expression system may not be higher than that from the *E.coli* system (Chooluck, 1999), the product is in the soluble form and is presented as the major protein in the secreted fraction, which facilitates further protein purification. This Pem-CMG that is produced from the *P. pastoris* system is biologically active and has demonstrated hyperglycemic activity in *Penaeus monodon* (Treeratrakool, 2001).

Acknowledgments We thank Associate Professor Paisarn Sitigorngul (Srinakharinwirot University, Thailand) for providing the anti CMG-antibody. The Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology and the Thailand Research Fund (TRF) financially supported this study. The Graduated Fellowship Program, NSTDA, funded ST. SP is the TRF Senior Research Scholar.

References

Bollag, D. M., Rozycki, M. D. and Edelistein, S. J. (1996) *Concentrating Protein Solutions: Protein Methods*, Wiley-Liss, New York.
Brake, A. (1981) Secretion of heterologous protein directed by the yeast α -factor leader; in *Yeast Genetic Engineering*, Barr P. J.,

- Brake, A. J. and Valenzuela, P. (eds.), pp. 269-280, Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts.
- Briand, L., Perez, V., Huet, J. C., Danty, E., Masson, C. and Pernollet, J. C. (1999) Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **15**, 362-369.
- Cereghino, J. and Cregg, J. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45-66.
- Chooluck, S. (1999) Cloning and expression of a cDNA encoding growth-related peptide hormone of *Penaeus monodon* in *Escherichia coli* [M.Sc. Thesis in Molecular Genetics-Genetic Engineering] Mahidol University, Thailand.
- Clare, J. J., Ronmanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A. and Payne, M. M. (1991) Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **165**, 205-212.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. and Van Herp, F. (1997). Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans, in *Endocrinology and Reproduction, Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1; Fingerman, M., Nagabhushanam, R. and Thomposon, M.-F (eds.), pp. 109-161, Science Publishers Inc, New Hampshire.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S. and Raschke, W. C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology* **11**, 905-910.
- De Kleijn, D. P. V. and Van Herp, F. (1995) Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalks of crustacean. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 573-579.
- Ferrari, E., Lodi, T., Sorbi, R. T., Tirindelli, R., Cavaggioni, A. and Spisni, A. (1997) Expression of a lipocalin in *Pichia pastoris*: secretion, purification and binding activity of a recombinant mouse major urinary protein. *FEBS Lett.* **401**, 73-77.
- Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 741-750.
- Goda, S., Takano, K., Yamagata, Y. and Yutani, K. (2000) Effect of extra N-terminal residues on the stability and folding of human lysozyme expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* **13**, 299-307.
- Morel, N. and Massculie, J. (1997) Expression and processing of vertebrate acetylcholinesterase in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. J.* **328**, 121-129.
- Raemaekers, R. J. M., de Muro, L., Gatehouse, J. A. and Fordham-Skelton, A. P. (1999) Functional Phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in the PHA-E signal peptide. *Eur. J. Biochem.* **15**, 362-369.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes P., Doaa, C., Conneli, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H. and Hood, L. E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Treeratrakool, S. (2001) Expression of Pem-CMG of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris* and analysis of its biological activity [M.Sc. Thesis in Molecular Genetics-Genetic Engineering] Mahidol University, Thailand.
- Tschopp, J. F., Svelow, G., Kosson, R., Craik, W. and Grinna, L. (1987) High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *BioTechnology* **5**, 1305-1308.
- Udomkit, A., Chooluck, S., Sonthayanon, B. and Panyim, S. (2000) Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **224**, 145-156.
- Van Nostrand, W. E., Schmaier, A. H., Neiditch, B. R., Siegel, R. S., Raschke, W. C., Sisodia, S. S. and Eagner, S. L. (1994) Expression purification and characterization of the kunitz type proteinase inhibitor domain of the amyloid β -protein precursor like protien-2. *Biochem. Biophys. Acta* **1209**, 165-170.
- Vedvick, T., Buckholz, R. G., Engel, M., Uracan, M., Kinney, J., Provow, S., Siegel, R. S. and Thill, G. P. (1991) High-level secretion of biologically active apotinin from the yeast *P. pastoris*. *J. Ind. Microbiol.* **7**, 197-201.
- Wagner, S. L., Siegel, R. S., Vedvick, T. G. S., Raschke, W. C. and Van Nostrand, W. E. (1992) High-level expression, Purification and characterization of the kunitz type protease inhibitor domain of protease nexin-2/amyloid b-protein precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1138-1145.

Expression of Biologically Active Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*

Supattra Treerattrakool,¹ Apinunt Udomkit,^{1,*} Lily Eurwilaichitr,² Burachai Sonthayanon,¹ and Sakol Panyim¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

²BIOTEC Training Center of Genetic Engineering and Biotechnology at Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Abstract: Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH), and gonad-inhibiting hormone (GIH) are members of a major peptide family produced from the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of crustaceans. This peptide family plays important roles in controlling several physiologic processes such as regulation of growth and reproduction. In this study the complementary DNA encoding a peptide related to the CHH/MIH/GIH family (so-called *Pem*-CMG) of the black tiger prawn *Penaeus monodon* was successfully expressed in the yeast *Pichia pastoris* under the control of the *AOX1* promoter. The recombinant *Pem*-CMG was secreted into the culture medium using the α -factor signal sequence; of *Saccharomyces cerevisiae* without the Glu-Ala-Glu-Ala spacer peptide. The amino terminus of the recombinant *Pem*-CMG was correctly processed as evidenced by amino-terminal peptide sequencing. The recombinant *Pem*-CMG was purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography and used in a biological assay for CHH activity. The final yield of the recombinant *Pem*-CMG after purification was 260 μ g/L of the culture medium. Both crude and purified recombinant *Pem*-CMG produced from *P. pastoris* showed the ability to elevate the glucose level in the hemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon*, which demonstrates that *Pem*-CMG peptide functions as hyperglycemic hormone in *P. monodon*.

Key words: α -mating factor, arthropod, black tiger prawn, crustacean hyperglycemic hormone (CHH), *Pichia pastoris*, yeast expression system.

INTRODUCTION

The X-organ sinus gland (XOSG) complex, located in the optic ganglia in the eyestalk, is the major neuroendocrine control center of crustaceans. The major hormone family produced in the XOSG complex is composed of crustacean

Received May 15, 2002; accepted September 5, 2002.

*Corresponding author: telephone 66-2-4419003, ext. 1237, 1253; fax 66-2-4419906;
e-mail staud@mahidol.ac.th

hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH), and gonad-inhibiting hormone (GIH) (Charman-tier et al., 1997), CHH has been widely studied as a result of its abundance and the well-established assays for biological activity (Leuven et al., 1982; Gu et al., 2000). Although CHH functions mainly in the regulation of glucose metabolism, recent studies have indicated that it might also play a role in reproduction and molting.

The primary structure of a hormone with both hyperglycemic activity and molt-inhibiting activity (CHH-A) has been described in *Homarus americanus* (Chang et al., 1990). Moreover, *H. americanus* CHH-A is also involved in triggering the onset of vitellogenesis, whereas CHH-B is responsible for stimulating oocyte maturation before spawning (De Kleijn et al., 1995, 1998). In *Metapenaeus ensis*, an important role of CHH-related neuropeptides, so-called MeCHH-A and MeCHH-B, in regulation of glucose metabolism and regulation of vitellogenesis in the female has also been demonstrated (Gu et al., 2000). A high level of MeCHH-A may be needed for the initial gonadal stage, and a high level of MeCHH-B is required for gonad maturation during middle and late vitellogenesis (Gu et al., 2000). In addition, CHH has been implicated in the regulation of lipid hepatopancreatic enzyme secretion and gill ion transport (Van Herp, 1998; Spanings-Pierrot et al., 2000).

In *Penaeus monodon*, 6 complementary DNA sequences encoding peptides in the CHH/MIH/GIH family have been reported so far (Davey et al., 2000; Udomkit et al., 2000). The biological activity of the peptides translated from these cDNAs has yet to be demonstrated. Though several recombinant peptides in this family, such as CHH and MIH of *M. ensis* (Gu et al., 2000, 2001) and MIH of *P. japonicus* (Ohira et al., 1999), were successfully expressed in *Escherichia coli* expression system, the expressed proteins aggregated in an insoluble form. The problems of complicated downstream processes resulting from *E. coli* expression systems such as solubilization and renaturation of the recombinant protein could be overcome by using eukaryotic expression systems, among which *Pichia pastoris* is one of the most powerful for synthesizing heterologous proteins (Higgings and Cregg, 1998). *Pichia pastoris* is a methylotrophic yeast that can grow on methanol as a sole carbon source. The first step in the methanol utilization pathway is catalyzed by alcohol oxidase, which accounts for more than 30% of total cellular proteins. The highly inducible promoter of the alcohol oxidase I (AOX1) gene has been used for efficient

production of a wide variety of heterologous proteins (Cereghino and Cregg, 2000).

In this study a recombinant peptide in the CHH/MIH/GIH family of *P. monodon*, so-called Pem-CMG, from *P. pastoris* in the form of secreted protein was expressed. The purification and biological assay for CHH activity of the recombinant Pem-CMG peptide are also described in this report.

MATERIALS AND METHODS

Construction of an Expression Plasmid

A DNA fragment containing the coding sequence for the mature Pem-CMG was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification from the plasmid Pem-CMG-EX2.1, which contains the mature Pem-CMG cDNA inserted in pET3a expression vector (Chooluck et al., 2000). The amplified DNA fragment was then cloned into the pPICZ α A expression vector (Invitrogen).

The resulting recombinant plasmid, α CMG, contains the coding sequence for mature Pem-CMG, fused in-frame with the α -factor secretion signal of *S. cerevisiae* without the double Glu-Ala repeats, under the control of AOX1 promoter. The physical map of the recombinant plasmid α CMG is shown in Figure 1.

Transformation of *Pichia pastoris* by Electroporation

The recombinant plasmid α CMG was linearized by *Pme*I, and used for transformation of *P. pastoris* strain KM71 (Invitrogen) by electroporation (Gene Pulser, Bio-Rad), with the following conditions: 1.5 kV, 25 μ F, and 200 Ω . After the addition of 1 ml of 1 M sorbitol, the cells were incubated at 30°C without shaking for 1 hour. Then 1 ml of YEPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) was added, and the incubation was continued with shaking at 30°C for 2 hours. The cells were collected and resuspended in 100 μ l of sterile distilled water. The cell suspension was spread on a YEPD plate containing 100 μ g/ml Zeocin and incubated for 2 to 3 days until colonies formed. The transformants were screened for integration of α CMG into the genome by PCR amplification with 5' and 3' AOX1 primers (5' AOX1, 5'-GACTGGTTCGAATTGACAAGC-3'; 3' AOX1, 5'-GCAATGGCATTCGTCATCC-3').

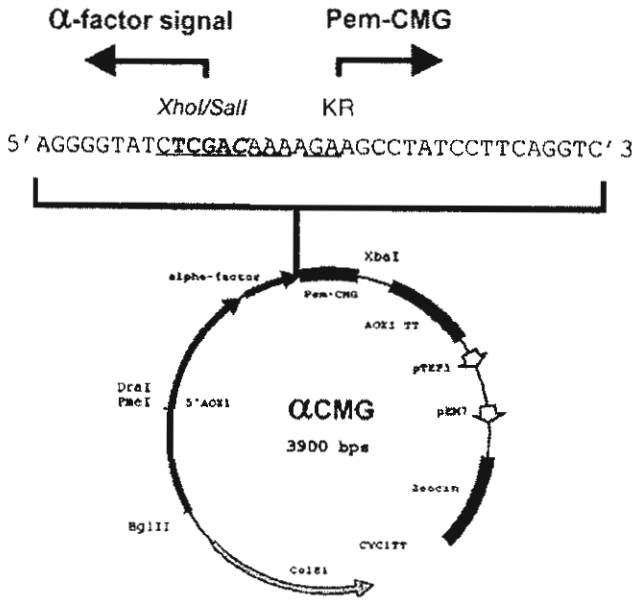


Figure 1. Physical map of α CMG. The recombinant α CMG plasmid contains the mature Pem-CMG cDNA fused in-frame with the α -factor secretion signal without Glu-Ala repeats. Expression of the mature Pem-CMG is driven by the AOX1 promoter in the 5' AOX region. The expanded region spans the junction between the α -factor secretion signal and the mature Pem-CMG cDNA, in which the KEX2 cleavage site (KR) at the 3' end of the α -factor secretion signal is followed directly by the mature Pem-CMG cDNA.

Expression of Recombinant Pem-CMG

A single colony of *P. pastoris* KM71 recombinant containing α CMG was inoculated in 5 ml of YEPD and incubated at 30°C with shaking at 250 rpm for 48 hours, following which the cell culture was transferred into 100 ml of fresh BMGY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 0.67% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% glycerol) and grown under the same conditions until the culture reached an OD_{600 nm} of 5 to 6. The cell pellet was harvested and resuspended in BMMY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 0.67% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 0.5% [vol/vol] methanol) using one-fifth volume of the original culture. Absolute methanol was added to a final concentration of 3% (vol/vol) to provide induction for 3 days. The expressed recombinant Pem-CMG secreted into the culture supernatant was analyzed on 16.5% Tricine gel for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the amino acid sequence at the amino terminus was determined by sequencing.

Purification of Recombinant Pem-CMG

After 3 days of induction, the culture supernatant was subjected to partial purification by precipitation with 30% to 50% ammonium sulfate and concentrated by ultrafiltration using Centrprep centrifugal filter devices (Amicon). Further purification was achieved by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on Jupiter Phenomenex C18 column (Phenomenex, 5 μ particle, 300 Å pore size, 250 $\times$ 4.6 mm). The column was eluted with a linear gradient of 0% to 10% acetonitrile in 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid (TFA) for 1 minute, then held at 10% acetonitrile in 0.1% (vol/vol) TFA for 10 minutes, followed by a linear gradient of 10% to 60% acetonitrile in 0.1% (vol/vol) TFA for 40 minutes, and finally held at 60% acetonitrile in 0.1% (vol/vol) TFA for 10 minutes at a flow rate of 1 ml/min. The expected fraction was collected and then freeze-dried. The purified protein was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, and used in the biological activity assay.

Biological Assay for Hyperglycemic Activity of Recombinant Pem-CMG

Farm-grown black tiger prawns (*P. monodon*, 16–25 g) were kept in Plexi Glass tanks filled with seawater (approx 11 ppt of salinity) at a depth of 8 to 10 cm with good aeration for 3 to 4 hours. Prawns were then bilaterally eyestalk-ablated with a pair of sharp scissors, the wounds were immediately sealed with hot forceps, and the prawns were returned to the tanks.

After bilateral eyestalk ablation the prawns were starved for 18 hours, following which 100 μ l of hemolymph was removed from individual prawns for the measurement of baseline glucose levels. For each experimental and control group, 10 prawns were used. Either 5 μ g of purified recombinant Pem-CMG or 25 μ g of total crude recombinant Pem-CMG protein in a volume of 100 μ l was injected into an individual prawn through the arthrodial membrane of the second walking leg. A 100- μ l volume of PBS and 1 pair-equivalent of eyestalk crude extract was injected into the negative and positive control groups, respectively. After injection the prawns were returned to the tanks, and the glucose levels in the hemolymph were determined at 0.5, 1, and 1.5 hours after injection using a glucose diagnostic kit (Sigma).

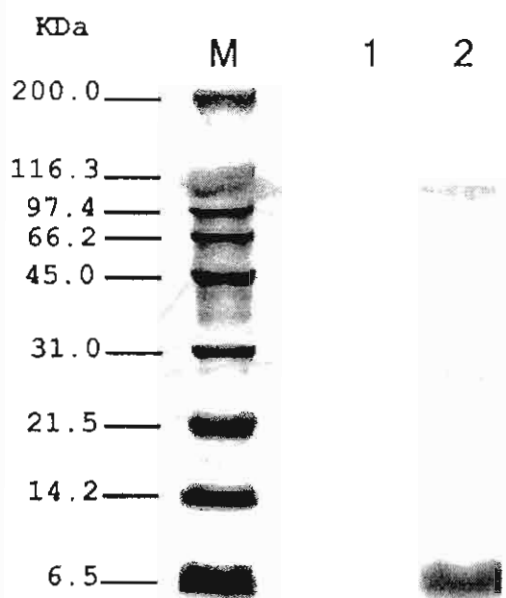


Figure 2. Coomassie blue-stained tricine SDS-PAGE analysis of the expression of the recombinant Pem-CMG protein from *P. pastoris* transformant. Lane M shows a broad-range protein marker (Bio-Rad). A 100- μ l volume of the culture supernatant of the *P. pastoris* transformant containing pPICZ α A vector only and α CMG after induction with 3% (vol/vol) methanol for 3 days were precipitated with TCA and loaded in lane 1 and lane 2, respectively.

