



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 ของกิ้งกูด

ชื่อนักวิจัย: นายอภิสิทธิ์ อุดมกิจ
สถาบันอนุชีววิทยาพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
อำเภอบางพลี 73170

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

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม 2543 ถึง 30 พฤศจิกายน 2546

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการวางไข่ในกิ้งกูด ได้แก่ crustacean hyperglycemic hormone (CHH) และ molt-inhibiting hormone (MIH) โดยได้ทำการแสดงออกของ cDNA ที่สร้าง CHH สามชนิด ของกิ้งกูด (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 พบว่ากิ้งกูดที่ได้รับการฉีดด้วย 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 การศึกษาหน้าที่ในกิ้งกูด พบว่า Pem-MIH สามารถเพิ่มระยะเวลาระหว่างการลอกคราบ (molt duration) ของกิ้งกูดอย่างมีนัยสำคัญ (จาก 11.8 วัน เป็น 16.3 วัน) การศึกษาการแสดงออกของ CHH และ MIH ในส่วนต่างๆของกิ้งกูดโดยใช้เทคนิค 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 maenus* 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 โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของ 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 อาจนำมาใช้ในการกระตุ้นให้กิ้งกูดไขไข่แทนการตัดตา ซึ่งจะมีข้อดีคือ สามารถใช้แม่พันธุ์กิ้งกูดได้หลายครั้ง และช่วยลดปริมาณการจับกิ้งกูดธรรมชาติ

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-DRELLVRLDRVCELTAVYFDVGVAAECRSNCHHEVELYCVDMFRPRQRNRAAALORLK--- : 128
Pem-CHH2 : STTAY-DRELLVRLDRVCEDCYLYPDVGVAAECRSNCHHEVELYCVDMFRPRQRNRAAALORLK--- : 127
Pem-CHH3 : STTAY-DRELLVRLDRVCEDCYLYPDVGVAAECRSNCHHEVELYCVDMFRPRQRNRAAALORLK--- : 127
Cam-CHH : STTAY-DRAAFNDLEHVGDCCYLYFTSYVESACRSNCYSLLVRCQDDLLMDEFDQARKVQMVRRKK- : 142
