



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์และหน้าที่ของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ

โดย ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล

มีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์และหน้าที่ของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ

ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

หน่วยวิจัยอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ทัศนาวจร และ รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณชกิจ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ Prof. Takashi Aoki และ Prof. Ikuo Hirono จาก Tokyo University of Marine Science and Technology ที่ได้ให้คำปรึกษาและความร่วมมือในการทำวิจัยภายใต้โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีไทย-ญี่ปุ่น (Thailand-Japan Technology Transfer Project, TJTTP)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนวิจัยบางส่วนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

Abstract

Project Code : TRG5280019

Project Title : Activity and function of antimicrobial peptides from the black tiger shrimp

Penaeus monodon

Investigator : Dr. Premruethai Supungul

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science,

Chulalongkorn University E-mail Address : premruethai.sup@biotec.or.th

Project Period : 2 years

This project was to characterize and investigate the functions of lysozymes and penaeidins from *Penaeus monodon*. The c-type (*PmLyzc*) and the two-catalytic residue ablated i-type lysozymes (*PmLyzi1* and 2) were identified from the *Penaeus monodon*. By RT-PCR, *PmLyzc* and *PmLyzi2* transcripts were highly expressed in hemocyte and heart, respectively while the *PmLyzi1* transcript was expressed only in hepatopancreas. The up-regulation of mRNA transcription after bacterial challenge was observed only with *PmLyzc*. Although the turbidimetric assay revealed that only recombinant *PmLyzc* possessed the muramidase activity, all of them variably exhibited antimicrobial activity against both Gram-positive and -negative bacteria. No synergistic effect was observed among these lysozymes. These results demonstrated that the ability of lysozyme to inhibit the growth of bacteria did not depend only on the muramidase activity and indicated the multifunction of lysozyme as immune defense and digestive enzymes in *P. monodon*.

From the *Penaeus monodon* EST database two isoforms of penaeidins were identified, *PenmonPEN3* and *PenmonPEN5*. Both penaeidin transcripts were mainly expressed in the hemocyte, and were up-regulated about 1.5 and 1.8 fold, respectively at 24h after WSSV-challenge. The recombinant proteins of both penaeidins were overproduced in the yeast *Pichia pastoris*. The *rPenmonPEN3* and *rPenmonPEN5* exhibited antibacterial activity against Gram-positive bacteria. However, no synergistic effect was observed in these penaeidins. The suppression of *PenmonPEN5* transcript levels by RNA interference mediated gene silencing led to an increase of WSSV copy numbers about 1.9 fold. Moreover, incubation of the *P. monodon* hemocyte primary cell culture with the mixture of WSSV and *rPenmonPEN5* inhibited the propagation of WSSV only 6.25µM but not at higher concentration of the protein. These results suggest a possible role of *P. monodon* penaeidins in the shrimp's antibacterial and antiviral immunity but its antiviral mechanism requires further investigation.

Keywords : *Penaeus monodon*, Antimicrobial peptide, muramidase activity, antiviral immunity

รหัสโครงการ: TRG5280019

ชื่อโครงการ: ฤทธิ์และหน้าที่ของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ

ชื่อนักวิจัย: ด.ร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนม
กุ้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : premrueythai.sup@biotec.or.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โครงการนี้ เป็นการศึกษาลักษณะสมบัติและหน้าที่ของกลุ่มยีน lysozyme และยีน penaeidin ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน c-type lysozyme (*PmLyzc*) และ สองไอโซฟอร์ม ของ i-type lysozyme ซึ่งขาด active residues (*PmLyzi1* และ *PmLyzi2*) ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RT-PCR พบ *PmLyzc* แสดงออกมากที่สุดที่เม็ดเลือด *PmLyzi2* แสดงออกมากที่สุดที่หัวใจ ในขณะที่ *PmLyzi1* แสดงออกที่ hepatopancreas เพียงอย่างเดียว และเฉพาะ *PmLyzc* เท่านั้นที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นให้กุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* แม้ว่าจะพบฤทธิ์ของ muramidase เฉพาะใน *PmLyzc* เท่านั้น แต่พบว่า รีคอมบิแนนท์ของทั้งสามไอโซฟอร์มสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของ lysozyme ทั้งสามในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียไม่ได้ขึ้นกับ muramidase activity แสดงถึงหน้าที่ของ lysozyme นอกจากเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแล้ว ยังน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบย่อยของกุ้งอีกด้วย

จากห้องสมุด EST ของกุ้งกุลาดำพบ penaeidin ทั้งหมดสองไอโซฟอร์ม คือ *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* โดยทั้งสองไอโซฟอร์มมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเป็น 1.5 และ 1.8 เท่าที่ 24 ชั่วโมง หลังจากกระตุ้นให้กุ้งติดเชื้อ WSSV เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของทั้งสองไอโซฟอร์ม พบสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาหน้าที่ของ *PenmonPEN5* โดยใช้เทคนิค RNAi พบว่า กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* แล้วฉีดเชื้อ WSSV มีการแสดงออกของยีน VP28 เพิ่มขึ้นเป็น 1.9 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ เมื่อบ่ม primary cell culture ของเม็ดเลือดกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผสมกับ WSSV พบ เฉพาะรีคอมบิแนนท์โปรตีน *PenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25 μ M เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเกิด propagation ของ WSSV จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า penaeidin นอกจากเป็นเพปไทด์ที่สำคัญในการต้านการติดเชื้อแบคทีเรียแล้ว ยังน่าจะมีบทบาทในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสอีกด้วย สำหรับกลไกการยับยั้งไวรัสนั้นยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำหลัก : *Penaeus monodon*, Antimicrobial peptide, muramidase activity, antiviral immunity

1. ความสำคัญและที่มา

กุ้งเป็นสินค้าส่งออกประเภทสัตว์น้ำที่มีศักยภาพของไทย โดยประเทศไทยผลิตกุ้งเพื่อการส่งออกมากกว่าการบริโภคภายในประเทศ ที่ผ่านมามีประเทศไทยเป็นผู้นำในการผลิตกุ้งและส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 จนถึงปัจจุบัน แม้ว่าตัวเลขการส่งออกจะเพิ่มมากขึ้น แต่พบว่าการเลี้ยงและการส่งออกกุ้งกุลาดำกลับลดน้อยลงเรื่อย ๆ อย่างไรก็ดี พบว่ามีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมากขึ้น โดยในปี 2548 มีการเลี้ยงถึง 340,000 ตัน และมีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพียง 32,000 ตัน สาเหตุที่ทำให้การผลิตกุ้งกุลาดำในประเทศไทยลดลง เนื่องจากประสบปัญหาการระบาดของโรคต่างๆที่สำคัญได้แก่ โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัส และแบคทีเรีย โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคตัวแดงดวงขาวและโรคหัวเหลือง ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส white spot syndrome virus และ yellow head virus ตามลำดับ เมื่อกุ้งติดโรคจากเชื้อไวรัสเหล่านี้จะทำให้กุ้งตายเฉียบพลัน (Wongteerasupaya และคณะ, 1995a; Wongteerasupaya และคณะ, 1995b) ส่วนโรคระบาดที่เกิดจากแบคทีเรียที่พบมาก ได้แก่ โรคเรืองแสง ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* species เมื่อกุ้งเป็นโรคเรืองแสง จะพบว่า ตามรอยังมีรอยไหม้สีดำซึ่งเกิดขึ้นจากการที่กุ้งพยายามสร้างเม็ดสี มีการอักเสบบริเวณตับ ตับจะอ่อน มีอาการตับฟ่อ การกินอาหารลดลง และทยอยตายไปเรื่อยๆ ซึ่งทำให้ผลผลิตจากอุตสาหกรรมกุ้งลดลงเป็นจำนวนมาก (Ruangpan, 1998) เกษตรกรจึงนำยาปฏิชีวนะเข้ามาใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคต่างๆ เช่น chloramphenicol, furazolidone, oxytetracycline และ streptomycin (Gatesoupe, 1989) ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะทำให้เกิดปัญหาสารตกค้างในกุ้ง นอกจากนี้ ยังทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา และอาจพัฒนายีนดื้อยาสู่เชื้อโรคของคนได้ (Hameed และคณะ, 2003; Somjetlerdcharoen, 2002; Graslund และคณะ, 2002) จากเหตุผลดังกล่าว จึงมีการพัฒนางานวิจัยทางด้านอนุชีววิทยาเพื่อใช้แก้ปัญหาที่เกิดขึ้น เช่น การพัฒนาวิธีการตรวจโรคโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Lo, 1996; Kiatpathomchai และคณะ, 2004) การศึกษาพันธุกรรมที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อต่างๆด้วยเทคนิค cDNA microarray (Fagutao และคณะ 2008; Pongsomboon และคณะ 2011; Wang และคณะ 2006; Wongpanya และคณะ 2007) การศึกษาโปรตีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อต่างๆด้วยเทคนิค Proteomic (Chai และคณะ 2010; Zhang และคณะ 2010) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีรายงานการค้นพบและศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides, AMPs) มากมายในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งหลายชนิด (Gross และคณะ 2001; Rojtinakorn และคณะ 2002; Tassanakajon และคณะ 2006) โดย ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ได้รับงานถึงการค้นพบยีนสร้างสารต้านจุลชีพ

และจัดเก็บไว้ใน website ของหน่วยที่ <http://pmonodon.biotec.or.th> จากรายงานการศึกษาเพปไทด์เหล่านี้ในกิ้งหลายชนิด พบ เพปไทด์ต้านจุลชีพแต่ละชนิดมีหลายไอโซฟอร์ม และเพปไทด์แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อจุลชีพได้แตกต่างกันออกไป ดังนั้น การศึกษาสารต้านจุลชีพเหล่านี้ น่าจะได้ข้อมูลสำคัญเพื่อพัฒนาไปใช้ในการควบคุมโรค ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ และเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวมีมากขึ้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของเพปไทด์ต้านจุลชีพ หรือ AMP ที่แยกได้จากกิ้งกุลาดำ รวมทั้งศึกษาลักษณะในการทำงานร่วมกัน (synergistic effect) โดยอาศัยเทคนิคการผลิตโปรตีนจากระบบแบคทีเรียและยีสต์ และใช้เทคนิค RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีนสร้างสารต้านจุลชีพ เพื่อศึกษาหน้าที่ของสารต้านจุลชีพเมื่อมีการติดเชื้อโรคต่าง ๆ โดยทำการศึกษายีนสร้างสารต้านจุลชีพสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม lysozyme และ กลุ่ม penaeidin

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ของเพปไทด์ต้านจุลชีพต่าง ๆ ที่ค้นพบจากกิ้งกุลาดำในโครงการจีโนมกิ้ง ทั้งแบบเดี่ยวและแบบทำงานร่วมกัน (synergistic effect)

2.2 เพื่อทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนสร้างสารต้านจุลชีพต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

2.3 เพื่อศึกษาหน้าที่ของเพปไทด์ต้านจุลชีพต่าง ๆ ทั้งแบบเดี่ยวและแบบทำงานร่วมกันในกิ้ง โดยยับยั้งการแสดงออกของยีนสร้างสารต้านจุลชีพโดยใช้เทคนิค RNAi และดูการตอบสนองของกิ้งหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส

3. วิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของกลุ่มยีน lysozyme

3.1.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน lysozyme ในเนื้อเยื่อกิ้งกุลาดำปกติ

โดยใช้เทคนิค RT-PCR

สร้าง first-strand cDNA จาก total RNA ของเนื้อเยื่อทั้ง 9 อวัยวะของกิ้ง ได้แก่ เหนืออก, antennal gland, epipodite, หัวใจ, เม็ดเลือด, hepatopancreas, eyestalk, lymphoid organ และ ลำไส้ โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน lysozyme ทั้ง c-type lysozyme (*PmLyzc*) และ 2 ไอโซฟอร์มของ i-

type lysozyme (*PmLyzi1* และ *PmLyzi2*) ที่ได้ออกแบบไว้ วิเคราะห์ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis วัดปริมาณ PCR product จากความเข้มของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) โดยมี β -actin เป็นยีนควบคุม

3.1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน lysozyme ในกิ้งกูดดำที่กระตุ้นด้วย

V. harveyi

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อของกิ้งกูด พบ *PmLyzc*, *PmLyzi1* และ *PmLyzi2* มีการแสดงออกมากที่สุดในเม็ดเลือด, hepatopancreas และ หัวใจ ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีน lysozyme ในกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* จึงทำการศึกษาในสามอวัยวะดังกล่าว โดยฉีดเชื้อ *V. harveyi* 10^6 CFU เข้ากล้ามเนื้อกิ้งกูดทดลอง ทำการเก็บเลือด hepatopancreas และ หัวใจ ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อโดยเก็บเวลาละ 3 ตัว ในกลุ่มควบคุมฉีด 0.85% NaCl แทน *V. harveyi* สกัด total RNA และทำการสร้าง first strand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcriptase System ตรวจสอบการแสดงออกของยีน lysozyme ในอวัยวะทั้งสามโดยการทำ PCR ที่ใช้ β -actin เป็นยีนควบคุม

3.1.3 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme และทำบริสุทธิ์

สร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์โดยการโคลนชิ้นยีน mature lysozyme ทั้งสามชนิด คือ *PmLyzc*, *PmLyzi1* และ *PmLyzi2* เข้าสู่เวกเตอร์ pET19 โดยให้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ได้มี His-tag อยู่ปลายทางด้านอะมิโน จากนั้น เลือกหาโคลนที่มียีน lysozyme โดยใช้เทคนิค colony PCR วิเคราะห์ขนาดของ DNA insert โดย agarose gel electrophoresis สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์โคลนและนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้โคลนที่ถูกต้องแล้วจึงย้ายพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่ได้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* Rosetta ผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์โดยชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue หลังจากนั้นจึงทำการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ปริมาณมากและทำการแยกโปรตีนรีคอมบิแนนท์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column ชะโปรตีนรีคอมบิแนนท์ออกจาก column ด้วย imidazole ความเข้มข้นต่างๆ นำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PmLyzc* (r*PmLyzc*) และ โปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PmLyzi1-2* (r*PmLyzi1-2*) ที่ได้ไป dialyze กับน้ำและ STE buffer ตามลำดับ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการทำ western blot ที่ใช้ antibody ตัวแรกเป็น anti-His-tag และ antibody ตัวที่สองเป็น goat-anti-mouse IgG

3.1.4 การทดสอบ muramidase activity

โดยทำการเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* ให้มีความเข้มข้นที่ OD600 nm เท่ากับ 0.5 จากนั้นบ่มโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme กับเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* ที่ 25 °C วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 20 นาที โดยเมื่อมีการย่อย peptidoglycan เกิดขึ้นจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง

3.1.5 การทดสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียและการศึกษา synergistic effect

นำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme บริสุทธิ์ทั้งสามชนิดมาตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*M. luteus*, *Staphylococcus aureus* และ *S. haemolyticus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholera*, *V. mimicus* และ *Escherichia coli*) ด้วยวิธี agar diffusion โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใน agar plate ที่เจาะหลุมสำหรับใส่โปรตีน ทำการบ่ม PmLyzc, PmLyzi1, PmLyzi2 ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และใช้ Lysozyme จากไข่ขาว (HEWL) เป็นโปรตีนควบคุม ทำการวัดวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ จากนั้นทำการทดสอบ synergistic effect โดยการบ่มโปรตีนรีคอมบิแนนท์สองหรือสามชนิด ใน agar plate ที่มีเชื้อแบคทีเรีย ทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบวงใสที่เกิดขึ้นกับวงใสที่เกิดจากการใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์เพียงชนิดเดียว

3.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน penaeidin

3.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน penaeidin ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำปกติ

โดยใช้เทคนิค RT-PCR

สร้าง first-strand cDNA จาก total RNA ของเนื้อเยื่อทั้ง 9 อวัยวะของกุ้งปกติ 3 ตัว ได้แก่ เหนืออก, antennal gland, epipodite, หัวใจ, เม็ดเลือด, hepatopancreas, eyestalk, lymphoid organ และ ลำไส้ โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน penaeidin ทั้งสองไอโซฟอร์ม (*PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5*) ที่ได้ออกแบบไว้ วิเคราะห์ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis วัดปริมาณ

PCR product จากความเข้มข้นของแถบ DNA ที่บันทึกด้วยกล้อง CCD โดยใช้โปรแกรม Genetools Analysis Software (Syngene) โดยมียีน EF1- α เป็นยีนควบคุม

3.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *penaeidin* ในกุ้งกุลาดำที่กระตุ้นด้วย

WSSV โดยใช้เทคนิค real time - RT-PCR

แบ่งกุ้งกุลาดำสุขภาพดีออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกฉีดด้วย WSSV (อัตราส่วน WSSV กับ Lobster hemolymph medium (LHM) 1:8000 ซึ่งทำให้กุ้งตาย 100% ภายใน 4 วัน) กลุ่มควบคุมฉีดด้วย LHM เก็บเลือดจากกุ้งกลุ่มละ 3 ตัวที่เวลา 0.25, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง สร้าง First-stand cDNA จาก total RNA ของเม็ดเลือดของกุ้งโดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega) และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค real-time RT-PCR โดยใช้เครื่อง iCycler-iQTM system (Bio-Rad Laboratories, USA) และใช้ชุดตรวจสอบ SYBR Green I dye detection ทำการทดลองสามซ้ำ คำนวณค่าการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน EF1- α และเปรียบเทียบค่าการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย WSSV เทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงด้วยค่า $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ค่า $\Delta\Delta Ct$ คำนวณจาก ΔCt (กลุ่มที่กระตุ้นด้วย WSSV) - ΔCt (กลุ่มควบคุม) จากนั้นจึงคำนวณค่าทางสถิติโดยใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA)

3.2.3 การศึกษาหน้าที่ของ *penaeidin* ในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV โดยใช้เทคนิค RNAi

ทำการสร้าง double strand RNA ของยีน *PenmonPEN5* (ds*PenmonPEN5*) โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด ในชุดแรกสำหรับสร้างเส้น sense ให้ปลายทางด้าน 5' ของไพรเมอร์ Forward มีเบสจำเพาะของ T7 promoter ส่วนชุดที่ 2 เป็นไพรเมอร์สำหรับสร้างเส้น anti-sense ให้ปลายทางด้าน 5' ของไพรเมอร์ Reverse มีเบสจำเพาะของ T7 promoter หลังจากทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุดแล้ว ทำการสร้างสาย RNA เส้น sense และ anti-sense โดยใช้ T7 RNA polymerase purify RNA สายเดี่ยวและทำ double strand RNA โดยการผสมเส้น sense และเส้น anti-sense ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้จับกันเป็นเส้นคู่

จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของ ds*PenmonPEN5* โดยนำกุ้งกุลาดำขนาดประมาณ 3 กรัม มาแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกฉีด ds*PenmonPEN5* ในอัตราส่วน 5 μ g ต่อ กุ้งหนัก 1 g กลุ่มที่สองฉีด polyGC เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ 3 ฉีดด้วย NaCl เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากการฉีดเป็นเวลา 24

ชั่วโมง นิดกึ่งแต่ละกลุ่มซ้ำโดยในกลุ่มที่ต้องนิต double strand RNA ในอัตราส่วน 2.5 µg ต่อ กึ่งหนัก 1 g เลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงเก็บเลือดมาสกัด total RNA เพื่อนำมาตรวจสอบความจำเพาะของ dsPenmonPEN5 โดยดูการแสดงออกของยีน PenmonPEN3 และยีน PenmonPEN5 ซึ่งใช้การแสดงออกของยีน EF1- α เป็นยีนควบคุม

เพื่อศึกษาหน้าที่ของ PenmonPEN5 เมื่อกึ่งติดเชื้อ WSSV จึงแบ่งกึ่งขนาด 3 กรัม ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกนิต dsPenmonPEN5 ในอัตราส่วน 5 µg ต่อ กึ่งหนัก 1 g กลุ่มที่สองนิต polyGC เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ 3 นิตด้วย NaCl เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม เลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ทำการนิต double strand RNA ในอัตราส่วน 2.5 µg ต่อ กึ่งหนัก 1 g พร้อมกับนิต WSSV จำนวน 100 copy เลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงเก็บเลือดมาสกัด total RNA ตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนที่ผิวของไวรัส ยีน PenmonPEN5, PenmonPEN3 และ EF1- α ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยทำการทดลองซ้ำสองครั้งจากกึ่งสองกลุ่ม

นอกจากนี้ ตรวจสอบจำนวน copy ของ WSSV โดยแบ่งกึ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ทำการนิต double strand RNA 2 ครั้งเหมือนการทดลองข้างต้น และในการนิตครั้งที่ 2 ทำการนิต WSSV จำนวน 100 copy พร้อมกับ double strand RNA เมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมงจึงเก็บเลือดจากทั้งสองกลุ่มเพื่อสกัด genomic DNA ตรวจสอบจำนวน copy ของไวรัสตามวิธีของ Durand และ Lightner (2000) โดยการทำ real-time RT-PCR ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ และทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ T-test

3.2.4 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ penaeidin และทำบริสุทธิ์

โคลนชั้นยีน mature penaeidin3 (PenmonPEN3) และยีน mature penaeidin5 (PenmonPEN5) เข้าสู่เวกเตอร์ pPIC9K ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ในระบบยีสต์ จากนั้นย้ายเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Pichia pastoris* km71 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีจำนวน copy ของยีน penaeidin ทั้ง 2 ที่มากที่สุด โดยเลือกโคลนที่ขึ้นบนอาหารที่มียา G418 ที่ความเข้มข้นสูง จากนั้นจึงผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ PenmonPEN3 (rPenmonPEN3) และโปรตีนรีคอมบิแนนท์ PenmonPEN5 (rPenmonPEN5) โดยใช้เมธานอลในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน เก็บน้ำเลี้ยงยีสต์ทุกวันแล้วนำมาตรวจสอบโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วย Tricine-SDS-PAGE เพื่อหาวันที่มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสูงสุด

เลือกโคลนที่ให้ผลดีที่สุดเพื่อนำไปผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ในปริมาณมาก ทำบริสุทธิ์ *rPenmonPEN3* และ *rPenmonPEN5* โดยนำน้ำเลี้ยงยีสต์มาผ่านคอลัมน์ cation-exchange chromatography และชะโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วย NaCl นำโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ได้ไป dialyze กับ 20 mM phosphate buffer pH 7 วัดความเข้มข้นของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วย spectrophotometer ที่ 280 nm ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย Tricine-SDS-PAGE

3.2.5 การทดสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียของ โปรตีนรีคอมบิแนนท์ penaeidin

นำ *rPenmonPEN3* และ *rPenmonPEN5* บริสุทธิ์มาตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *M. luteus* และ *Aerococcus viridians* ด้วยวิธี agar diffusion โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใน agar plate ที่เจาะหลุมสำหรับใส่โปรตีน ทำการหยอดโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลุม โดยใช้ HEWL หรือ ampicillin และ buffer เป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงจึงวัดวงใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ จากนั้นทำการทดสอบ synergistic effect โดยการบ่มรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองชนิดใน agar plate ที่มีเชื้อแบคทีเรีย ทำการเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบวงใสที่เกิดขึ้นเทียบกับวงใสที่เกิดจากการใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์เพียงชนิดเดียว