RESULTS

Analysis of Pem-CMG Expression in *Pichia pastoris*

An SDS-PAGE analysis of the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing α CMG showed a major protein product of about 8 kDa, which is the expected size for Pem-CMG (Figure 2, lane 2). This protein band was not present in the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing pPICZ α A vector alone (Figure 2, lane 1). The result of amino-terminal sequencing of this protein showed that the first 5 amino acid residues were Ser-Leu-Ser-Phe-Arg, corresponding to the amino acid sequence deduced from cDNA encoding the mature Pem-CMG.

Purification of Recombinant Pem-CMG

Partial purification by ammonium sulfate precipitation was successful in removing some endogenous proteins from the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing α CMG, as shown in Figure 3 (B, lane 1). The RP-HPLC

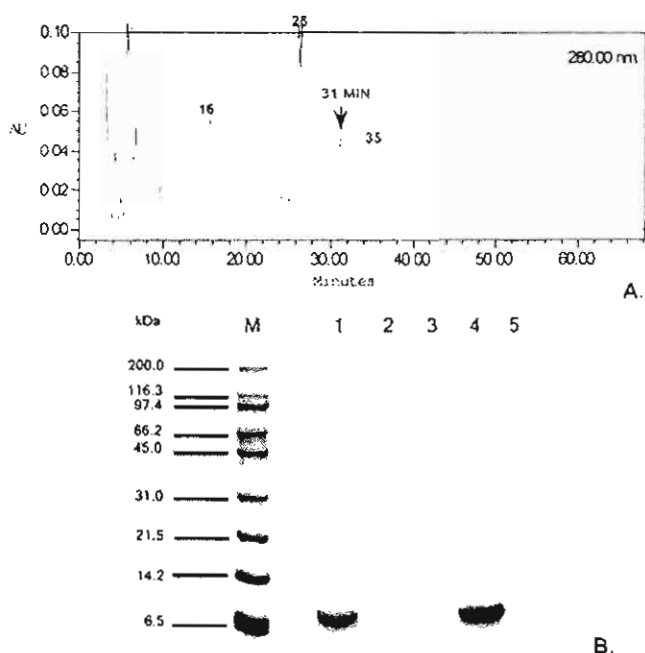


Figure 3. Purification of recombinant Pem-CMG. A: HPLC analysis of the partially purified recombinant Pem-CMG at wavelength of 280 nm. B: Tricine SDS-PAGE of 3 μ g of the partially purified Pem-CMG from 30% to 50% ammonium sulfate precipitation (lane 1), and RP-HPLC purified fractions at retention times of 16, 26, 31, and 35 minutes (lanes 2, 3, 4, and 5, respectively). Lane M shows a broad-range protein marker (Bio-Rad).

elution profile of the partially purified Pem-CMG and the result of Tricine SDS-PAGE (Figure 3 A and B) showed that a protein of the expected size for Pem-CMG eluted at 31 minutes (B, lane 4). The expected fraction was reloaded onto RP-HPLC column under the same conditions as the previous step so as to confirm the purity of the purified Pem-CMG protein. The chromatogram and Tricine SDS-PAGE revealed that Pem-CMG eluted as a single population at 31 minutes, and no contaminating proteins co-eluted at this stage (data not shown). The final yield of the purified Pem-CMG was 260 μ g/L of the culture medium as determined by Bradford's method using the Bio-Rad Protein Assay kit.

Hyperglycemic Activity of Recombinant Pem-CMG

The hemolymph glucose level increased by 5 to 10 mg/dl after injection of 1 pair-equivalent of eyestalk extract into eyestalk-ablated prawns, whereas injection of PBS had little effect on glucose level in the hemolymph (Figure 4, A and B). Recombinant Pem-CMG, in both crude and purified form, had the ability to elevate hemolymph glucose levels of

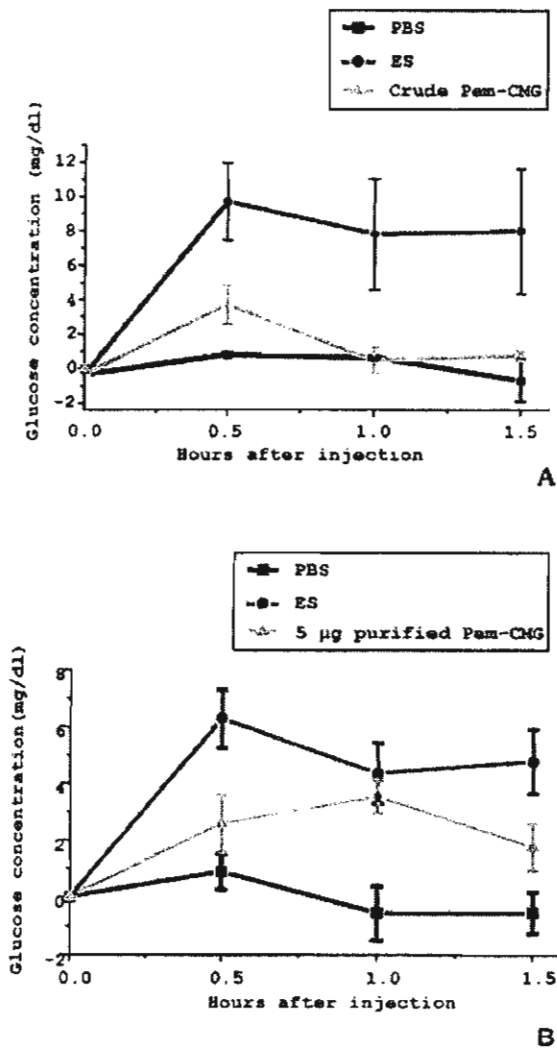


Figure 4. Determination of hyperglycemia in bilaterally eyestalk-ablated *P. monodon* after injection with crude recombinant Pem-CMG (A) or with purified recombinant Pem-CMG (B). The y-axis represents the glucose concentration (mg/dl) and the x-axis represents time at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2 hours after injection. The level of the hemolymph glucose after injection with PBS (■), eyestalk extract (●), and crude Pem-CMG, after subtraction of the background glucose level from pPICZαA in A or purified Pem-CMG in B (▲), was determined every 0.5 hour. The error bars represent the SEM value ($n = 5$ and $n = 6$ for A and B, respectively).

eyestalk-ablated prawns, although to a smaller extent than compared with the crude eyestalk extract. The hyperglycemic effect could be observed from 0.5 hour, after injection. The highest levels of 3.5 and 3.25 mg/dl of hemolymph glucose were detected at 0.5 hour and 1 hour after injection with crude and purified recombinant Pem-CMG, respectively.

DISCUSSION

The recombinant Pem-CMG was successfully expressed as a secreted peptide in *P. pastoris*. The result of amino-terminal sequencing showed amino acid sequence identical to that deduced from the cDNA encoding the mature Pem-CMG peptide (Udomkit et al., 2000). This suggests that the amino-terminus of the recombinant Pem-CMG was correctly processed by the KEX2 enzyme regardless of the absence of the double Glu-Ala repeats downstream of its cleavage site. The Glu-Ala repeat was suggested to be necessary for efficient cleavage by KEX2 (Cregg, 1999). The Glu-Ala residues left at the amino-terminus of the secreted peptide after Kex2 cleavage will later be removed by a dipeptidyl aminopeptidase encoded by the *STE13* gene (Clare et al., 1991; Wagner et al., 1992; Cregg et al., 1993; Van Nostrand et al., 1994; Raemaekers et al., 1999). However, our result demonstrates an example in which the Glu-Ala repeats are not necessary for KEX2 cleavage. A similar result was obtained with the expression of ASP2 in *P. pastoris* (Briand et al., 1999).

As determined by RP-HPLC, the acidic conditions in the purification step did not seem to affect the structure, and hence the biological activity, of the recombinant Pem-CMG, as the protein still retained activity after purification. The same strategy was successful in purification of CHH (Sithigorngul et al., 1999) and MIH (Ohira et al., 1999) in other species. It is possible that these peptides can tolerate a denaturing environment because their structures are held by 3 disulfide bonds that help stabilize the proteins.

Although the yield of the purified recombinant Pem-CMG expressed in this study was lower than that of other crustacean recombinant eyestalk neurohormones expressed in *E. coli* (Ohira et al., 1999; Gu et al., 2001), the recombinant Pem-CMG could be purified by one step of RP-HPLC, making the solubilization and renaturation steps required for obtaining active proteins expressed in *E. coli* unnecessary.

The ability to elevate the glucose level in the hemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon* suggests that the recombinant Pem-CMG induces hyperglycemia, and thus Pem-CMG functions as CHH in *P. monodon*. This is in agreement with its primary structure—i.e., the lack of the amino acid glycine at position 12 of the mature peptide compared with those of MIH and GIH and the presence of an amidation signal, GK at the carboxy-terminal, which are characteristics of most CHH characterized so

far (Chang, 1997). The modification of translated proteins by amidation reaction is widespread in invertebrates and vertebrates but seems to be absent from yeast, as has been shown in *Saccharomyces cerevisiae* (Rourke et al., 1997). The recombinant Pem-CMG in this study may have different feature from the natural peptide in that it does not have the amidated carboxyl-terminus because of the possible lack of amidation in *P. pastoris*. The carboxy-terminal amidation could be essential for biological activity of proteins (Martinez et al., 1986); Therefore the lack of amidation may account for the low hyperglycemic activity of the recombinant Pem-CMG compared with that of natural substance in the eyestalk extract.

Although the major function of CHH is to regulate glucose metabolism in crustaceans, several studies have indicated that it may also contribute to the regulation of reproduction and the molting cycle (Chang et al., 1990; De Kleijn et al., 1995; Gu et al., 2000). Therefore the possibility that Pem-CMG also serves other functions in prawns cannot be excluded.

As shown in this study, yeast recombinant technology can produce biologically active proteins with high yield. As such, the recombinant crustacean eyestalk hormone is more desirable for further studies on topics such as structure-function relationships than are the native hormones that require large numbers of animals and complicated purification steps in the preparation process.

In summary, we have achieved expression of a biologically active eyestalk neuropeptide of *P. monodon* using the *P. pastoris* expression system. The recombinant Pem-CMG protein was characterized as a hyperglycemic hormone. As Pem-CMG is the first eyestalk hormone with a defined hyperglycemic activity that has been demonstrated in *P. monodon*, we propose that it be referred to as Pem-CHH1.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Duncan Smith for his critical reading of this manuscript and Dr. Paisarn Sithigorngul, Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, for his suggestion on protein purification and the biological assay. This work was financially supported by Thailand Research Fund (TRF) and Thailand National Center for Biotechnology and Genetic Engineering, National Science and Technology Development Agency (NSTDA). S.T.

was funded by Graduated Fellowship Program, NSTDA, 1999–2001.

REFERENCES

Briand, L., Perez, V., Huet, J.C., Danty, E., Masson, C., and Pernellet, J.C. (1999). Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 15:362–369.

Cereghino, J.L., and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45–66.

Chang, E.S. (1997). Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Fingerman, M., Nagabhushanam, R., and Thompson, M.-F., (eds.). Enfield, N.H.: Science Publishers, 1:163–178.

Chang, E.S., Prestwich, G.D., and Bruce, M.J. (1990). Amino acid sequence of peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem Biophys Res Commun* 171:818–826.

Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., and Van Herp, F. (1997). Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. In: *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Fingerman, M., Nagabhushanam R., and Thompson, M.-F. (eds.). Enfield, N.H.: Science Publishers, 1:109–161.

Chooluck, S., Wongsombat, T., Udomkit, A., Sonthayanon, B., and Panyim, S. (2000). Expression of Pem-CMG1, an eyestalk neuropeptide of *Penaeus monodon* in *Escherichia coli*. Phuket, Thailand: *Proceedings of the 2nd National Symposium on Marine Shrimp*, 56–62.

Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, I.F., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K., and Henwood, C.A. (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105:205–212.

Cregg, J.M. (1999). Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: *Gene Expression Systems*, Fernandez, J.M., and Hoefler, J.P. (eds.). NewYork, N.Y.: Academic Press, 157–191.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S., and Raschke, W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11:905–910.

Davey, M.I., Hall, M.R., Willis, R.H., Oliver, R.W., Thurn, M.J., and Wilson, K.J. (2000). Five crustacean hyperglycemic family hormones of *Penaeus monodon*: complementary DNA sequence and identification in single sinus glands by electrospray ionization–Fourier transform mass spectrometry. *Mar Biotechnol* 2:80–91.

- De Kleijn, D.P.V., De Leeuw, E.P.H., Van Den Berg, M.C., Martens, G.J.M., and 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* 1260:62–66.
- De Kleijn, D.P.V., Janssen, K.P.C., Waddy, S.L., Hegeman, R., Lai, W.Y., Martens, G.J.M., and Van Herp, F. (1998). Expression of the crustacean hyperglycemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. *J Endocrinol* 156:291–298.
- Gu, P.-L., Yu, K.L., and Chan, S.-M. (2000). Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Lett* 472:122–128.
- Gu, P.-L., Chu, K.H., and Chan, S.-M. (2001). Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tissue Res* 303:129–136.
- Higgings, D.R., and Cregg, J.M. (1998). *Methods in Molecular Biology. Pichia Protocols*, vol 103. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Leuven, R.S.E.W., Jaros, P.P., Van Herp, R, and Keller, R. (1982). Species or group specificity in biological and immunological studies of crustacean hyperglycemic hormone. *Gen Comp Endocrinol* 46:288–296.
- Martinez, J., Rodriguez, M., Bali, J.P., and Laur, J. (1986). Phenethyl ester derivative analogous of the C-terminal tetrapeptide of gastrin as potent gastrin antagonists. *J Med Chem* 29:2201–2206.
- Ohira, T., Nishimura, T., Sonobe, H., Okuno, A., Watanabe, T., Nagasawa, H., Kawazoe, I., and Aida, K. (1999). Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:1576–1581.
- Raemaekers, R.J., de Muro, L., Gatehouse, J.A., and Fordham-Skelton, A.P. (1999). Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in the PHA-E signal peptide. *Eur J Biochem* 265:394–403.
- Sithigorngul, W., Jaideechoeys, S., Saraithongkum, W., Longyant, S., and Sithigorngul, P. (1999). Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *J Exp Zool* 284:217–224.
- Spanings-Pierrot, C., Soye, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E., and Charmantier, G. (2000). Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen Comp Endocrinol* 119:340–350.
- Udomkit, A., Chooluck, S., Sonthayanon, B., and Panyim, S. (2000). Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. *J Exp Mar Biol Ecol* 224:145–156.
- Van Herp, F. (1998). Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family. In: *Recent Advance in Arthropod Endocrinology*, Coast, E.M., and Webster, S.G., eds. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 65:53–70.
- Van Nostrand, W.E., Schmaier, A.H., Neiditch, B.R., Siegel, R.S., Raschke, W.C., Sisodia, S.S., and Eagner, S.L. (1994). Expression purification and characterization of the kunitz type proteinase inhibitor domain of the amyloid β -protein precursor like protien-2. *Biochim Biophys Acta* 1209:165–170.
- Wagner, S.L., Siegel, R.S., Vedvick, T.S., Raschke, W.C., and Van Nostrand, W.E. (1992). High level expression, purification and characterization of the kunitz type protease inhibitor domain of protease nexin-2/amyloid β -protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 186:1138–1145.



Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues

Apinunt Udomkit*, Supattra Treerattrakool, Sakol Panyim

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

Received 1 July 2003; received in revised form 4 August 2003; accepted 14 August 2003

Abstract

Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) is the most abundant peptide in the eyestalk of crustacean. This hormone not only plays its major role in controlling glucose level in the haemolymph, but is also significant to other processes such as ecdysteroid synthesis and ovarian maturation. Multiple forms of CHH have been reported in several species. In addition to the Pem-CHH1 of *Penaeus monodon* recently identified, here, we report the cloning and characterization of the cDNA encoding another two Pem-CHH peptides, so-called Pem-CHH2 and Pem-CHH3. Both cDNAs contained 381-bp open reading frame encoding 127 amino acids. The cleavage at the putative processing site of the signal peptide, KR, would generate a 74 amino acids mature hormone for both Pem-CHH2 and Pem-CHH3. Amino acid sequence analysis revealed that Pem-CHH2 and Pem-CHH3 shared 95% identity in their amino acid sequences to that of Pem-CHH1. Both recombinant Pem-CHH2 and recombinant Pem-CHH3 expressed as secreted proteins in *Pichia pastoris* exhibited hyperglycemic activity at the comparable level to that of Pem-CHH1. Furthermore, investigation of the transcripts of each Pem-CHH in several tissues by RT-PCR showed that expression of Pem-CHH1, Pem-CHH2 and Pem-CHH3 was not restricted only to the eyestalk but also detectable in the heart. In addition, the transcript of Pem-CHH1 was also present in the gill. CHHs from various origins may play different roles and thus contribute towards its pleiotropic nature.

© 2003 Published by Elsevier B.V.

Keywords: cDNA; Crustacean hyperglycemic hormone (CHH); Expression; *Penaeus monodon*; *Pichia pastoris*

* Corresponding author. Tel.: +66-2-441-9003x1237; fax: +66-2-441-9906.
E-mail address: staud@mahidol.ac.th (A. Udomkit).

1. Introduction

33

The eyestalk of decapod crustaceans contains neurosecretory neurons, from which a variety of peptide hormones is synthesized and secreted (Keller, 1992; Charmantier et al., 1997). Among the eyestalk peptides, crustacean hyperglycemic hormone (CHH) is the most abundant and the best studied. CHH is a member of a structurally related peptide family, which also includes molt-inhibiting hormone (MIH), gonad-inhibiting hormone (GIH) and mandibular organ-inhibiting hormone (MO-IH) (Wainwright et al., 1996; Chang, 1997). In addition to its major role in blood glucose regulation (Cooke and Sullivan, 1982), CHH is also involved in the regulation of several physiological processes such as edysteroid production (Yasuda et al., 1994), lipid metabolism (Santos et al., 1997), ovarian physiology (Khayat et al., 1998) and osmoregulation (Charmantier-Daures et al., 1994; Serrano et al., 2003).

CHH has been isolated from several crustaceans such as crabs (Kegel et al., 1989; Chung et al., 1998), lobster (Tensen et al., 1991), crayfishes (Kegel et al., 1991; Huberman et al., 1993), prawn (Sithigorngul et al., 1999) as well as isopod (Martin et al., 1984). CHH-related peptides were also found in insects. For instance, the amino acid sequence of the ion transport peptide of the locust, *Schistocerca gregaria*, was reported and revealed similarity to that of CHH (Meredith et al., 1995), and a cDNA encoding a CHH-family peptide was recently isolated from the silkworm *Bombyx mori* (Endo et al., 2000).

CHH exists as multiple isoforms in several of the species examined so far. Two isoforms of CHH were reported in *Homarus americanus* (De Kleijn et al., 1995), *Jasus lalandii* (Marco et al., 2000), *Orconectes limulus* (De Kleijn et al., 1994) and *Procambarus clarkii* (Yasuda et al., 1994), whereas at least five peptides with hyperglycemic activity were reported in *Penaeus japonicus* (Yang et al., 1997).

In *Penaeus monodon*, a cDNA encoding CHH has been identified and characterized (Udomkit et al., 2000). The recombinant protein expressed from this cDNA showed the ability to elevate glucose level in the haemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon*, and thus designated Pem-CHH (Trécratrakool et al., in press). In this study, another two Pem-CHH cDNAs were isolated from the eyestalk of *P. monodon*. The biological activity of the recombinant proteins expressed from these cDNAs was determined and their expression in different tissues of *P. monodon* was also investigated.

→ 2003

2. Materials and methods

2.1. RNA extraction and cDNA cloning

Total RNA was isolated from a pair of eyestalks of a single shrimp. After removal of the cuticle and non-neural tissues, the dissected eyestalks were homogenized in TRIZOL Reagent (GIBCO BRL), and the RNA was extracted according to the manufacturer's protocol.

Rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique was used to amplify both the 3' and the 5' regions of cDNA. The detailed protocols described earlier (Udomkit et al., 2000) were followed except that about 5 µg of total RNA were used as a template for first strand

cDNA synthesis instead of poly(A)⁺RNA. The degenerate oligonucleotide PM2 was used as a gene specific primer in 3' RACE for both *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* cDNAs. For 5' RACE, CHH2-CSP1 and CHH3-CSP1 were used to prime first strand cDNA synthesis of *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3*, respectively. Another two specific primers CHH2-CSP2 and CHH2-CSP3 were used for amplification of 5' *Pem-CHH2* cDNA, whereas CHH3-CSP2 and CHH3-CSP3 were used for 5' *Pem-CHH3* cDNA.

The coding regions of the cDNAs were amplified by RT-PCR using primers CDF-2 and CDR for *Pem-CHH2* and primers CDF-3 and CDR for *Pem-CHH3*.

The nucleotide sequences of the primers used in these experiments are shown in Table 1.

2.2. DNA sequence analysis

The PCR products were either cloned into pUC18 at specific sites or directly cloned into pGEM[®]-T Easy vector (Promega). Nucleotide sequences were determined by the method of ABI[™] PRISM Dye Terminator Cycle (PE Applied Biosystems).

2.3. Protein expression and purification

The cDNA encoding the mature *Pem-CHH2* peptide was amplified with primers CHH2-Ex and CDR-2. The amplified fragment was digested with *Sal*I and *Xba*I before ligating to *Pichia pastoris* expression vector pPIC α A (Invitrogen) that had been digested with *Xho*I and *Xba*I. The cDNA encoding the mature *Pem-CHH3* peptide was amplified with primers CHH3-Ex and CDR-2, then subcloned into pPIC α A using the same

Table 1

Primers used for cDNA cloning

	Name	Sequence (5' → 3')	Size	T _m (°C)
3' RACE	PM2	CCGGAATTCTGYGAAGAYTGYTACAAC	27	70
5' RACE				
<i>Pem-CHH2</i>	CHH2-CSP1	CCGGAATTCCTTTGACGAGGCCGGAAC	28	90
	CHH2-CSP2	CCGAAGCTTGTCCACGCAGTAGAG	24	76
	CHH2-CSP3	CCGGAATTCACCTCGTTGTGGAACACAG	27	82
<i>Pem-CHH3</i>	CHH3-CSP1	ATGCTTTATGAAGACATTAC	20	52
	CHH3-CSP2	CGTCAATATGGTGTTCAGC	18	54
	CHH3-CSP3	GCAAGCTTCCTAGAGTCTGGTCATTC	26	58
Coding region				
<i>Pem-CHH2</i>	CDF-2	CGGGATCCATGGTTGCGGTCCGATTGG	27	82
	CDR	CGGGATCCCTACTTGCUGAGCCTCTA	26	77
<i>Pem-CHH3</i>	CDF-3	GGCATATGGTTGCGGTCCGATTGG	24	66
Protein expression				
<i>Pem-CHH2</i>	CHH2-Ex	ATGAATTCGTGACAAAAAGATCTAATG GTTCAATTC	37	65
	CDR-2	GCTCTAGACTACTTGCCTGAGCCTCTG	26	60
<i>Pem-CHH3</i>	CHH3-Ex	ATGAATTCGTGACAAAAAGAACCATGTC GTTCAATTC	37	71

strategy The physical maps of the resulting plasmids, α CHH2 and α CHH3, are shown in Fig. 1.

An overnight culture of *Pichia* transformants was transferred into 100 ml of fresh BMGY medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 0.67% (w/v) YNB, 4 μ g/ml D-biotin, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0 and 1% (v/v) glycerol] and was grown at 30 °C with shaking at 250 rpm until the OD₆₀₀ reached 5–6. The cell pellet was then collected and resuspended in 1/5 volume of BMGY medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 0.67% (w/v) YNB, 4 μ g/ml D-biotin, 100 mM potassium phosphate]. The culture was added with methanol at various concentrations from 0% to 5% (v/v) before incubated at the same condition. An aliquot of the culture was collected daily from 0 to 7 days. After the cells were discarded, the culture medium was subjected to further analysis for Pem-CHH2 and Pem-CHH3 expression.

The recombinant Pem-CHHs expressed and secreted into the culture medium were partially purified by ammonium sulfate precipitation prior to purification using BPC® system (Amersham Pharmacia Biotech). The protein sample was loaded to a Superdex 75 PC 3.2/30 column. The column was eluted with two-column volume of phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 at the flow rate of 0.4 ml/min. The eluted fractions were collected every 1 ml by the fraction collector (Frac-900, Amersham Pharmacia Biotech), and were vacuum-dried before dissolved in PBS, pH 7.4 and used for biological assay. The amount of proteins was determined by Bradford's method (Bradford, 1976) using the Bio-Rad Protein Assay kit.

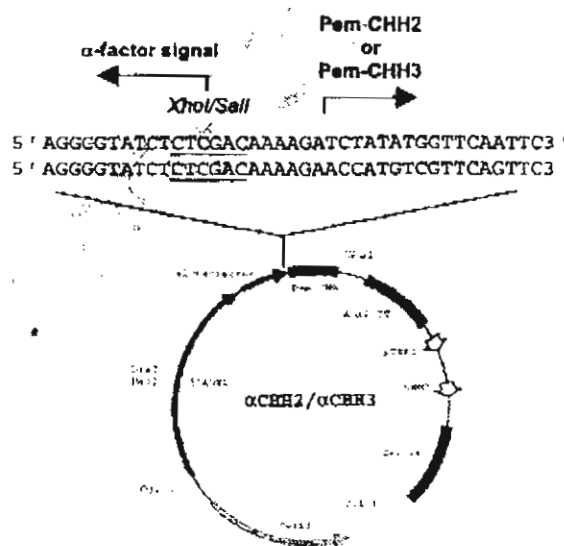


Fig. 1. The physical map of α CHH2 and α CHH3 expression plasmids. The *SalI/XbaI* digested cDNA fragments encoding the mature Pem-CHH2 and Pem-CHH3 were inserted into pPICZaA vector at *XhoI* and *XbaI* sites. This insertion allows the mature Pem-CHH2 and Pem-CHH3 cDNAs to fuse in-frame with the α factor secretion signal. The expanded region shows the nucleotide sequence of the junction at which the α factor secretion signal is followed by the coding sequence for the dibasic KR cleavage site (AAAAGA), which precedes the cDNA for the mature Pem-CHH2 and Pem-CHH3.

2.4. Biological assay for hyperglycemic activity

Farm grown black tiger shrimp, *P. monodon* (~ 20 g), were bilaterally eyestalk ablated and kept in tanks filled with seawater (approximately 11 ppt of salinity) for 18 h with starvation. About 50 µl of the haemolymph were collected from individual shrimps for the measurement of baseline glucose level. Five micrograms of either the purified Pem-CHH 2 or the purified Pem-CHH 3 were then injected into 10 individual shrimps through the arthrodial membrane of the second walking leg. For the negative and positive control groups, each individual prawn was injected with 100 µl of PBS and one pair equivalent of eyestalk's neuron crude extract, respectively. The glucose levels in the haemolymph of individual shrimps were determined at 0.5, 1 and 1.5 h after injection using a glucose diagnostic kit (Sigma).

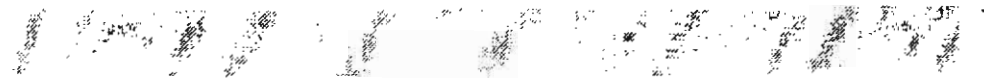
2.5. Dot-blot hybridization

Screening for the recombinants by dot-blot hybridization was conducted as follows. One microliter of 10 pg of each DNA sample was heat-denatured in boiling water for 5 min, snap cooled on ice and dotted on the GeneScreen Plus® hybridization transfer membrane (Dupont). The hybridization was performed as described below.

The DNA probes were synthesized by incorporation of Fluorescein-11-dUTP with the Gene Image random prime labelling module (Amersham Pharmacia Biotech) following the manufacturer's protocol. Hybridization was performed in hybridization solution [5 × SSC, 0.1% (w/v) SDS, 5% (w/v) dextran sulphate, 20-fold dilution of liquid block and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA] at 65 °C overnight. After hybridization, the first wash was performed in 1 × SSC, 0.1% (w/v) SDS at 65 °C for 15 min, followed by the second wash in 0.2% SDS, 0.1% (w/v) SDS at the same temperature for 15 min. The detection step was conducted according to the protocol of the Gene Images CDP-Star detection module (Amersham Pharmacia Biotech).

2.6. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of Pem-CHH transcripts

Total RNA extracted from several tissues of *P. monodon* including eyestalk, gill, heart, muscle and thoracic ganglia was used as a template for RT-PCR. The reverse transcription step was performed with Impromt-II(tm)™ Reverse Transcriptase (Promega) according to the manufacturer's protocol using PRT1 primer (5'-CCGGAATTCAAGCTTCTAGAG-GATCCTTTTTTTTTTTTTTTT-3') to prime cDNA synthesis. The amplification of cDNA was performed with CMG-F primer (5'-CGGAATTCTCAGTGCAGAGGGA-GAGCC-3') and PM1 primer (5'-CCGGAATTCAAGCTTCTAGAGGATCC-3'). The product from the first round of amplification with CMG-F and PM1 primers was used as a template for specific amplification of *Pem-CHH1* and *Pem-CHH3* cDNAs using the following pairs of primers: α-CMG (5'-ATGAATTCGTCGACAAAAGAAGCC-TATCCTTCAGGTC-3') and CDR-2 for *Pem-CHH1* and CHH3-Ex and CDR-2 for *Pem-CHH3*. Specific amplification of *Pem-CHH2* cDNA was performed using CMG-F and CHH2-R (5'-GCGGATCCCTGCTTTATGAAGACACTG-3') in the first round and using CHH2-Ex and CDR-2 primers in the second round. The amplification was achieved



6

A. Udomkit et al / J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 43668 (2003) xxx-xxx

by 35 successive cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min followed by 159
a final extension at 72 °C for 7 min. 160

3. Results 161

3.1. Cloning of the cDNA encoding Pem-CHH2 and Pem-CHH3 peptides 162

The PCR products from 3'RACE were purified and cloned into pUC18 vector at 164
*Eco*RI site. A total of 130 transformants were firstly screened by DNA dot-blot 165
hybridization using a 384-bp open reading frame of *Pem-CHH1*, previously called 166
Pem-CMG (Udomkit et al., 2000) as a probe. Five recombinant clones producing 167
positive hybridization signal were subjected to subsequent analysis by DNA sequenc- 168
ing. The nucleotide sequences of these five 3'-cDNAs were aligned using Clustalx 169
program. Three of these 3' cDNA showed 97–99% identity in their nucleotide 170
sequences to the cDNA encoding hyperglycemic hormone homolog of *P. monodon*, 171
PmSGP-IV (AF104389), *PmSGP-II* (AF104387) and *PmSGP-III* (AF104388), previ- 172
ously submitted to the Genbank database by Davey et al. Whereas the other two 173
clones, designated 3'-*CHH2* and 3'-*CHH3*, shared around 72% nucleotide identity to 174
the cDNA encoding *Pem-CHH1* (AF233295) (data not shown). Using a set of specific 175
primers derived from the 3'-*CHH2* and 3'-*CHH3* cDNA, the corresponding 5' fragments 176
were successfully cloned. The combination of the nucleotide sequences between the 3' 177
and 5' fragments gave rise to the complete *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* cDNA. The 178
nucleotide and deduced amino acid sequences of *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* are 179
shown in Fig. 2. 180

3.2. Nucleotide sequence analysis of *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* cDNA 181

Pem-CHH2 cDNA contained a 381-bp open reading frame encoding 127 amino acids. 183
A cleavage at the putative processing site (KR) of *Pem-CHH2* would generate a 53 184
amino acids signal peptide and a mature peptide of 74 amino acid residues. A 381-bp 185
open reading frame of *Pem-CHH3* also coded for 127 amino acid residues. *Pem-CHH3* 186
contained a putative mature peptide of the same length as that of *Pem-CHH2*. The 187
alignment of the amino acid sequences of the putative mature *Pem-CHH2* and *Pem-* 188
CHH3 peptides with that of the previously characterized *Pem-CHH1* in Fig. 3 revealed 189
that their mature peptides shared high level of similarity (95%). The three *Pem-CHH* 190
peptides also exhibited a unique characteristic of the CHH/MIH/GIH family, i.e., the 191
alignment of the six cysteine residues at identical positions. 192