Hoa-CHHa : STTAY-GRNIFKRLDRVCEDCYLYKPFVATTCEHCYSWVFRCCDDLLSDVIDVYVSNQMVVK--- : 134
Prc-CHH : STTAY-DRAAFKRLDRVCEDCYLYKPFVATTCEHCYSWVFRCCDDLLSDVIDVYVSNQMVVK--- : 137
Cam-MIH : SPNIGNEDLYKVEWICDQASLFRKTCASLORRCHFEDEFLWCVRATERSEDLALQKWITILEAGRI : 113
Cas-MIH : SPNIGNEDLYKVEWICDQASLFRKTCASLORRCHFEDEFLWCVRATERSEDLALQKWITILEAGRI : 113
Pej-MIH : SPNIGNEDLYKVVVRVCEDCYLYLPGLDGMCHNRCHYEWEELICKAANREDEIEKRVWISILNAGQ- : 105
Hoa-GIH : SPNIGNEDLYEVAWVNDGANLFRNNDVGMCKKCHHTMDLWCYATERHGEIDSRKWISILNAGRK : 112

```

รูปที่ 1 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH จากครีเสเตียนชนิดต่าง 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 pPICZXA 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 pPICZXA 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' ATGAATTCGTCGACAAAAGAACCATGTCGTTTCAGTTC 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

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 สารสกัดจากก้านดาของกึ่งกุลาดำ anti-Pem-CHH1 antibody (1:500 dilution) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปฉีดในกึ่งกุลาดำที่ตัดก้านดา และวัดระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ทุก 30 นาที เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกึ่งกลุ่มที่ฉีดสารสกัดจากก้านดาที่ไม่ได้ 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

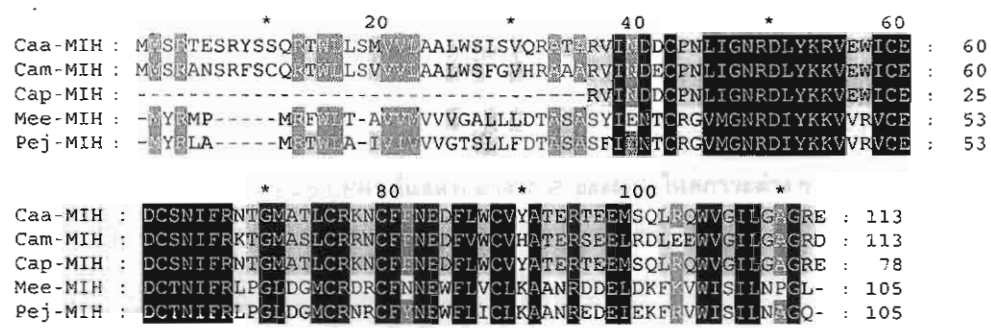
8. การแสดงออกและแยกบริสุทธิ์ Pem-MIH

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

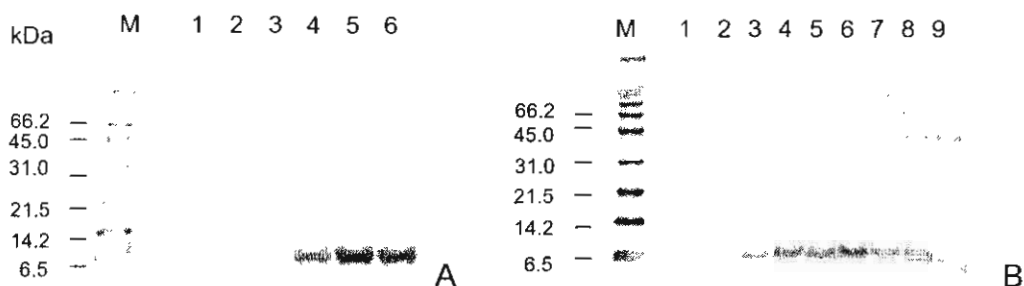
10. การแสดงออกของ Pem-CHH และ Pem-MIH ในส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ

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)



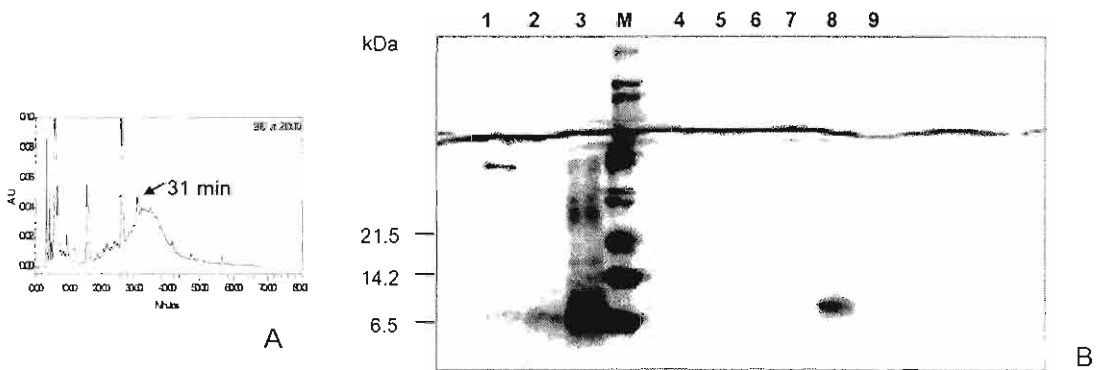