3.2.6 การศึกษาความเป็นพิษของรีคอมบิแนนท์โปรตีน *PenmonPEN5* ต่อ cell

เม็ดเลือดกุ้ง

เพื่อทดสอบความเป็นพิษของรีคอมบิแนนท์โปรตีน penaeidin ต่อ cell line จากเม็ดเลือดของกุ้ง จึงเตรียม cell line โดยดูดเลือดจากกุ้งและใช้สารกันเลือดแข็งที่ประกอบด้วย 0.82% sodium chloride, 0.55% citric acid, 1.98% glucose และ 0.88% sodium citrate ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อปั่นเก็บ cell เม็ดเลือดและกระจาย cell ด้วย L-15 culture medium แล้ว นำ cell เม็ดเลือดไปใส่ใน microtiter plate (96-well plate) นำไปบ่มที่ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ cell เม็ดเลือดเกาะพื้นผิวของ microtiter plate จากนั้น จึงเติม *rPenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 μ M นำไปบ่มที่ 28°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง cell line ด้วย L-15 culture medium นำไปบ่มที่ 28°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ potassium phosphate แทนรีคอมบิแนนท์โปรตีน และใช้ cell เม็ดเลือดเพียงอย่างเดียวเป็นตัวควบคุม จากนั้นจึงย้อม

cell ด้วย trypan blue แล้วเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ cell ที่มีชีวิต โดยการนับ cell ที่มีชีวิตเทียบกับจำนวน cell ทั้งหมด

3.2.7 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง propagation ของ WSSV ของ *PenmonPEN5*

ใน cell line จากเม็ดเลือดกุ้ง

เพื่อดูผลของ *rPenmonPEN5* ในการยับยั้งการเกิด propagation ของ WSSV ใน cell line จากเม็ดเลือดกุ้ง จึงทำการเตรียม cell line ตามข้อ 3.2.6 หลังจากบ่ม cell เม็ดเลือดที่ 28°C เพื่อให้ cell เม็ดเลือดเกาะผิวของ microtiter plate แล้วจึงเติม WSSV จำนวน 10^6 copy ที่ผสมกับ *rPenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 μ M ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่ 28°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงล้าง WSSV และ *rPenmonPEN5* ออกด้วย L-15 culture medium และนำไปบ่มที่ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการเก็บ cell เม็ดเลือดเพื่อสกัด total RNA ด้วย Trizol สร้าง first strand cDNA และตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV โดยดูการแสดงออกของยีน VP28 และใช้การแสดงออกของยีน EF1- α เป็นยีนควบคุม

4. ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของกลุ่มยีน lysozyme

lysozyme เป็นเอนไซม์พวก hydrolase ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง lysozyme มีฤทธิ์ในการสลาย β -1,4-glycosidic ระหว่าง *N*-acetylglucosamine กับ *N*-acetylmuramic acid ของ peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Qasba และคณะ 1997; Mai และ Hu, 2009) จึงเป็นโมเลกุลสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันในการต้านการรุกรานของเชื้อจุลินทรีย์ ยีนในกลุ่ม lysozyme มีหลายชนิด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ chicken-type (c-type), goose-type (g-type) และ invertebrate-lysozyme (i-type) (Hikima และคณะ 2001) c-type lysozyme เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้ง ไวรัส แบคทีเรีย พืช แมลง สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ปีก ปลา และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mai และ Hu 2009) g-type lysozyme มีรายงานพบในสัตว์ปีกบางชนิด ปลา และหอย (Ito และคณะ 1999; Zhao และคณะ 2007) ส่วน i-type lysozyme พบเฉพาะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเท่านั้น (Ito และคณะ 1999; Bachali และคณะ 2007) จากการศึกษาวิเคราะห์ยีนของกุ้งกุลาดำจากฐานข้อมูล EST (<http://pmonodon.biotec.or.th>) พบ ยีนในกลุ่ม lysozyme 3 ชนิด ได้แก่ c-type (*PmLyzc*), i-type (*PmLyzi2*) และ destabilase (*PmLyzi1*) *PmLyzi1* หรือ

destabilase เป็น lysozyme ชนิด i-type มีขนาดเล็กที่สุด ประกอบด้วยกรดอะมิโน 142 ตัว โดยมี cysteine 10 ตัว ตามด้วย *PmLyzc* ที่มีกรดอะมิโน 158 ตัว โดยเป็น cysteine 8 ตัว ส่วน *PmLyzi2* มีขนาดใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยกรดอะมิโน 163 ตัว โดยมี cysteine 12 ตัว เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน lysozyme ทั้งสามกับ lysozyme ที่มีรายงานจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบ *PmLyzc* มีกรดอะมิโน glutamic และ aspartic ที่เป็น active residue ของ muramidase activity (รูปที่ 1ก.) และพบ 7 อะมิโนได้แก่ [GRG(K/N)GY(T/S)] เฉพาะ lysozyme ที่มาจากกิ้งก่าอยู่ระหว่าง Cys ที่ 6 กับ Cys ที่ 7 ขณะที่ *PmLyzi1-2* และ lysozyme ชนิด i-type ที่มาจาก arthropod เช่น แมลงหวี่ ยุง และกิ้งก่าอื่นๆจะขาดกรดอะมิโน glutamic และ aspartic แต่จะพบกรดอะมิโนที่เป็น active residue ทั้งสองใน i-type lysozyme ที่มาจาก annelid (ไส้เดือนดิน และ ทาก) echinoderm (ปลาดาว และ ปลิง) และ mollusk (หอยสองฝา และ หอยนางรม) ดังรูปที่ 1ข. เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ *PmLyzc* และ *PmLyzi1-2* กับ lysozyme c-, g- และ i type ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆด้วย phylogenetic tree โดยใช้ neighbor-joining และใช้ α -lactalbumin ของคนและหนูเป็น outgroups พบ lysozyme แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ c-, g- และ i-type โดย *PmLyzc* จัดอยู่ในกลุ่ม c-type ซึ่งรวมอยู่กับ lysozyme ของกิ้งก่าอื่นๆ (รูปที่ 2) ส่วน *PmLyzi1-2* จัดอยู่ใน i-type โดย *PmLyzi1* และ lysozyme หรือ destabilase ที่มาจากกิ้งก่าอื่นๆอยู่รวมกัน lysozyme i-type ที่มีกรดอะมิโน glutamic และ aspartic บริเวณ active site ขณะที่ *PmLyzi2* จัดกลุ่มอยู่กับ lysozyme i-type ที่มาจาก arthropod ซึ่งขาด active residue ที่บริเวณ active site (รูปที่ 2)

ก.

PmLyzc (GQ478702)	KVFRKCEFAELLETR--YILSRNDIKNWVCIAEFES-SFNTAAIN-RNRNRSTDYGI FQINNKYWCGSD---YGK
FcLyzc (AAV83994)	KVFGKCEFAELLETR--YNLSRNDIKNWVCIAEFES-SFNTAATN-RNRNRSTDYGI FQINNKYWCGSD---YGK
LvLyzc (AAL23948)	KVFGKCEFAELLKRD--YILSRNDIKNWVCIAEFES-SFNTAAIN-RNRNRSTDYGI FQINNKYWCGSD---YGK
MjLyzc (BAC57467)	KIFRKCEFAELLERR--YILSRNDIKNWVCIAEFES-SFNTGAIN-RNRNRSTDYGI FQINNKYWCGSD---YGK
DrLyzc (NP_631919)	KTLGRCDVYKIFKNEGLDGFEGFSIGNYVCTAYWES-RFKTHRV--RSADTGKDYGI FQINSFKWCDGDG-TPGGK
GgLyzc (1LSG A)	KVFGRCELAAAMKRHLNDYRGYSLGNWVCAAKFES-NFNTQATN-RNTDGGSTDYGI LQINSRWNCNDRTPGSR
MmLyzc (NP_001028599)	KVYERCEFARTLKRNGMAGYGVSLADWVCLAQHES-NYNTRATNYNRGDQSTDYGI FQINSRYWNCNDRTPRAV
HcLyzc (P05105)	KRFTRCGLVQELRRL---GFDETILMSNWVCLVENEGGRFTDKIGK-VNKNRSRDYGLFQINDKYWCSKG--TTPG
AgLyzc (XP_308481)	KTFGKCELAKALANN---GIAKASLPDWVCLVQNES-AFSTSATN-KNKNSTDYGI FQINNKYWCDSG--YGS-
	* : * . : : : * . * * : . : . * : * . * . .

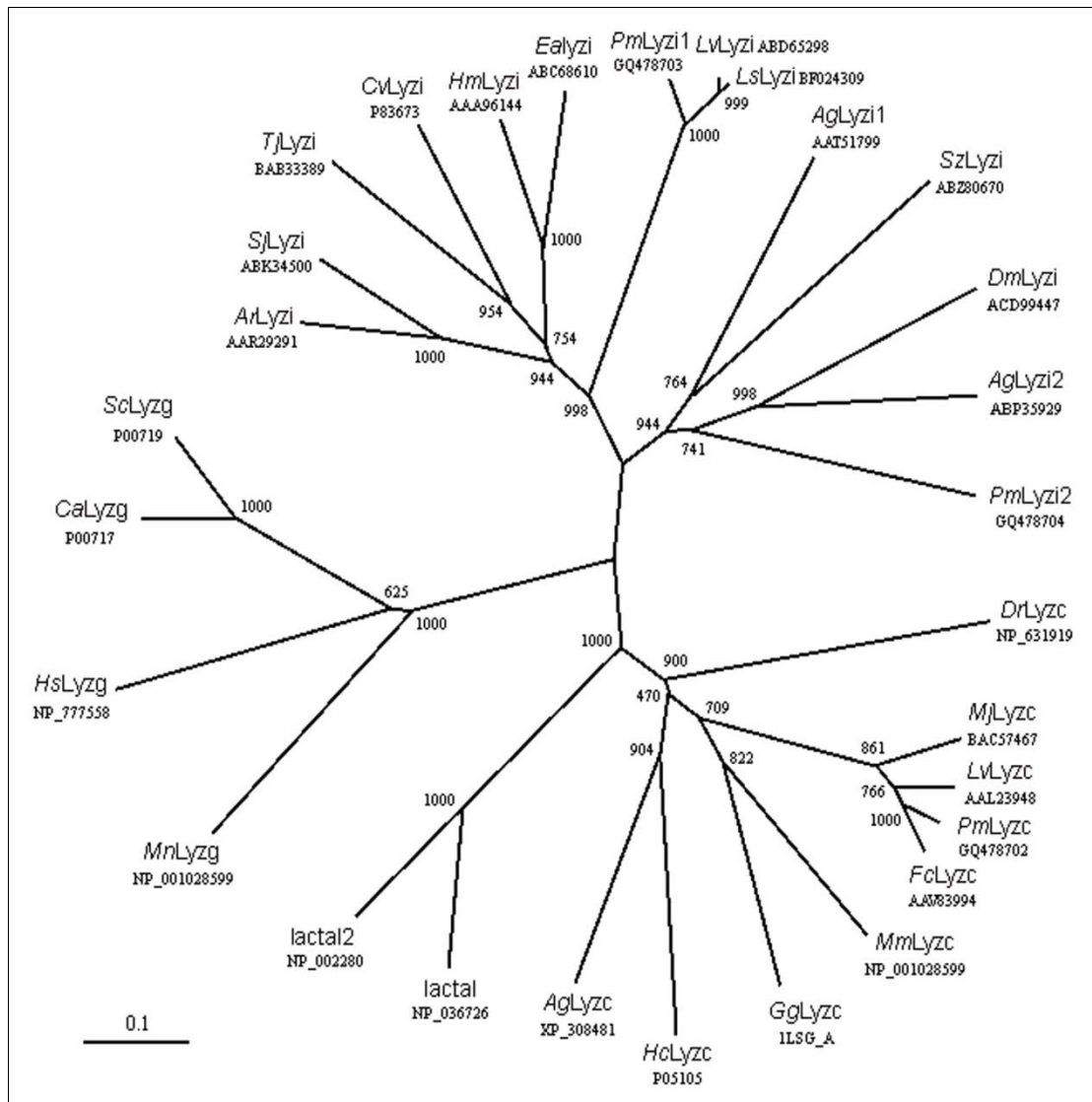
PmLyzc (GQ478702)	NVCGIPCSDLMSDDITAARCAETVRDRTERYKGRGKGYTAWVAYNSKCKNRDLQYMAECW-----
FcLyzc (AAV83994)	NVCGIPCSDLMSDDITAALRCAETVRRETERYRGRGEGYTAWVAYNSKCKNRDLQYMAECW-----
LvLyzc (AAL23948)	NVCKIPCSDLMSDDITEALRCAETIRRDTERFRGRGKYSAWVAYNSKCKNRDLQYMAECW-----
MjLyzc (BAC57467)	NACGIPCSDLMSDDITAALRCAEAVRRDTEGFRGRNGYTAWVAYNNKCKNRDLDRYMDACW-----
DrLyzc (NP_631919)	NLCKVACSDLLNDDLKASVGCALIVK-LMDGLK-----SWETWDSYCNCRKMSRWVKGCEQRKQSLRA
GgLyzc (1LSG A)	NLCNIPCSALLSSDITASVNCACKIVSDGNGMN-----AWVAWRNRCKGTVDQAWIRGCR-----
MmLyzc (NP_001028599)	NACGINGSALLQDDITAAIQCAKRVVRDPQGIK-----AWVAWRNRCKGTVDQAWIRGCR-----
HcLyzc (P05105)	KDCNVTCNQLLTDISVAATCAKKIYK-RHKFD-----AWYGWKNHCQHG-LPDIS-DC-----
AgLyzc (XP_308481)	NDCKIACKNLLNDDITDDIKCAKLIHK-RHGFN-----AWYGWKNHCNGKKLPNVS-SCF-----
	: * : * . * . * : . * : : : : : : : : : : : : : : : *

ข.

LvLyzi (ABD65298)	LEDSCCLACMCYVSSDGCVPMPDEVCRITTSWSEVCGPWAVTKPYWEDAHKPGG-----EFYTCMGWDWCNE
LsLyzi (BF024309)	LEDTCCLACMCYVSSDGCIMPDEVCRITTSWSEVCGPWAVTKPYWEDAHKPGG-----DFYTCMGWDWCNE
PmLyzi1 (GQ478703)	LEDSCCLACMCYVSSSGCVPMDGVCRNTAWSEVCGPWAVTKPYWEDAHKPGG-----DFYPCMDADWCNE
TjLyzi (BAB33389)	VSQKCLLCMKLBSGGCKPIG--CRMVVGSLSCGYFQIKQPYWIDCGKPGG-----DWKSCSNINCSS
CvLyzi (P83673)	VSQKCLRCICNVBSG-CRPIG--CHMDVNSDSCGYFQIKRAYWIDCGSPGG-----DWQTCANNLACSS
ArLyzi (AAR29291)	VPSGCLRCICVBSG-CRMPNPVCRMDVGSLSGCGPYQIKKGYWSDATLKGGSLM-----GDWKKCTATSPCE
SjLyzi (ABK34500)	-PSDCLKICFVBSG-CTIPSPCHMDVGSLSGCGPYQIKLGYWDARLKGGSD-----GDWQKCSATFDCE
HmLyzi (AAA96144)	FTDSCCLRCICKVSGCDSQIGK--CGMDVGSLSGCGPYQIKKPYWIDCGKPGG-----GYESCTKNKACSE
EaLyzi (ABC68610)	ISENCLNCICQIBGCESSQIGK--CRMVVGSLSCGFPYQIKKPYWIDCGRPGG-----DWKSCSTTQMDCSR
DmLyzi (ACD99447)	VTELCLTCICEAISG-CNATAICTSAEK--GACGIFRITWGYWVDAGKLTVNGEHPDSEKAFINCANDPHCAA
AgLyzi2 (ABP35929)	VTDVCLSCICEASSG-CDASLRCG-----DVCGMFAITWAYWADAGKFPVQGGSDSPDSQNAVANCANEPYCAA
PmLyzi2 (GQ478704)	VDPNCLGCLCEASTK-CNASTACHTPYPGAYFCGPFLLISWAYWADAKPIIEGDNAEQKGAFCRVCQDLYCGA
AgLyzi (AAT51799)	LNATCFRCICDASTG-CSTSTTCRQ-----SYCGPFSISRAYWMDAGRLVLPADPEPTRWGAFCDCANDYDCAT
SzLyzi (ABZ80670)	LHRQCMRCLCHVATE-CDLTRGCEK-----GYCGPYKISKIYWKDASQVTLPPDDKERAGAYEDCALSYQCAQ
	* : * : * . * : . * : : . * : * . : : * : *

LvLyzi (ABD65298)	QTVRAYLDRYVSN-----PYASCETYARTHYGGPFGMNEDYATD-----YWLQVKDCDLD
LsLyzi (BF024309)	QTVRAYLDRYVSN-----PYASCETYARTHYGGPFGMNEDYATD-----YWLQVKDCDLD
PmLyzi1 (GQ478703)	QTVRAYLDRYVEN-----PFATCETYARTHYGGPFGMNEDYATD-----YWLQVKDCDLD
TjLyzi (BAB33389)	KCVQQYMKRSATHYRC-PLN--CEGFAREHNGGPNCHSSRTLK-----YWELLQKPIG
CvLyzi (P83673)	RCVQAYMARYHRRSGC-SNS--CESFARIHNGGPRGCRNSNTEG-----YWRVQVQAQC
ArLyzi (AAR29291)	AAVQGYMERYAVQGR-L-GHPPTCEDFARIHNGGPNGYKNPATFG-----YWLKVKACLM
SjLyzi (ABK34500)	RAVQGYMARYATYARL-EHNPTCEDFARIHNGGPNGFKNPAEEK-----YWLRVKCKLD
HmLyzi (AAA96144)	TCVRAVMKRYGTCTG-GRTPCQDYARIHNGGPRGCKSSATVG-----YWNKVKQCLR
EaLyzi (ABC68610)	TCVRSYMKRYGTCTG-GRAPTQDYARIHNGGPKGCQHASTVG-----YWNKVKQCCS
DmLyzi (ACD99447)	DLVQNYMKKFN-QDCNDGEMDCHDYARIHKLGAIGCQA--DMPYN--FQSVFEECIE
AgLyzi2 (ABP35929)	RTVQGYMRKFG-QDCNGDGRIDCFDHAIVHKLGGYNCKN--AVPIV--YQSKIDECIQ
PmLyzi2 (GQ478704)	ETVRRYMAKFLDIDCNLDGTVDCTDYAHIMMGYGCDFSVSTTD---FYKVFCEKWD
AgLyzi (AAT51799)	GIVTQYMEKYG-TDCNGDGLVDCVDYTMHVNNGGPRCQALGCT---FASRFYQCLR
SzLyzi (ABZ80670)	RIVLNYIAKYG-RDCNDGIDTDDYMMINFGGYQCHPLNRSRSEAGVGLQRYKACNP
	* * : : : * : : : : : : : : : : : : : : : *

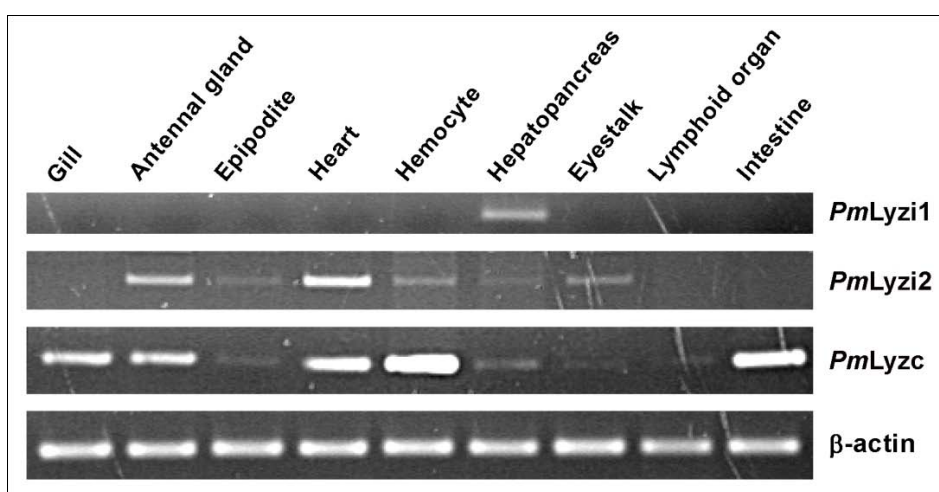
รูปที่ 1 (ก) เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ PmLyzc จากทั้งกุลาดำกับ c-type lysozyme ที่มีรายงานในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ กุ้งขาวจีน (FcLyzc; *F. chinensis*), กุ้งขาวแปซิฟิก (LvLyzc; *L. Vannamei*), กุ้งครุมา (MjLyzc; *Marsupenaeus japonicas*), ปลาหมอสี (DrLyzc; *Danio rerio*), ฝี่เสื้อกลางคืน (HcLyzc; *Hyalophora cecropia*) และยุง (AgLyzc; *Anopheles gambiae*) และในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ หนู (MmLyzc; *Mus musculus*) และไก่ (GgLyzc; *Gallus gallus*) (ข) เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ PmLyzi1 และ PmLyzi2 จากทั้งกุลาดำกับ i-type lysozyme ที่มีรายงานในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ กุ้งขาวแปซิฟิก (LvLyzi; *L. Vannamei*, LsLyzi; *L. setiferus*), หอยสองฝา (TjLyzi; *Tapes japonica*), หอยนางรม (CvLyzi; *Crassostrea virginica*), ปลาดาว (ArLyzi; *Asterias rubens*), ไส้เดือนดิน (EaLyzi; *Eisenia Andrei*), แมลงหวี่ (DmLyzi; *Drosophila melanogaster*), ยุง (AgLyzi1-2; *Anopheles gambiae*), ตัวง (SzLyzi; *Sitophilus zeamais*), ปลิงทะเล (SjLyzi; *Stichopus japonicas*) และหาค (HmLyzi; *Hirudo medicinalis*) กรดอะมิโน glutamic และ aspartic ซึ่งเป็น catalytic residue แสดงด้วยแถบสีดำและกรดอะมิโน cysteine แสดงด้วยแถบสีเทา * แสดงถึงกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (.) และ (:) แสดงถึงกรดอะมิโนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน



รูปที่ 2 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของ lysozyme ชนิด c-, g- และ i-type โดยมี α -lactalbumin ของคนและหนูเป็น outgroups โดยลำดับกรดอะมิโนของ lysozyme ต่างๆได้มาจาก GenBank *Pm*, *P. monodon*; *Fc*, *F. chinensis*; *Lv*, *L. vannamei*; *Mj*, *M. japonica*; *Ls*, *L. sertiferus*; *Ag*, *Anopheles gambiae*; *Hc*, *Hyalophora cecropia*; *Gg*, *Gallus gallus*; *Dr*, *Danio rerio*; *Tj*, *Tapes japonica*; *Cv*, *Crassostrea virginica*; *Ar*, *Asterias rubens*; *Sj*, *Stichopus japonica*; *Hm*, *Hirudo medicinalis*; *Ea*, *Eisenia andrei*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Sz*, *Sitophilus zeamais*; *Ca*, *Cygnus atratus*; *Sc*, *Struthio camelus*; *Mm*, *Mus musculus*; *Hs*, *Homo sapiens*.