3.3. Expression of recombinant *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* in *P. pastoris* 193

Pem-CHH2 and *Pem-CHH3* cDNA were separately cloned into pPICZαA vector to 195
produce αCHH2 and αCHH3 recombinant plasmids, respectively (Fig. 1). The recom- 196
binant plasmids were later introduced into *P. pastoris* KM71. The transformants having 197
either αCHH2 or αCHH3 integrated into their genome were examined by PCR. The 198

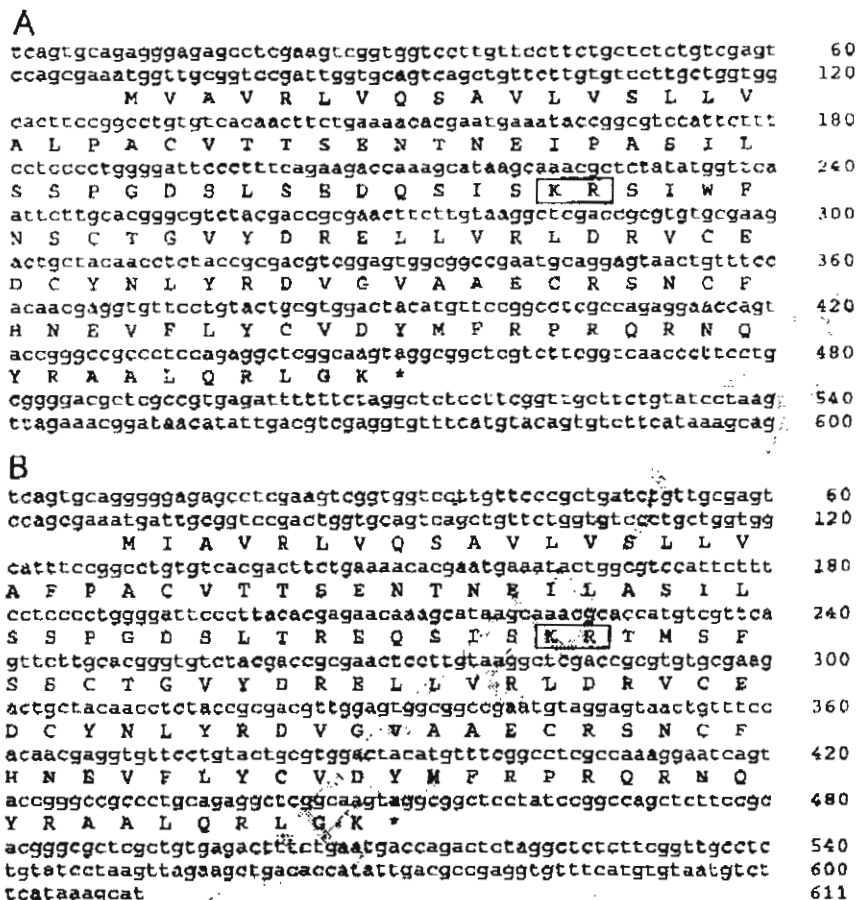


Fig. 2. The nucleotide and deduced amino acid sequences of Pem-CHH2 (A) and Pem-CHH3 (B). Amino acids are shown in one-letter symbol. Asterisk marks the stop codon. The putative cleavage site, KR, is boxed in both sequences.

optimal condition for expression was induction with 3% (v/v) methanol for 2 days for Pem-CHH2 and induction with 4% (v/v) methanol for 2 days for Pem-CHH3. An SDS-PAGE analysis of the culture supernatant of both α CHH2 and α CHH3 *P. pastoris* transformants showed major protein products of about 8 kDa, which were of the expected size for Pem-CHH2 and Pem-CHH3 (lane 1 in Fig. 4A,B, respectively). These protein bands were not present in the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing pPICZ α A vector alone (data not shown). Purification of these secreted products by size exclusion could remove all contaminated proteins from Pem-CHH2 and Pem-CHH3 as shown by SDS-PAGE in lane 2, in Fig. 4A,B, respectively. The final yield of the purified Pem-CHH2 and Pem-CHH3 was 270 and 450 μ g/l of the culture medium, respectively.

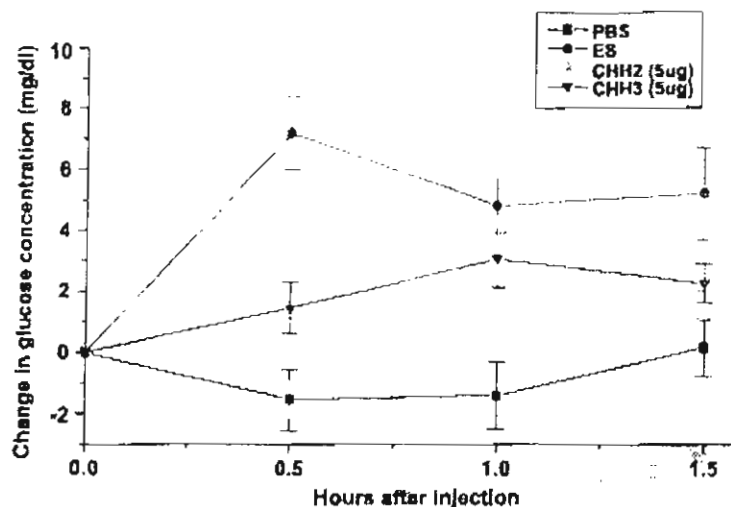


Fig. 5. Determination of glucose level in the hemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon* after injection with 100 μ l each of PBS (—■—), crude extract from one pair of eyestalk (—●—), 5 μ g of purified Pem-CHH2 (—▲—) and 5 μ g of purified Pem-CHH3 (—▼—). The hyperglycemia was presented as a change in glucose concentration (mg/dl) at each time points comparing to those at 0 h (before injection) for each group.

3.4. Hyperglycemic activity of recombinant Pem-CHH2 and Pem-CHH3

The hyperglycemic effect in the haemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon* could be observed within 0.5 h after injection with both recombinant Pem-CHH2 and recombinant Pem-CHH3 (Fig. 5). Although the highest levels of haemolymph glucose (3.58 and 3.05 mg/dl for shrimp injected with Pem-CHH2 and Pem-CHH3, respectively) were somewhat lower than the level raised by injection of extract from eyestalk's neurons, they were

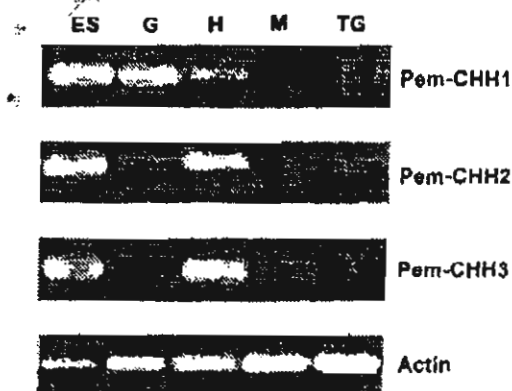


Fig. 6. Expression of Pem-CHH transcripts in different tissues of *P. monodon*. The RT-PCR products for Pem-CHH1, Pem-CHH2, Pem-CHH3 and β -actin were analyzed on 1.5% agarose gel. RNA from eyestalk, gill, heart, muscle and thoracic ganglia was a template for RT-PCR in the lanes indicated ES, G, H, M and TG, respectively.

significantly higher than that of the PBS-injected shrimps and, therefore, demonstrated the hyperglycemic activity of both Pem-CHH2 and Pem-CHH3.

3.5. Expression of Pem-CHHs in *P. monodon*

The transcripts of each Pem-CHH gene in *P. monodon* were examined in several tissues by RT-PCR. The RT-PCR products of Pem-CHH1, Pem-CHH2 and Pem-CHH3 were detected in both the eyestalk and the heart. These transcripts were not present in other tissues, i.e., gill, muscle and thoracic ganglia, except for the transcript of Pem-CHH1 that was also detectable in the gill (Fig. 6).

4. Discussion

Multiple molecular forms of CHH have been reported in several species: two forms of CHH were identified in *H. americanus* (Tensen et al., 1991) and *Metapenaeus ensis* (Gu and Chan, 1998, Gu et al., 2000) and five peptides with hyperglycemic activity were reported in *P. japonicus* (Yang et al., 1997). In *P. monodon*, the first CHH, namely Pem-CHH1, has been described (Udomkit et al., 2000). Another five CHH-homologs in *P. monodon* (Pm-sgp-1 to -V) were also identified by Davey et al. (2000). These suggest that CHHs are also encoded in multiple forms in *P. monodon* as in other species. Here, we reported two additional *P. monodon*'s CHHs, so-called Pem-CHH2 and Pem-CHH3. Both Pem-CHH2 and Pem-CHH3 share 60–70% similarity to CHH of other crustaceans. Most of the differences in the amino acid sequence among the three types of Pem-CHH lie within the first five amino acid residues at the N-terminus of their mature peptides. However, these Pem-CHHs can be distinguished from Pm-sgp-I to -V by the presence of a conserved amino acid block MFRPRQRNQ, residues 56–64, which can be found only in Pem-CHH1. This different feature suggests that Pem-CHH and Pm-sgp belong to different subgroups of the CHH in *P. monodon*.

Both Pem-CHH2 and Pem-CHH3 showed hyperglycemic activity through the capability to elevate the glucose level in the haemolymph of eyestalk ablated *P. monodon*. The hyperglycemia levels produced by Pem-CHH2 and Pem-CHH3 were comparable to that of Pem-CHH1. CHH is classified into type I of CHH family peptides (Lacombe et al., 1999). One of the distinctive characteristics of the hormones in type I is the amidated carboxyl-terminus (C-terminus). Recently, this carboxyl-terminal amide moiety has been shown to play significant role in conferring hyperglycemic activity of crustacean hyperglycemic hormone, Pej-SGP-I, in *P. japonicus* (Katayama et al., 2002). The recombinant Pej-SGP-I having a free C-terminus showed lower hyperglycemic activity by approximately one order of magnitude than that of the recombinant Pej-SGP-I with an amidated C-terminus. In our studies, the recombinant Pem-CHHs were expressed in *P. pastoris*, in which no information about amidation is available. However, it was demonstrated that the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lacks the ability to amidate proteins (Rourke et al., 1997). It is, therefore, possible that the recombinant Pem-CHHs expressed in *P. pastoris* may have free C-terminus and, as a consequence, exhibited lower hyperglycemic activity than that of the natural hormones.

Although the eyestalk has long been known as a source for CHH production (Kleinholz et al., 1967), the results of RT-PCR showed that *Pem-CHH1*, *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* were also expressed in the heart. CHH-like peptides originated from pericardial organ neurosecretory cells, so-called PO-CHH, have been found in the crab *Carcinus maenas* (Dirksen et al., 2001). The PO-CHH and the CHH from sinus gland in this species arise by alternative splicing of the same mRNA precursor. As a consequence, these two types of CHH have the same amino acid sequences in the N-terminal part but are different at the C-terminus. In addition, PO-CHH did not exhibit hyperglycemic activity. In this study, the nucleotide sequence of the *Pem-CHH* transcript from the heart is identical to that of the sinus gland-derived CHH (data not shown). However, physiological roles of CHH synthesized from the heart of *P. monodon* remain to be elucidated. Interestingly, the transcripts of *Pem-CHH1* were also detected in the gill. In the other experiments, the RT-PCR product from the gill was also observed for *Pem-CHH3* (data not shown). Although there has been no report on the gill-associated CHH in other species so far, the CHH isolated from the sinus gland of the crab *Pachygrapsus marmoratus* was demonstrated to be involved in the control of gill ion transport (Spanings-Pierrot et al., 2000). It is possible that the CHH originated from the gill may be a major factor that contributes to the control of osmoregulation. However, its physiological role needs further investigation.

In summary, cDNAs encoding two additional CHH of *P. monodon*, so-called *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3*, were cloned and characterized. The recombinant proteins expressed from *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* cDNAs in *P. pastoris* were biologically active and exhibited hyperglycemic activity at a level comparable to that of *Pem-CHH1*. Furthermore, expression study of the three *Pem-CHH* genes in different tissues of *P. monodon* showed that transcription of *Pem-CHH1*, *Pem-CHH2* and *Pem-CHH3* was not only restricted to the eyestalk but also occurred in the gill and the heart. This result implies that CHH may play multi-functional roles and thus supports the evidences provided by several workers. Functional study of these tissue-specific CHHs will provide an inference for clearer understanding of the physiological roles of this pleiotropic hormone.

Acknowledgements

the

This work was supported by Thailand Research Fund (TRF). AU is the TRF research scholar. [58]

References

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chang, E.S., 1997. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.-F. (Eds.), *Endocrinology and Reproduction. Recent Advances in Marine Biotechnology*, vol. 1. Science Publishers, New Hampshire, USA, pp. 163-178.
- Charmanier, G., Charmanier-Daures, M., Van Herp, F., 1997. Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.-F. (Eds.), *Endocrinology and Re-*

- production. Recent Advances in Marine Biotechnology, vol. 1. Science Publishers, New Hampshire, USA, pp. 109–161. 298
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Jansen, K.P.C., Aiken, D.E., Van Herp, F., 1994. Involvement of 299
- cystalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster, *Homarus amer-* 300
- icanus*. Gen. Comp. Endocrinol. 94, 281–293. 301
- Chung, J.S., Wilkinson, M.C., Webster, S.G., 1998. Amino acid sequences of both isoforms of crustacean 302
- hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus*. Regul. Pept. 303
- 77, 17–24. 304
- Cooke, J.M., Sullivan, R.E., 1982. Hormones and neurosecretion. In: Bliss, D.E. (Ed.), The Biology of Crustacea, 305
- vol. 3. Academic Press, New York, USA, pp. 205–290. 306
- Davey, M.L., Hall, M.R., Willis, R.H., Oliver, R.W., Thum, M.J., Wilson, K.J., 2000. Five crustacean hyper- 307
- glycemic family hormones of *Penaeus monodon*: complementary DNA sequence and identification in single 308
- sinus glands by electrospray ionization–fourier transform mass spectroscopy. Mar. Biotechnol. 2, 80–91. 309
- De Kleijn, D.P.V., Janssen, K.P., Mortens, G.J., Van Herp, F., 1994. Cloning and expression of two crustacean 310
- hyperglycemic hormone mRNAs in the cystalk of the crayfish *Orconectes limosus*. Eur. J. Biochem. 224, 311
- 623–629. 312
- De Kleijn, D.P.V., de Leeuw, E.P.H., Van Den Berg, M.C., Martens, G.J.M., Van Herp, F., 1995. Cloning and 313
- expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in 314
- the lobster *Homarus americanus*. Biochim. Biophys. Acta 1260, 62–66. 315
- Dirksen, H., Bocking, D., Heyn, U., Mandel, C., Chung, J.S., Baggerman, G., 2001. Crustacean hyperglycemic 316
- hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory 317
- cells in the crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. Biochem. 318
- J. 356, 159–170. 319
- Endo, H., Nagasawa, H., Watanabe, T., 2000. Isolation of a cDNA encoding a CHH-family peptide from the 320
- silkworm *Bombyx mori*. Insect. Biochem. Mol. Biol. 30, 355–361. 321
- Gu, P.-L., Chan, S.-M., 1998. The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple 322
- copies of genes arranged in a cluster. FEBS Lett. 441, 397–403. 323
- Gu, P.-L., Yu, K.L., Chan, S.-M., 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic 324
- hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. FEBS 325
- Let. 472, 122–128. 326
- Huberman, A., Aguilar, M.B., Brew, K., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., 1993. Primary structure of the major 327
- isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish 328
- Procambarus bouvieri* (Ortmann): interspecies comparison. Peptides 14, 7–16. 329
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K., Nagasawa, H., 2002. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the 330
- folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. Peptide 23, 1537–1546. 331
- Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J., Keller, R., 1989. Amino acid sequence of the 332
- crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*. FEBS Lett. 255, 10–14. 333
- Kegel, G., Reichwein, B., Teasen, C., Keller, R., 1991. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic 334
- hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: emergence of a novel neuropeptide family. Peptides 335
- 12, 909–913. 336
- Keller, R., 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. Experientia 48, 337
- 439–448. 338
- Khayat, M., Yang, W.-J., Aida, K., Nakasawa, H., Tietz, A., Funkenstein, B., Lühzens, E., 1998. Hyperglycemic 339
- hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated ovarian fragments of the marine shrimp 340
- Penaeus semisulcatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 110, 307–318. 341
- Kleinholz, L.H., Kimball, F., McGarvey, M., 1967. Initial characterization and separation of hyperglycemic 342
- (diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk. Gen. Comp. Endocrinol. 8, 75–81. 343
- Lucombe, C., Greve, P., Martin, G., 1999. Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic 344
- hormone family. Neuropeptides 33, 71–80. 345
- Marco, H.G., Brandt, W., Stoeva, S., Voelter, W., Gade, G., 2000. Primary structures of a second hyperglycemic 346
- peptide and of two truncated forms in the spiny lobster, *Jasus lalandii*. Peptides 21, 19–27. 347
- Meredith, J., Cheng, N., Little Ford, D., Ring, M., Audsley, N., Brock, H., Phillips, J.E., 1995. Amino acid 348
- sequence of locust ion transport peptide (ITP). FASEB J. 9, A355. 349
- 350