รูปที่ 5 Tricine SDS-PAGE ของโปรตีน Pem-CHH1 ที่แสดงออกจาก *P. pastoris* ในสภาวะต่าง ๆ

- 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 ของกิ้งกูดดำที่ตัดก้านตาได้ถึงระดับ 3.5 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ในขณะที่โปรตีน Pem-CHH1 ที่แยกบริสุทธิ์แล้วมีความสามารถในการเพิ่มน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ได้ในระดับ 3.25 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากก้านตากิ้งกูดดำ 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

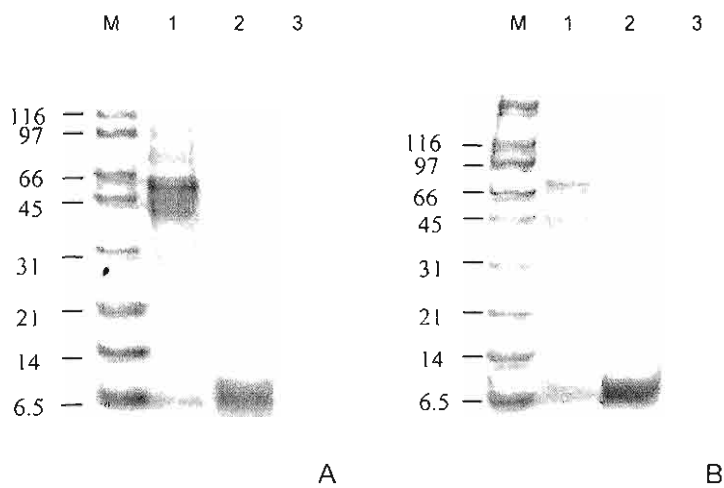
lane 1 : 3 ไมโครกรัมของโปรตีนใน culture supernatant ที่ใช้เลี้ยง *P. pastoris* ที่มี α CHH1 อยู่ใน genome

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

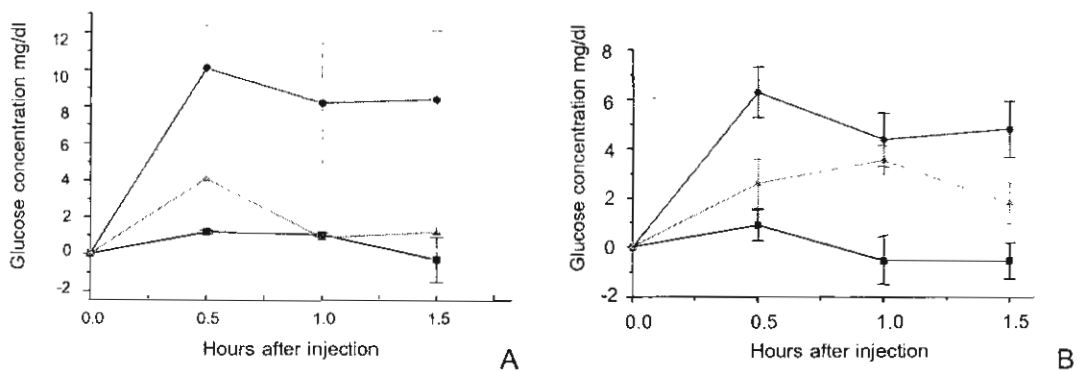


รูปที่ 7 SDS-PAGE แสดงโปรตีน Pem-CMG2 (A) และ Pem-CMG3 (B) ในขั้นตอนต่างๆของการแสดงออกและการแยกบริสุทธิ์

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

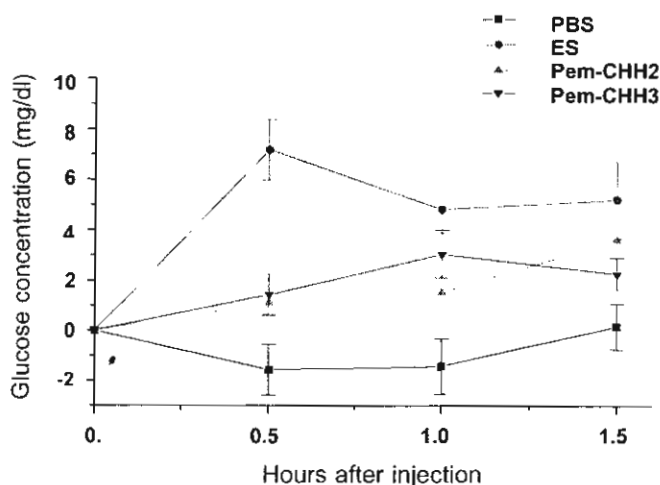
lane 2 : 3 ไมโครกรัมของโปรตีนหลังจากตกตะกอนด้วย ammonium sulfate 30-50%



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



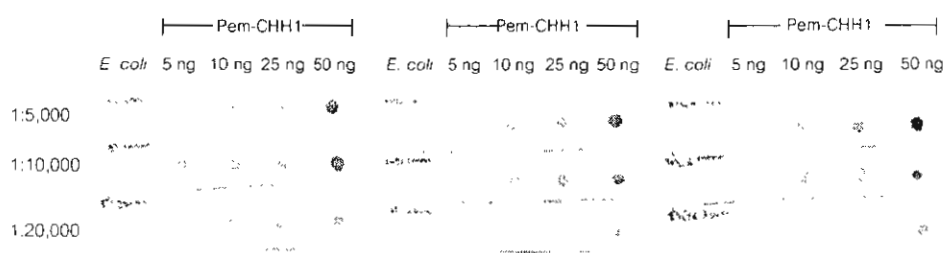
รูปที่ 9 การเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ของกิ้งกูดดำ

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

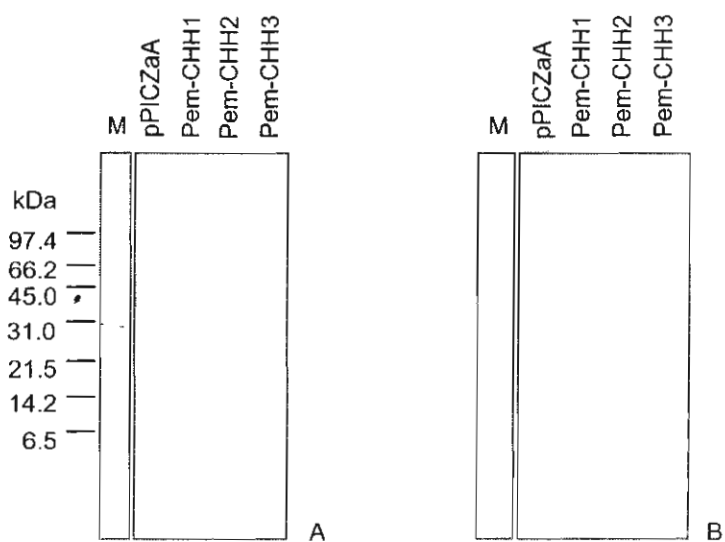
3. ความไวและความจำเพาะของ anti-Pem-CHH1 antibody

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 ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบของกิ้งกูดดำ (Pem-MIH) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มเดียวกับ CHH (รูปที่ 11 และ 12)

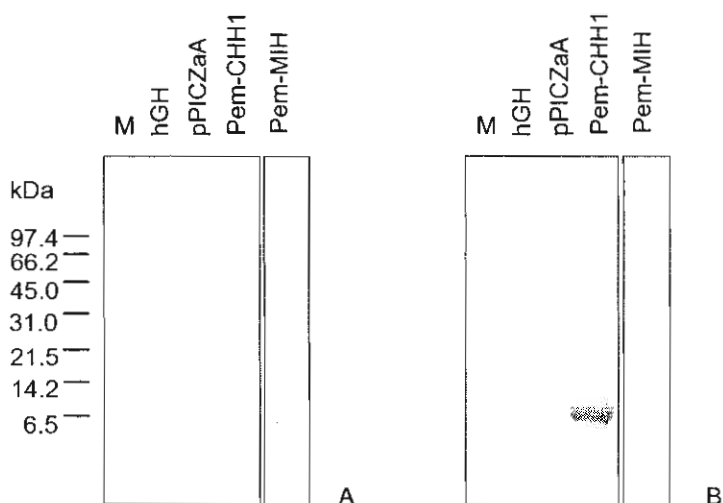