4.1.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน lysozyme ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำปกติ โดยใช้เทคนิค RT-PCR

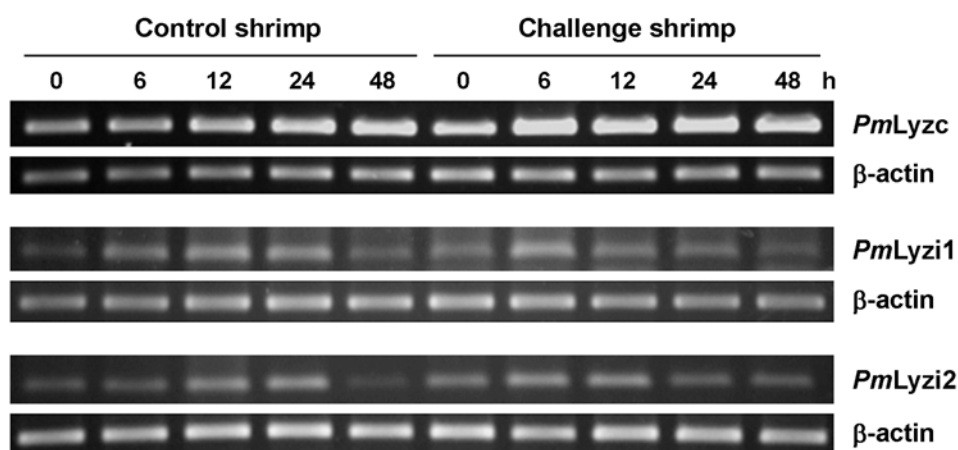
ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PmLyzc*, *PmLyz1* และ *PmLyz2* จากเนื้อเยื่อทั้ง 9 อวัยวะของกุ้ง ได้แก่ เหงือก, antennal gland, epipodite, หัวใจ, เม็ดเลือด, hepatopancreas, eyestalk, lymphoid organ และ ลำไส้ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบ *PmLyzc* และ *PmLyz2* มีการแสดงออกในหลายอวัยวะ โดย *PmLyzc* มีการแสดงออกมากที่สุดในเม็ดเลือด *PmLyz2* แสดงออกมากที่สุดในหัวใจ ในขณะที่ *PmLyz1* แสดงออกเฉพาะใน hepatopancreas ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การแสดงออกของยีน lysozyme ทั้งสามไอโซฟอร์ม *PmLyzc*, *PmLyz1* และ *PmLyz2* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีน β -actin เป็นยีนควบคุม

4.1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน lysozyme ในกุ้งกุลาดำที่กระตุ้นด้วย *V. harveyi*

หลังจากพบการแสดงออกของยีน lysozyme ไอโซฟอร์มต่างๆมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน จึงศึกษาการแสดงออกของยีน lysozyme หลังกุ้งได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* ในเม็ดเลือด, ตับ และ หัวใจ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งพบการแสดงออกของยีน *PmLyzc* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl (รูปที่ 4) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของยีน *PmLyz1* และ *PmLyz2* ในตับและหัวใจหลังกุ้งได้รับการกระตุ้นด้วย *V. harveyi* ตามลำดับ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การแสดงออกของยีน *PmLyzc*, *PmLyzi1* และ *PmLyzi2* ในเม็ดเลือด ตับ และหัวใจตามลำดับ หลังจากกุ้งกุลาดำถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* ด้วยการทำให้ RT-PCR โดยใช้การแสดงออกของยีน β-actin เป็นยีนควบคุม

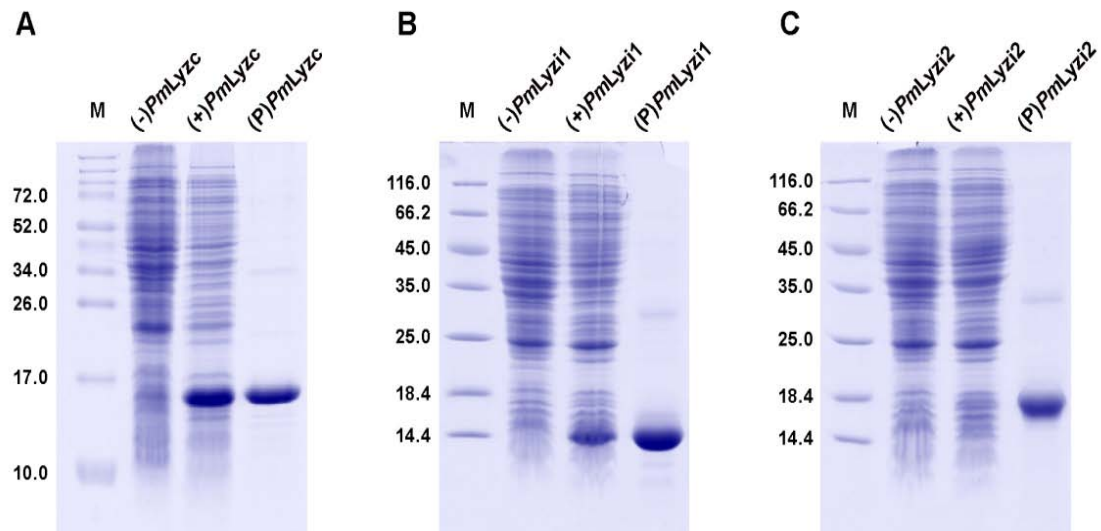
4.1.3 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme และทำบริสุทธิ์

เพื่อทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของ lysozyme จากกุ้งกุลาดำ จึงโคลนยีน lysozyme ทั้งสามไอโซฟอร์มเข้าสู่เวกเตอร์ pET19 แล้วทำการย้ายเข้าสู่ *E. coli* Rosetta ทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย IPTG หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE พบรีคอมบิแนนท์โปรตีน *PmLyzc*, *PmLyzi1* และ *PmLyzi2* มีขนาดประมาณ 16, 15 และ 17 kDa ตามลำดับ ดังรูปที่ 5

4.1.4 การทดสอบ muramidase activity

muramidase activity เป็นฤทธิ์ในการย่อย peptidoglycan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก พบ muramidase activity ใน lysozyme โดยทั่วไป เมื่อได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน lysozyme ทั้งสามไอโซฟอร์มแล้ว จึงศึกษา muramidase activity ของ lysozyme ในกุ้งกุลาดำ โดยบ่มโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme กับเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* ที่ 25 °C แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 20 นาที พบ เฉพาะ *PmLyzc* เท่านั้นที่มีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเกิดจากการย่อย peptidoglycan ของ *M. luteus* ซึ่งให้เห็นว่า เฉพาะ *PmLyzc* เท่านั้นที่มีฤทธิ์ muramidase ดังรูปที่ 6 ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ *PmLyzi1* และ 2 เหมือนกับ i-type lysozyme ที่พบ

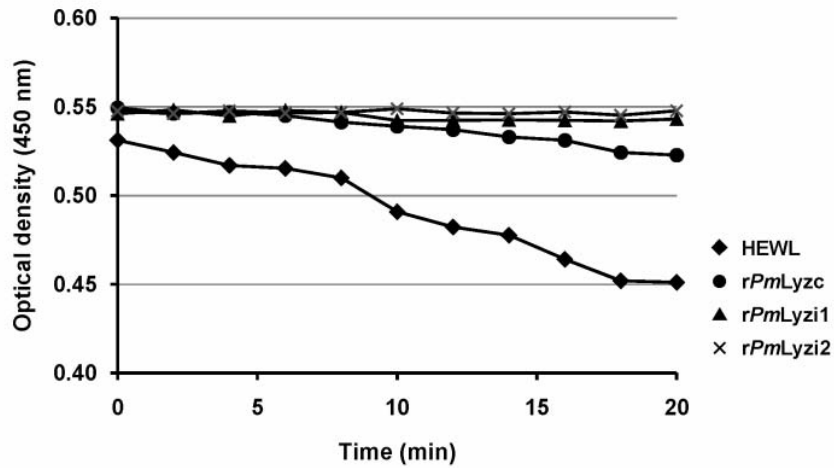
ในสัตว์ตระกูล arthropod เช่น แมลงหริ, ยุง และกิ้งก่าที่ไม่มีกรดอะมิโน Glu และ Asp ที่เป็น catalytic residue ที่บริเวณ active site จึงทำให้ไม่มี muramidase activity



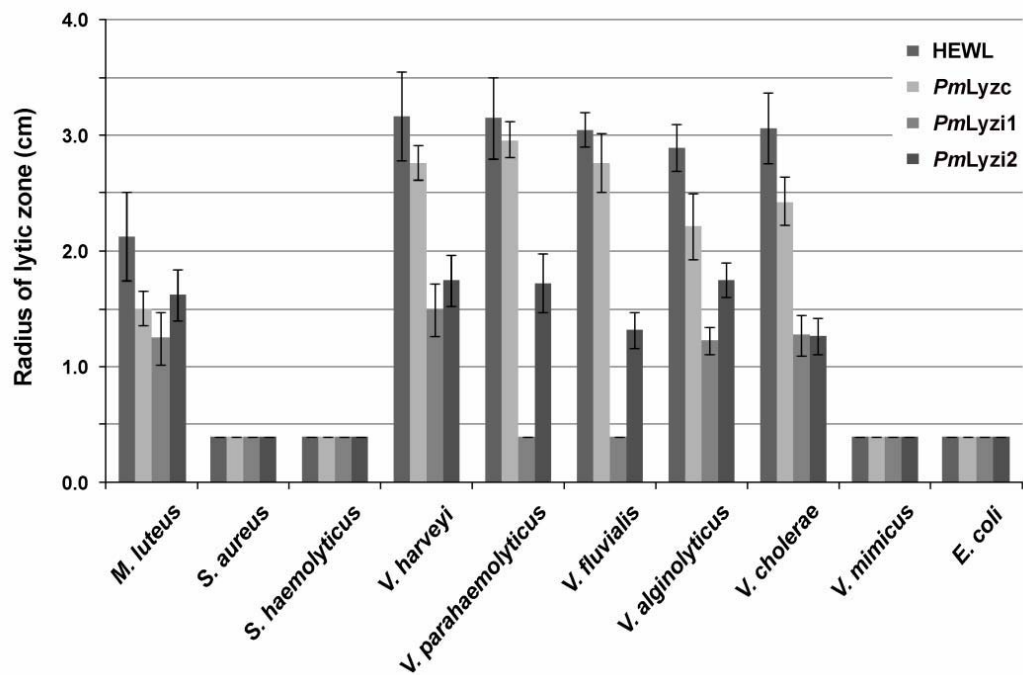
รูปที่ 5 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *PmLzyc* (A), *PmLyzi1* (B) และ *PmLyzi2* (C) ใน *E. coli* Rosetta (-) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไม่ได้รับการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (+) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้รับการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย IPTG และ (P) แสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์

4.1.5 การทดสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียและการศึกษา synergistic effect

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบด้วยเทคนิค agar diffusion โดยบ่มโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme ความเข้มข้น 10 μ g ในหลุมของ plate ที่มีเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบ lysozyme ทั้งสามไอโซฟอร์มสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยยับยั้ง *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในกุ้ง และ *V. cholera* ที่ก่อโรคในคนได้ดี ดังแสดงผลการยับยั้งในรูปที่ 7 และ พบ *rPmLzyc* มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย



รูปที่ 6 การทดสอบฤทธิ์ muramidase ของ rPmLyzc, rPmLyzi1 และ rPmLyzi2 โดยการบ่มรีคอมบิแนนท์โปรตีนกับเชื้อ *Micrococcus luteus* และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ lysozyme จากไข่ขาว (HEWL) เป็นโปรตีนควบคุม



รูปที่ 7 ฤทธิ์ของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ PmLyzc, PmLyzi1 และ PmLyzi2 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยใช้เทคนิค agar diffusion แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสเป็นเซนติเมตร โดยมี lysozyme จากไข่ขาว (HEWL) เป็นยีนควบคุม

เมื่อศึกษาฤทธิ์ร่วม (synergistic) ของ lysozyme ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยการบ่มโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme สอง หรือสามไอโซฟอร์มในหลุมของ plate ที่มีเชื้อแบคทีเรีย ไม่พบการเสริมฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ทั้งสามอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบวงใสมีขนาดเท่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับวงใสที่เกิดจากโปรตีนรีคอมบิแนนท์ lysozyme เพียงตัวเดียว

4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของกลุ่มยีน penaeidin

penaeidin เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพซึ่งพบเฉพาะในกุ้งตระกูล Penaeid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพได้มากมายทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา พบครั้งแรกในกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) (Destoumieux และคณะ 1997) penaeidin ประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆคือ proline-rich domain (PRD) อยู่ทางปลายด้านอะมิโน และ cysteine-rich domain (CRD) อยู่ทางปลายด้านคาร์บอกซิล (Destoumieux และคณะ 1997; Destoumieux และคณะ 2000) Gueguen และคณะ (2006) ได้จัดจำแนก penaeidin ที่พบจากกุ้งสกุลต่างๆ ได้เป็น 5 ไอโซฟอร์ม และแสดงอยู่ใน PenBase ([ผลิตผล! การอ้างอิงการเชื่อมโยงหลายมิติไม่ถูกต้อง](#) penaeidin ไอโซฟอร์ม 1 เป็น variation ของ penaeidin ไอโซฟอร์ม 2 และแสดงกรดอะมิโนที่เป็น signature ของแต่ละไอโซฟอร์ม ดังรูปที่ 8 ในปี 2007 Kang และคณะ ได้รายงานการพบ penaeidin5 จากกุ้งชาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) จากฐานข้อมูล Expressed Sequence Tag database ของกุ้งกุลาดำ ([ผลิตผล! การอ้างอิงการเชื่อมโยงหลายมิติไม่ถูกต้อง](#) penaeidin 2 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ penaeidin3 (PenmonPEN3; accession no. ACQ66008 และ FJ686018) และ penaeidin5 (PenmonPEN5; accession no. ACQ66006 และ ACQ66007) เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนกับ penaeidin ไอโซฟอร์มอื่นๆที่มีรายงานใน PenBase พบกรดอะมิโนที่จำเพาะกับ penaeidin3 และ penaeidin5 คือ Asp43 และ Ser18 ตามลำดับ(Gueguen และคณะ 2006; Kang และคณะ 2007; Tassanakajon และคณะ 2010)

PenmonPEN3 และ PenmonPEN5 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 74 และ 79 อะมิโนตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ PenmonPEN3 กับ PenmonPEN5 พบมีความเหมือน 57% ขณะที่ PenmonPEN5 เหมือนกับ penaeidin5 จาก *F. chinensis* 72% เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ PenmonPEN3 และ PenmonPEN5 กับ penaeidin3 และ penaeidin5 ของ *F. chinensis* พบ penaeidin3 มีความแตกต่างของทั้งทั้งสองสกุลมากกว่าใน penaeidin5 (รูปที่ 9) อย่างไรก็ตาม penaeidin ทั้งสอง

ไอโซฟอร์มยังคงแสดงให้เห็นบริเวณอนุรักษ์ทั้ง signal peptide และ PRD ที่ปลายด้านอะมิโน และ CRD ที่ปลายคาร์บอกซิล ซึ่งจะเห็น Cys อนุรักษ์จำนวน 6 ตัว

	1	5	13	18		35	37	43	46
PEN3	Q	G	R	V		S	R	Q	S
				G			H		A
							P		
PEN4	--	S	K	I		-	Y	T	L
PEN2		G	R	G		-	Y	D	N
		S						A	I
PEN5	Q	S	R	S		G	R	D	A
		G				S	H	K	

รูปที่ 8 แสดงกรดอะมิโน 8 ตำแหน่งที่จำเพาะกับแต่ละไอโซฟอร์มของ penaeidin โดยอะมิโนที่มีแถบดำ แสดงกรดอะมิโนที่มีเฉพาะไอโซฟอร์มนั้นเท่านั้น (Gueguen และคณะ 2006; Kang และคณะ 2007; Tassanakajon และคณะ 2010)

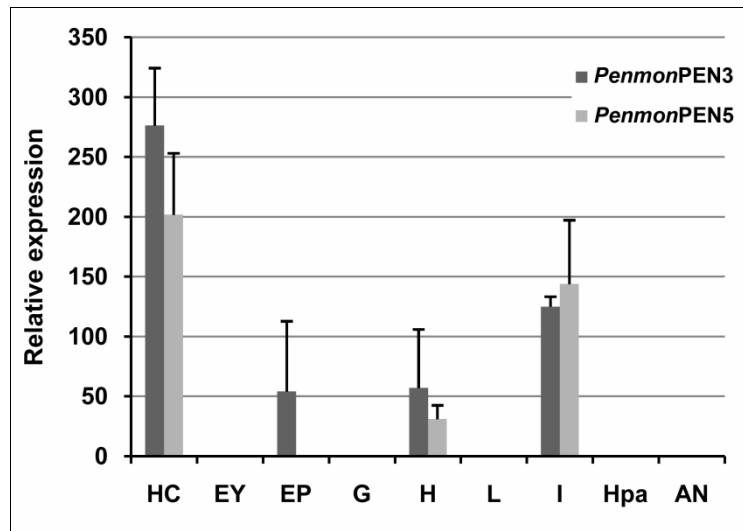
PenmonPEN3b (ACQ66007)	MRLVVCLVFLASFALVCQAGYQG	GGYTRPFPRPPYGG	---	GYHPV	---	PVCTSCHRLSPL	ARACCRQLRCCDAKQTY-G
PenmonPEN3a (ACQ66006)	MRLVVCLVFLASFALVCQAGYQG	GGYTRPFPRPPYGG	---	GYHPV	---	PVCTSCHRLSPL	ARACCRQLRCCDAKQTY-G
FenchiPEN3-1 (AAP33450)	MRLVVCLVFLASFALVCQGG	--KGGYTRPISRPPYGG	---	GYG	---	NVCTSCHVLTTS	ARSCCSRFRGCCVPRRGYSG
FenchiPEN3-2 (ABC33920)	MRLVVCLVFLASFALVCQGG	--KSGYTRPISRPPYGG	---	GYG	---	NVCTSCHVLTTS	ARSCCSRFRGCCVPRRGYSG
PenmonPEN5 (ACQ66008)	MRLVVCLVFLVSFALVCQGGYK	GGYTGYSRPPYGSRPISTRPISR	PATGCTSCHTITFD	KAIA	CCCRQFGRCCS	SALKG---	
FenchiPEN5-2 (AAZ80041)	MRLVVCLVFLASFALVCRGGYK	SHTGYPRLPYGSRPIGLRPITRPDP	SCACRIITLDDAIA	CCRRRLGRCCS	SALKG---		
FenchiPEN5-1 (AAZ79334)	MRLVVCLVFLASFALVCRGGYK	SHTGYPRLPYGSRPIGLRPITRPDP	SCACRIITLDDAIA	CCRRRLGRCCS	SALKG---		
FenchiPEN5 (AAV85945)	MRLVVCLVFLASFALVCRGGYK	SHTGYPRLPYGSRPIGIRPITRPDP	SCACRIITLDDAIA	CCRRRLGRCCS	SALKG---		
	*****:	*****:	*	..*:	* ..**	..*:	..*:

รูปที่ 9 เปรียบเทียบลำดับอะมิโนของ penaeidin3 และ penaeidin5 ของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) และกุ้งขาวจีน (*F. chinensis*) แสดงบริเวณอนุรักษ์ peptide sequence (ขีดเส้นใต้) และ proline-rich domain (PRD) ทางปลายด้านอะมิโน และ cysteine-rich domain (CRD) ทางปลายด้านคาร์บอกซิล conserved Cys 6 ตัวแสดงด้วย ▼ ส่วนกรดอะมิโนที่เป็น signature ของแต่ละไอโซฟอร์มแสดงด้วยแถบสีเทา และกรดอะมิโนที่จำเพาะกับ penaeidin3 และ penaeidin5 แสดงด้วยแถบสีดำ

4.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน penaeidin ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำปกติ

โดยใช้เทคนิค RT-PCR

ศึกษาการแสดงออกของยีน penaeidin ทั้ง *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อของกุ้งสุขภาพดี 3 ตัว 9 อวัยวะ คือ เหงือก, antennal gland, epipodite, หัวใจ, เม็ดเลือด, hepatopancreas, eyestalk, lymphoid organ และ ลำไส้ พบ penaeidin ทั้งสองไอโซฟอร์มแสดงออกในบางอวัยวะ โดยทั้งสองไอโซฟอร์มแสดงออกมากที่สุดในเม็ดเลือด (รูปที่ 10) ตามด้วย ลำไส้ และ หัวใจ ส่วนที่ epipodite พบการแสดงออกเฉพาะ *PenmonPEN3* เท่านั้น

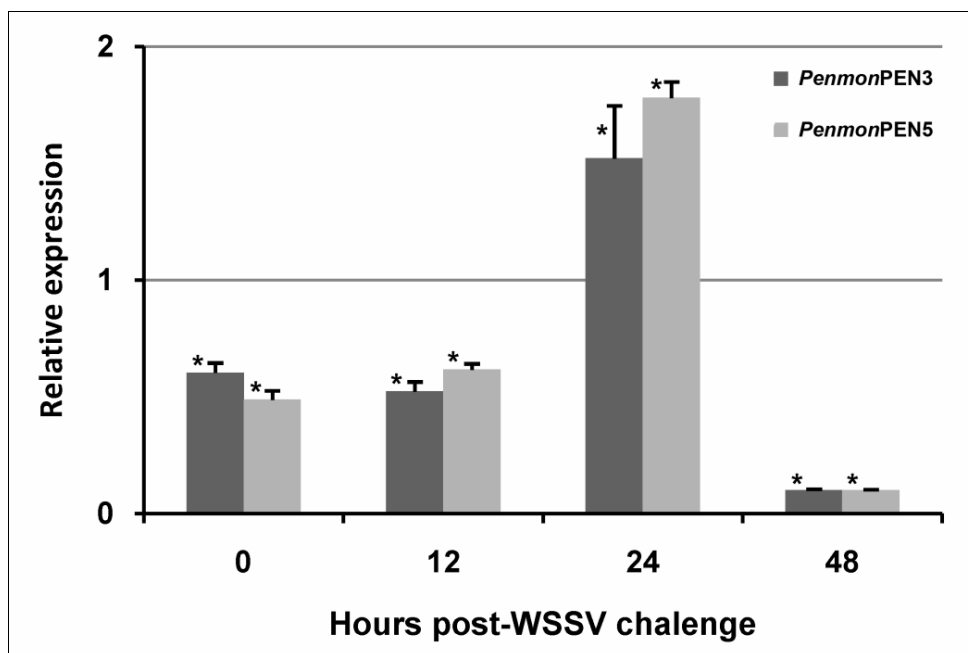


รูปที่ 10 การตรวจการแสดงออกของยีน penaeidin ด้วยเทคนิค RT-PCR จากกุ้งกุลาดำปกติ 3 ตัว ใน 9 อวัยวะ ได้แก่ เม็ดเลือด (HC), eyestalk (EY), epipodite (EP), เหงือก (G), หัวใจ (H), lymphoid organ (L), ลำไส้ (I), hepatopancreas (Hpa) และ antennal gland (AN) โดยใช้ยีน EF1 α เป็นยีนควบคุม

4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน penaeidin ในกุ้งกุลาดำที่กระตุ้นด้วย

WSSV โดยใช้เทคนิค real time RT-PCR

เพื่อศึกษาการตอบสนองของยีน *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* หลังจากกุ้งกุลาดำถูกกระตุ้นให้ติดเชื้อ WSSV จึงเก็บเลือดจากกลุ่มที่ฉีดเชื้อ WSSV และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl ที่เวลาต่างๆแล้วเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนทั้งสองไอโซฟอร์ม โดยมีการแสดงออกของยีน EF1 α เป็นยีนควบคุม หลังจากวิเคราะห์การแสดงออกด้วย real time RT-PCR และวิเคราะห์ผลความแตกต่างทางสถิติด้วย One-Way ANOVA แล้ว พบการแสดงออกของทั้งสองไอโซฟอร์มลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เวลา 0.25 ชั่วโมง (15 นาที) หลังการกระตุ้นด้วย WSSV อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ประมาณ 1.5 และ 1.8 เท่าตามลำดับ และกลับลดลงอย่างรวดเร็วอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 11)