- Martin, G., Keller, R., Kegel, G., Besse, G., Jaros, P.P., 1984. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcelio dilatatus*: I. Isolation and characterization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55, 208-216. 351-352
- Rourke, L.J., Johnsen, A.H., Din, N., Petersen, J.G.L., Rehfeld, J.F., 1997. Heterologous expression of human cholecystokinin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 9720-9727. 353-354
- Santos, E.A., Nery, L.E.M., Keller, R., Goncalves, A.A., 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol. Zool.* 70, 415-420. 355-356
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyeux, D., Charmanier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Spanings-Pierrot, C., 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J. Exp. Biol.* 206, 979-988. 357-359
- Sithigorngul, W., Jaidechoey, S., Sarathongkum, 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, 217-224. 360-362
- Spanings-Pierrot, C., Soyeux, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skarset, G., Grousset, E., Charmanier, G., 2000. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus murmuratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 340-350. 363-365
- Tensen, C.P., De Kleijn, D.P.V., Van Herp, F., 1991. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Eur. J. Biochem.* 200, 103-106. 366-367
- Treeratrakool, S., Udomkit, A., Sonthayanon, B., Panyim, S., 2003. Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*. *Mar. Biotechnol.* (in press). 368-369
- Udomkit, A., Chooluck, S., Sonthayanon, B., Panyim, S., 2000. Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GiH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 244, 145-156. 370-372
- Wainwright, G., Webster, S.G., Wilkinson, M.C., Chung, J.S., Rees, H.H., 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*: involvement in multi-hormonal regulation of growth and reproduction. *J. Biol. Chem.* 271, 12749-12754. 373-375
- Yang, W.-J., Aida, K., Nagasawa, H., 1997. Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides* 18, 479-485. 376-377
- Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T., Naya, Y., 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoisomerism and diverse function. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 387-398. 378-380

O-Shrimp-08

Expression of growth-related peptide, Pem-CMG, of *Penaeus monodon* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*

Supattra Treerattrakool¹, Apinunt Udomkit¹, Lily Eurwilaichitr², Burachai Sonthayanon¹ and Sakol Panyim¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170 Thailand

²Training center of Genetic Engineering and Biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Bangkok, Thailand

Abstract

Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and gonad-inhibiting hormone (GIH) are members of novel peptide family produced from the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of crustaceans. This peptide family plays important roles in controlling several physiological processes such as regulation of growth and reproduction. In this study, the cDNA encoding a peptide related to the CHH/MIH/GIH family (so-called Pem-CMG) of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, was successfully expressed in the yeast *Pichia pastoris* by AOX1 promotor. The recombinant Pem-CMG was secreted into the culture medium using α -factor signal sequence from *Saccharomyces cerevisiae* with an accumulated yield of 150 mg/l in the induction medium. The N-terminus of the recombinant Pem-CMG was determined and the result showed that it was correctly processed. The recombinant Pem-CMG was purified by one-step reverse phase HPLC and was used in biological assay for CHH activity. The recombinant Pem-CMG produced from *P. pastoris* demonstrated the ability to elevate glucose level in the haemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon* suggesting that Pem-CMG possesses the activity of hyperglycemic hormone.

Introduction

The X-organ sinus gland (XOSG) complex located in the optic ganglia in the eyestalk is the major neuroendocrine control center of crustaceans. The major hormone family produced in the XOSG complex is composed of crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and gonad-inhibiting hormone (GIH). Apart from the small quantity presented in nature, the similarity in size and the primary structure of this neuropeptide family limits the isolation and purification of these peptides directly from crustacean eyestalk. Recombinant DNA technology is one of the simplest and fastest methods to obtain large quantities of purified proteins. Recently, the

cDNA sequences encoding peptides in the CHH/MIH/GIH family in *P. monodon* were reported (Udomkit et al., 2000 and Davey et al., 2001). The recombinant protein from one of these cDNA sequences, Pem-CMG, was expressed in *E. coli* expression system (Chooluck, 1999). Unfortunately, The protein was expressed in an insoluble form. To overcome the problems of the complicating downstream processes such as solubilization and renaturation of the recombinant protein, *Pichia pastoris* was chosen to be used as expression system for Pem-CMG in this study because it is an ideal eukaryotic host cell for synthesizing a great deal of heterologous proteins. Moreover, it usually gives higher expression levels and less complicating downstream processes as it has a tendency to produce heterologous protein in a soluble form (Hitzman RA, 1981).

Materials and Methods

Construction of expression plasmid

A DNA fragment containing the coding sequence for mature Pem-CMG was obtained by PCR amplification from the plasmid Pem-CMG-EX2.1 (Chooluck, 1999). The amplified DNA fragment was then cloned into pPICZ α A expression vector resulting in the recombinant plasmid α CMG, which contain the coding sequence for mature Pem-CMG fused in-frame with the α -factor secretion signal of *Saccharomyces cerevisiae* without the double Glu-Ala repeats. The physical map of the recombinant plasmid α CMG was shown in figure 1.

Transformation of Pichia pastoris by electroporation

The recombinant plasmid α CMG was linearized by PmeI, and used for transformation of *Pichia pastoris* strain KM71 by electroporation with the condition: 1.5 kV, 25 μ F and 200 Ω . After addition with 1M sorbitol, the cells were incubated at 30°C without shaking for 1 h, then YEPD was added and the incubation was continued with shaking at 30°C for 2 h. The cells were pelleted and resuspended in 100 μ l sterile distilled water. The cell suspension was spread on YEPD plate containing 100 μ g/ml ZeocinTM, and was incubated for 2-3 days until colonies formed. The transformants were screened for integration of α CMG into the genome by PCR amplification with 5'AOX and 3' AOX primers.

Expression of recombinant α CMG

A single colony of *P. pastoris* KM71 recombinant containing α CMG was inoculated in 5 ml of YEPD and incubated at 30°C with shaking at 250 rpm for 48 h. Then, the cell culture was transferred into 100 ml of fresh BMGY medium and grown in the same condition until the culture reached an OD₆₀₀ of 5 – 6. The cell pellet was harvested and resuspended in BMMY using 1/5 volume of the original culture. Absolute methanol was added to a final concentration of 3% (v/v) to maintain the induction for 3 days. The expressed recombinant Pem-CMG in the culture supernatant was analyzed on 16.5% Tricine SDS-PAGE and the amino acid sequence at the N-terminus was determined by N-terminal sequencing.

Purification of recombinant α CMG

After three days of induction, the culture supernatant was subjected to partial purification by precipitation with 30-50% ammonium sulfate and was concentrated by ultrafiltration using the Centriprep® centrifugal filter devices (Amicon® bioseparations). The concentrated partially purified protein was further purified by reverse phase-HPLC on Jupiter Phenomenex C18 column (Phenomenex, 5 μ particle, 300Å pore size, 250 x 4.6 mm). The column was eluted with a linear gradient of 0-10% acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) for 1 min, holding at 10% acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) for 10 min, followed by a linear gradient of 10-60% acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) for 40 min, holding at 60% acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) for 10 min at a flow rate of 1 ml/min. The expected fraction was collected and then freeze dried. The purified protein was dissolved with PBS (137.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1.76 mM KH₂PO₄, pH7.4) and used for biological activity assay.

Biological assay for hyperglycemic activity of recombinant Pem-CMG

Shrimps (16-25 g) were cultured in the tanks filled with seawater (approximately 11 ppt of salinity) at the depth of 8-10 cm with good aeration for 3-4 h. Shrimps were then bilaterally eyestalk ablated with a pair of sharp scissors and the wounds were immediately sealed with hot forceps and returned to the culture conditions.

After bilaterally eyestalk ablated, the shrimps were fasted for 18 h. Ten shrimps were used for each group. One hundred microliters of hemolymph were removed from the individual shrimp for baseline measurement of glucose levels. Five micrograms of purified recombinant Pem-CMG in a volume of 100 μ l was injected into an individual shrimp through the arthrodiol membrane of the second walking leg by a syringe. A volume of 100 μ l of PBS and two eyestalk-equivalent of crude extract was injected in each control group as negative and positive controls, respectively. After

injection, shrimps were returned to the culture tanks, and 100 μ l of haemolymph of the individual shrimp was removed at 0, 0.5, 1 and 1.5 h for measurement of glucose level using the glucose diagnostic kit (Sigma, USA).

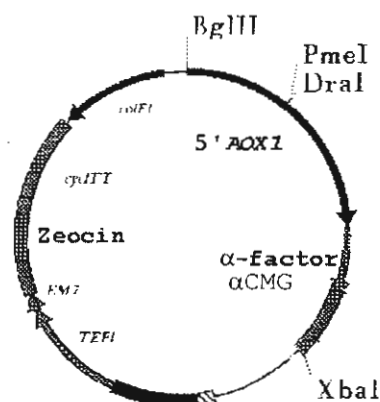


Figure 1. The Physical map of α CMG the recombinant α CMG plasmid contains Pem-CMGcDNA that fused in-frame with the α -factor secretion signal without Glu-Ala repeats, AOX1 promoter and ZeocinTM resistant gene.

Results

Analysis of Pem-CMG expression in *P. pastoris*

An SDS-PAGE analysis of the culture supernatant of α CMG *P. pastoris* transformant showed the major protein product of about 8.3 kDa, which is the expected size for Pem-CMG (Figure 2, lane 1). This protein band was not present in the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing pPICZ α A alone. The N-terminal sequencing of this protein showed that the first five amino acid residues were Ser-Leu-Ser-Phe-Arg corresponding to the deduced amino acid sequence from the Pem-CMG cDNA. The total yield of secreted proteins from *P. pastoris* transformant containing α CMG was 150 mg/l as determined by Bradford's method using Bio-Rad Protein Assay kit.

Purification of recombinant Pem-CMG

Partial purification by ammonium sulfate precipitation was successful in removing some impurities from the culture supernatant of *P. pastoris* transformant containing α CMG as shown in figure 2 (lane 2). The RP-HPLC elution profile of the partially purified Pem-CMG and the result of Tricine SDS-PAGE (Figure 2A and 2B) showed that the protein of the expected size for Pem-CMG was eluted at 31 minutes.

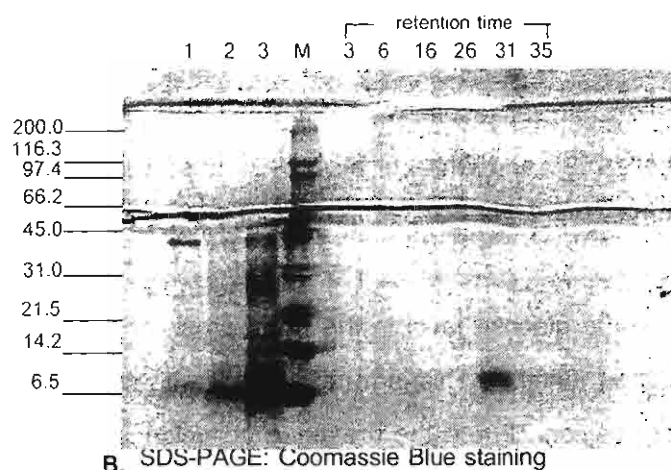
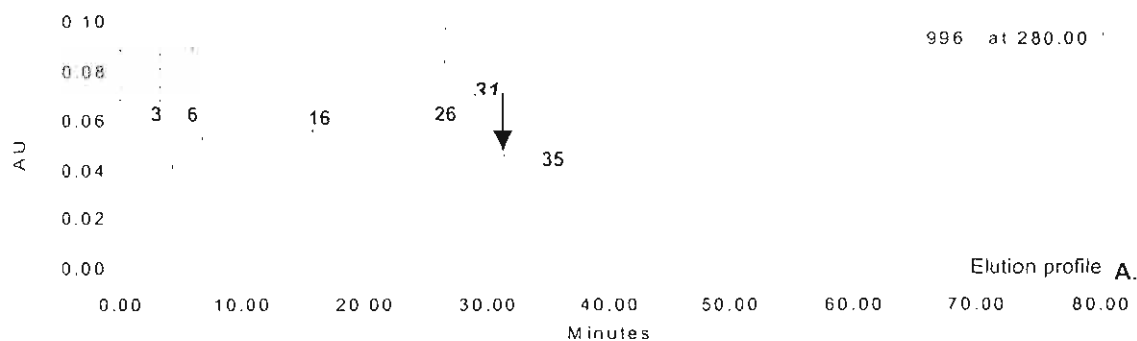


Figure 2. Purification of recombinant Pem-CMG. Panel A shows the chromatogram pattern of partially purified recombinant Pem-CMG by HPLC observed at the wavelength of 280 nm. Panel B shows a Tricine SDS-PAGE of 3 μ g of the culture supernatant (Lane 1), 3 μ g of the partially purified Pem-CMG from 30-50% ammonium sulfate precipitation (Lane 2), 10 μ g of the concentrated partially purified by ultrafiltration (Lane 3) and the purified fractions of Pem-CMG by using HPLC at the retention time of 3, 6, 16, 26, 31 and 35.

Hyperglycemic activity of recombinant Pem-CMG

The result of an assay for hyperglycemic activity showed that injection of two eyestalk-equivalent protein extract of *P. monodon* raised the haemolymph glucose level of eyestalk-ablated *P. monodon* to about 5 mg/dl. The purified recombinant Pem-CMG also had an ability to elevate haemolymph glucose level after injection into eyestalk-ablated *P. monodon* to a level of about 3 mg/dl whereas injection of PBS had no effect on glucose level in the haemolymph (Figure 3).

Discussion

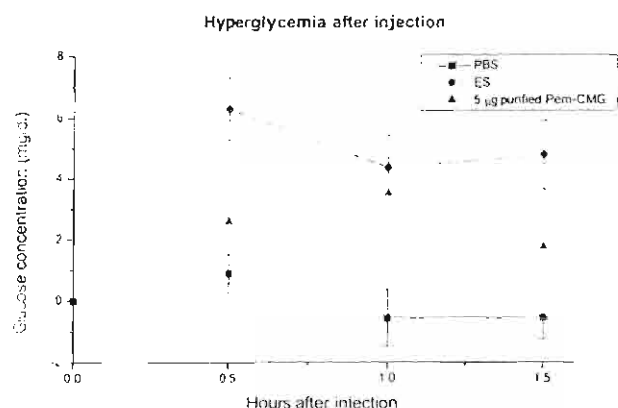


Figure 3. Biological assay of purified recombinant Pem-CMG in *P. monodon*. Effect of purified recombinant Pem-CMG on haemolymph hyperglycemic activity. The Y-axis indicates the increase in haemolymph glucose level (mg/dl) and the X-axis represents the time of haemolymph sampling after 0, 0.5, 1.0 and 1.5 h.

The recombinant Pem-CMG was successfully expressed as secreted peptide in *P. pastoris*. The result of N-terminal sequencing revealed that the N-terminus of the recombinant Pem-CMG was correctly processed by KEX2 enzyme regardless of the absence of the Glu-Ala repeats downstream of its cleavage site. Our result demonstrates an example in which the Glu-Ala repeats are not necessary for KEX2 cleavage. Similar result was obtained with the expression of ASP2 in *P. pastoris*. (Briand L et al., 1999).