รูปที่ 10 การทดสอบความไวของ anti -Pem-CHH1 antibody ตัวเลข 1:5,000, 1:10,000 และ 1:20,000 แสดง dilution ของ anti-Pem-CHH1 antibody ที่ใช้ในการทดสอบความไวโดยการตรวจจับโปรตีน Pem-CHH1 ในปริมาณ 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัม โดยมี cell lysate ของ *E. Coli* เป็น negative control



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 ของกิ้งก่าตุ๊กตา 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 ในกิ้งก่าตุ๊กตา

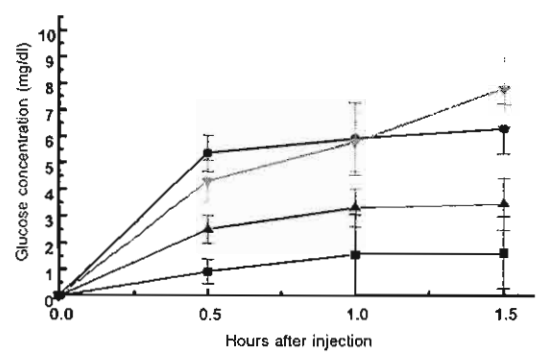
ในช่วงแรกได้ทำการ incubate สารสกัดจากก้านตาของกิ้งก่าตุ๊กตากับ anti-Pem-CHH1 antibody (1:500 dilution) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปฉีดในกิ้งก่าตุ๊กตาที่ตัดก้านตา พบว่า สารสกัดจากก้านตาที่ incubate กับ antibody ก่อนทำการฉีด มีความสามารถในการเพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ลดลงประมาณ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

จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของ antibody ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน CHH ในกิ้งก่าตุ๊กตา โดยฉีด antibody (1:500 dilution) เข้าไปในกิ้งก่าตุ๊กตา และวัดระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ที่เวลา 0.5 ชั่วโมงหลังการฉีด เทียบกับ ระดับน้ำตาลใน haemolymph ของกิ้งก่าในกลุ่มควบคุม ที่ฉีดด้วย PBS พบว่า กิ้งก่าที่ฉีดด้วย antibody มีระดับน้ำตาลกลูโคสใน haemolymph ลดลงโดยเฉลี่ย 15-20 % เมื่อเทียบกับระดับน้ำตาลของกิ้งก่าในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 14)

5. การโคลนนิ่ง cDNA ที่สร้างฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (Pem-MIH) จากกิ้งก่าตุ๊กตา

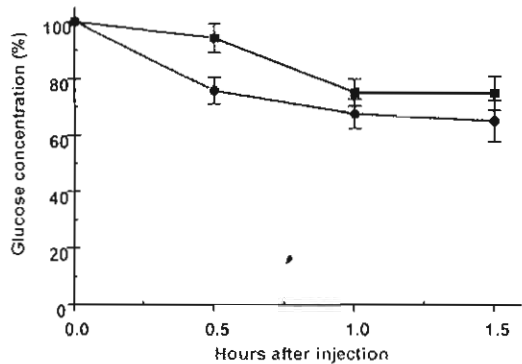