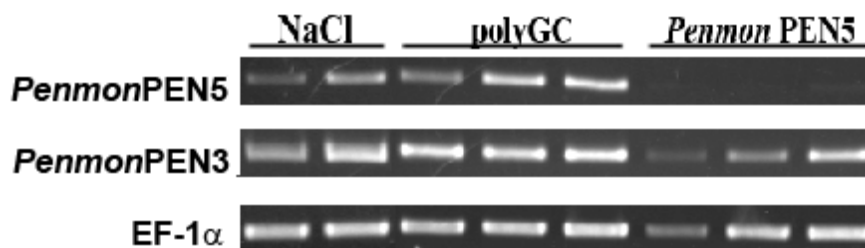
รูปที่ 11 การศึกษาการแสดงออกของยีน *PenmonPEN3* และยีน *PenmonPEN5* ในกุ้งที่ถูกกระตุ้นให้ติดเชื้อ WSSV ที่เวลา 0.25, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อ WSSV โดยการทำ real time RT-PCR เปรียบเทียบกับกลุ่มกุ้งควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl โดยเทียบการแสดงออกของยีน *penaeidin* กับ ยีน *EF-1α* แล้วจึงเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนกลุ่มควบคุม โดยให้การแสดงออกของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4.2.3 การศึกษาหน้าที่ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน *penaeidin* ในกุ้งที่ติดเชื้อ

WSSV ด้วยเทคนิค RNAi

ทำการศึกษาหน้าที่ของยีน *penaeidin* ต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค RNAi โดยสร้าง *dsPenmonPEN3* และ *dsPenmomPEN5* หลังจากทดลองหาความเข้มข้นในการฉีด double strand RNA แล้วจึงเลือกฉีด *dsPenmonPEN3* และ *dsPenmomPEN5* 5 µg ต่อกุ้งหนัก 1 g ในกุ้งกลุ่มทดลอง 3 ตัว และใช้ poly GC และ NaCl เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้น 24 ชั่วโมงฉีดซ้ำด้วย double strand RNA 2.5 µg ต่อกุ้งหนัก 1 g เลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมงจึงเก็บเลือดเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *penaeidin* โดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งพบ *dsPenonPEN3* ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN3* ได้หมด และยังมีผลลดการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* ส่วนการฉีด *dsPenmonPEN5* สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* ได้ดี เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้ง 2 ดังรูปที่ 12 เพื่อดูความจำเพาะของ *dsPenmonPEN5* ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน จึงตรวจการแสดงออกของยีน

PenmonPEN3 พบการฉีด *dsPenmonPEN5* ส่งผลลดการแสดงออกของยีน *PenmonPEN3* เล็กน้อยเมื่อเทียบกับกึ่งกลุ่มควบคุม (รูปที่ 12)



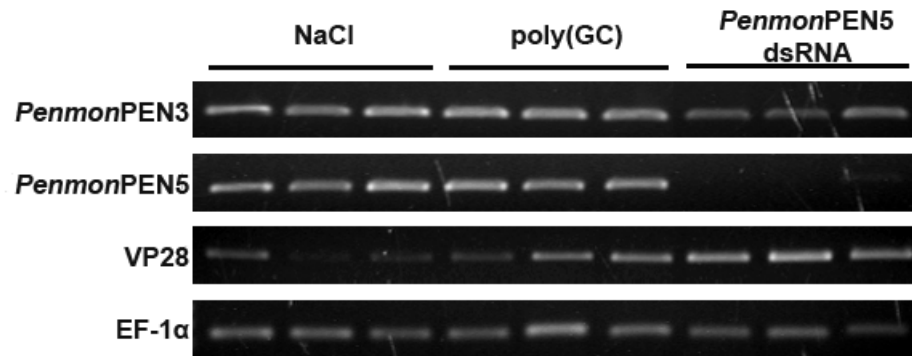
รูปที่ 12 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* ในเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ หลังจากฉีด NaCl, poly GC และ *dsPenmonPNE5* สองรอบ หลังจากเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* และ *PenmonPEN3* โดยมียีน EF-1 α เป็นยีนควบคุม (ทำการทดลองซ้ำสองครั้งจากกึ่งสองกลุ่ม รูปแสดงผลของกึ่ง 1 กลุ่ม)

เมื่อ *dsPenmonPEN5* มีความจำเพาะในการยับยั้งการแสดงออกของยีน จึงทำการศึกษาหน้าที่ของยีน *PenmonPEN5* ในกึ่งที่ติดเชื้อ WSSV โดยทำการฉีด *dsPenmonPEN5* สองครั้ง โดยในการฉีดครั้งที่สองทำการฉีดเชื้อ WSSV จำนวน 100 copy ไปพร้อมกับการฉีด double strand RNA โดยมีกึ่งกลุ่มที่ฉีด polyGC และ NaCl เป็นกลุ่มควบคุม หลังฉีด WSSV เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเม็ดเลือดสกัด total RNA เพื่อตรวจการติดเชื้อ WSSV โดยดูการแสดงออกของยีน VP28 ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนที่ผิวของไวรัสด้วยการทำ RT-PCR และวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน VP28 เทียบกับการแสดงออกของยีน EF-1 α และใช้ One Way ANOVA เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบ กึ่งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* มีการแสดงออกของยีน VP28 มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีการแสดงออกของยีน EF1- α เป็นยีนควบคุม (รูปที่ 13 ก-ข)

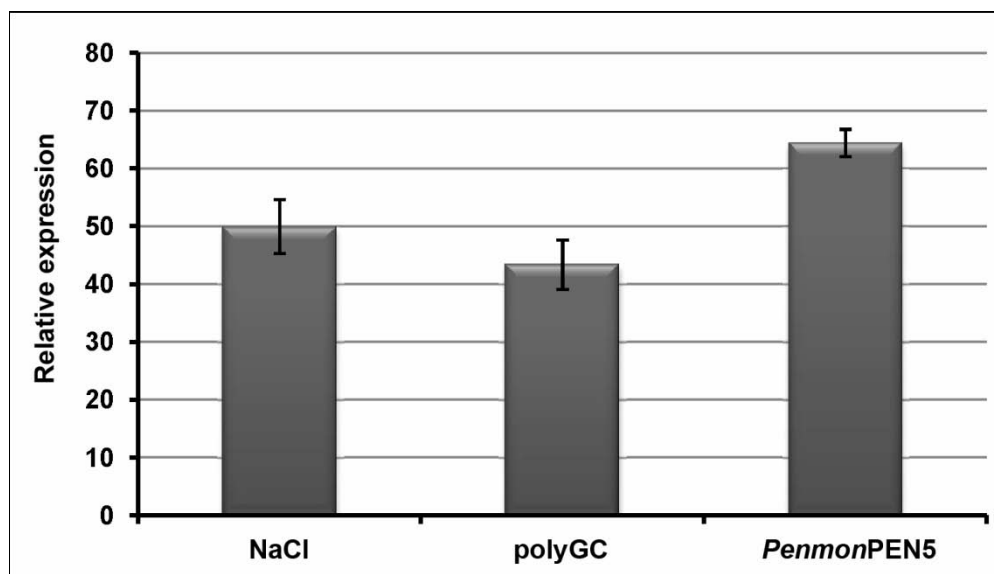
เพื่อตรวจสอบจำนวน copy ของ WSSV หลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPNE5* แล้วกระตุ้นให้กึ่งติดเชื้อ WSSV จึงทำการฉีด *dsPenmonPEN5* สองครั้งและฉีด WSSV จำนวน 100 copy หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงทำการเก็บเม็ดเลือดเพื่อสกัด genomic DNA วิเคราะห์จำนวน copy ของไวรัสจาก genomic DNA ด้วยเทคนิค real time RT-PCR พบ กึ่งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออก

ของยีน *PenmonPEN5* มีการแสดงออกของยีน VP28 เพิ่มขึ้น 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย polyGC คือเพิ่มขึ้นจาก 7.8×10^4 copy ในกลุ่มควบคุม เป็น 1.5×10^5 copy (รูปที่ 14)

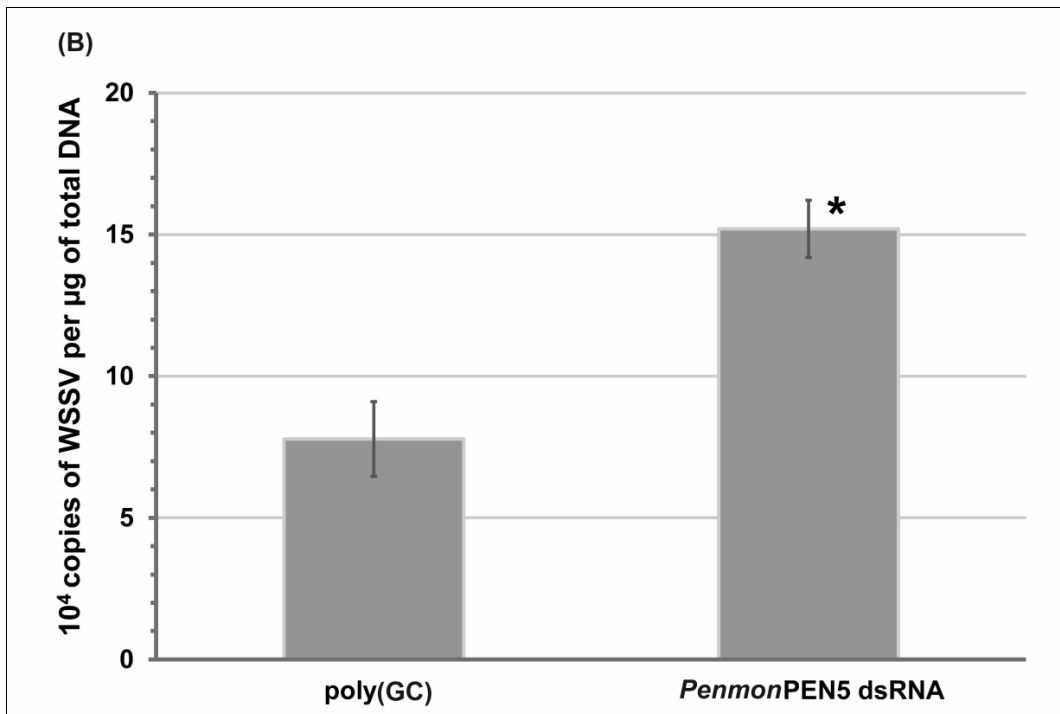
ก.



ข.



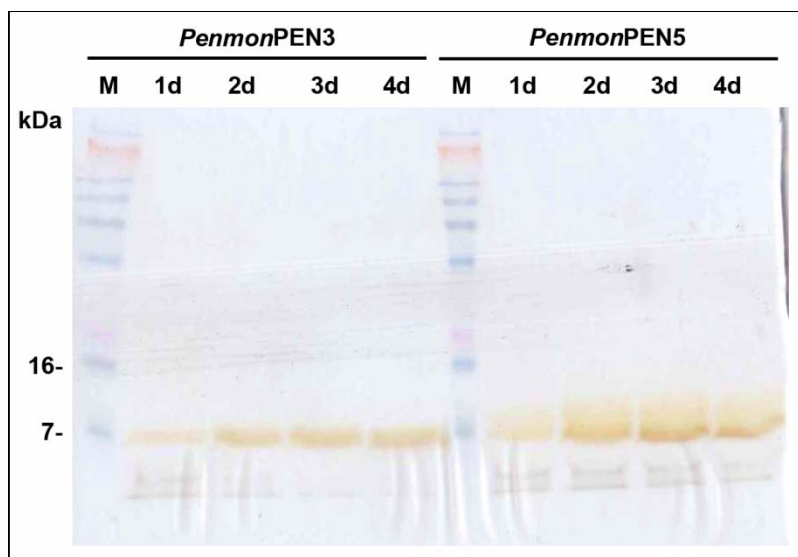
รูปที่ 13 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* ด้วย ds*PenmonPEN5* ในกุ้ง ส่งผลให้การแสดงออกของยีน VP28 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย polyGC และ NaCl ซึ่งตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ด้วย RT-PCR ที่ใช้การแสดงออกของยีน EF-1α เป็นยีนควบคุม (ก) วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน VP28 เทียบกับการแสดงออกของยีน EF-1α และใช้ One Way ANOVA เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ (ข) (ทำการทดลองซ้ำสองครั้งจากกุ้งสองกลุ่ม รูปแสดงผลของกุ้ง 1 กลุ่ม)



รูปที่ 14 การตรวจสอบจำนวน copy ของยีน VP28 ด้วย real time RT-PCR หลังจากถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* ด้วย *dsPenmonPEN5* และกระตุ้นให้ติดเชื้อ WSSV โดยมีกลุ่มที่ฉีดด้วย polyGC และ NaCl เป็นกลุ่มควบคุม และใช้การแสดงออกของยีน EF-1α เป็นยีนควบคุม (ทำการทดลองซ้ำสองครั้งจากทั้งสองกลุ่ม รูปแสดงผลของทั้ง 1 กลุ่ม)

4.2.4 การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ penaeidin และทำบริสุทธิ์

เพื่อศึกษาผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน penaeidin ต่อการติดเชื้อ WSSV ใน cell line ของเม็ดเลือดกุ้ง จึงผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของทั้งสองไอโซฟอร์ม โดยโคลนยีนสมบูรณ์ของ *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* เข้าในเวกเตอร์ pPIC9K และย้ายเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Pichia pastoris* km71 คัดเลือกโคลนที่ให้ copy ของยีน *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* มากสุด จากนั้นผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์โดยใช้ methanol เป็นตัวชักนำ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย SDS-PAGE พบ *rPenmonPEN3* และ *rPenmonPEN5* มีขนาดประมาณ 7 kDa และแสดงออกมากที่สุดในวันที่ 3 (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* โดยใช้ระบบยีสต์ *Pichia pastoris* km71 หลังจากชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย Methanol แล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแต่ละวันเป็นเวลา 4 วัน (1d-4d) โดยใช้ SDS-PAGE พบรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองมีขนาดประมาณ 7 kDa และแสดงออกมากที่สุดในวันที่ 3 M แสดงขนาดของโปรตีนมาตรฐาน

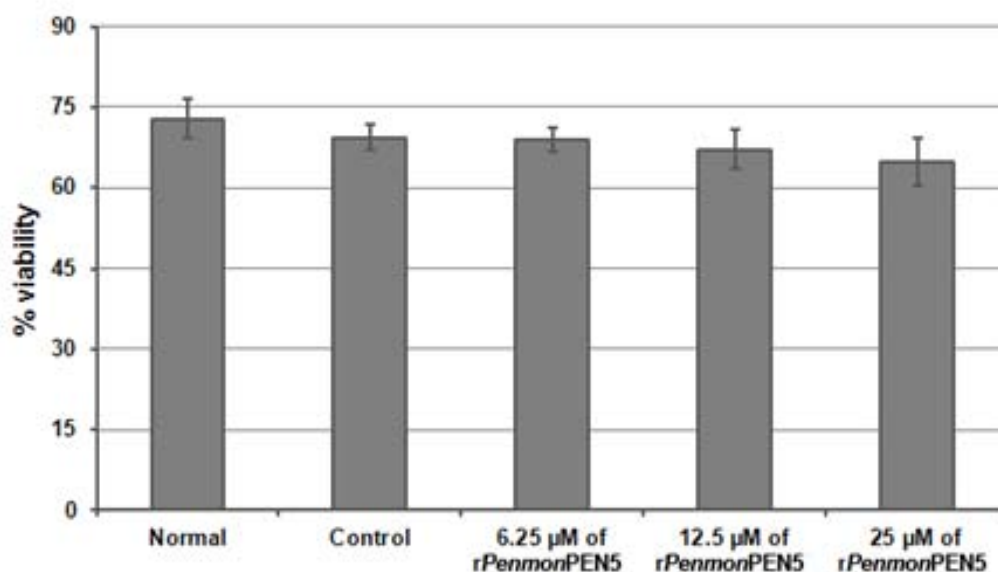
4.2.5 การทดสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนรีคอมบิแนนท์

penaeidin

เพื่อยืนยันว่า *rPenmonPEN3* และ *rPenmonPEN5* ที่ได้มี activity เพื่อนำไปศึกษาต่อใน cell เม็ดเลือด ดังนั้นเมื่อได้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* แล้วจึงทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Micrococcus luteus* และ *Aerococcus viridians* พบ *rPenmonPEN3* และ *rPenmonPEN5* ที่ความเข้มข้น 60 µg ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นวงใสขนาด 2.5 และ 1.9 ซม. ใน plate *M. luteus* และเกิดวงใสขนาด 2.0 และ 1.3 ซม. ใน plate *A. viridians* ตามลำดับ เมื่อศึกษาฤทธิ์ร่วม (synergistic) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยการบ่มโปรตีนรีคอมบิแนนท์ *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* ในหลุมของ plate ที่มีเชื้อแบคทีเรีย ไม่พบการเสริมฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ทั้งสองไอโซฟอร์ม โดยพบวงใสมีขนาดไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวงใสที่เกิดจากโปรตีนรีคอมบิแนนท์ penaeidin เพียงตัวเดียว

4.2.6 การศึกษาความเป็นพิษของ *rPenmonPEN5* ต่อ cell เม็ดเลือดก้าง

เพื่อศึกษาผลของ *rPenmonPEN5* ต่อการติดเชื้อ WSSV ใน cell เม็ดเลือด ก้าง นำ *rPenmonPEN5* มาทดสอบเพื่อดูว่าปริมาณที่ใช้เป็นพิษต่อ cell เม็ดเลือดหรือไม่ โดยเตรียม cell เม็ดเลือดของก้างใน microtiter plate หลังจากเลี้ยง cell เม็ดเลือดใน L-15 culture medium ที่ 28 °C เพื่อให้ cell ติดกับพื้นของ plate แล้ว จึงนำ *rPenmonPEN5* มาบ่มกับ cell เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงล้างออกด้วย L-15 culture medium หลังจากเลี้ยง cell เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงย้อม trypan blue เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของ cell ที่มีชีวิตกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ buffer แทนรีคอมบิแนนท์โปรตีน จากผลการทดลองพบว่า เม็ดเลือดที่บ่มกับ *rPenmonPEN5* ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 μ M มีเปอร์เซ็นต์ cell ที่มีชีวิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ buffer (รูปที่ 16) ซึ่งให้เห็นว่า *rPenmonPEN5* ไม่มีความเป็นพิษต่อ cell เม็ดเลือดของก้าง

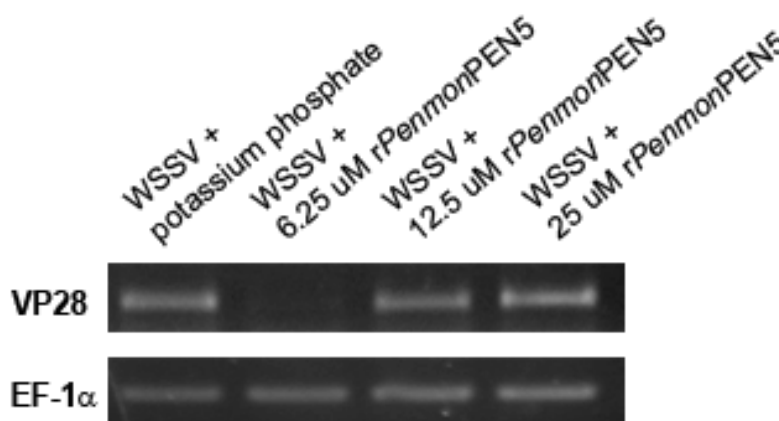


รูปที่ 16 การทดสอบความเป็นพิษของ *rPenmonPEN5* ต่อ cell เม็ดเลือดก้าง โดยบ่ม *rPenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 μ M กับเม็ดเลือดก้างเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเลี้ยง cell ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงย้อม cell ด้วย trypan blue เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ cell ที่มีชีวิตกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ buffer แทน *rPenmonPEN5*

4.2.7 การศึกษาผลของ *rPenmonPEN5* ต่อการยับยั้ง propagation ของ WSSV

ใน cell เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำ

ศึกษาผลของ *rPenmonPEN5* ต่อการยับยั้ง propagation ของ WSSV ใน cell เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำ โดยผสมเชื้อ WSSV จำนวน 10^6 copy กับ *rPenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 μM แล้วบ่มกับ cell เม็ดเลือดที่เตรียมไว้ใน microtiter plate หลังบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจึงล้างออก และนำไปบ่มใน L-15 culture medium หลังจากเลี้ยง cell เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 28°C จึงเก็บ cell สกัด total RNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 โดยใช้เทคนิค RT-PCR ที่ใช้ EF-1 α เป็นยีนควบคุม ผลการตรวจสอบพบเฉพาะ *rPenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25 μM เท่านั้นที่มีผลลดการแสดงออกของยีน VP28 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 การศึกษาผลของ *rPenmonPEN5* ต่อการยับยั้งการติดเชื้อ WSSV ใน cell เม็ดเลือดกิ้งกูดดำ โดยบ่ม เชื้อ WSSV กับ *rPenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25, 12.5 และ 25 μM กับเม็ดเลือดกิ้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากล้าง cell และเลี้ยง cell ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเก็บ cell สกัด total RNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ด้วย RT-PCR และใช้การแสดงออกของยีน EF-1 α เป็นยีนควบคุม ซึ่งพบเฉพาะ *rPenmonPEN5* ความเข้มข้น 6.25 μM เท่านั้นที่สามารถลดการแสดงออกของยีน VP28 ได้

5. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

โครงการนี้เป็นการศึกษาเพปไทด์ต้านจุลชีพ หรือ AMP ที่แยกได้จากกิ้งกูดดำ โดยทำการศึกษาลักษณะสมบัติ และหน้าที่ของเพปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่ม lysozyme และ penaeidin รวมทั้งศึกษาลักษณะในการทำงานร่วมกัน (synergistic effect) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพทั้งสองกลุ่ม

lysozyme พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) โดยสลาย peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Qasba และคณะ 1997; Mai และ Hu, 2009) มีรายงานการพบและศึกษา lysozyme หลายชนิดทั้ง c-, g- และ i-type lysozyme ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาค-type lysozyme (*PmLyzc*) และ สองไอโซฟอร์มของ i-type lysozyme (*PmLyzi1* และ *PmLyzi2*) ที่แยกได้จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งกุลาดำ ซึ่งพบว่า *PmLyzc* เหมือนกับ c-type lysozyme ทั่วไปที่ประกอบด้วย 8 conserved Cys และมี 2 catalytic residue ได้แก่ Glu และ Asp ในขณะที่ *PmLyzi-1* หรือ destabilase และ *PmLyzi-2* ซึ่งเป็นรายงานการพบครั้งแรกในกุ้ง ประกอบด้วย conserved Cys 10 และ 12 กรดอะมิโนตามลำดับ เหมือนที่มีรายงานใน i-type lysozyme อื่นๆ และเหมือนกับ i-type lysozyme ที่พบในพวก arthropod คือไม่พบกรดอะมิโน Glu และ Asp ที่บริเวณ catalytic site ทำให้พบ muramidase activity เฉพาะใน *PmLyzc* เท่านั้น อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบทั้งสามไอโซฟอร์มยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *M. luteus* และ *Vibrio* สปีชีส์ต่างๆได้ดี และ *PmLyzc* มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Ibrahim และคณะ (2001) ได้ศึกษาริเวณ catalytic site ของ c-type lysozyme โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนบริเวณนี้ทำให้ c-type lysozyme ไม่มี muramidase activity แต่ยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Gandhe และคณะ (2007) พบ c-type lysozyme ในฝักเปลือกกลางคืนที่ขาดกรดอะมิโน Glu และ Asp ที่บริเวณ active site ซึ่งพบว่ายังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่ได้ขึ้นกับบริเวณ catalytic site ที่มีกรดอะมิโน Glu และ Asp