Reverse phase HPLC was used for purification of Pem-CMG. The denaturing condition in the purification step did not seem to affect the structure, and hence, the biological activity of Pem-CMG as the protein was still active after purification. Similar results were observed with the purified CHH and MIH in other species (Sithigorngul et al., 1999 and Ohira et al., 1999). It is possible that the peptides can tolerate the denaturing environment because their structure was held by the three disulfide bonds that help stabilizing the proteins.

The recombinant Pem-CMG could elevate the glucose level in the hemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon* suggesting that it possess CHH function. This is in agreement with its primary structure i.e. the lack the amino acid glycine at position 12 and the presence of amidation signal, GK at the C-terminus, which are the characteristics of most CHH characterized so far.

Although, CHH's major function is to regulate glucose metabolism, recent studies indicated that it might also play a role in the regulation of reproduction and molting cycle (De Kleijn et al., 1995, Chang ES et al., 1990 and Gu P-L et al., 2000). It is possible that Pem-CMG also serves other functions as MIH and GIH. Therefore, it is of interest to determine other functions of recombinant Pem-CMG peptide, including the ability of Pem-CMG to inhibit the release of ecdysone from Y-organ or vitellogenesis in the ovary of *P. monodon*.

Reference

- Briand L, Perez V, Huet JC, Danty E, Masson C, Pernollet JC. Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 1999;15:362-369
- Chang ES, Prestwich GD, Bruce MJ. Amino acid sequence of peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;171:818-826
- Chooluck S. Cloning and expression of a cDNA encoding growth-related peptide hormone of *Penaeus monodon* in *Escherichia coli* [M.Sc. Thesis in Molecular genetics - genetic engineering]. Mahidol: Faculty of Graduated studies 1999.

- Davey ML, Hall MR, Willis, Oliver RWA, Thurn MJ, Wilson KJ. Five crustacean hyperglycemic family hormones of *Penaeus monodon*: complementary DNA Sequence and Identification in single sinus gland by electrospray ionization-fourier transform mass spectrometry. Mar Biotechnol 2001;2:80-91.
- De Kleijn DPV, De Leeuw EPH, Van Den Berg MC, Martens GJM, Van Herp F. Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. Biochimica et Biophysica Acta. 1995; 1260:62-66.
- Gu P-L, Yu KL, Chan S-M. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. FEBS Letters. 2000;472:122-128.
- Hitzeman RA, Hagie FF, Levine HL, Goeddel DW, Ammerer G, Hall BD. Expression of human gene for interferon in yeast. Nature. 1981;293:717-723.
- Ohira T, Nishimura T, Sonobe H, Okuno A, Watanabe T, Nagasawa H, Kawazoe I, and Aida K. Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem. 1999;63(9):1576-1581
- Sithigornkul W, Jaideechoeys S, Sarai thongkum W, Longyant S and Sithigornkul P. Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. J Exp Zool. 1999; 284:217-224.
- Udomkit A, Chooluck S, Sonthayanon B, Panyim S. Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. J Exp Mar Biol Ecol. 2000;224:145-156.

Molecular cloning and expression of a putative molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*.

Supansa Yodmuang, Apinunt Udomkit, Burachai Sonthayanon, Sakol Panyim

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

Abstract Growth in Crustacean occurs only when the exoskeleton is removed by a physiological process called molting. Molting is triggered by ecdysteroids that are synthesized and secreted from Y-organ. The synthesis of ecdysteroid is negatively regulated by molt-inhibiting hormone (MIH), a member belonging to the CHH/MIH/GIH peptide family of eyestalk neuropeptides produced by X-organ sinus gland complex (XOSG). In this study, a cDNA encoding the mature region of MIH of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, was obtained by amplification of first stranded cDNA from eyestalk using gene specific primers. This cDNA contained a 231 bp open reading frame encoding a 77 residues of putative mature MIH (Pem-MIH) that shows comparable degree of identity (94%) with the active MIH of *P. jaenicus*. Pem-MIH cDNA was inserted downstream of α -factor secretion signal of pPICZ α A *Pichia pastoris* expression vector under the control of AOX1 promoter. The putative recombinant Pem-MIH, of expected size about 8.5 kDa, was expressed and secreted to culture medium approximately 5 mg/l after induced with 3% (v/v) methanol for 3 days.

Introduction

Molting is a physiological process that plays an important role to remove the old exoskeleton and allows growth in crustaceans to occur. This process is regulated by antagonistic function of two hormones. Ecdysteroid hormone, synthesized from Y-organ, stimulates molt. The activity of ecdysteroids is negatively regulated by the second hormone called molt-inhibiting hormone (MIH). MIH is a neuropeptide belonging to the CHH/MIH/GIH family that is produced by a group of neuroendocrine cells in the X-organ sinus gland complex (XOSG) located in eyestalks. The hormones in this family comprise crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and gonad-inhibiting hormone (GIH) that are involved in blood sugar regulation, inhibition of ecdysteroid synthesis and regulation of reproduction, respectively (Chang, 1993; Huberman, 2000). These hormones consist of 72-90 amino acid residues of their mature peptide and contain six conserved cystein residues at identical positions.

In Thailand, Black tiger prawn (*Penaeus monodon*) is one of the most economically important species that is raised in numerous aquaculture farms along the coast line. One of the problems that most of the shrimp farms are encountering is growth retardation that can be related to molting process. Study of MIH will lead to understanding how the molting process is regulated. This could be the major contribution toward the improvement of black tiger prawn quality. Isolation and purification of MIH from crude eyestalk extracts have some limitations due to the similarity in size and primary structure of the peptides in this family. To avoid this problem, recombinant DNA technology has been employed in order to obtain a large quantity and higher purity of MIH. In 2001, Gu, P.L., et al. cloned a cDNA encoding MIH of *Metapenaeus ensis* (Mee-MIH) and expressed the recombinant Mee-MIH in *E. coli*. Although the bacterial expression system produced the recombinant protein at high level, this protein could not be dissolved and existed as inclusion bodies in the cells. Therefore, to avoid the problem of solubilization and renaturation that are needed to convert protein product into biologically active form, utilization of eukaryotic expression system would be more appropriate as the product should be expressed in its native form. *Pichia pastoris*, an industrial methylotrophic yeast that is capable of metabolizing methanol as its sole carbon source, was chosen as an expression system for the putative molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* (Pem-MIH) in this study.

Material and methods

Amplification of putative mature Pem-MIH cDNA

A cDNA encoding the mature Pem-MIH was obtained by amplification of the first stranded cDNA from eyestalk using gene specific primers MIH-F and MIH-R1 that were designed from the 3' and 5' RACE fragments of Pem-MIH (Fig. 1). The amplification by polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total volume of 50 μ l containing 4 μ l of first stranded cDNA, 0.2 μ M of each primer, 0.2 μ M dNTP, 1.5 mM Mg^{2+} and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Biotool). Amplification was performed in a DNA thermal cycler (GeneAmp System 2400, PE applification Biosystems) with 35 cycles under the following condition: 95 $^{\circ}$ C for 30 seconds, 50 $^{\circ}$ C for 30 seconds and 72 $^{\circ}$ C for 1 minute. The last PCR cycle was followed by a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 7 minutes. One microliter of the resulting PCR product was subjected to a secondary amplification in order to increase the specificity of the amplified product by using gene specific primers MIH-F and MIH-R2.1. The amplification was performed with the same condition as primary amplification.

acagcatccacgccgtctcagggtagaaggctcttcgaqtccggtctccttgggttcatttcc : 62

64 : cccacgattatacaactc**ATGTATCGGCTGGCGATGAAGACATGGCTGGCGATAGTGAATTGTA** : 124
M Y R L A N E T W L A I V I

127 : GTAGTTGGGACAAGCCTCTTCTTTGACACCGCTCGGCC**AGTTTCATAGACGGCACTTGTGGA** : 189
V V G T S L F F D T A S A S F I D G T C R

190 : GCGTAATGGGCAATCGTGACATTTACAAGAAGGTAGTGGGTGTGTGTGAGGATTGCACCAAT : 252
G V M G N R D I Y K E V V R V C E D C T N

253 : ATCTTCGGACTTCCAGGCTTGGACGGC**ATGTGCAGAGATCGG**TGCTTCTACAACGAATGGTTC : 315
I F R L P G L D G M C R D R C F Y N E W F

316 : CTGATTTGTCTAAAGGCTGCCAACAGGGAGGACGAGATCGAAAAATTCAAAGTTTGGATCAGC : 378
L I C L K A A N R E D E I G K F K V W I S

MIH-F

MIH-R2.1

MIH-R1

379 : **ATCCTGAACCGCGGTCACTCA**aggtcgaacgcgacaggactctctccacttgcgaaggcctcgct : 441
I L N A G Q *

442 : cccgcaggccagtagccgacgacatt... (n)

Oligo nucleotide primers

Forward primer EcoRI SalI Kex2 start

MIH-F : 5' CTTCGAATTCGTCGACAAAAGAAGTTTCATAGACGGCAC 3'

Reverse primers

MIH-R1 : 5' GAGCGAGGCCTTGCAAGTGAAGGAG 3'

XbaI stop

MIH-R2.1 : 5' GCGTTCTAGATCACTGACCGGCGTTCAGGATG 3'

Fig. 1 Nucleotide sequence of putative Pem-MIH cDNA derived from the sequence of 5' and 3' RACE fragments (previous work). *The 15 bp overlapping sequence is black shaded. The 315 bp open reading frame is depicted by capital letters. The deduced amino acids are written in one-letter symbols. The mature peptide starts from block arrow. Black arrows represent primers.

Construction of expression vector

A cDNA encoding the mature Pem-MIH fragment was cloned into pPICZαA expression vector by inserting downstream of α-factor secretion signal. In the resulting construct, pPICZαA/MIH (Fig.2), the Pem-MIH cDNA was placed under the control of AOX1 promoter and the expressed product was expected to be secreted into the culture medium by the α-factor secretion signal that contains no Glu-Ala repeats. The construct, pPICZαA/MIH was then transformed into *E. coli* strain DH5α and the recombinant clones were selected on LB agar plate supplemented with 25 µg/ml ZeocinTM. The transformants clones were subjected to PCR

screening and the DNA sequence of the positive clones were determined by the method of ABI PRISM™ using ABI PRISM Model 377 Dye terminator cycle Automate DNA sequencer (PE Applied Biosystems).

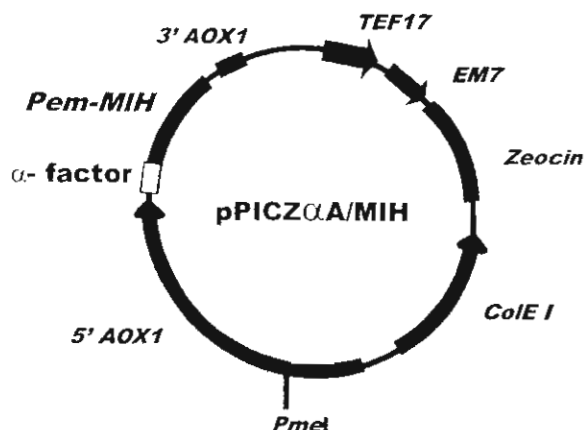


Fig 2. A physical map of pPICZαA/MIH. The recombinant vector contains Pem-MIH cDNA that fused in-frame with the α-factor secretion signal without Glu-Ala repeats. The fusion protein is under the control of 5' AOX1 promoter. TEF1 and EM7 promoter drive expression of the Zeocin™ resistance gene in *Pichia* and *E. coli*, respectively. ColE1 allows replication and maintenance of the vector in *E. coli*.

Transformation of Pichia pastoris by electroporation

The recombinant vector, pPICZαA/MIH, were linearized by *PmeI* within the 5' AOX1 region. About 500 ng of linearized vectors were precipitated, resuspended in 5 μl sterile distill water and subsequently incubated with *P. pastoris* competent cells. The mixture was transfer to an ice-cold 0.2 cm electrocuvette and pulsed by using Bio-Rad Gene Pulser with the condition: 1.5 kV, 2.5 μF and 200 Ω. The transformed reaction was added with 1 ml of 1 M sorbitol and incubated at 30 °C without shaking for 1 h. Then, 1 ml of YEPD was added and the incubation was continued at 30 °C with shaking for 2 h. The *P. pastoris* recombinant were selected on YEPD plate supplemented with 100 μg/ml Zeocin™ and subsequently analyzed for the integration of pPICZαA/MIH into *P. pastoris* genome by using PCR amplification with 5'AOX1 and 3'AOX1 primers.

Small scale expression of recombinants Pem-MIH peptide in P. pastoris.

A single colony of recombinant *P. pastoris* was inoculated in 2 ml YEPD supplemented with 100 μg/ml Zeocin™ at 30 °C with shaking for 72 h. The culture was transferred to 5 ml BMGY medium, starting at OD₆₀₀ = 0.2, and grown at the same condition until OD₆₀₀ reach 5 - 6. In the induction step, the cell pellet was harvested by centrifuge at 5,000 rpm for 5 minutes at room temperature, then resuspended in 1 ml BMMY medium. Absolute methanol was added

to a final concentration of 3% (v/v) every 24 h to maintain the induction for 3 days. To monitor Pem-MIH expression and secretion from the cell, the culture supernatant was analyzed on 16.5% Tricine SDS-PAGE.

Results

Amplification of putative mature Pem-MIH cDNA

By using gene specific primers to amplify the cDNA encoding the mature Pem-MIH, a single band of amplification product was obtained (Fig. 3) and subsequently cloned into pPICZQA expression vector. The nucleotide sequence analysis revealed a 231 bp open reading frame encoding 77 residues of Pem-MIH. The deduced amino acid sequence of Pem-MIH was compared with MIH, GIH and CHH peptide from other crustaceans (Fig. 4). Pem-MIH showed the highest similarity in its structure to that of the processed active MIH of *P. japonicus*, Pej-MIH (Ohira et al., 1997)

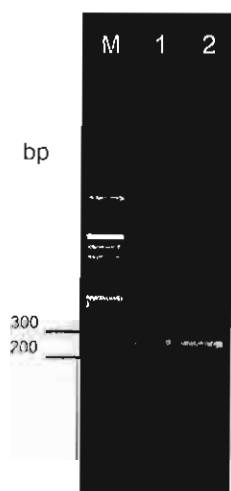


Fig. 3 The PCR products amplified using gene specific primers.

M: 100 bp DNA ladder markers.

Lane 1: Primary amplification using MIH-F and MIH-R1 primers

Lane 2: Secondary amplification using MIH-F and MIH-R2.1

```

      *                               80                               *
Phe-CHH1 : MELICLKAAANREDEIGKPKVWVISILNAGQ- : 77
Arg-CHH1 : MELICLKAAANREDEIEKGRVWVISILNAGQ- : 77 (accession no. T10473)
Arg-CHH1 : MELVOLKAAANRDELDDKSKVWVISILNPLG- : 77 (accession no. 076534)
Phe-SFG1 : MELVOLKAAANREDEIENGRVWVISILNA--- : 75 (accession no. AB054187)
Asn-GIH1 : DELWCVYATERHGEIDGRKWKVVISILRAGRK : 90 (accession no. AAK58133)
Ser-GIH1 : DELWCVYATERHGEIDGRKWKVVISILRAGRK : 80 (accession no. CAA60644)
His-CHH2 : VERQCLDDLLLDVIDEIVSNVQMV----- : 72 (accession no. Q25154)
Pro-CHH1 : VERQCLDDLLLDVVDVEISGVQTVGK--- : 77 (accession no. Q25683)
Met-CHH1 : VERQCMEYLLPAHLHLDVRLAWQV/GK--- : 74 (accession no. BAA88339)
Mal-CHH1 : VERQCQLDLMDQLDEIVANAQVTVGK--- : 74 (accession no. AAC36310)
Phe-CHH1 : VELYCVDYMFPRPRQRNCRYRAALQRLGK--- : 74

```

Fig. 4 Comparison of the amino acid sequence of Pem-MIH peptide with those of *P. japonicus* MIH (Pej-MIH, Ohira et al., 1997), *M. enesis* MIH (Mee-MIH, Gu et al., 2000), *P. monodon* sinus gland peptide (Pem-SPG-C1, Krugkasem et al., 2002), *Nephrops norvegicus* GIH (Nen-GIH, Edomi et al., 2002), *H. americanus* GIH (Hoa-GIH, De Kleijn et al., 1994), *H. americanus* CHHB (Hoa-CHHB, De Kleijn et al., 1995), *Procambarus clarkii* CHH (Prc-CHH, Yasuda-Kamatani et al., 1999), *Masupenaesus japonicus* CHH (Mej-CHH, Ohira et al., 1999), *Macrobrachium lanchesteri* CHH (Mal-CHH, Ju et al., 1998) and *P. monodon* CHH1 (Pem-CHH1, Treerattrakool, 2001). The amino acid residues that are identical to Pem-MIH peptide are highlighted.