การค้นหาโคลนจากการเพิ่มจำนวนขึ้น cDNA ทางปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่พบเฉพาะในฮอร์โมน MIH ของ *P. japonicus* และ *M. ensis* (P/RGVMGN) โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น 3' cDNA ที่โคลนได้ พบว่ามี 1

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

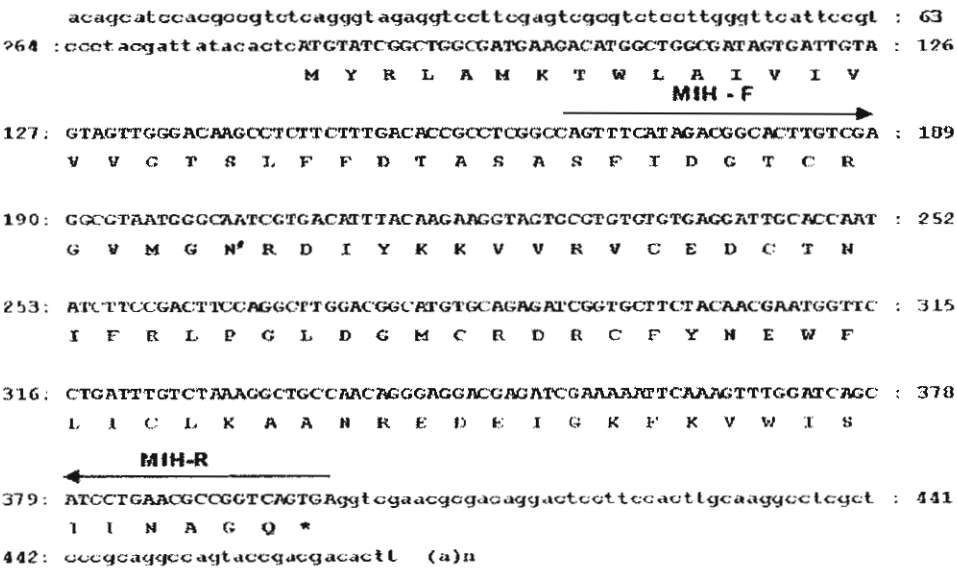
Query: 1 GVMGNRDIYKKVVRVCECTNIFRLPGLDGMCRDRCFYNEWFLICLKAANREDEIGKFKV 60
GVMGNRDIYKKVVRVCECTNIFRLPGLDGMCR RCFYNEWFLICLKAANREDEI KF+V
Sbjct: 37 GVMGNRDIYKKVVRVCECTNIFRLPGLDGMCRNRCFYNEWFLICLKAANREDEIEKFRV 96

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)



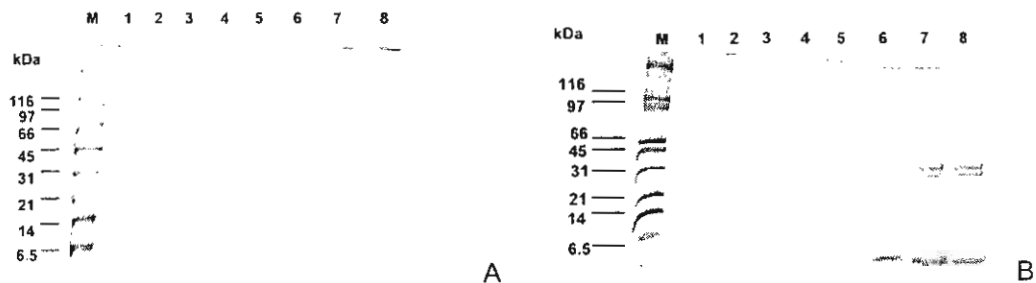
รูปที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ Pem-MIH-like peptide ตัวอักษรเล็กแสดงนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5' และ 3'UTR ตัวอักษรใหญ่แสดงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ open reading frame ที่ถอดรหัสได้เป็น MIH-like peptide จากกึ่งกลางลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงด้วยสัญลักษณ์ตัวอักษรหนึ่งตัว เครื่องหมาย * แสดง stop codon ลูกศรแสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ MIH-F และ MIH-R ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ในส่วนที่สร้าง mature ออร์โมนของ Pem-MIH

		*	20	*	40	*	6
Pem-MIH	:	---	SFI	GTCRCGVMGNRDI	NKVVRVCE	DCTNIFRLPGLDGMCRDRCFYNEWFTICLKA	: 56
Pec-MIH	:	---	SFI	GTCRCGVMGNRDI	NKVVRVCE	DCTNIFRLPGLDGMCRDRCFYNEWFTICLKA	: 56
Pej-MIH	:	---	SFI	NTCRCGVMGNRDI	NKVVRVCE	DCTNIFRLPGLDGMCRNRCFYNEWFTICLKA	: 56
Mee-MIH	:	---	SYI	ENTCRCGVMGNRDI	NKVVRVCE	DCTNIFRLPGLDGMCRDRCFNNEWFTVCLKA	: 56
Pem-SPG-C1	:	---	SLT	GTCRCRMGNREIN	EKVDRVCEDCANIFRLPGLEGLCRORCFYEWFTICLKA	: 56	
Hoa-GIH	:	-	SAWFT	MDPCPMGNRDILNEKVAWCNDCANIFRNNDVGVMCKKCDPHTMDEFWCVYA	: 58		