เมื่อศึกษาการตอบสนองของยีน lysozyme หลังจากถูกกระตุ้นให้ติดเชื้อ *V. harveyi* พบ *PmLyzc* มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกใน *PmLyzi1* และ *PmLyzi2* เหมือนกับ i-type lysozyme ของยุง (*Anopheles gambiae*) ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย (Paskewitz และคณะ 2008) นอกจากนี้ยังไม่พบการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของ lysozyme ทั้งสาม *PmLyzc* เหมือน c-type lysozyme ที่พบในกุ้ง *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* และ *Fenneropenaeus chinensis* ที่พบแสดงออกในหลายอวัยวะ แต่พบแสดงออกมากที่สุดที่เม็ดเลือด (Bu และคณะ 2008; de Lorgeril และคณะ 2005; Burge และคณะ 2007) ซึ่งเม็ดเลือดเป็นอวัยวะหลักของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง การตอบสนองต่อเชื้อ *V. harveyi* และการพบมากในเม็ดเลือด ชี้ให้เห็นว่า *PmLyzc* น่าจะเป็นโมเลกุลสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง *PmLyzi1* พบในหลายอวัยวะ

โดยเฉพาะในหัวใจ แต่ไม่พบในเหงือก lymphoid organ และลำไส้ ในขณะที่ *PmLyzi2* พบเฉพาะในระดับเท่านั้น ในแมลงหวี่ (fruit fly) พบ lysozyme ใน hepatopancreas ซึ่งพบว่าทำงานเกี่ยวกับระบบย่อย (digestive system) (Dobson และคณะ 1984) ดังนั้น *PmLyzi2* ซึ่งไม่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* และแสดงออกเฉพาะใน hepatopancreas น่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยของกุ้ง อย่างไรก็ดี สำหรับหน้าที่ของ *PmLyzi1* ยังต้องการการศึกษาต่อไป

Penaeidin เป็นเปปไทด์ที่พบเฉพาะในกุ้ง ปัจจุบัน penaeidin ในกุ้งสกุลต่างๆ แบ่งออกได้เป็น 5 ไอโซฟอร์ม ซึ่งแสดงอยู่ใน PenBase ([ผลิตผล! การอ้างอิงการเชื่อมโยงหลายมิติไม่ถูกต้อง](#)) โดย penaeidin1 เป็น variation ของ penaeidin2 จากรายงานการศึกษา penaeidin ในกุ้งสกุลต่างๆพบ penaeidin3 มีความหลากหลายมากที่สุด โดยเฉพาะบริเวณ Pro-rich พบมีความหลากหลายมากที่สุด ส่วน penaeidin5 พบเฉพาะในกุ้งขาวจีน (*F. chinensis*) และกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบ penaeidin3 และ penaeidin5 ในกุ้งทั้งสองสกุล พบ penaeidin3 และ penaeidin5 ของกุ้งกุลาดำมีความคล้ายกันมากกว่าในกุ้งขาวจีน (Tassanakajon และคณะ 2010) และพบกรดอะมิโน Ser ที่ตำแหน่ง 35 และ Lys/Asp ที่ตำแหน่ง 43 สามารถแยก penaeidin ทั้งสองไอโซฟอร์มได้ นอกจากนี้ Lys/Asp ที่ตำแหน่ง 43 ยังสามารถแยก penaeidin5 ในกุ้งขาวจีนและกุ้งกุลาดำได้อีกด้วย เมื่อดูการแสดงออกของยีน *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* ในกุ้งกุลาดำปกติ พบทั้งสองไอโซฟอร์มแสดงออกมากที่สุดที่เม็ดเลือดตามด้วยลำไส้ และหัวใจ สอดคล้องกับ penaeidin2 (Destoumieux และคณะ 2000) penaeidin3 (Ho และคณะ 2004) และ anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) (Somboonwiwat และคณะ 2005) ที่พบในเม็ดเลือดซึ่งเป็นอวัยวะหลักของระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของรีคอมบิแนนท์โปรตีน penaeidin ทั้งสองไอโซฟอร์ม พบ ทั้งสองไอโซฟอร์มสามารถยับยั้งการเจริญของ *M. luteus* และ *A. viridians* ได้ดี แต่ไม่มีการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ โดย *PenmonPEN3* สามารถยับยั้งได้ดีกว่า *PenmonPEN5* เมื่อเทียบกับ penaeidin ไอโซฟอร์มอื่นๆ พบ penaeidin5 ทั้งจากกุ้งขาวจีนและกุ้งกุลาดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยกว่า penaeidin ไอโซฟอร์ม 2, 3 และ 4 (Destoumieux และคณะ 1999; Cuthbertson และคณะ 2004; Li และคณะ 2005 ; Kang และคณะ 2007)

เมื่อศึกษาการตอบสนองของยีน penaeidin ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PenmonPEN3* และ *PenmonPEN5* ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากการติดเชื้อที่เวลา 15 นาที

และ 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 24 ชั่วโมงเป็น 1.5 และ 1.8 ตามลำดับเมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย LHM buffer อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *penaeidin* ทั้งสองไอโซฟอร์มลดลงอย่างรวดเร็วอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังฉีด WSSV เมื่อมีการติดเชื้อในพวก crustacean เม็ดเลือดจะมีการเคลื่อนที่ไปที่บริเวณที่มีการติดเชื้อ (Martin และคณะ 1998) เม็ดเลือดจะถูกกระตุ้นให้ปล่อย สารต่างๆรวมทั้งสารต้านจุลชีพโดยการแตกของเม็ดเลือด (Bachere และคณะ 2004) ดังที่ Destoumieux และคณะ (2000) ได้กระตุ้นกุ้งด้วยแบคทีเรียและตรวจสอบการแสดงออกของยีน *penaeidin2* พบมีการแสดงออกลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีน *penaeidin2* ในน้ำเลือดพบว่ามีความเข้มข้นซึ่งน่าจะเกิดจากการแตกของเม็ดเลือด นอกจากนี้ Dong และคณะ (2005) ได้ศึกษาการแสดงออกของ *penaeidin* ในกุ้งขาวจีนพบว่าหลังถูกกระตุ้นด้วย WSSV แล้วจะมีการแสดงออกของยีนเป็นแบบ “U” หักกลับ และ Pongsomboon และคณะ (2010) ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในกุ้งกุลาดำหลังถูกกระตุ้นด้วย เชื้อ WSSV โดยใช้เทคนิค microarray พบการแสดงออกของยีน *penaeidin* ลดลงในช่วงท้ายของการทดลอง ซึ่งการลดลงของยีนอย่างรวดเร็วหลังจากเพิ่มขึ้นอาจจะเกิดจากการที่เชื้อ WSSV ไปยับยั้งการแสดงออกของ ยีนซึ่งต้องศึกษากลไณย์ต่อไป (Dong และคณะ 2005)

การศึกษาหน้าที่ของยีน *PenmonPEN5* โดยใช้เทคนิค RNAi พบว่า เมื่อทำการยับยั้งการ แสดงออกของยีน *PenmonPEN5* และกระตุ้นให้กุ้งติดเชื้อ WSSV และติดตามการแสดงออกของยีน *VP28* ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนที่ผิวของ WSSV พบว่ากุ้งมีการแสดงออกของยีน *VP28* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย NaCl และ polyGC นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบจำนวน copy ของ WSSV พบว่ากลุ่มที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *PenmonPEN5* มีจำนวน copy ของ WSSV เพิ่มขึ้น 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง propagation ของเชื้อ WSSV ของ *rPenmonPEN5* พบว่าการยับยั้ง propagation ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์ โปรตีน พบการเกิดการยับยั้ง propagation ของเชื้อ WSSV ในเม็ดเลือดที่บ่มกับ *rPenmonPEN5* ความ เข้มข้น 6.25 μ M เท่านั้น ปัจจุบัน มีรายงานการป้องกันการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งโดย antimicrobial peptide ได้แก่ anti-lipopolysaccharide factor (ALF) (Tharntada และคณะ 2009) ในขณะที่มีการศึกษาฤทธิ์ของ *penaeidin* ต่อ herpes simplex virus type 1 ของคน โดย Carriel-Gomes และคณะ (2007) แสดงให้เห็นว่า *penaeidin* เป็นเปปไทด์ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง นอกจากนี้มีหน้าที่ในการต่อต้านการติดเชื้อ แบคทีเรียแล้ว ยังน่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านการติดเชื้อไวรัสในกุ้งอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jolles, P., Fiala-Medioni, A., Deutsch, J.S. (2002) Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J Mol Evol.* 54: 652-664.
- Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B. (2004). Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev.* 198: 149-168.
- Bu, X., Du, X., Zhou, W., Zhao, X., Wang, J. (2008). Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese J Biotechnol.* 24: 723-732.
- Burge, E.J., Madigan, D.J., Burnett, L.E., Burnett, K.G. (2007). Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 327-339.
- Carriel-Gomes, M.C., Kratz, J.M., Barracco, M.A., Bachere, E., Barardi, C.R.M., Simoes, C.M.O. (2007). In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102: 469-472.
- Chai, Y.M., Yu, S.S, Zhao, X.F., Zhu, Q., Wang, J.X. (2010). Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 480-486.
- Cuthbertson, B.J., Bullesbach, E.E., Fievet, J., Bachere, E., Gross, P.S. (2004). A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochem J.* 381: 79-86.

- de Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M.G., Gueguen, Y., Bachere, E. (2005). Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol Genomics*. 21: 174-183.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., and Bachère, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*. 272: 28398–28406.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A., Bachere, E. (1999). Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem*. 266: 335-346.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Bulet, P., and Bachère, E. (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci*. 57: 1260–71.
- Dobson, D.E., Prager, E.M., Wilson, A.C. (1984). Stomach lysosomes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *J Biol Chem*. 259: 11607-11616.
- Dong, B., Liu, F.S., Xiang, J.H., Li, F.H., Gao, H.W. (2005). Expression profiles of penaeidin from *Fenneropenaeus chinensis* in response to WSSV and *vibrio* infection by real time PCR. *Acta Oceanologica Sinica*. 24: 131-140.
- Fagutao, F.F., Yasuike, M., Caipang, C.M., Kondo, H., Hirano, I., Takahashi, Y., Aoki, T. (2008). Gene Expression Profile of Hemocytes of Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Following Peptidoglycan Stimulation. *Mar Biotechnol*. 10: 731–740.
- Gandhe, A.S., Janardhan, G., Nagaraju, J. (2007). Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkworms (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochem Mol Biol*. 37: 655-666.
- Gatesoupe, F.J. (1989). The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 83:39-44.
- Graslund, S., Karlsson, K. and Wongtavatchai, J (2002) Responsible use of antibiotics in shrimp farming. *Aquaculture Asia Magazine*. 7:17.

- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol.* 25(7): 565–577.
- Gueguen, Y., Garnier, J., Robert, L., Lefranc, M.P., Mougenot, I., de Lorgeril, J., Janech, M., Gross, P.S., Warr, G.W., Cuthbertson, B., Barracco, M.A., Bulet, P., Aumelas, A., Yang, Y., Bo, D., Xiang, J., Tassanakajon, A., Piquemal, D., Bachère, E. (2006). PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev Comp Immunol.* 30: 283–288.
- Hameed, ASS., Rahaman, KH., Alagan, A. and Yoganandhan, K. (2003). Antibiotic resistance in bacterial isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture.* 217:39-48.
- Hikima, J., Minagawa, S., Hirono, I., Aoki, T. (2001). Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. *Biochim Biophys Acta.* 1520: 35-44.
- Ho ,S.H., Chao, Y.C., Tsao, H.W., Sakai, M., Chou, H.N., Song, Y.L. (2004). Molecular cloning and recombinant expression of tiger shrimp *Penaeus monodon* penaeidin. *Fish Pathol.* 39: 15-23.
- Kang, C.J., Xue, J.F., Liu, N., Zhao, X.F., Wang, J.X. (2007). Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol.* 44: 1546–1554.
- Kiatpathomchai, W., Jitrapakdee, S., Panyim, S. and Boonsaeng, V. (2004). RT-PCR detection of yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus monodon* using dried haemolymph spots. *J Virol Methods* 119: 1-5.
- Ibrahim, H.R., Matsuzaki, T., Aoki, T. (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett.* 506: 27-32.

- Ito, Y., Yoshikawa, A., Hotani, T., Fukuda, S., Sugimura, K., Imoto, T. (1999). Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *Eur J Biochem.* 259: 456-461.
- Li, L., Wang, J.X., Zhao, X.F., Kang, C.J., Liu, N., Xiang, J.H., Li, F.H., Sueda, S., Kondo, H. (2005). High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. *Protein Exp Purif.* 39: 144-151.
- Lo, Y. M. (1996). Application of PCR for fetal cell detection. *Early Hum Dev* 47 Suppl: S73-7.
- Mai WJ, Hu CQ. (2002). Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis*. *Mol Biol Rep.* 36: 1587-1595.
- Martin, G.G., Kay, J., Poole, D., Poole, C. (1998). In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Sycionia ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus*. *J Invert Pathol.* 17: 155-168.
- Rojtinnakorn, J., Hirano, I., Itami, T., Takahashi, Y., Aoki, T. (2002). Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol.* 13(1): 69–83.
- Qasba, P.K., Kumar, S. (1997). Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 32: 255-306.
- Ruangpan, L., (1998). Luminous bacteria associated with shrimp mortality. In: *Advances in shrimp biotechnology*. Flegel, T.W. (ed). Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Paskewitz, S.M., Li, B., Kijla, M.K. (2008). Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol.* 17: 217-225.
- Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirano, I., Tassanakajon, A. (2011). A cDNA microarray approach for analyzing transcriptional changes in *Penaeus monodon* after infection by pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 439-446.
- Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G., Bachere, E. (2005). Recombinant expression and anti-

- microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*. 29: 841-851.
- Somjetlerdcharoen, A. (2002). Chloramphenicol concerns in shrimp culture. *Aquaculture Asia*. 7:51-54.
- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Jitrapakdee, S., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. (2002). Identification of immune-related genes in hemocytes of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar Biotechnol*. 4:487-494.
- Tassanakajon, A., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Supungul, P. (2010). Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. *Mar Biotechnol*. 12: 487–505.
- Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Paunglarp, N., Rimphanitchayakit, V., Udomkit, A., Jitrapakdee, S., Sritunyalucksana, K., Phongdara, A., Pongsomboon, S., Supungul, P., Tang, S., Kuphanumart, K., Pichyangkura, R., Lursinsap, C. (2006). *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene*. 384: 104-12.
- Tharntada, S., Ponprateep, S., Somboonwiwat, K., Liu, H., Soderhall, I., Soderhall, K., Tassanakajon, A. (2009). Role of anti-lipopolysaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. *J Gen Virol*. 90: 1491-1498.
- Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C., Xiang, J. (2006). Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Mar Biotechnol*. (NY) 8: 491-500.
- Wongpanya, R., Aoki, T., Hirono, I., Yasuik, M., Tassanakajon, A. (2007). Analysis of gene expression in haemocytes of shrimp *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus by cDNA microarray. *Sc. Asia*. 33: 165-174.
- Wongteerasapaya, C., Sriurawatana, S., Vickers, J. E., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. Flegel, T. W. (1995b). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis aquat. Org*. 22: 45-60.

- Wongteerasapaya, C., Vickers, J. E., Sriuraiwatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. Flegel, T. W. (1995a). A non-occluded, systemic baculovirus that occur in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, *Dis Aquat Org.* 21: 69-77.
- Zhang, J., Li, F., Jiang, H., Yu, Y., Liu, C., Li, S., Wang, B., Xiang, J. (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in lymphoid organ of *Fenneropenaeus chinensis* response to *Vibrio anguillarum* stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 186-194.
- Zhao, J., Song, L., Li, C., Zou, H., Ni, D., Wang, W., Xu, W. (2007). Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Mol Immunol.* 44: 1198-1208.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A. Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 2010. 28: 490-498.

Woramongkolchai, N., **Supungul, P.,** Tassanakajon, A. The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. Dev Comp Immunol. 2011. 35: 530-536.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
- เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

3. อื่นๆ (เช่น หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

- เสนอผลงานภาคโปสเตอร์

Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., ., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. Molecular cloning, expression and characterization of c-type and i-type lysozymes in *Penaeus monodon*. In Proc. ABIC 2009. Apicultural Biotechnology International Conference. Bangkok, Thailand. 22-25 September 2009.

Woramongkolchai, N., **Supungul, P.**, Tassanakajon, A. (2009). Expression and characterization of penaeidin 5 antimicrobial peptides from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. The 35th Congress on Science and Technology of Thailand, 15-17 Oct, 2009, Chonburi, Thailand.

- เสนอผลงานภาคบรรยาย

Woramongkolchai, N., **Supungul, P.**, Tassanakajon A. Gene expression analysis and anti-WSSV property of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. 15th Biological Sciences Graduate Congress, 15-17 December 2010, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsiMolecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*Premruethai Supungul^{a,b}, Vichien Rimphanitchayakit^a, Takashi Aoki^c, Ikuo Hirono^c, Anchalee Tassanakajon^{a,*}^a Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathumthani 12120, Thailand^c Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2009

Received in revised form

22 December 2009

Accepted 3 January 2010

Available online 15 January 2010

Keywords:

Penaeus monodon

Lysozyme

Innate immunity

Antimicrobial activity

Muramidase activity

ABSTRACT

Lysozyme is a widely distributed hydrolase possessing a hydrolytic activity against peptidoglycan in the bacterial cell wall and, hence, causing lysis of the bacteria. Two types of lysozymes; the c-type (*PmLyzc*) and the two catalytic residue ablated i-type lysozymes (*PmLyzi1* and 2), were identified from the *Penaeus monodon* EST database (<http://pmonodon.biotec.or.th>). By RT-PCR, *PmLyzc* transcript was detected in all tissues: gill, antennal gland, epipodite, heart, hemocyte, hepatopancreas, eyestalk, lymphoid organ and intestine, and highly expressed in hemocyte. The expression of *PmLyzi2* mRNA was highest in heart while undetected in gill, lymphoid organ and intestine. The *PmLyzi1* transcript was expressed only in hepatopancreas. The up-regulation of mRNA transcription after bacterial challenge was observed only with *PmLyzc*. To investigate their biological activities, the three mature recombinant proteins were expressed in an *Escherichia coli* system. Although the turbidimetric assay revealed that only recombinant *PmLyzc* possessed the muramidase activity, all of them variably exhibited antimicrobial activity against both Gram-positive and -negative bacteria especially the shrimp pathogens, *Vibrio* species. The antimicrobial activities of recombinant *PmLyzc* was the most effective one. These results demonstrated that the ability of lysozyme to inhibit the growth of bacteria did not depend only on the muramidase activity. Differences in tissue expression pattern of these gene transcripts and their antimicrobial activities indicated the multifunction of lysozyme as immune defense and digestive enzymes in *P. monodon*.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lacking an adaptive immune response like all invertebrates, the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, rely on an innate immunity to protect themselves from the surrounding pathogens. This defense system is able to eliminate the invading pathogens efficiently after infection by cellular and humoral defense mechanisms [1]. An important component of humoral mechanism is the antimicrobial peptides (AMPs). The AMPs are the first barriers of the host defense which kill or slow the growth of microbes like bacteria, fungi, viruses and protozoa [2,3]. Among the various AMPs, lysozyme is the most well-known and has been described in numerous phylogenetically diverse organisms such as bacteria, bacteriophages, fungi, plants and animals.

Lysozyme catalyzes the hydrolysis of β -1,4-glycosidic linkage between *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid of peptidoglycan in the bacterial cell walls [4]. It, thus, plays a role as a bio-defense molecule in the innate immunity against the invasion of bacterial pathogens. Lysozyme is particular important for invertebrate marine animals that constantly contact the microorganisms in the environment [5–7]. In addition to the hydrolytic activity, lysozymes from invertebrates also possess isopeptidase and chitinase activities [8,9]. The finding of lysozyme in the ruminant stomachs of cattle and the digestive organs of marine bivalves also indicates the digestive function of lysozyme [10,11].

Based on their differences in structural, catalytic and immunological characteristics, lysozymes have been traditionally categorized into three major types: chicken-type lysozyme (c-type), goose-type lysozyme (g-type) and invertebrate-type lysozyme (i-type) [12,13]. The c-type lysozyme is the most found group having been identified from several organisms including virus, bacteria, plants, insects, reptiles, avian, fish and mammals [7]. The g-type lysozyme is found in some avian, fish and scallop [8,14].

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5418.
E-mail address: anchalee.k@chula.ac.th (A. Tassanakajon).

The i-type lysozyme is found in the invertebrate. Furthermore, the multiple-typed lysozymes have been reported as c-type plus g-type in bird and brill, and as g-type plus i-type in mollusk [15,16].

The i-type lysozyme was first described for the starfish, *Asterias rubens*, by Jolles and Jolles [17]. The partial N-terminal sequence of the protein was shown to be different from those of other types of lysozyme. Thereafter, similar lysozymes have been identified in other bivalves and categorized as a new type of lysozyme, the so-called i-type lysozyme [8,13]. In 1996, Zavalova et al. [18] identified a novel enzyme from the medicinal leech which hydrolyzed the ϵ -(γ -Glu)-Lys crosslink between Glu and Lys in the stabilized fibin [19] and hence named it destabilase. The destabilase from leech also possessed the isopeptidase and lytic activity like those i-type lysozymes from bivalves. It was, then, categorized as one of the i-type lysozymes [13,19].

In shrimp, the c-type lysozymes from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [6], white shrimp *Litopenaeus vannamei* [20], black tiger shrimp *P. monodon* [21,22], banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* [7] and Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [23] are well characterized. However, the i-type lysozyme from penaeid shrimp has not yet been characterized. Recently, the EST clones with an apparent sequence homologue of the i-type lysozyme were identified from the cDNA libraries of *P. monodon* (<http://pmonodon.biotec.or.th>) [24]. One of them shows identity to the destabilase of *L. vannamei*. The other one shares 39% identity to the i-type lysozyme from the fly, *Drosophila virilis*. The latter is a novel form of the i-type lysozyme found in shrimp.

In the present study, the *P. monodon* c-type and the two forms of i-type lysozymes were presented. The phylogenetic analysis and tissue distribution of all three lysozyme transcripts were carried out. The recombinant proteins of the three lysozymes were over-expressed in an *Escherichia coli* system and their antimicrobial activities characterized.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

E. coli strain Rosetta(DE3)pLysS was used for protein expression. For the antibacterial assays, the Gram-positive bacteria: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, and the Gram-negative bacteria: *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholera*, *Vibrio mimicus*, *E. coli*, were used.

2.2. Animals and sample preparation

Juvenile *P. monodon* shrimp approximately 3 months old, 20 g of body weight, were acclimatized in aquaria at an ambient temperature of 28 °C and a salinity of 15 ppt for a week before use in the

experiments. Shrimp tissues (eyestalk, antennal gland, epipodite, gill, lymphoid organ, hepatopancreas, intestine and heart) were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. Hemocytes were isolated by centrifugation at 800 g for 10 min at 4 °C. The hemocyte pellet was resuspended in 1 ml of TRI Reagent® (Molecular Research Center).

2.3. Total RNA extraction and cDNA synthesis

The samples were homogenized in TRI Reagent® and total RNA was extracted according to the manufacturer's instruction. The total RNA was treated with DNase (Promega) to remove the DNA contamination. After determining the RNA concentration, 1 µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA using oligo(dT)₁₈ primers with ImProm-II™ Reverse Transcriptase System kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. The synthesized cDNA was stored at –20 °C until use.

2.4. Sequence and phylogenetic analysis

The cDNA sequences of the c-type lysozyme (*PmLyzc*, accession no. GQ478702), i-type lysozyme-like protein 1 (*PmLyzi1*, accession no. GQ478703) and i-type lysozyme-like protein 2 (*PmLyzi2*, accession no. GQ478704) were retrieved from the *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotec.or.th>). They were analyzed for the identity and similarity by BLAST online [25] and the domain identification was analyzed by PROSITE and SmartTM databases (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). The molecular weight and pI were predicted using the Expasy software (<http://www.expasy.org/>). The signal peptide was predicted using the online SignalP 3.0 program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [26].