Determination of Pem-MIH cDNA integration into *P.pastoris* genome.

The recombinant vector pPICZQA/MIH was linearized with *PmeI* before transformed into *P. pastoris*. Digestion with *PmeI* provides the integration region for Pem-MIH cDNA fragment to integrate into *P. pastoris* genome. *P. pastoris* transformants were firstly screen for ZeocinTM-resistance using YEPD supplemented with 100 µg/ml ZeocinTM plate. Genomic DNA of ZeocinTM transformants were extracted and further identified for integration by PCR analysis using 5' AOX1 and 3' AOX1 primers. PCR screening of ten *P. pastoris* transformants that were transformed with pPCZQA/MIH showed PCR products with the sizes of 754 bp, while a band of 589 bp was observed from transformants containing only pPICZQA expression vector (Fig. 5). These results suggest that the linearized vectors containing Pem-MIH fragment was integrated into the *P. pastoris* genome in all ten clones.

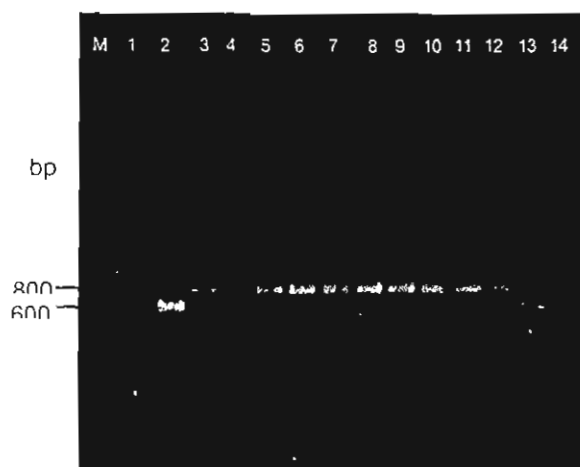


Fig. 5 PCR screening for integration of pPICZ α A recombinant plasmids into the genome of *P. pastoris* transformants.

M: 100 bp DNA ladder markers

Lane 1: PCR product of *P. pastoris* genome

Lane 2: PCR product of transformants containing integrated pPICZ α A vector.

Lane 3 –12: PCR product of transformants containing integrated pPICZ α A/MIH plasmids.

Lane 13: PCR product of pPICZ α A plasmid.

Lane 14: negative control in the absence of DNA template.

Small scale expression of recombinant Pem-MIH

The positive clones that contains Pem-MIH fragment integration were chosen for small scale expression in order to select for the clones that give highest level of expression. These clones were grown in BMGY medium until OD_{600} reach 5-6. To induce the expression, cells were harvested and resuspend in BM containing 1% (v/v) of methanol. The methanol was subsequently added to final concentration of 3 % (v/v) every 24 h. for 3 days. The secreted Pem-MIH expression was detected by 16.5 % Tricine SDS-PAGE as a band at the expected size about 8.4 kDa (Fig. 6). The three highest level expression clones (clone 22, 25 and 28 in lane 7, 9 and 12 respectively) secreted about 5 mg/l of Pem-MIH into culture medium.

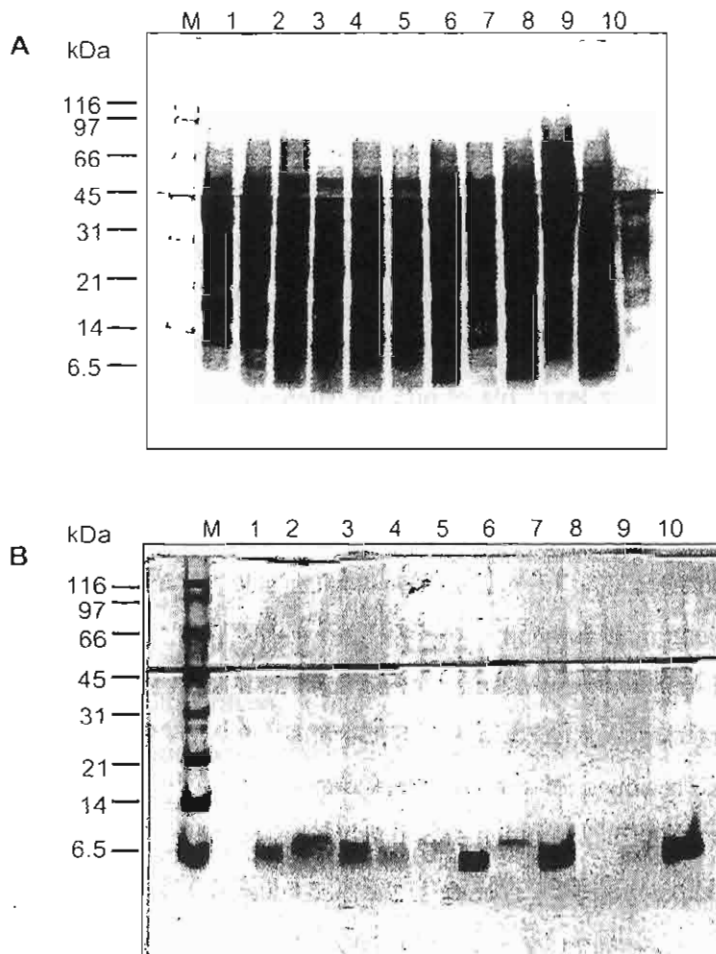


Fig. 6 Tricine SDS-PAGE protein profile of the *P. pastoris* transformants containing pPICZαA/MIH integration. Panel A and B show total lysate OD₆₀₀ = 0.2 and 100 µl culture medium of *P. pastoris* recombinant after methanol induction, respectively.

M : Molecular weight marker

Lane 1: pPICZαA *P. pastoris* transformants

Lane 2: pPICZαA/CHH *P. pastoris* transformants

Lane 3 -12: pPICZαA/MIH *P. pastoris* transformants.

Discussion

The open reading frame of Pem-MIH peptide from *P. monodon* was successfully cloned. The deduced amino acid sequence reveals a putative mature peptide comprising 77 amino acid residues and shares the highest degree of identity with process peptide of MIH of *P. japonicus* (94%). Significant degrees of identity were observed between Pem-MIH and MIH

of *Metapenaeus ensis* (87%), including recently report of *P. monodon* sinus gland peptide (Pem-SGP-C1, 80%). On the contrary, lower degrees of identity were found between Pem-MIH and GIH (47%) and CHH-B (32%) of the american lobster, *Homarus americanus*. Pem-MIH also showed low level of identity (29%) in the amino acid sequences to CHH1 of *P. monodon* (Treerattrakool, 2001)

Chan et al., (1990) has shown that the purified peptide from the sinus gland of *H. americanus* had both MIH and CHH activity. Moreover, Cam-MIH and Pej-SGP-VI were also demonstrated to possess both functions (Webster, 1991 and Yang et al., 1996). This is not surprising as the overlapping activities could be due to structural similarity among the peptides in this family. The high degree of identity between these peptides not only depends on species, but also correlates with a highly conserved function of these hormones. In contrast, the MIH peptide of *P. bouvieri* that share 90% identity in the amino acid sequence with its own CHH does not present any hyperglycemic activity (Aguilar-Gaytan et al., 1997). However, to conclude that Pem-MIH is a molt-inhibiting hormone, physiological study is necessary to clarify whether this hormone can prolong molt duration.

The recombinant Pem-MIH was expressed in *P. pastoris* as a secreted protein with higher yield than the Mee-MIH that was expressed in *E. coli* (Gu et al., 2001). Although the N - terminus of Mee-MIH contains 47 residues of the additional amino acids that could have effect to its biological activity, Mee-MIH significantly extended molt duration of juvenile *M. ensis*. For the recombinant protein expressed in *P. pastoris*, the additional N - terminus peptides of the α -factor secretion signal is removed by KEX2 protease. The cleavage at KEX2 cleavage site could be facilitated by the presence of the juxtaposed downstream Glu-Ala repeats (Romanos et al., 1995). However, the recombinant Pem-CHH1 expressed in *P. pastoris* has been demonstrated to be completely processed by KEX2 protease without the Glu-Ala repeats and also retained biological activity (Treerattrakool, 2001). This result indicates that the cleavage between the α -factor signal sequence and Pem-CHH1 at the KEX2 site did not necessarily require the Glu-Ala repeats. However, the N-terminal region of the secreted Pem-MIH peptide needs to be determined in order to ensure that the α -factor secretion signal was completely cleaved by KEX2 protease in the absence of Glu-Ala repeat. Since the isolation of MIH from eyestalks using HPLC (High - performance liquid chromatography) and other techniques have their limitation, recombinant DNA technology may provide an alternative approach to obtain a large quantity of pure and biologically active protein to study the structural and function relationships of MIH including determination of a precise mechanism of molt inhibition.

Acknowledgements

We thank Ms Supattra Treerattrakool (Prawn Molecular Biology laboratory, Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University) for suggestion in *Pichia pastoris* expression. This study was supported by the Thailand Research Fund (TRF).

References

- Aguilar-Gaytan, R., Cerbon, M.A., Cevallos, M.A., Lizano, M., Huberman, A., 1997. Sequence of a cDNA encoding the molt-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Crustacean, Decapoda). *As. Pac. J. Mol. Biol.* 5, 51-55.
- Chang, E.S., Prestwich, G.D., Bruce, M.J., 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 818-826.
- Chang, E.S., 1993. Comparative endocrinology of molt and reproduction: insects and Crustaceans. *Ann. Rev. Entomol.* 38, 161-180.
- De Kleijn, D.P.V., Sleutels, F.J., Martens, G.J.M., Van Herp, F., 1994b. Cloning and expression of two mRNA encoding preprogonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Lett* 353, 255-258.
- De Kleijn, D.P.V., De Leeuw, E.P.H., Van den Berg, M.G., Martens, G.J.M., Van Herp, F., 1995. Cloning and expression of two mRNA encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1263 (1), 62-66.
- Edomi P., Azzoni, E., Mettullo, R., Pandolfelli, N., Ferreno, E.A., Giulianini, P.G., 2002. Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization. *Gene* 248 (1-2), 93-102.
- Gu, P.L., Chu K.H., Chan, S.M., 2000. Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell. Tissue. Res.* 303, 129-136.
- Huberman, A., 2000. Shrimp endocrinology. A review *Aquaculture*. 1991, 191-208.
- Ju, B., Khoo, H.W., Direct Submission. Submitted (30-AUG-1998) Biological Sciences, National University of Singapore, Lower Kent Ridge Road, Singapore 117600, Republic of Singapore.
- Ohira, T., Watanabe, T., Aida, K., Nagasawa, H. 1999. Crustacean hyperglycemic hormone of kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Published Only in DataBase.

- Romanos, M.A., Scorer C.A., Clare J.J., 1995. Expression of cloned gene in yeast. In: Glover, D.M., Hames, B.D., eds. A practical approach series: DNA cloning II. Expression system. 2nd. New York: Oxford University, 123-165.
- Treerattrakool, S., 2001. Expression of Pem-CMG of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris* and analysis of its biological activity. (M. Sc. Thesis in Molecular genetics engineering). Mahidol: Faculty of Graduated studies.
- Webster, S.G., 1991. Amino acid sequence of putative molt-inhibiting hormone from crab, *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 244, 247-252.
- Yang, W.J., Aida, K., Terauchi, A., Sonobe, H., Nakasawa, H., 1996. Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*. *Peptide.* 17, 197-202.



บทคัดย่อ ABSTRACTS

การประชุมวิชาการ

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 29

20-22 ตุลาคม 2546

ณ ศูนย์ประชุมเนกประสงค์กาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยขอนแก่น

29th Congress on Science and Technology of Thailand

20-22 October 2003

Golden Jubilee Convention Hall, Khon Kean University



สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
THE SCIENCE SOCIETY OF THAILAND UNDER THE PATRONAGE
OF HIS MAJESTY THE KING



คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
FACULTY OF SCIENCE
KHON KAEU UNIVERSITY

การศึกษาลักษณะและหน้าที่ของ PUTATIVE MOLT-INHIBITING HORMONE ในกุ้งกุลาดำ
MOLECULAR CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ASSAY
OF A PUTATIVE MOLT-INHIBITING HORMONE OF PENAEUS MONODON

สุพรรณษา ยอดเมือง, อภินันท์ อุดมกิจและ สกล พันธุ์ยิ้ม.

Supansa Yodmuang, Apinunt Udomkit, Sakol Panyim

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

g4436434@student.mahidol.ac.th

บทคัดย่อ: การเจริญเติบโตของสัตว์จำพวก ครัสเตเชียน ต้องอาศัยกระบวนการทางสรีรวิทยาที่เรียกว่า กระบวนการลอกคราบ ซึ่งถูกกระตุ้นโดย ecdysteroid ที่สังเคราะห์มาจาก Y-organ การสร้าง ecdysteroid จะถูกควบคุมโดย molt-inhibiting hormone (MIH) ที่ผลิตโดยกลุ่มประสาทบริเวณ ก้านตาที่เรียกว่า X-organ sinus gland complex (XOSG) ชิ้น cDNA ของ mature MIH ในกุ้ง กุลาดำ (*Penaeus monodon*) ถูกโคลนและนำไปแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* โปรตีนลูกผสม Pem-MIH ที่ผลิตได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี size exclusion chromatography และเมื่อ ทดสอบหน้าที่ของ Pem-MIH ในกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งที่ได้รับ Pem-MIH จะใช้เวลาในการเกิดการลอก คราบครั้งต่อไปนานกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโปรตีนลูกผสมที่ได้จาก การทดลองนี้คือ molt-inhibiting hormone

Abstract: Growth in Crustacean occurs only when the exoskeleton is removed by a physiological process called molting. Molting is triggered by ecdysteroids that are synthesized and secreted from the Y-organ. The synthesis of ecdysteroids is negatively regulated by molt-inhibiting hormone produced by X-organ sinus gland complex (XOSG) in the eyestalk. A cDNA encoding the mature region of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* (Pem-MIH) was cloned. Recombinant protein of the expected size for MIH was expressed from Pem-MIH cDNA in the yeast *Pichia pastoris*. The recombinant Pem-MIH was purified by size exclusion chromatography. Biological activity assay revealed that recombinant Pem-MIH could significantly prolong the molt duration of *P. monodon* suggesting it function as a molt-inhibiting hormone.

Key word: MIH, molt duration, Black tiger shrimp

Methodology: 1. Cloning of a cDNA encoding the mature molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* (Pem-MIH). Total RNA from optic ganglia was used as a template to synthesize the first strand cDNA by using an oligo-dT primer and Superscript™ II reverse transcriptase (Gibco-BRL). The resulting first strand cDNA was subjected to PCR amplification by gene specific primers, MIH-F and MIH-R2.1. The PCR product was subsequently clone and its nucleotide sequences determined. 2. Expression of recombinant Pem-MIH peptide. The cDNA encoding Pem-MIH was ligated to pPICZαA expression vector downstream of α-factor secretion signal. The resulting plasmid, αMIH-EX was *Pme* I endonuclease before transformed into a methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. The recombinant clones were determined for the integration of αMIH-EX into *P. pastoris* genome by using PCR amplification with 5'AOX1 and 3'AOX1 primers. A single colony of recombinant *P. pastoris* was grown in BMGY Medium at 30 °C with

shaking until OD₆₀₀ reach 5-6. The cell pellets were then harvested and resuspended in 1/5 volume in BMMY medium. The expression was induced by the addition of absolute methanol to a final concentration of 3% (v/v) every 24 h for 5 days. The secreted protein in the culture supernatant was determined by 16.5% SDS-PAGE and the recombinant Pem-MIH was purified on Superdex 75 column (Amersham pharmacia biotech).

3. In vivo bioassay of Pem-MIH. Individual live black tiger shrimps (13.5-14 gm each) were maintained in 10 ppt aerated artificial seawater in separate compartments. Shrimps were allowed to molt once and leaved for 3 days before injected with 5 µg purified Pem-MIH. Shrimps in control group were received an equal volume of PBS injection. Molt duration was determined by the time that the shrimps took for completing the next round of molting.