Nen-GIH	:	-	SAWFT	MDPCPMGNRDILNEKVAWCNDCANIFRNNDVGVKCKKDCHFMDFWCVYA	: 58		
Cam-MIH	:	---	RVI	DDCPNLIGNRDILEKVEWICE	DCSNIFRKTMGAISLCRNCFFEDFHWCVHA	: 56	
Cap-MIH	:	---	RVI	DDCPNLIGNRDILEKVEWICE	DCSNIFRNTHMATLCRKNCFFEDFHWCVYA	: 56	
Hoa-CHHB	:	---	QVF	FQACKGVY-DRNLEPKLINRVCE	DCYNLYRKPFIVTTCRENCYSRVERQCILD	: 55	
Mal-CHH	:	---	AII	LQSCKTF-DRELKKLDLRVCCDCYNLYRKPYVAIDREGCQLNVFRQCIDD	: 55		
Pem-CMG	:	---	SLFSRSCTAY-	DRELVLRLDRVCEDCYNVYRDVGAACRSCNRHNVEFYCYVDY	: 55		
Prc-CHH	:	-	NKRQVF	FQACKGVY-DRAIEKKLDLRVCE	DCYNLYRKPYVATTCRONCNANSVRERQCILD	: 58	

รูปที่ 17 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Pem-MIH กับ MIH จากคริสต์เตียนชนิดต่าง 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

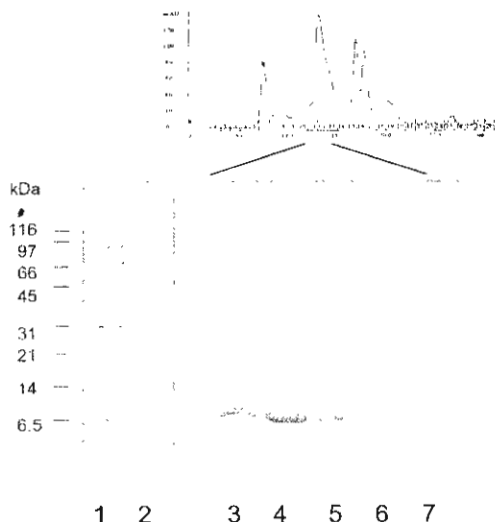
lane 2 : 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* transformants ที่มี αCHH1 อยู่ใน genome เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 3% เป็นเวลา 3 วัน

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

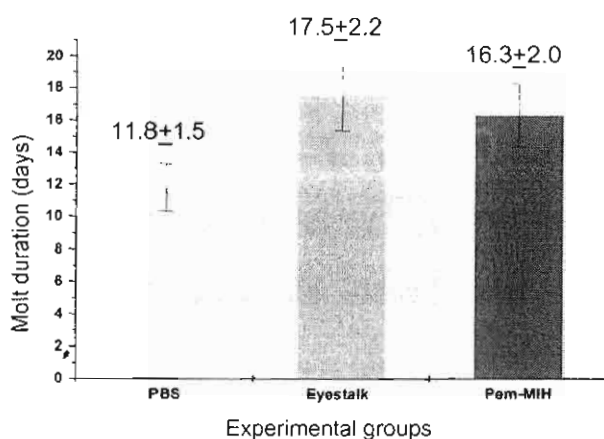
lane 1 : Broad range protein marker (Bio-RAD, USA)

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



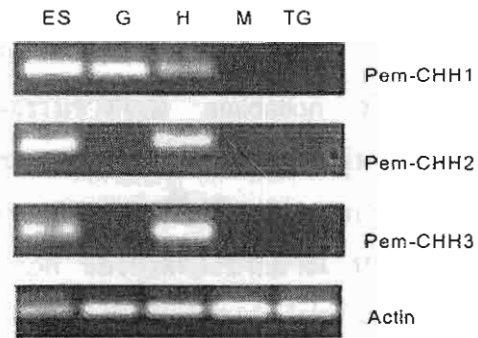
รูปที่ 20 ผลของ Pem-MIH ต่อ molt duration ของกิ้งก่าสีดำ

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

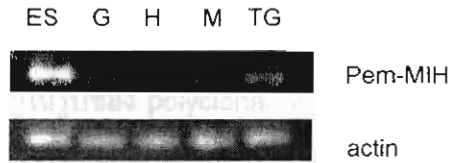
การทำ RT-PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ CHH และ MIH จากส่วนต่างๆของกิ้งก่าสีดำโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ cDNA ของฮอร์โมนแต่ละชนิด พบว่าการแสดงออกของ Pem-CHH1 ในก้านตา หัวใจ และเหงือก ในขณะที่ Pem-CHH2 และ Pem-CHH3 แสดงออกใน

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 ในส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ

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 ในส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ

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 สารสกัดจากก้านตากิ้งกับ 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) ดังนั้นการศึกษารหัสพันธุกรรม CHH และ MIH ในกุ้งกุลาดำจึงให้ข้อมูลที่มีประโยชน์ ทำให้ทราบถึงลักษณะของฮอร์โมนเหล่านี้ในกุ้งกุลาดำ ฮอร์โมนที่ได้จากการแสดงออกของ cDNA ที่สร้าง CHH และ MIH ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของฮอร์โมนในกลุ่มนี้เพื่อให้เข้าใจถึงการทำงาน และเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศ ข้อมูลเบื้องต้นในการยับยั้งการทำงานของ CHH โดยใช้ antibody จากงานวิจัยนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมการเจริญเติบโต 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

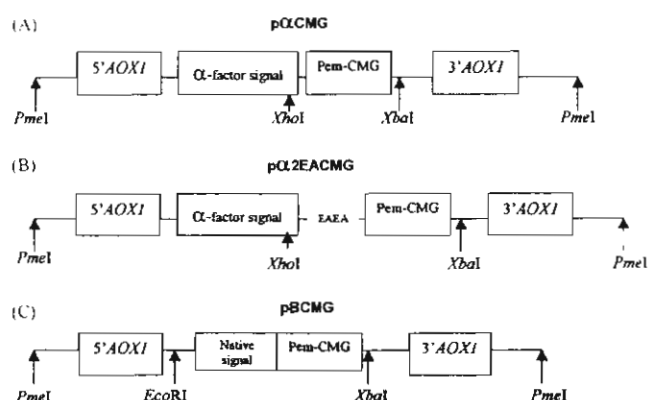


Fig. 1. Construction of the *Pichia* expression vector for secreted Pem-CMG. The linearized plasmids are consisted of the 5'AOX1 promoter, Pem-CMG cDNA and the 3'AOX1 sequence. (a) The cDNA encoding mature Pem-CMG peptide was cloned into the pPICZ α A expression vector at *Xho*I and *Xba*I sites in-frame 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,

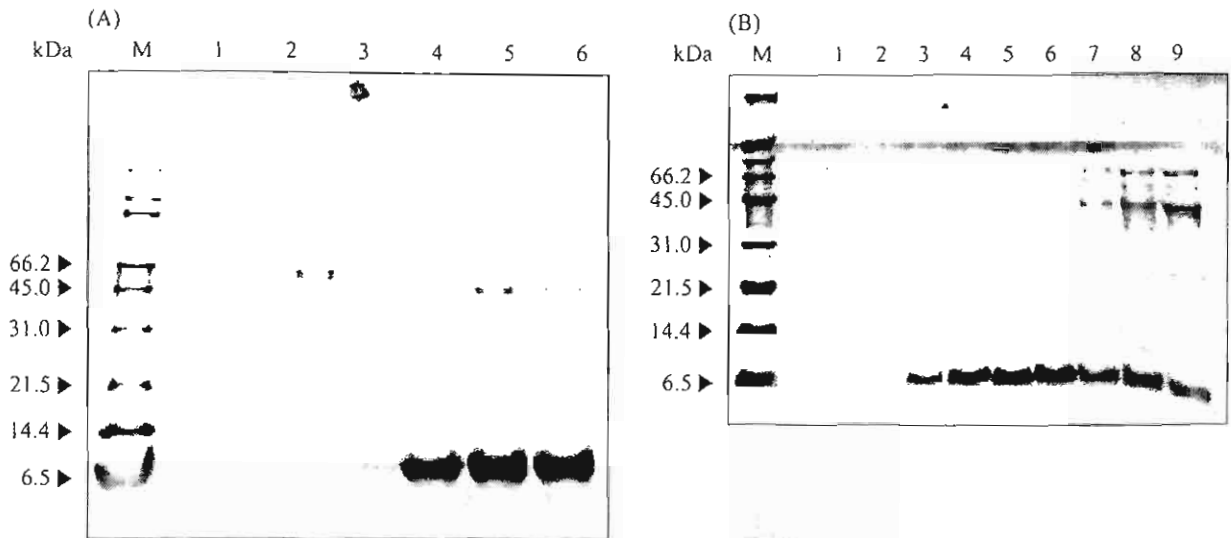


Fig. 2. Tricine-SDS analysis of the optimal expression condition from the α CMG *P. pastoris* transformant. (A) Determination of the optimal concentration of methanol. *P. pastoris* clone α CMG was induced in BM supplementing with 0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 % (v/v) of methanol. A total volume of 100 μ l of 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.