The amino acid sequences deprived of signal peptides of c-, i- and g-type lysozymes from SwissProt and GenBank databases were aligned using the ClustalX [27]. Based on the alignment, a phylogenetic tree was constructed using the Phylip program. Bootstrap analysis was performed for values representing 1000 replicates using the SeqBoot. The human and rat α -lactalbumins that were similar to the c-type lysozyme were used as the outgroups.

2.5. Tissue specific expression of lysozymes

Expression of *PmLyzc*, *PmLyzi1* and *PmLyzi2* in various shrimp tissues was determined by semi-quantitative RT-PCR. Total RNAs were extracted from the hemocyte, hepatopancreas, lymphoid organ, gill, intestine, heart, epipodite, eyestalk and antennal gland using TRI Reagent® according to the manufacturer's instruction for the syntheses of single-strand cDNAs. The semi-quantitative PCR was, then, performed to determine the level of each lysozyme transcript using gene specific primers designed using the SECentral program (Scientific & Educational Software) as listed in Table 1.

Table 1
The sequences of primers used in RT-PCR and cloning into the expression vector. The NcoI and XhoI sites are underlined.

Primer	Sequence	Usage
PmLyzc_F	5' ATACCATGGGCCATCATCATCATCACAAGGCTTCAGGAAGTCCG 3'	Cloning
PmLyzc_R	5' CTCGAGCACTTGAATGGGAATATCGAGTTG 3'	Cloning
PmLyzi1_F	5' CCATGGGCCATCATCATCATCAGCAGAAATGGAGGATAGTTGC 3'	Cloning
PmLyzi1_R	5' CTCGAGTCACTCTACACTCGGAGGATTTGTG 3'	Cloning
PmLyzi2_F	5' CCATGGGCCATCATCATCATCAGCAGAAAGGGTTGACCCCAACT 3'	Cloning
PmLyzi2_R	5' CTCGAGTCACTAGCAGTTGGAGAAGAAG 3'	Cloning
Lyzc_F	5' TCCTCTGGTGTGCTGGTTG 3'	RT-PCR
Lyzc_R	5' GGTTCGGTTCGGGTGATG 3'	RT-PCR
Lyzi1_F	5' CCGTTACCAAGCCTTACTG 3'	RT-PCR
Lyzi1_R	5' TAATCGGTCGGTAGTCTC 3'	RT-PCR
Lyzi2_F	5' CGACAACGCGGAACAGAAGG 3'	RT-PCR
Lyzi2_R	5' CGGTGGTGTGACAGATGGA 3'	RT-PCR

One microlitre of the first-strand cDNA was subjected to PCR in a 25 μ l reaction volume containing 750 mM Tris–HCl, pH 8.8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% (v/v) Tween 20, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μ M of each specific primers and 1.25 units of *Taq* DNA polymerase (Fermentas). The reaction was pre-denatured at 94 °C for 1 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. Ten microlitres of the amplification reactions were analyzed through 2% agarose gel electrophoresis.

2.6. Expression of lysozyme mRNAs after *V. harveyi* challenge

After acclimatization, the experimental shrimp were separated into 2 groups; the control and the challenge groups. The control shrimp were injected with 0.85% NaCl while the challenge shrimp injected with 10^6 CFU of *V. harveyi*. Three shrimp from each group were collected at 0, 6, 12, 24 and 48 h after injection. The total RNA from hemocyte, hepatopancreas and heart was extracted. The total RNA samples from each tissue at each time point were pooled and cDNAs synthesized as described above. The expression of *PmLyzc*, *PmLyzi1* and *PmLyzi2* were determined from the hemocyte, hepatopancreas and heart, respectively, by RT-PCR analysis as mention above. Their expressions were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis.

2.7. Recombinant protein expression and purification

The PCR fragments encoding the mature proteins of *PmLyzc*, *PmLyzi1* and *PmLyzi2* lysozymes were amplified with gene specific primers which introduced an *NcoI* site and a 6 $\times$ His-tag at the amino-terminus, the forward primers, and an *XhoI* site at the carboxyl-terminus, the reverse primers (Table 1). They were cloned into an *E. coli* expression vector, pET-19b. The PCR was performed as described previously [28]. The gel-purified PCR products were digested with *NcoI* and *XhoI* and ligated to the vector digested with the same restriction enzymes. The correct reading frames of amino acids were verified by DNA sequencing.

For recombinant protein expression, the recombinant plasmids were transformed into an *E. coli* strain Rosetta(DE3)pLysS. The cells were grown to appropriate density and the protein expression was induced with 1 mM IPTG. After 4 h of induction, cells were harvested by centrifugation at 8000 g for 15 min and resuspended in phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 and 2 mM KH_2PO_4). The cells were disrupted by a French press at 9000 psi [29]. The inclusion bodies were collected by centrifugation and solubilized in denaturing solution (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 8 M urea, 0.5 M NaCl and 20 mM imidazol). The expressed proteins with the 6 $\times$ His-tag at the amino-terminus were purified under denaturing condition using the Ni-NTA agarose (Qiagen) as instructed by the manufacturer's protocol. The purified *PmLyzc* protein was dialyzed against Milli-Q water containing 0.2 mM oxidized, 2 mM reduced glutathione and decreasing concentrations of urea (6, 4, 2 and 0 M) for 12 h at 4 °C. The purified *PmLyzi1* and 2 were dialyzed against STE buffer (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) containing 0.2 mM oxidized, 2 mM reduced glutathione and decreasing concentrations of urea as above for 12 h at 4 °C. The proteins were kept track of using 15% SDS-PAGE. Protein concentrations were determined using the Bradford method [30].

2.8. Muramidase activity assay

The cell lysis of *M. luteus* was measured as muramidase activity according to the turbidimetric method, previously described by Shugar [31]. A 4-ml overnight culture of *M. luteus* was harvested by

centrifugation at 8000 g for 5 min. The bacterial pellet was washed twice with STE buffer, pH 7.4, and resuspended in STE buffer making an initial OD₄₅₀ of 0.5. Thirty micrograms of each recombinant lysozyme were mixed with 3 ml of cell suspension. The optical density was monitored at 450 nm at every 2 min over a 20 min period using a spectrophotometer. For each recombinant lysozyme, the measurement was performed in triplicates. A lysis with 10 μ g of hen egg white lysozyme (HEWL) was performed as a positive control.

2.9. Antimicrobial assay of lysozyme

Antimicrobial activities of the recombinant lysozymes were assessed using a lysoplate assay as described by Minagawa et al. [5]. The bacterial density was adjusted to 0.2 at 600 nm with STE buffer, pH 7.4, containing 1% agarose and poured onto the 90 mm plates. Wells with diameter of 0.4 cm were cut into the freshly poured plates after the agar solidified. Ten micrograms of each recombinant lysozyme were added into the wells and incubated at 30 °C. After 24 h, the diameters of lysis circular zone were measured in centimeter. Ten micrograms of HEWL and STE buffer, pH 7.4, were used as positive and negative controls, respectively. The measurements were performed in triplicates.

The inhibitory concentration (IC) was calculated from the inhibitory zone using a formula from a method (a) as described by Hultmark et al. [32]: $\text{IC} = 0.486 n/ad^2$ where *a* is the thickness of agar layer in centimeter, *d* is the inhibition zone diameter in centimeter and *n* is the concentration in nanomole of the antimicrobial protein utilized in the assay. The IC is expressed in μ M.

3. Results

3.1. Identification of lysozyme cDNAs from *P. monodon*

Three full-length cDNAs of lysozyme transcripts were identified from the *P. monodon* EST database (<http://pmonodon.biotech.or.th>) [24]. BLAST search indicated that one of them was a homologue of the c-type lysozyme and thus named *PmLyzc*. The other two were homologues of destabilase and i-type lysozyme but lacked the essential catalytic residues (Glu and Asp). They were named as i-type lysozyme-like proteins 1 and 2 (*PmLyzi1* and 2).

The open reading frame of *PmLyzc* was 474 bp in length coding for 158 amino acid residues (Fig. 1A). Amino acid sequence analysis using the online SignalP 3.0 program revealed the presence of an 18 amino acid signal peptide resulting in a 140 residue mature protein with a calculated molecular mass of 16.3 kDa and a predicted pI of 8.78. The deduced amino acid sequence of *PmLyzc* revealed 100% and 96% identities with the c-type lysozyme of *P. monodon* (accession no. AAN16375, ABU75288) previously reported in the GenBank.

The open reading frame of *PmLyzi1* was composed of 426 bp encoding a polypeptide of 142 amino acids with a signal peptide of 17 amino acid residues (Fig. 1B). The calculated molecular weight and the pI of the mature protein was 14.2 kDa and 4.18, respectively. The *PmLyzi2* transcript contained an open reading frame of 489 bp coding for a polypeptide of 163 amino acid residues with a signal peptide of 22 amino acid residues (Fig. 1C). The predicted molecular weight of the mature protein and the pI was 15.5 kDa and 4.68, respectively.

The *PmLyzi1* shared 89% identity with a destabilase of the Pacific white shrimp, *L. vannamei* (accession no. ABD65298) and 39% identity with an i-type lysozyme of the segment worm, *Eisenia andrei* (accession no. ABC68610). The *PmLyzi2* was similar to an i-type lysozyme from the flies, *D. virilis* (accession no. XP_002048990) and mosquito, *Anopheles gambiae* (accession no.

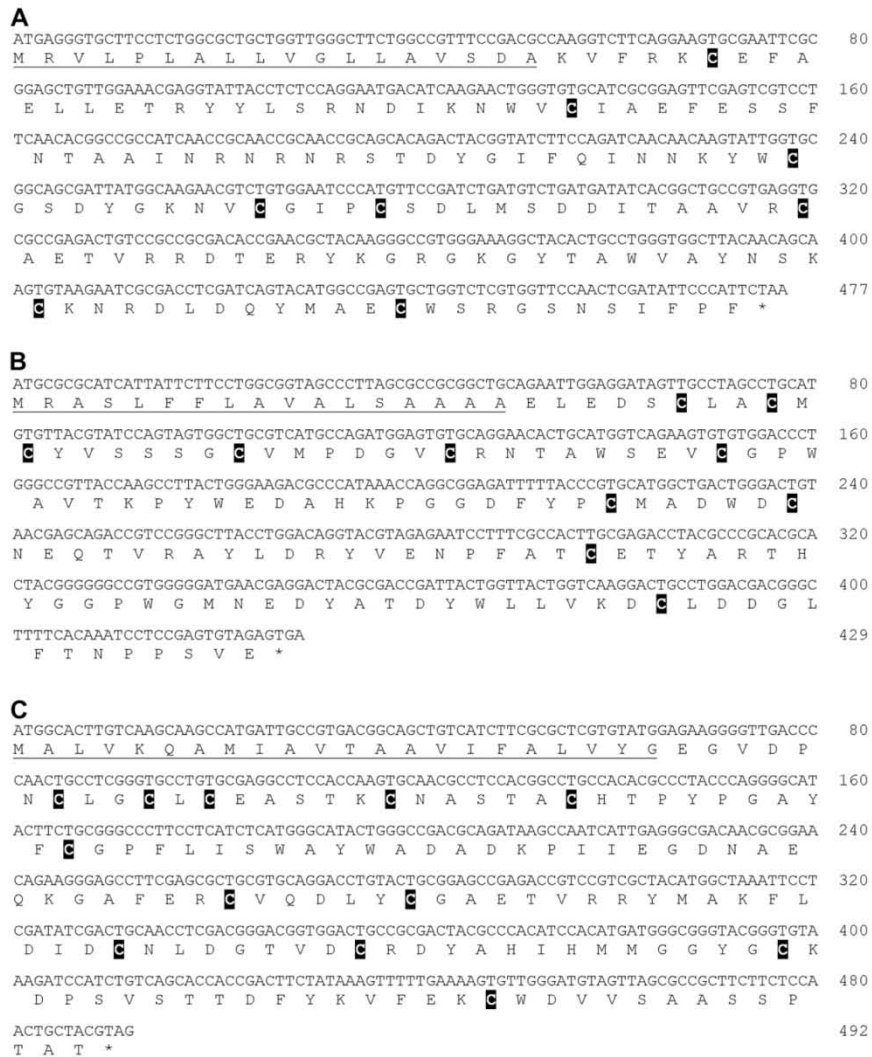


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *PmLyzc* (A), *PmLyz1* (B) and *PmLyz2* (C) from *P. monodon*. Asterisks indicate the stop codons. The putative signal peptides are underlined. The conserved Cys residues are boxed.

AAT51799) with the identity scores of 39% and 45%, respectively. Comparison between the *PmLyz1* and 2 gave only 27% identity.

3.2. Phylogenetic analysis

The deduced amino acid sequence of mature *PmLyzc* was compared with those of the eight known c-type lysozymes from the vertebrate (zebrafish, chicken and mouse), insect (moth and mosquito) and other shrimps as illustrated in Fig. 2A. The multiple sequence alignment showed the two catalytically essential residues, Glu and Asp, and the completely conserved eight-cysteine residue motif. The insertion of seven amino acid residues

[GRG(K/N)GY(T/S)] was found only in the shrimp proteins between Cys6 and Cys7.

The mature amino acid sequences of *PmLyz1* and 2 were also aligned with other invertebrate i-type lysozymes. All proteins had an exceptionally high content of Cys residues. The *PmLyz1* had ten conserved Cys and *PmLyz2* had twelve conserved Cys (Fig. 2B and C). The largest insertion of nine amino acid residues was observed between the Cys6 and Cys7 of the twelve conserved Cys residues. Interestingly, the i-type lysozyme from *P. monodon* and other arthropods lacked both catalytically important residues (Glu and Asp). In contrast, the i-type lysozymes from annelid (segmented worm and medicinal leech), echinoderm (starfish and sea

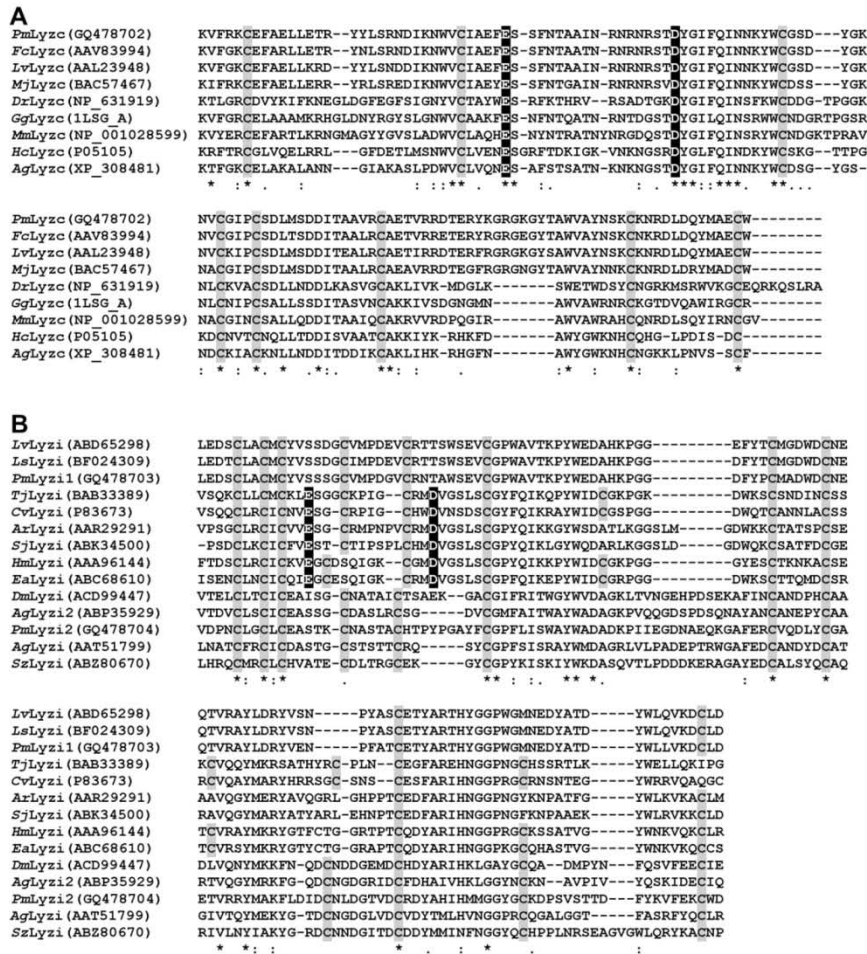


Fig. 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of mature protein of the *P. monodon* c-type lysozyme (*PmLyzc*) with those of other invertebrate and vertebrate c-type lysozymes (A), and those of mature proteins of the *P. monodon* i-type lysozymes (*PmLyz1* and *PmLyz2*) with other invertebrate i-type lysozymes (B). The conserved Cys residues are highlighted in grey. The catalytic residues Glu (E) and Asp (D) are black-boxed. Asterisks indicate amino acid identity, and (.) and (:) indicate amino acid similarity. The amino acid sequences are from the GenBank. *Pm*, *P. monodon*; *Fc*, *F. chinensis*; *Lv*, *L. vannamei*; *Mj*, *M. japonicus*; *Ag*, *Anopheles gambiae*; *Hc*, *Hyalophora cecropia*; *Gg*, *Gallus gallus*; *Dr*, *Danio rerio*; *Tj*, *Tapes japonica*; *Cv*, *Crassostrea virginica*; *Ar*, *Asterias rubens*; *Sj*, *Stichopus japonicus*; *Hm*, *Hirudo medicinalis*; *Ea*, *Eisenia andrei*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Sz*, *Sitophilus zeamais*. The numbers in parentheses are the GenBank accession numbers.

cucumber) and mollusk (bivalve and eastern oyster) possessed the two conserved catalytic residues.

To evaluate the relationships among the *PmLyzc*, *PmLyz1*, *PmLyz2* and other c-, i- and g-type lysozymes, a phylogenetic tree was constructed based on the mature protein sequences by neighbor-joining method using α -lactalbumin from human and rat as the outgroups. As shown in Fig. 3, the c-, i- and g-type lysozymes were separately clustered together correctly. Within the c-type cluster, the *PmLyzc* along with lysozymes from other shrimp (*MjLyzc*, *LvLyzc* and *FcLyzc*) formed an independent group. In the i-type cluster, the lysozymes were separated into two groups. One group, including the *PmLyz1*, *AgLyz1*, *AgLyz2*, *SzLyz1* and *DmLyz1*, had no catalytic residues. The other group, including the *AvLyz1*, *SjLyz1*, *TjLyz1*, *CvLyz1*, *HmLyz1* and *EaLyz1*, possessed the two catalytic

residues. The only branch in the latter group that had no catalytic residues included the *PmLyz1*, *LvLyz1* and *LsLyz1* lysozymes.

3.3. Tissue distribution of the *PmLyzc*, *PmLyz1* and *PmLyz2* transcripts

To determine the sites of lysozyme expression in shrimp, the total RNAs from hemocyte, hepatopancreas, lymphoid organ, gill, intestine, heart, epipodite, eyestalk and antennal gland were prepared. RT-PCR was carried out to analyze the lysozyme transcripts using the shrimp β -actin gene as an internal control. It was found that the *PmLyzc* transcript was detected in all tissues tested and highly expressed in hemocyte followed by intestine (Fig. 4). The expression of *PmLyz2* mRNA was highest in the heart while

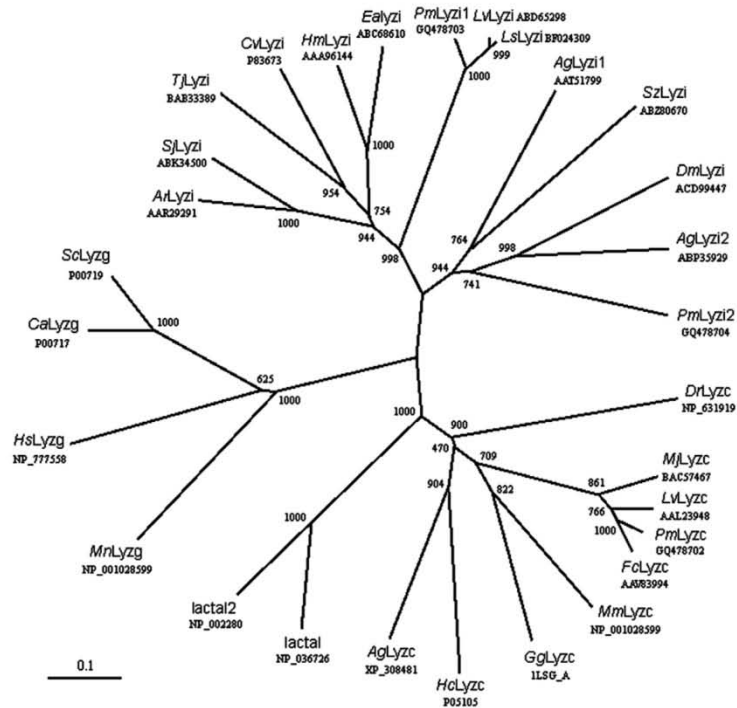


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the alignment of amino acid sequences of various c-, g- and i-type lysozymes using ClustalX and Phylip programs. Bootstrap analysis was performed for values representing 1000 replicates by the SeqBoot. The amino acid sequences of α -lactalbumins from human and rat were used as the outgroups. The amino acid sequences are from the GenBank. *Pm*, *P. monodon*; *Fc*, *F. chinensis*; *Lv*, *L. vannamei*; *Mj*, *M. japonica*; *Ls*, *L. tertiarius*; *Ag*, *Anopheles gambiae*; *Hc*, *Hyalophora cecropia*; *Gg*, *Gallus gallus*; *Dr*, *Danio rerio*; *Tj*, *Tapes japonica*; *Cv*, *Crassostrea virginica*; *Ar*, *Asterias rubens*; *Sj*, *Stichopus japonica*; *Hm*, *Hirudo medicinalis*; *Ea*, *Eisemia andrei*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Sz*, *Sitophilus zeamais*; *Ca*, *Cygnus atratus*; *Sc*, *Struthio camelus*; *Mm*, *Mus musculus*; *Hs*, *Homo sapiens*. The numbers in parentheses are the GenBank accession numbers.

undetectable in gill, lymphoid organ and intestine. Interestingly, the *PmLyzi1* transcript was expressed only in the hepatopancreas.

3.4. Expression of *PmLyzc*, *PmLyzi1* and *PmLyzi2* after bacterial challenge

Since lysozyme was an antimicrobial protein, it was, then, worthwhile to test its expression in the major distributed tissues in response to particularly bacterial infection. The shrimp were injected with *V. harveyi*. The hemocyte, hepatopancreas and heart were removed at various time points for total RNA extraction which were, then, used to investigate the mRNA expression of *PmLyzc*,

PmLyzi1 and *PmLyzi2*, respectively, by RT-PCR. The results in Fig. 5 illustrated that the *PmLyzc* transcript was up-regulated in the hemocyte after 6 h through 24 h after bacterial challenge before it subsided slightly at 48 h. The transcription levels of *PmLyzi1* and 2 were, however, remained more or less unchanged in the challenge shrimp as compared to those of the control shrimp.

3.5. Preparation of the shrimp recombinant lysozymes

The nucleotide sequence encoding the mature peptide of each lysozyme from *P. monodon* was amplified using a specific primer

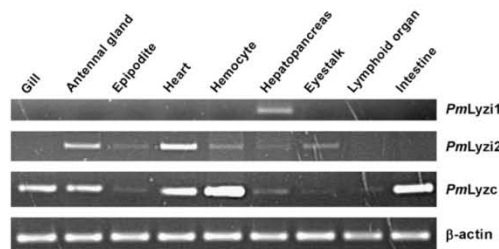


Fig. 4. Expression of lysozyme mRNAs in the nine tissues of *P. monodon* by RT-PCR analysis. The β -actin gene was used as an internal control.