Results, Discussion and conclusion: The total RNA from of a shrimp was used as a template for cDNA cloning in order to exclude polymorphism among individuals. A PCR product of the expected size of 231 bp encoding 77 amino acids was obtained. The deduced amino acid sequences from the cDNA share the highest degree of identity (94%) with the processed peptide of MIH of *P. japonicus*. Significant degree of identity was observed between Pem-MIH and MIH of *Metapenaeus ensis* (87%). Pem-MIH also shares 29% identity to crustacean hyperglycemic hormone1 of *P. Monodon* (Pem-CHH1) previously shown to have the ability to elevate haemolymph glucose level. A peptide purified from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus* had been shown to processes both MIH and CHH activity. It is not surprising that overlapping activities were due to closely related structures among peptides in this family. Typically six cysteine residues are conserved an identical positions in all of these hormones. Determination of the molting period showed that molting took place within a duration of 11.8 ± 1.48 days for the *P. monodon* infected with PBS. In the biological assay for MIH activity of the recombinant Pem-MIH, the length of molt duration was significantly extended to 16.29 ± 1.98 days for shrimps injected with purified recombinant Pem-MIH. There was no significant difference in the molt cycle duration for shrimp injected with crude eyestalk extract compared to shrimp injected with purified Pem-MIH. These results suggested that Pem-MIH function to prolong the molt duration, and thus are considered as a molt-inhibiting hormone of *P. monodon*.

References:

- Chang, E.S., Prestwich, G.D., Bruce, M.J., 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. Biochem Biophys, Res. Commun. 171, 818-826.
- Gu, P.L., Chu K.H., Chan, S.M., 2000. Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. Cell. Tissue. Res. 303, 129-136.
- Treerattrakool, S., 2001. Expression of Pem-CMG of *Penaeus monodon* in *Pichai pastoris* and analysis of its biological activity. (M. Sc. Thesis in Molecular genetics engineering). Mahidol: Faculty of Graduated studies.
- Yang, W.J., Aida, K., Terauchi, A., Sonobe, H., Nakasawa, H., 1996. Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*. Peptide. 17, 197-202.

การยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเพิ่มระดับน้ำตาล (CHH) ในกุ้งกุลาดำ โดยแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม Pem-CHH 1

THE INHIBITORY EFFECT OF ANTI-rPem-CHH 1 ANTIBODY ON THE ACTIVITY OF CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE (CHH) IN *Penaeus monodon*.

สุพัตรา ตรีรัตน์กระกุล, อภินันท์ อุดมกิจ และ สกอล พันธุ์อิม.

Supattra Treerattrakool, Apinunt Udomkit and Sakol Panyim.

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand; e-mail address: staud@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ : Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่สร้างจากเซลล์ประสาทหลังสารของ X-organ ในก้านตาของสัตว์จำพวกครัสเตเชียน CHH ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของไข่ในระบบสืบพันธุ์ ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการโคลนนิ่ง และ หน้าที่ของ CHH ในกุ้งกุลาดำ (Pem-CHH) ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ในการศึกษานี้ได้ทำการสร้างโปรตีนลูกผสม CHH 1 ของกุ้งกุลาดำ (rPem-CHH 1) ในระบบของแบคทีเรีย และนำมาใช้ในการสร้างแอนติบอดีในหนู แอนติบอดีที่สร้างได้มีความจำเพาะต่อ rPem-CHH 1 จากการศึกษ พบว่าแอนติบอดีต่อ rPem-CHH 1 ยังยังสามารถใช้ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด ของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งกุลาดำได้ประมาณ 50 % นอกจากนี้ แอนติบอดีต่อ rPem-CHH 1 ยังสามารถยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน CHH ในกุ้งกุลาดำ ได้ประมาณ 15-20%.

Abstract: Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), produced from the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of crustaceans, is responsible for glucose level in the haemolymph and also plays role in ovarian development. The cloning and characterization of recombinant CHH 1 of *Penaeus monodon* (rPem-CHH 1) has been previously reported. In this study, large quantity of rPem-CHH1 was obtained by expression in bacterial expression system, and was used for antibody production in mice. The antibody obtained showed specificity to rPem-CHH1. This anti-rPem-CHH 1 antibody reduced the ability to elevate the haemolymph glucose level of the eyestalk crude extract to about 50 %. Moreover, the antibody could also inhibit about 15-20% of the activity of the natural CHH in *P. monodon*.

Methodology: 1 Expression and Purification of rPem-CHH 1. Using *E. coli* expression system, the rPem-CHH 1 protein was expressed after induction with 0.4 mM IPTG for 4 h. The inclusion form of rPem-CHH 1 was solubilized in 8M Urea/PBS (pH 7.4). The soluble protein was subsequently purified by size-exclusion chromatography. 2 Antibody production against rPem-CHH 1. The purified rPem-CHH 1 was transferred to a buffer containing 0.2% (w/v) SDS in PBS, pH 7.4 by Centriplus YM-3 column (Millipore, USA). The female mice (BALB/C) were immunized with the mixture between 100 µg of purified rPem-CHH 1 and complete Freud's adjuvant (Sigma). Subsequently the antibody production was boosted with the mixture between 100 µg of purified rPem-CHH 1 and incomplete Freud's adjuvant in the second and third injections. The antiserum of whole blood from the heart was determined for its sensitivity and specificity, and used in biological assay. 3 Biological assay for inhibitory effect of anti-rPem-CHH 1 antibody on CHH activity. 3.1 One pair-equivalent of eyestalk crude extract was pre-incubated with anti-rPem-CHH 1 antibody in a final dilution of 1:500 at 4°C for 2 h. This solution was injected into ten individual starved eyestalk-ablated *P. monodon* through the arthodial membrane of the second walking leg. For the negative and positive control groups, each individual shrimp was injected with 100 µl of PBS and one pair-equivalent of eyestalk crude extract, respectively. 3.2 Anti-rPem-CHH 1 antibody (1:500) was injected into twenty individual normal shrimps while the control group was injected with 100 µl of PBS. The glucose level in the haemolymph of individual shrimp in 3.1 and 3.2 were determined at 0, 0.5, 1, 1.5 h after injection using a glucose diagnostic kit (Sigma).

Results, Discussion and Conclusion: The rPem-CHH 1 protein was expressed as inclusion bodies. Generally, inclusion bodies can be solubilized in high concentration of denaturant such as urea or guanidine-HCl. In this study, the inclusion bodies of rPem-CHH 1 were solubilized in 8M urea/PBS (pH 7.4). The soluble fraction was purified by size-exclusion FPLC chromatography. This purification could remove all contaminated protein from rPem-CHH 1. The urea in the buffer was removed by replacing with 0.2% (w/v) SDS in PBS, pH 7.4 in Centriplus YM- 3 column. The low concentration of SDS would increase solubility of rPem-CHH 1. The final yield of purified rPem-CHH 1 was 12 mg/L of the culture medium as determined by Bradford's method using the Bio-Rad Protein Assay kit. Mouse antiserum was raised against purified rPem-CHH1. The sensitivity of anti-rPem-CHH 1 antibody was determined by dot blot analysis. Five nanograms of purified rPem-CHH could be detected by a 1:20,000 dilution of the antibody. Anti-rPem-CHH 1 antibody specifically recognized CHH. The ability to elevate the haemolymph glucose level of the eyestalk crude extract decreased dramatically (50%) after pre-incubated with the antibody suggesting that the binding of antibody to CHH in the eyestalk extract can inhibit its hyperglycemic activity. Moreover, *P. monodon* injected with anti-rPem-CHH 1 antibody exhibited about 15-20 % decrease in hyperglycemic activity suggesting that anti-rPem-CHH 1 antibody could also inhibit the activity of the natural CHH in *P. monodon* at some extent.

Reference: (1) Udomkit, A., Chooluck, S., Sonthayanon, B., and Panyim, S. 2000. J. Exp. Mar. Biol. Eco. 224, 145-156.

(2) Treerattrakool, S., Udomkit, A., Eurwilaichitr, L., Sonthayanon, B., and Panyim, S. Mar. Biotechnol. (In Press).

Keywords: Antibody, Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), *Penaeus monodon*.

THE INHIBITORY EFFECT OF ANTI-rPem-CHH I ANTIBODY ON THE ACTIVITY OF CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE (CHH) IN *Penaeus monodon*.

Supattra Treeratrakool, Apunant Udomkit* and Sakol Panyim
Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand



Abstract

Crustacean hyperglycemic hormone (CHH), produced from the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of crustaceans, is responsible for glucose level in the haemolymph and also plays role in ovarian development. The cloning and characterization of recombinant CHH I of *Penaeus monodon* (rPem-CHH I) has been previously reported. In this study, large quantity of rPem-CHH I was obtained by expression in bacterial expression system, and was used for antibody production in mice. The antibody obtained showed specificity to rPem-CHH I. This anti-rPem-CHH I antibody reduced the ability to elevate the haemolymph glucose level of the eyestalk crude extract to about 50 %. Moreover, the antibody could also inhibit about 15-20% of the activity of the natural CHH in *P. monodon*.

Introduction

A novel peptide family in crustaceans comprising the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH) and gonad-inhibiting hormone (GIH) is produced in and released from the major neuroendocrine control center in the eyestalk called X-organ sinus gland (XOSG) complex. CHH is the most abundant eyestalk hormone, and the biological assay for its activity is well-established (1,2). In addition to its principle function in blood glucose regulation (3), it is also involved in ovarian development (4). In *Penaeus monodon*, a cDNA encoding CHH has been identified and characterized (5). The expressed recombinant protein from this cDNA showed the ability to elevate glucose level in the haemolymph of eyestalk-ablated *P. monodon* (6). In this work, large quantity of recombinant Pem-CHH I (rPem-CHH I) was obtained and used for antibody production in mice. The inhibitory effect of anti-CHH I antibody on CHH activity was investigated.

Methodology

1. Expression and Purification of rPem-CHH I

1.1. *Escherichia coli* expression system, the rPem-CHH I protein was expressed after induction with 0.4 mM IPTG for 4 h. The inclusion form of rPem-CHH I was solubilized in 8M Urea/PBS (pH 7.4). The soluble protein was subsequently purified by size-exclusion chromatography.

2. Antibody production against rPem-CHH I

The purified rPem-CHH I was transferred to a buffer containing 0.2% (w/v) SDS in PBS, pH 7.2 by Centrplus YM-3 column (Millipore, USA). The female mice (BALB/C) were immunized with the mixture between 100 µg of purified rPem-CHH I and complete Freund's adjuvant (Sigma). Subsequently the antibody production was boosted with the mixture between 100 µg of purified rPem-CHH I and incomplete Freund's adjuvant in the second and third injections. The titer of whole blood serum was determined for its sensitivity and specificity, and used in biological assay.

3. Biological assay for inhibitory effect of anti-rPem-CHH I antibody on CHH activity

3.1. One µl equivalent of eyestalk crude extract was pre-incubated with anti-rPem-CHH I antibody in a final dilution of 1:500 at 4°C for 2 h. This solution was injected on the individual starved eyestalk-ablated *P. monodon* through the arthrodial membrane of the second walking leg. For the negative and positive control groups, each individual shrimp was injected with 100 µl of PBS and one µl equivalent of eyestalk crude extract, respectively.

3.2. Anti-rPem-CHH I antibody (1:500) was injected into twenty individual normal shrimps while the control group was injected with 100 µl of PBS.

The glucose level in the haemolymph of individual shrimp in 3.1 and 3.2 were determined at 0, 10, 30, 60, 90, 120 min after injection using a glucose diagnostic kit (Sigma).

Results and Discussion

The rPem-CHH I protein was expressed as inclusion bodies. Generally, inclusion bodies can be solubilized in high concentration of denaturant such as urea or guanidine-HCl. In this study, the inclusion bodies of rPem-CHH I were solubilized in 8M urea/PBS (pH 7.4). The soluble fraction was purified by size-exclusion FPLC chromatography. This purification could remove all contaminated protein from rPem-CHH I (Figure 1). The urea in the buffer was removed by replacing with 0.2% (w/v) SDS in PBS, pH 7.4 in Centrplus YM-3 column. The low concentration of SDS would increase solubility of rPem-CHH I. The final yield of purified rPem-CHH I was 12 mg/L of the culture medium as determined by Bradford's method using the Bio-Rad Protein Assay kit. Mouse antiserum was raised against purified rPem-CHH I. The sensitivity of anti-rPem-CHH I antibody was determined by dot blot analysis. Five nanograms of purified rPem-CHH I could be detected by a 1:20,000 dilution of the antibody (Figure 2). Anti-rPem-CHH I antibody specifically recognized CHH (Figure 3). The ability to elevate the haemolymph glucose level of the eyestalk crude extract decreased dramatically (50%) after pre-incubation with the antibody suggesting that the binding of antibody to CHH in the eyestalk extract can inhibit its hyperglycemic activity (Table 1). Moreover, *P. monodon* injected with anti-rPem-CHH I antibody exhibited about 15-20 % decrease in hyperglycemic activity (Table 2) suggesting that anti-rPem-CHH I antibody could also inhibit the activity of the natural CHH in *P. monodon* at some extent.

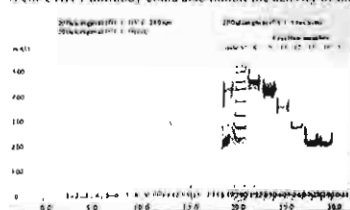


Figure 1. The FPLC profile of rPem-CHH I purification and the co-elution of the stained SDS gel.

1000 5 ng 10 ng 25 ng 50 ng

Figure 2. Sensitivity of anti-CHH I antibody by dot blot analysis.

Sample	Glucose concentration before and after injection	Inhibitory effect (%)
ES	5.51 ± 0.2	
ES + anti-CHH I		100

Table 1. The haemolymph glucose level at 1 h after injected with eyestalk crude extract pre-incubated with antibodies.

Sample	Relative % haemolymph glucose	Inhibitory effect (%)
ES	100	
ES + anti-CHH I	50.52	49.48

Table 2. The haemolymph glucose level at 1 h after injected with anti-CHH I antibody.

(A) A R B M I S S I O N

(B) A R B M I S S I O N

100 50

Figure 3. Specificity of anti-CHH I antibody. A dot blot analysis of eyestalk crude extract pre-incubated with antibodies. Lane 1: 100 µg of eyestalk crude extract; Lane 2: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH I antibody; Lane 3: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH II antibody; Lane 4: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH III antibody; Lane 5: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH IV antibody; Lane 6: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH V antibody; Lane 7: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH VI antibody; Lane 8: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH VII antibody; Lane 9: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH VIII antibody; Lane 10: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH IX antibody; Lane 11: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH X antibody; Lane 12: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XI antibody; Lane 13: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XII antibody; Lane 14: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XIII antibody; Lane 15: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XIV antibody; Lane 16: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XV antibody; Lane 17: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XVI antibody; Lane 18: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XVII antibody; Lane 19: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XVIII antibody; Lane 20: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XIX antibody; Lane 21: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XX antibody; Lane 22: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXI antibody; Lane 23: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXII antibody; Lane 24: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXIII antibody; Lane 25: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXIV antibody; Lane 26: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXV antibody; Lane 27: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXVI antibody; Lane 28: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXVII antibody; Lane 29: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXVIII antibody; Lane 30: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXIX antibody; Lane 31: 100 µg of eyestalk crude extract pre-incubated with anti-CHH XXX antibody.

Acknowledgement

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF).

References

- (1) Lavenex R, S E W. Janse P P, Van Herp R and Kalla R. 1983. *Gen Comp Endocrinol* 60: 288-295.
- (2) Gu P, Li Y, and Chan S. 2000. *FEBS Lett* 472: 122-128.
- (3) Cook J M, Nalbach R E. 1982. *The Biology of Crustacea* Vol 3: 368-399.
- (4) Kilavatt M, Yang W J, Ando K, Nakagawa H, Igarashi A, Pankratov R and Kobayashi T. 1998. *Comp Biochem Physiol* 119: 505-510.
- (5) Udomkit A, Chachuk S, Sontharanon B and Panyim S. 2000. *J Exp Mar Biol Ecol* 254: 145-150.
- (6) Treeratrakool S, Udomkit A, Luvachitwan T, Sontharanon B and Panyim S. *Mol Reprod* 5(4): 573-578.