

บทคัดย่อ

(Thai) โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนชนิดใหม่ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสจากกุ้งกุลาดำ
Penaeus monodon, PmVRP15

งานวิจัย suppression subtractive hybridization library ค้นพบยีน viral responsive protein 15 (PmVRP15) ที่มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 9,000 เท่า ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ที่ 48 ชั่วโมง (Vatanavicharn et al., 2014) ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน PmVRP15 ด้วยเทคนิค RNA interference พบว่า เมื่อฉีด dsRNA PmVRP15 ส่งผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนของไวรัส ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงกล่าวได้ว่า ยีน PmVRP15 มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน PmVRP15 ด้วย confocal laser scanning microscope พบว่า โปรตีน PmVRP15 มีการแสดงออกบริเวณนิวเคลียสเมมเบรน ซึ่งจากการทำนายโครงสร้างของโปรตีนดังกล่าว พบว่า PmVRP15 ประกอบด้วย transmembrane อยู่ 1 ส่วน เมื่อสกัดแยกเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นแต่ละส่วน (subcellular fractionation) จะพบโปรตีน PmVRP15 อยู่ในส่วนของนิวเคลียส และส่วนที่จับกับโครมาติน ดังนั้น PmVRP15 อาจเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่นิวเคลียสหรือการออกจากนิวเคลียสของไวรัสตัวแดงดวงขาว เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว จึงทำการตรวจวัดปริมาณไวรัสในส่วนของนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมในสภาวะที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน PmVRP15 เทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีน PmVRP15 ส่งผลให้จำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวในส่วนนิวเคลียสต่อไซโทพลาสซึมลดลงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 9.3 เท่า จึงคาดว่า PmVRP15 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่นิวเคลียสของไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน PmVRP15 ที่ผลิตใน *Escherichia coli* C43 (DE3) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA and DEAE Sepharose แล้วนำไปหา circular dichroism spectra พบว่า รีคอมบิแนนท์ PmVRP15 ประกอบด้วยส่วนของแอลฟาฮีลิกซ์ 48% และบีตาชีต 14% การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์ PmVRP15 ด้วยเทคนิค analytical ultracentrifugation พบว่า PmVRP15 สามารถจับกันเป็นเตตระเมอร์ (tetramer) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 60 μM นอกจากนี้ ได้ทำการทดลอง หาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึก PmVRP15 ใน 96-well plate แต่ไม่พบสภาวะที่ทำให้เกิดผลึกโปรตีนที่มีการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ที่ดี

คำหลัก: *Penaeus monodon*, viral responsive protein 15, white spot syndrome virus, WSSV

Abstract

(English) Structure and Function of a Novel Responsive Protein from the Black Tiger
Shrimp *Penaeus monodon*, *PmVRP15*

A viral responsive protein 15 (*PmVRP15*) was previously identified from suppression subtractive hybridization library. *PmVRP15* was highly up-regulated (> 9000 folds at 48 hours) after WSSV challenge (Vatanavicharn et al., 2014). Double-stranded RNAi-mediated knockdown of *PmVRP15* gene expression suggested that *PmVRP15* has a crucial role in WSSV propagation in *P. monodon*. Confocal laser scanning microscopy showed that *PmVRP15* localized around the nuclear membrane of shrimp hemocytes. Analysis of *PmVRP15* sequence predicted that *PmVRP15* possesses one transmembrane segment. Subcellular fractionation study showed that *PmVRP15* was found in soluble nuclear and chromatin-bound fractions. As a result, *PmVRP15* may function in a nucleus and involve in nuclear import/export of WSSV. To test this hypothesis, ratio of WSSV DNA in nuclear and cytoplasmic fractions of *PmVRP15*-silenced hemocytes was compared to that of the control. *PmVRP15* silencing resulted in a lower ratio of WSSV copy number (9.3 fold) in nuclear and cytoplasmic fractions, indicating that *PmVRP15* may play a role in nuclear entry of WSSV. For structural study, recombinant *PmVRP15* was expressed in *Escherichia coli* C43 (DE3) and purified by Ni-NTA and DEAE Sepharose columns. Circular dichroism spectra showed that *PmVRP15* contains 48% of alpha-helix and 14% of beta-sheet. Analytical ultracentrifugation study suggested that *PmVRP15* forms a tetramer at 60 μ M. Crystallization screening of *PmVRP15* was performed in 96-well plate using several crystallization screens. However, no good diffracted protein crystal was obtained.

Keywords: *Penaeus monodon*, viral responsive protein 15, white spot syndrome virus, WSSV