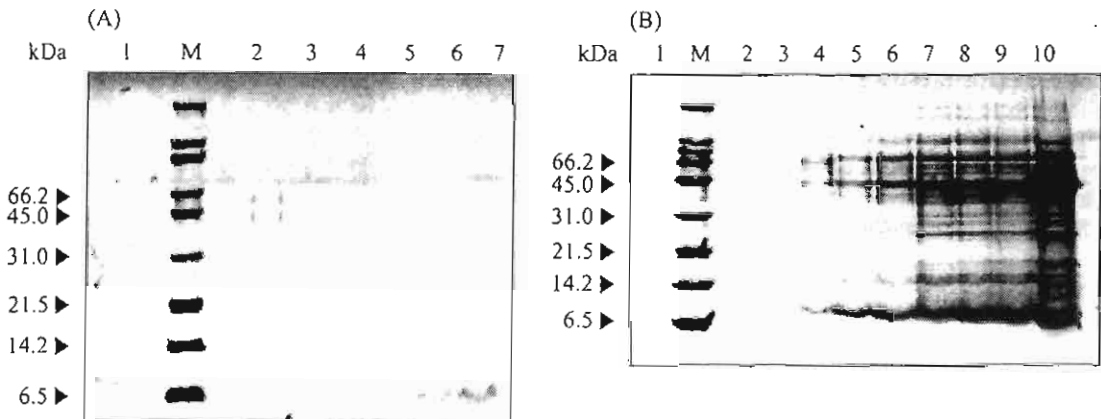


Fig. 3. Tricine-SDS analysis of the optimal expression condition from the α 2EACMG *P. pastoris* transformant. (A) Determination of the optimal concentration of methanol. *P. pastoris* clone α 2EACMG was grown in BMGY and was then induced in BM supplemented with 0, 0.5, 1, 2, 3 and 4% (v/v) of methanol. 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	-

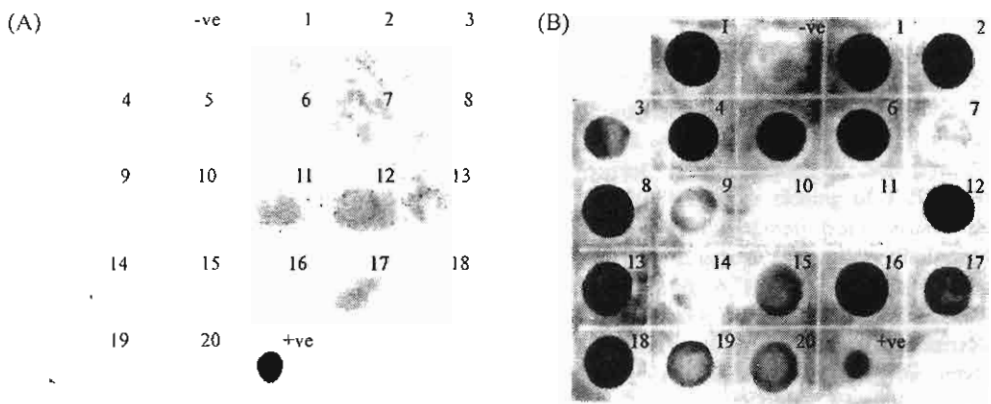


Fig. 4. Immuno-dot blotting analysis of the *P. pastoris* recombinant clones containing BCMG. Twenty BCMG *P. pastoris* transformants were grown in BMGY and were then induced in BM containing 3% (v/v) of methanol for 4 days. (A) dot blot analysis of 50 μ l of culture supernatant of clones no.1-20, and -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