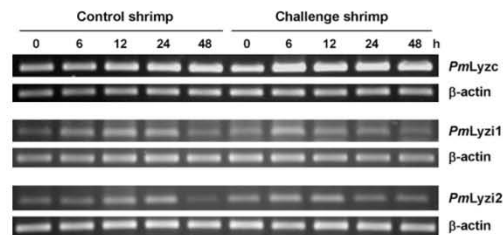


Fig. 5. Expression of *PmLyzc*, *PmLyzi1* and *PmLyzi2* in hemocyte, hepatopancreas and heart, respectively, after *V. harveyi* challenge. The result at each time point was from a pool of total RNA from three individual shrimp. The expression of three lysozymes was analyzed by RT-PCR. The β -actin gene was used as an internal control.

pairs that incorporated an NcoI site and a 6×His-tag at the N-terminus and an XhoI site at the C-terminus and cloned into the pET-19b expression vector. For expression, each recombinant expression plasmid was transformed into an *E. coli* strain Rosetta (DE3)pLysS. The cells were grown and expression induced with IPTG. All recombinant proteins were expressed as inclusion bodies and were subjected to purification under denaturation condition through the Ni-NTA column. The recombinant PmLyzc (rPmLyzc) was renatured in Milli-Q water containing glutathione. The two recombinant PmLyz1 proteins (rPmLyz1 and 2) were refolded in STE buffer containing glutathione. SDS-PAGE was used to assist the purification of the recombinant proteins. The observed molecular weights from SDS-PAGE of rPmLyzc, rPmLyz1 and rPmLyz2 were 15.5, 14.4 and 16.5 kDa (Fig. 6) while the calculated ones were 17.3, 15.3 and 16.5 kDa, respectively. The molecular weight discrepancy between the observed one and that calculated is possible with unknown reason for some proteins in SDS-PAGE.

3.6. Muramidase activity of *P. monodon* lysozymes

The turbidimetric approach was used to measure the muramidase activity of the recombinant lysozymes. Instead of using the peptidoglycan substrate, a Gram-positive bacteria *M. luteus* was used. Upon the addition of lysozyme, the bacterial cells lysed as the reaction progressed, and the turbidity decreased. The activity was measured by monitoring the optical density at 450 nm. It was found that the rPmLyz1 and 2 could hardly lyse the *M. luteus* while the rPmLyzc was able to lyse the cells though less active than the HEWL control (Fig. 7). This result indicated that the rPmLyz1 and 2 lacked the muramidase activity.

3.7. Antimicrobial activity of *P. monodon* lysozymes

To test the antimicrobial activity of the recombinant *P. monodon* lysozymes, a lysoplate assay was employed to evaluate the activity against Gram-positive bacteria: *M. luteus*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, and Gram-negative bacteria including shrimp pathogenic Vibrios: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholera*, *V. mimicus*, *E. coli*. Like the HEWL, the shrimp recombinant lysozyme rPmLyzc exhibited the antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria except *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *V. mimicus* and *E. coli* as showed in Fig. 8. As far as the strength of antimicrobial activity was concerned, the rPmLyz1 and 2 were less active. Moreover, the rPmLyz1 had antimicrobial

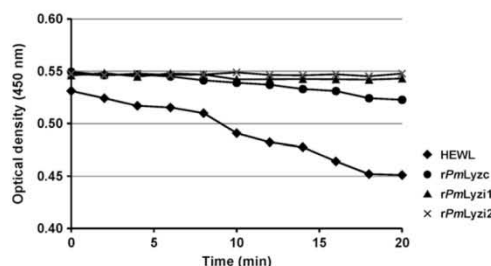


Fig. 7. Muramidase activity assay of the three recombinant shrimp lysozymes. Thirty micrograms of each lysozyme were incubated with *M. luteus* and the change in OD₄₅₀ over time was recorded. Ten micrograms of HEWL were used as a positive control.

activity against only the *M. luteus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. cholera* while the rPmLyz2 had antimicrobial spectrum similar to HEWL and rPmLyzc.

The inhibition concentrations (ICs) of *P. monodon* recombinant lysozymes were calculated and presented in Table 2. In general, all three shrimp recombinant lysozymes exhibited the antimicrobial activity in term of IC against the Gram-negative better than the Gram-positive bacteria. The rPmLyzc was the most effective one.

4. Discussion

Lysozyme is found widely in many organisms. It is a well-known AMP, one of the key components in the innate immunity that attacks directly the invading bacterial pathogens by catalyzing the hydrolysis of bacterial cell wall and subsequently making the bacterial cell prone to lysis [4,7]. Several types of lysozyme, such as the c-, g- and i-type lysozymes have been identified and studied. The studies on phylogenetics demonstrate that the different types of lysozyme may possibly diverge from a common evolutionary origin [13,33]. In penaeid shrimp, the c-type lysozymes are well studied [7,20–23]. Herein, the c-type and two forms of i-type lysozymes are reported. They were identified from the *P. monodon* EST database [24]. Like all other c-type lysozymes identified from shrimp and other organisms, the c-type lysozyme (PmLyzc) from *P. monodon* contains eight conserved Cys residues and the two catalytically important residues, Glu and Asp. The two forms of i-type lysozymes from *P. monodon*, PmLyz1 or destabilase and

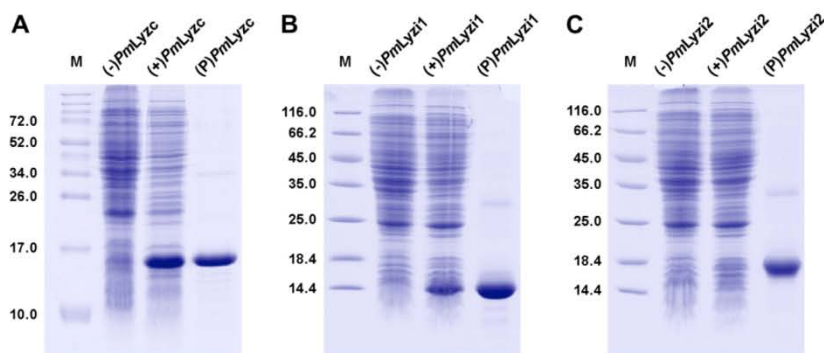


Fig. 6. The expression and purification of recombinant PmLyzc (A), PmLyz1 (B) and PmLyz2 (C) proteins. The proteins were kept tract using 15% SDS-PAGE. The samples were from the *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS transformants with (+) and without (–) IPTG induction. Lanes (P) are the purified proteins. Lanes M are standard protein size markers.

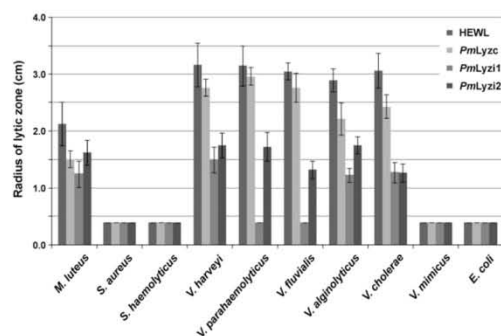


Fig. 8. Radial diffusion antimicrobial assay of HEWL, rPmLyzc, rPmLyz1 and rPmLyz2. Lytic activity of the purified recombinant proteins was analyzed against the Gram-positive bacteria: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, and Gram-negative bacteria: *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *Escherichia coli*. The results represent the mean values with standard deviations.

PmLyz2, are the first to be reported in penaeid shrimp. Amino acid sequence comparison reveals that they are the i-type proteins as they share the conserved Cys residues with other invertebrate i-type lysozymes. Nevertheless, they lack the two catalytic residues found in other i-type lysozymes of arthropods such as mosquito, flies and other shrimp [13]. This report presents the characterization of the i-type lysozymes from the *P. monodon*.

The c-type lysozymes from *P. monodon*, *L. vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* and *F. chinensis* are generally detected in several organs but they are especially abundant in hemocyte [21–23,34,35]. The hemocyte is, therefore, believed to be the main site of c-type lysozyme synthesis in line with the notion that the lysozyme is involved in innate immune system. In this study, second to that in hemocyte was the PmLyzc synthesis in intestine suggesting that the enzyme was also involved in digestive system.

Interestingly, the different expression patterns were observed in i-type lysozymes of *P. monodon*. The PmLyz1 was expressed only in hepatopancreas while the PmLyz2 was expressed in several tissues especially heart but not in gill, lymphoid organ and intestine. In fruit flies, the digestive i-type lysozyme was found to be expressed in hepatopancreas [11]. These results indicated that the PmLyz1 might play a role in digestion. The PmLyz2 might have an unknown role other than digestion yet to be elucidated.

Since the immune effectors are believed to be up-regulated in response to infection, the expression in the major expression tissues of the three *P. monodon* lysozyme transcripts in response to bacterial challenge was analyzed. As expected, the expression of

PmLyzc was up-regulated upon *V. harveyi* challenge for it was suspected from the tissue distribution experiment to play a role in bacterial defense. The transcription of two i-type lysozymes was not responded to the bacterial challenge. Similarly in *A. gambiae*, two i-type lysozymes that also lacked the two catalytic residues were found to constitutively express after bacterial challenge [36].

To study their activities, the three mature recombinant lysozymes were expressed in the *E. coli* system. By using the turbidimetric approach, the recombinant PmLyzc was found to be muramidase active while the two i-type lysozymes were not. Although muramidase activity can strongly depend on physical properties i.e. pH, ionic strength, temperature, the conditions used in this study were within the active ranges previously reported for the shrimp lysozymes [7,20–23]. Thus, the results suggested that PmLyzc but not PmLyz1 and PmLyz2 had muramidase activity.

The antimicrobial assay against various strains of bacteria revealed that the three lysozymes variably exhibited the antimicrobial activities on the bacteria. The PmLyzc was slightly less active than the HEWL control while the two i-type lysozymes were much less active. The PmLyzc including the HEWL were more active against the Gram-negative bacteria than Gram-positive bacteria. This was in contrast to the antimicrobial activity of other c-type lysozymes from fish, silkworm, reptile and other shrimps that were more effective against the Gram-positive bacteria [5,21,22,37]. The antimicrobial activities of the c-type lysozyme naturally lacking the two catalytic residues had been demonstrated compared to the mutated one [37,38]. They were muramidase inactive but still possessed the antimicrobial activity against the bacteria. Therefore, the ability of lysozyme to inhibit the growth of bacteria was not related to or dependent on the muramidase activity. Nevertheless, lysozymes with muramidase activity were more effective antimicrobial proteins.

Acknowledgements

The present work was supported by grants from (i) the Thailand Research Fund (Grant no. TRG5280019) to P. Supungul, (ii) the Commission on Higher Education, (iii) the Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC). The exchange of scientists under the JSPS-NRCT Program is also acknowledged.

References

- [1] Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *The Lancet* 2002;360:1116–7.
- [2] Bachere E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture* 2003;227:427–38.
- [3] Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:169–84.
- [4] Qasba PK, Kumar S. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997;32:255–306.
- [5] Minagawa S, Hikima J, Hirono I, Aoki T, Mori H. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells. *Dev Comp Immunol* 2001;25:439–45.
- [6] Hikima S, Hikima J, Rojtinakorn J, Hirono I, Aoki T. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* 2003;316:187–95.
- [7] Mai WJ, Hu CQ. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis*. *Mol Biol Rep* 2009;36:1587–95.
- [8] Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, Fukuda S, Sugimura K, Imoto T. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *Eur J Biochem* 1999;259:456–61.
- [9] Joskova R, Silerova M, Prochazkova P, Bilej M. Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*. *Dev Comp Immunol* 2009;33:932–8.
- [10] McHenry JG, Birkbeck TH, Allen JA. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp Biochem Physiol* 1979;63:25–8.
- [11] Dobson DE, Prager EM, Wilson AC. Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *J Biol Chem* 1984;259:11607–16.

Table 2

The inhibitory concentrations (ICs) of shrimp recombinant lysozymes.

Bacteria	IC (μM)		
	rPmLyzc	rPmLyz1	rPmLyz2
<i>Micrococcus luteus</i>	0.335	0.491	0.261
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	—	—	—
<i>Vibrio harveyi</i>	0.088	0.273	0.232
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.077	1.184	0.237
<i>Vibrio fluvialis</i>	0.088	—	0.408
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.137	0.507	0.232
<i>Vibrio cholerae</i>	0.114	0.468	0.440
<i>Vibrio mimicus</i>	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—

— means no inhibition.

- [12] Simpson RJ, Begg GS, Dorow DS, Morgan FJ. Complete amino acid sequence of the goose-type lysozyme from the egg white of the black swan. *Biochemistry* 1980;19:1814–9.
- [13] Bachali S, Jager M, Hassanin A, Schoentgen F, Jolles P, Fiala-Medioni A, et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J Mol Evol* 2002;54:652–64.
- [14] Zhao J, Song L, Li C, Zou H, Ni D, Wang W, et al. Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Mol Immunol* 2007;44:1198–208.
- [15] Xue QG, Itoh N, Schey KL, Li YL, Cooper RK, La Peyre JF. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:82–95.
- [16] Jimenez-Cantizano RM, Infante C, Martin-Antonio B, Ponce M, Hachero I, Navas JL, et al. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish Shellfish Immunol* 2008;25:57–65.
- [17] Jolles J, Jolles P. The lysozyme from *Asterias rubens*. *Eur J Biochem* 1975;54:19–23.
- [18] Zavalova LL, Baskova IP, Lukyanov SA, Sass AV, Snezhkov EV, Akopov SB, et al. Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochim Biophys Acta* 2000;1478:69–77.
- [19] Zavalova LL, Lukyanov S, Baskova I, Snezhkov E, Akopov S, Berezhnoy S, et al. Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo- α (γ -Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve blood clots. *Mol Gen Genet* 1996;253:20–5.
- [20] Sotelo-Mundo RR, Islas-Osuna MA, de-la-Re-Vega E, Hernandez-Lopez J, Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:325–31.
- [21] Tyagi A, Khushiramani R, Karunasagar I, Karunasagar I. Antiviral activity of recombinant lysozyme expressed from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 2007;272:246–53.
- [22] Xing Y, Feng-Ying G, Qing-Mei Z, Jun-Jie B, Huan W, Hai-Hua L, et al. Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme. *Mol Biol Rep* 2009;36:1239–46.
- [23] Bu X, Du X, Zhou W, Zhao X, Wang J. Molecular cloning, recombinant expression and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chin J Biotechnol* 2008;24:723–32.
- [24] Tassanakajon A, Klinbunga S, Paunglarp N, Rimphanitchayakit V, Udomkit A, Jitrapakdee S, et al. *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 2006;384:104–12.
- [25] Altschul SF, Lipman DJ. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5509–13.
- [26] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: signalP 3.0. *J Mol Biol* 2004;340:783–95.
- [27] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876–82.
- [28] Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, Rimphanitchayakit V, Hirono I, Aoki T, et al. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustin Pm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 2008;32:61–70.
- [29] Jorgensen L, O'Neill BK, Thomas CJ, Morona R, Middelberg APJ. Release of chloramphenicol acetyl transferase from recombinant *Escherichia coli* by sonication and the French press. *Biotech Technol* 1995;9:477–80.
- [30] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [31] Shugar D. Measurement of lysozyme activity and the ultraviolet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta* 1952;8:302–8.
- [32] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Kapur R, Boman HG. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*. *Eur J Biochem* 1982;127:207–17.
- [33] Grutter MG, Weaver LH, Matthews BW. Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes? *Nature* 1983;303:828–31.
- [34] de Lorgeil J, Saulnier D, Janech MG, Gueguen Y, Bachere E. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol Genomics* 2005;21:174–83.
- [35] Burge EJ, Madigan DJ, Burnett LE, Burnett KG. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:327–39.
- [36] Paskewitz SM, Li B, Kajla MK. Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 2008;17:217–25.
- [37] Gandhe AS, Janardhan G, Nagaraju J. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkworms (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochem Mol Biol* 2007;37:655–66.
- [38] Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Lett* 2001;506:27–32.



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci

Short communication

The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infectionNoppawan Woramongkolchai^a, Premruethai Supungul^{a,b}, Anchalee Tassanakajon^{a,*}^a Center of Excellence for Molecular Biology and Genomics of Shrimp, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2010

Received in revised form

27 December 2010

Accepted 27 December 2010

Available online 31 December 2010

Keywords:

Shrimp

Penaeus monodon

Penaeidins

Antimicrobial peptide

White spot virus

ABSTRACT

Penaeidin class 5 (PEN5) has so far only been reported in the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, and the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. The PEN5 homolog from *F. chinensis* (FenchiPEN5) exhibits antimicrobial activities against both Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as fungi. Here, we characterized the PEN5 gene from *P. monodon* (PenmonPEN5) and evaluated its potential involvement in antiviral immunity. The deduced open reading frame of PenmonPEN5 encodes for a predicted 79 amino acid peptide including a 19 amino acid signal peptide. The gene structure of PenmonPEN5 contains two exons interrupted by one intron, whilst the 5' upstream sequence contains a putative TATA box and several GATA, GATA-3, AP-1 and dorsal transcription factor binding sites. PenmonPEN5 mRNA levels in *P. monodon* shrimps following a systemic infection with white spot syndrome virus (WSSV) were significantly induced at 24 h post infection, but was strongly down-regulated at 48 h post injection, compared to those of the uninfected control shrimps. The suppression of PenmonPEN5 transcript levels by RNA interference mediated gene silencing led to an increased susceptibility of shrimps to WSSV infection, suggesting a possible role of PenmonPEN5 in the shrimp's antiviral immunity.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Multicellular organisms possess potent, broad-spectrum antimicrobial peptides (AMPs) that are used to help fend off a wide range of pathogenic microorganisms, including bacteria, fungi, protozoa and viruses (Hancock, 2001; Zasloff, 2002; Jenssen et al., 2006). In invertebrates, which lack an adaptive immune system, these AMP molecules provide an important means to fight such foreign invaders (Hancock and Sahl, 2006). AMPs are typically small cationic molecules (15–100 amino acids), which although they differ in primary amino acid sequences they adopt a similar amphipathic secondary structure that is believed to be essential for their antimicrobial action.

Penaeidins are shrimp AMPs that contain the unique characteristic in that they are composed of two domains, the N-terminal proline-rich domain (PRD) and the C-terminal cysteine-rich domain (CRD) (Destoumieux et al., 1997; Cuthbertson et al., 2002). Penaeidins can be classified into four distinct classes: PEN2, PEN3, PEN4 and PEN5 (as PEN1 turned out to be the variant of PEN2) based on their primary amino acid sequence diversity (Destoumieux et al., 1999; Cuthbertson et al., 2002). Moreover, each class has been

defined by the conserved key residues of eight specific amino acids located in precise positions (Gueguen et al., 2006; Kang et al., 2007).

It has been reported that different shrimp species each express different classes of penaeidins (Gross et al., 2001; Supungul et al., 2002; Rojtinakorn et al., 2002; Barracco et al., 2005). For example, PEN2, PEN3 and PEN4, were identified in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the white shrimp, *L. setiferus* (Gross et al., 2001), whilst PEN3 and PEN5 were found in the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* (Kang et al., 2007) and the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Tassanakajon et al., 2010). In addition to class diversity, each penaeidin class also displays isoform diversity arising from multiple length and single nucleotide polymorphisms (Cuthbertson et al., 2002).

Penaeidins possess Gram-positive antibacterial and antifungal activities (Destoumieux et al., 1999; Cuthbertson et al., 2004), but it appears that different classes exhibit variations in their potency and target specificity against various strains of microorganisms. Interestingly, penaeidins exhibit significant activity against human pathogens including multiple species of *Candida* (Cuthbertson et al., 2006) and the herpes simplex virus type (HSV-1) (Carriel-Gomes et al., 2007). Recently, penaeidin from *P. monodon* was reported to possess an integrin- β -mediated cytokine feature that promotes shrimp granulocyte and semi-granulocyte adhesion (Li et al., 2010). However, no activity of penaeidin against shrimp viral pathogens has been reported to date.

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5439; fax: +66 2 218 5414.
E-mail address: anchalee.k@chula.ac.th (A. Tassanakajon).

In this study, we investigated the role of *PenmonPEN5*, a *PEN5* homolog from *P. monodon*, in antiviral immunity since its transcript level was previously identified by microarray analysis to be upregulated upon white spot syndrome virus (WSSV) and yellow-head virus infections (Pongsomboon et al., 2010). The viral induction of *PenmonPEN5* mRNA expression was confirmed by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), whereas RNA interference mediated gene silencing was performed to study the effect of penaeidin knockdown on the susceptibility of shrimps to WSSV infection. *PenmonPEN5* was also characterized for its gene organization and tissue distribution.

2. Materials and methods

2.1. Animals and sample preparation

Sub-adult *P. monodon* shrimps of about 15–20 g body weight were obtained from a local shrimp farm in Thailand and adapted in laboratory aquaria, at a temperature of $28 \pm 4^\circ\text{C}$ and a salinity of 15 ppt, for at least 1 week before use in the experiments. Shrimps were separated into two groups, those in the first group were injected with 100 μl of a 1:8000 dilution of the WSSV stock in lobster hemolymph medium (LHM), a level which was found to cause 100% shrimp mortality within 4 days (data not shown), whilst those in the second (control) group were injected with 100 μl LHM (15 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 8.1 mM MgSO_4 , 486 mM NaCl, 0.5 mM Na_2HPO_4 , 36 mM NaHCO_3 and 0.05% (w/v) dextrose in Minimum Essential Medium (Invitrogen)). Hemolymph was collected from the shrimp ventral sinus at 0, 12, 24 and 48 h post challenge (three individual shrimps for each time point) into an anticoagulant solution of 10% (w/v) trisodium citrate dehydrate, pH 4.6, and immediately centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4°C to separate the hemocytes from the plasma. The harvested hemocyte pellet was then immediately resuspended in TRI REAGENT (Molecular Research Center, USA) for further processing.

A small portion of the gill tissue from each shrimp was subjected to PCR detection with the WSSV-specific primers WSSVF/WSSVR (Table 1), as described by Kiatpathomchai et al. (2001), to ensure that they were WSSV-free before experimental infection.

2.2. Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from hemocytes using the TRI REAGENT and treated with DNase I (Promega, USA) following the manufacturer's protocol and the RNA concentration was assessed by UV spectrophotometry. Then 1 μg of the DNA-free total RNA sample was used with oligo(dT)₁₈ as the primer for first-strand cDNA synthesis using a RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to the manufacturer's protocol. The synthesized cDNA was stored at -80°C until used.

2.3. Genomic DNA isolation

Genomic DNA was prepared from muscle tissues by a standard phenol–chloroform based method, as described previously (Tassanakajon et al., 1998). The DNA concentration was measured spectrophotometrically by monitoring the absorbance at 260 and 280 nm.

2.4. Sequence analysis

The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *PenmonPEN5* were analyzed using the NCBI BLAST programs in GenBank and with GENETYX 7.0.3 program. Multiple nucleotide and deduced amino acid sequence alignments of the penaeidin

isoforms were performed using the ClustalX program. The signal peptide was predicted by the online SignalP 3.0 algorithm at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

2.5. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis

For analysis of the transcriptional expression of the *PenmonPEN5* gene after WSSV challenge, qRT-PCR was performed. The *PEN5* specific primers (SpPEN5/CT470R) were designed using the SECentral computer program (Scientific & Educational Software, Durham, NC, USA) (Table 1), and amplify a 133 bp product. A partial fragment (150 bp) of the EF-1 α gene transcript was amplified using the EF-1 α F/EF-1 α R primers (Table 1) and used as the reference control. A standard curve for amplification of the *PEN5* fragment was produced and compared to that for the EF-1 α fragment. QRT-PCR was carried out in a real-time thermal cycler (Bio-Rad, USA) with SYBR® Green (Bio-Rad, USA). The second stage reaction mixture (20 μl) consisted of 3 μl of the 1:10 diluted cDNA template, 0.4 μM of each primer and $1 \times \text{iQ}^{\text{TM}}$ buffer containing DNA polymerase. PCR amplification was performed by an initial denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of 95°C for 20 s, 57°C for 25 s and 72°C for 30 s. For each cDNA sample, the ΔC_t was calculated from the threshold PCR cycle (C_t) of the test gene normalized relative to the C_t of the reference EF-1 α gene fragment in the same sample. The $\Delta\Delta C_t$ value was then calculated as ΔC_t (WSSV challenged group) – ΔC_t (control, LHM injected group). The mean data values, derived from triplicate samples, are then presented as $2^{-\Delta\Delta C_t}$, which represents the fold difference relative to the basal expression. Data obtained from qRT-PCR analysis were subjected to one-way analysis of variance (one-way ANOVA).

2.6. Tissue distribution of the *PenmonPEN5* transcript

The expression level of the *PenmonPEN5* transcript in various *P. monodon* tissues was measured by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from the hemocyte, eyestalk, epipodite, gill, heart, lymphoid organ, hepatopancreas, intestine, and antennal gland tissues of three healthy shrimps using the TRI REAGENT according to the manufacturer's instructions, and the first strand cDNA was synthesized as described above. The specific primers for *PenmonPEN5* (SpPEN5/CT470R) were designed based on the sequence from the EST clones (including CT470) of *P. monodon* (<http://pmonodon.biotec.or.th/>) to yield an amplicon of ca 133 bp, and are described in Table 1. The PCR reaction (25 μl) included 75 mM Tris–HCl, pH 8.8, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μM of specific primers, 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Fermentas) and 3 μl of the 1:10 diluted first-strand cDNA. The PCR cycle parameters were an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 30 s, and then finally 72°C for 10 min. The EF-1 α gene transcript fragment (see above), as the internal control, was amplified as per the *PenmonPEN5* transcript fragment except with an annealing temperature of 55°C . Ten microlitres of each PCR reaction was visualized by UV transillumination following electrophoretic resolution through 1.5% (w/v) agarose–TBE gel and staining with ethidium bromide. The band intensity of PCR products between the penaeidin gene fragment and the EF-1 α gene fragment internal control were analyzed and correlated using the Genetools analysis software (Syngene). The ratios of the *PEN5* to EF-1 α transcript fragments are presented.

2.7. Genomic DNA library construction and determination of the 5' upstream sequence of the *PenmonPEN5* gene

The sequence of the *PenmonPEN5* gene from *P. monodon* was obtained by a PCR approach using genomic DNA as the template

Table 1
Sequences and uses of the PCR primers used in this report.

Primer	Primer sequences (5'–3')	Location (5' to 3')(clone)	Usage
CT470F	CAAGGATACAAGGCGGTTA	121–140 (CT470)	Full-length
CT470R	TTATCCTTTCAATGCAGAACAA	303–282 (CT470)	qRT-PCR, Full-length
2Gsp2PEN5	ACGCCACGCGTTGTGCAAGCAGTT	–	Genome walk
2Gsp1PEN5	GTCAAGTGAGAGCCAAGCACCAGCT	–	Genome walk
SpPEN5	ATCCCGACCTATTAGTACTC	171–190 (CT470)	qRT-PCR, RT-PCR
SpPEN3F	GGCTTAGCCCTTACA	278–293 (CT111)	Gene specific
SpPEN3R	GACCCATACCTACAAATAAC	630–611 (CT111)	Gene specific
PEN5-RNAiF	TTGGTCTATGCTTTGCAAGG	441–460 (CT470)	Gene silencing
PEN5-RNAiR	ACAGATAGTTAAAGTGAAGAC	579–558 (CT470)	Gene silencing
EF-1αF	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC	–	qRT-PCR, RT-PCR
EF-1αR	CGTTCCGCTGATCATGTTCTTGATG	–	qRT-PCR, RT-PCR
VP28F	TCACCTTTCCGGTCTGTGTCG	–	RT-PCR
VP28R	CCACACACAAGGTGCCAAC	–	RT-PCR
WSSVF	AGAGCCGAATAGTGTTCCTCAGC	–	WSSV detection
WSSVR	AACACAGCTAACCTTTATGAG	–	WSSV detection
WSSV1011F	TGGTCCGCTCCTCATCTCAG	–	WSSV copy number detection
WSSV1079R	GCTGCTTGCAGAAATTA	–	WSSV copy number detection

and the CT470F/CT470R primers (Table 1), so as to amplify from the start to stop codons of the penaeidin gene (183 bp amplicon).

Approximately 20 ng of template DNA was used for the PCR amplification in a 50 µl final reaction volume containing one unit Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, USA), 1× Advantage 2 buffer, 200 mM each dNTP, 0.2 mM each primer and thermocycled with an initial denaturation step at 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 3 min with the final 72 °C for 10 min. The PCR product was then cloned into a TA vector and sequenced with an automated sequencer by a commercial service (Macrogen Inc., Korea).

To obtain the 5' UTR sequence of the *PenmonPEN5* gene, the 2Gsp1PEN5 and 2Gsp2PEN5 primers (Table 1) were designed from the upstream sequence of the EST clones, including CT470. The PCR based genome walking was carried out using universal GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech, USA). Four libraries were constructed according to manufacturer's instructions for the PCR template. Primary PCR was performed using the AP1 and the gene specific 2Gsp1PEN5 primers (Table 1). The PCR reaction contained one unit of Advantage 2 Polymerase Mix, 1× Advantage 2 buffer, 10 mM each dNTP, 10 µM each primer and was performed with a two stage and two-step PCR cycle comprised of 7 cycles at 94 °C for 25 s and 72 °C for 4 min, followed by 32 cycles at 94 °C for 25 s and 67 °C for 4 min, with a final 67 °C for 4 min. In the subsequent nested PCR, the primary PCR products were used as templates and amplified using the AP2 and gene specific 2Gsp2PEN5 primers (Table 1) with PCR cycle parameters of five cycles at 94 °C for 25 s and 72 °C for 4 min, followed by 22 cycles at 94 °C for 25 s and 67 °C for 4 min with a final stage of 67 °C for 4 min. The PCR products were then separated by 1% (w/v) agarose-TBE gel electrophoresis, the desired band eluted and cloned into the TA vector for sequencing.

The putative promoter and transcription start site were predicted with neural network promoter prediction (<http://www.fruitfly.org/seq.tools/promoter.html>) (Reese, 2001) and Match.1.0 Public/TRANSFAC.6.0 program (BIOBASE, <http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>), respectively. The Match.1.0 Public program was set to high quality matrices with 0.85 as the matrix and core similarity cut-off value.

2.8. Synthesis of double stranded RNA

Double stranded RNA (dsRNA) that correlated with nucleotide sequence of *PenmonPEN5* was synthesized by *in vitro* transcription. The template DNA for generating dsRNA was amplified in two separate PCR reactions. The sense strand template was synthesized from T7PEN5-RNAiF and PEN5-RNAiR primers (Table 1),

whereas the anti-sense strand template was synthesized from the PEN5-RNAiF and T7PEN5-RNAiR primers, where T7 designates the primer sequence was flanked at the 5' end by the T7 promoter sequence (5' GGATCCTAATACGACTCACTATAGG 3'). Both PCR reactions were performed with 0.02 units/µl of Hotstart Phusion *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs) with PCR cycle parameters of an initial denaturation at 98 °C for 30 s, followed by 39 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 20 s, and with a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR product was separated by 1.5% (w/v) agarose-TBE gel electrophoresis and the desired band eluted and purified using NucleoSpin® Extract II Kits. One microgram of each template was used in an *in vitro* transcription of T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol. The sense and anti-sense single stranded RNA were then mixed at equimolar amounts and annealed to construct the dsRNA. The DNA template was then eliminated by treatment with RNase-free DNase I. The dsRNA was examined for quality and quantity by 1.5% (w/v) agarose-TBE gel electrophoresis resolution and UV spectrophotometry, respectively.

2.9. Specific gene silencing of *PenmonPEN5* transcript and the effect on WSSV challenge

To assess the sequence-specific knockdown effect of *PenmonPEN5* dsRNA, 20 µg (5 µg per 1 g shrimp) of *PenmonPEN5* dsRNA, or poly(GC) (Invitrogen) as a control, dissolved in 30 µl of 0.85% (w/v) NaCl, were injected into each *P. monodon* shrimp (approximately 4 g body weight each) in the lateral area of the fourth abdominal segment using a 0.5 ml insulin syringe with a 29-gauge needle. An additional control group of shrimps were injected with 0.85% (w/v) NaCl only. At 24 h after the first injection, the injection of dsRNA (2.5 µg per 1 g shrimp) or NaCl was repeated. The hemolymph of three individual shrimps from each group were collected and used for total RNA extraction and first strand cDNA synthesis, as described above. The efficiency and specificity of dsRNA-mediated gene knockdown of *PenmonPEN5* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR using the SpPEN3 and SpPEN5/CT470R (Table 1).

To determine the effect of suppression of the *PenmonPEN5* transcript on WSSV infection, shrimp were double injected with *PenmonPEN5* dsRNA, poly(GC) or 0.85% (w/v) NaCl as mentioned above and at the second injection, shrimp was injected together with WSSV (10² copies). After a further 24 h, the hemolymph of three individual shrimps from each group were collected and used for total RNA extraction and then reverse transcribed to first strand cDNA, as described above. The *PenmonPEN3*, *PenmonPEN5*

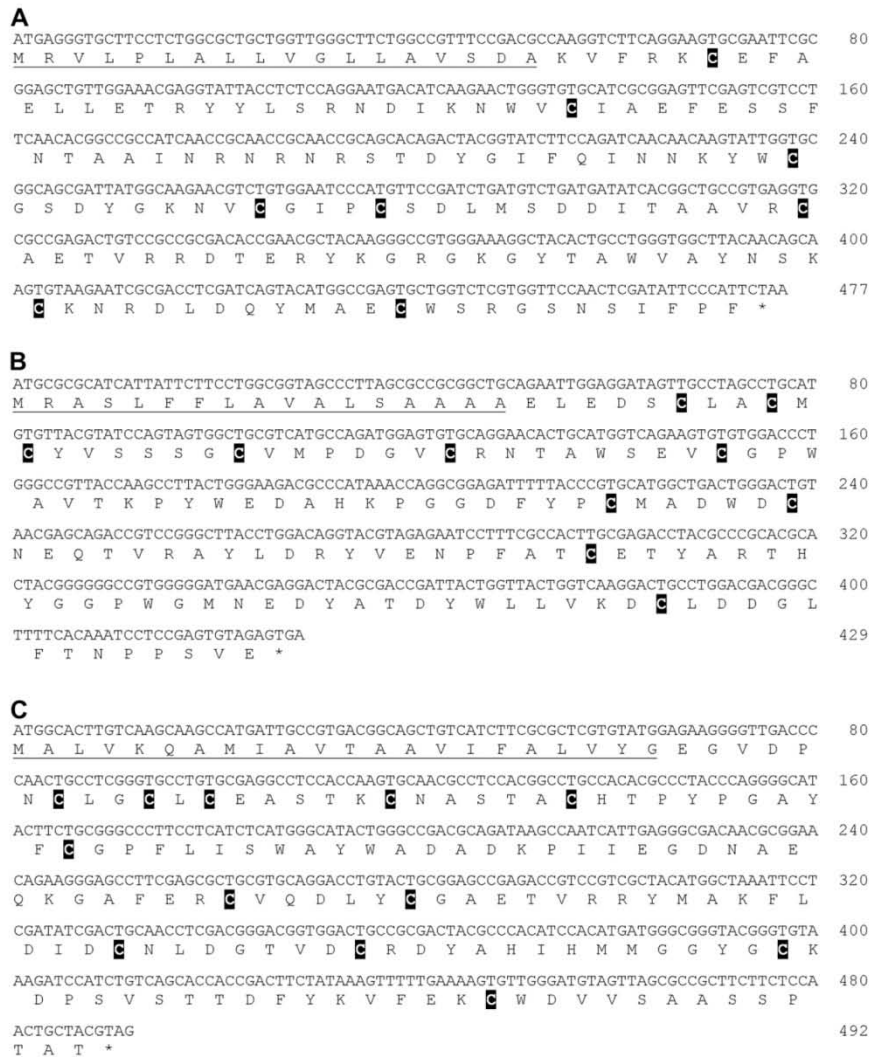


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *PmLyzc* (A), *PmLyz1* (B) and *PmLyz2* (C) from *P. monodon*. Asterisks indicate the stop codons. The putative signal peptides are underlined. The conserved Cys residues are boxed.

AAT51799) with the identity scores of 39% and 45%, respectively. Comparison between the *PmLyz1* and 2 gave only 27% identity.

3.2. Phylogenetic analysis

The deduced amino acid sequence of mature *PmLyzc* was compared with those of the eight known c-type lysozymes from the vertebrate (zebrafish, chicken and mouse), insect (moth and mosquito) and other shrimps as illustrated in Fig. 2A. The multiple sequence alignment showed the two catalytically essential residues, Glu and Asp, and the completely conserved eight-cysteine residue motif. The insertion of seven amino acid residues

[GRG(K/N)GY(T/S)] was found only in the shrimp proteins between Cys6 and Cys7.

The mature amino acid sequences of *PmLyz1* and 2 were also aligned with other invertebrate i-type lysozymes. All proteins had an exceptionally high content of Cys residues. The *PmLyz1* had ten conserved Cys and *PmLyz2* had twelve conserved Cys (Fig. 2B and C). The largest insertion of nine amino acid residues was observed between the Cys6 and Cys7 of the twelve conserved Cys residues. Interestingly, the i-type lysozyme from *P. monodon* and other arthropods lacked both catalytically important residues (Glu and Asp). In contrast, the i-type lysozymes from annelid (segmented worm and medicinal leech), echinoderm (starfish and sea

Fig. 2. The nucleotide sequence of the complete *PenmonPEN5* gene. The 5' upstream, exon and intron sequences are shown in upper case, shaded upper case and lower case letters, respectively. The encoding amino acid sequence is bold-faced with the signal peptide underlined. The nucleotide sequence is numbered starting from the putative transcription start site (+1) in exon-1 and proceeding as positive numbers in a 3' direction and negative numbers in the 5' direction. The putative binding sequence motifs for transcription factors are shown as underlined and bold text with the name of the corresponding factor shown above. Double underlined and asterisks marked sequences are the TATA box and stop codon, respectively. A polyadenylation site (AATAAA) is shown in bold italic upper case letters. The predicted intron dinucleotide acceptor and donor sites for RNA splicing are in bold italic lower case letters.

expressed relative to the control group which was injected with the viral-free LHM media. The results showed that transcripts of *PenmonPEN5* were rapidly down-regulated after WSSV-challenge (Fig. 3) but at 24 hpi the expression level was up-regulated by approximately 1.8-fold. Interestingly, the transcripts of *PenmonPEN5* were then almost undetectable at 48 h post-challenge indicating a strong down-regulation of the penaeidin5 transcripts by this time point.

The expression profile of *PenmonPEN5* transcripts in the hemocytes of WSSV-challenged *P. monodon* was determined by qrt-RT-PCR. The mRNA expression level of the *PenmonPEN5* gene found in WSSV (in LHM) injected shrimps was first normalized to that of the EF-1 α transcript fragment as the reference, and then

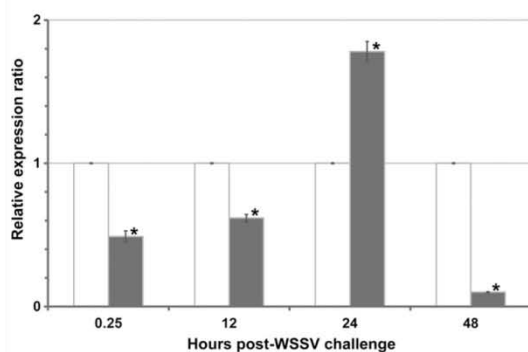


Fig. 3. Analysis of *PenmonPEN5* mRNA expression in the hemocytes of *P. monodon* shrimps by qRT-PCR at different times (0, 12, 24 and 48 h) after WSSV infection. Data are shown as the mean (± 1 SD) of three replicates and represent the fold change of *PenmonPEN5* after normalization relative to the EF-1 α transcript levels and then compared relative to the control group (set as = 1). Significant differences ($p < 0.05$) are marked with an asterisk.

3.4. RNAi-mediated suppression of the *PenmonPEN5* transcript levels and the effect on WSSV infection

The shrimp's response to WSSV challenge in terms of *PenmonPEN5* transcript levels was determined by qRT-PCR. This was initiated in accordance with a previous report from microarray analysis that *PenmonPEN5* is likely to be a viral responsive gene (Pongsomboon et al., 2010). Therefore, its potential function in the shrimp's antiviral immunity was investigated in *P. monodon* by RNAi mediated gene silencing. Shrimps (each of ~4 g) were first injected with 20 μ g of *PenmonPEN5* dsRNA and then 24 h later they were injected with either 10 μ g of *PenmonPEN5* dsRNA for the experimental group or with poly(GC) for the control group. The *PenmonPEN5* dsRNA appeared at least partially specific in that suppression of transcription levels was observed for *PenmonPEN5* but not *PenmonPEN3* (data not shown). Moreover, injection of the control poly(GC) did not affect the mRNA level of *PenmonPEN5*.

To determine whether the suppression of *PenmonPEN5* gene transcript levels would affect WSSV infection, shrimps were pre-injected with *PenmonPEN5* dsRNA, poly(GC) (control) or NaCl (control) and subsequently injected with *PenmonPEN5* dsRNA, poly(GC) or NaCl together with 10^2 copies of WSSV. After 24 h, hemocytes were collected for RNA extraction and the VP28 expression level was determined. A significant increase in the VP28 transcript level was observed in the *PenmonPEN5* RNAi knockdown shrimps when compared with the control shrimps injected with either the virus-free saline solution or with the virus and poly(GC) (Fig. 4A).

In addition, genomic DNA was extracted from *P. monodon* hemocytes and WSSV infection in shrimp was detected by qRT-PCR. It was found that silencing of *PenmonPEN5* gene resulted in a 1.9-fold increase in the WSSV copy number in the infected shrimps, from 7.8×10^4 to 1.5×10^5 copies, compared to the control shrimps injected with poly(GC) and WSSV, 24 h after the initial WSSV infection (Fig. 4B).

4. Discussion

To date, members of the penaeidin class 5 (PEN5) family have only been reported from two shrimp species, *F. chinensis* and *P. monodon*. Other penaeidin classes, and especially PEN3, are well characterized (Destoumieux et al., 1997; Cuthbertson et al., 2002, 2004), whilst PEN5 is accordingly poorly defined (Chen et al., 2004;

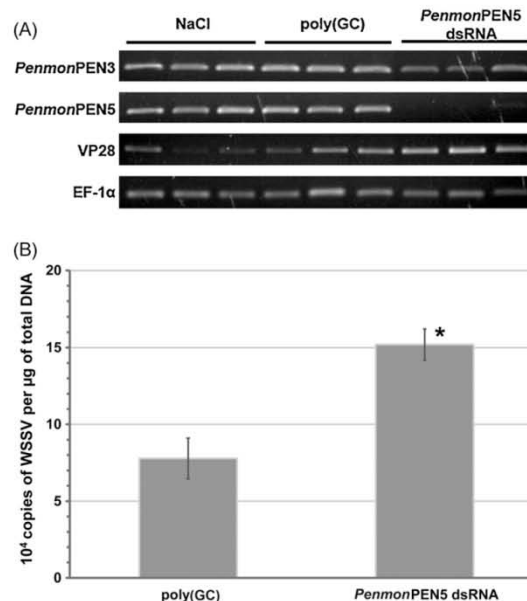


Fig. 4. *PenmonPEN5* transcript downregulation by RNAi results in an increase in the (A) VP28 transcript levels and (B) WSSV copy number in *P. monodon* shrimps challenged with WSSV (10^2 copies). Shrimps were injected twice with *PenmonPEN5* dsRNA, poly(GC) or NaCl and then injected with 10^2 WSSV virions. (A) Total RNA was extracted from *P. monodon* hemocytes 24 h after WSSV injection and assayed for the transcript expression levels of *PenmonPEN5*, *PenmonPEN3* and VP28 by RT-PCR. EF-1 α was used as an internal control to standardize the amount of cDNA template in each reaction. (B) Total DNA was extracted from hemocytes at 24 h post WSSV injection. Data are shown as the mean fold-change of WSSV copy numbers relative to the control group and are derived from three shrimps for each group using qRT-PCR. Significant differences ($p < 0.05$) are marked with an asterisk. A representative experiment of two independent experiments is shown.

Kang et al., 2007). From the deduced amino acid sequence of the PEN5 gene from *P. monodon* (*PenmonPEN5*) it appears that of the eight conserved residues (Gln1, Ser5, Arg13, Ser18, Gly35, Arg37, Asp43 and Ala46) proposed by Kang et al. (2007), variations in three of them, Gly5, Ser35 and His37, are observed, which are identical to the residues in PEN3 (Fig. 1B). Although PEN5 contain Ser18, which is a specific class 5 residue (Tassanakajon et al., 2010), it also contains Lys/Asp at position 43 which illustrates the specific subgroup between PEN3 and PEN5 (Fig. 1A). In addition, the Lys/Asp at position 43 was also species specific in PEN5 (Fig. 1A). Although a PEN5 from *P. monodon* has been reported before (Chen et al., 2004), this is different from that reported here in this study. From analysis of the conserved amino acid signatures of the penaeidin classes and phylogenetic analysis, this previously reported PEN5 should rather be classified as PEN3 and not PEN5 (Kang et al., 2007; Tassanakajon et al., 2008).

The gene structure of the *PenmonPEN5* reported here is very similar to that of the *FenchiPEN5* (Kang et al., 2007). The entire encoding sequence was interrupted by only one intron of 620 and 608 bp for *PenmonPEN5* and *FenchiPEN5*, respectively that separates the proline-rich domain from the cysteine-rich domain. This was also similar to the overall gene organization of other penaeidin classes, subject to variations in the intron length (O'Leary and Gross, 2006). Despite the similar gene organization, it has been shown that each penaeidin class is encoded by a unique gene and that class diversity is not generated by alternative splicing. Indeed, genomic DNA

sequence analysis indicates that PEN2, PEN3 and PEN4 of the Pacific white shrimp, *L. vannamei*, are encoded by different genes (O'Leary and Gross, 2006; Cuthbertson et al., 2008).

The 5' upstream sequence of *PenmonPEN5* contained some nine putative regulatory motifs known to be involved in the regulation of immune genes in other arthropods, comprised of two AP-1, dorsal and GATA-3 sites and three GATA sites. Two promoter types, Type536 and Type411, have been reported in *P. monodon* (Ho and Song, 2009) and it has been demonstrated that Type411 exhibits a stronger transcriptional activity. According to the 5' upstream sequences, the *PenmonPEN5* promoter is nearly identical to the Type536 promoter, but a few nucleotide variations, and so Type411 could, presumably, be the *PenmonPEN3* promoter. The analysis of cDNA libraries (>10,000 ESTs) from *P. monodon*, indicated that transcripts of PEN3 are much more abundant than PEN5 (Tassanakajon et al., 2006), which could result from the differences in the promoter activities.

Penaeidins are generally active against Gram-positive bacteria and fungi but PEN5 from *F. chinensis* (*FenchPEN5*) displays antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as against fungi (Kang et al., 2007). In this study, we demonstrated that *PenmonPEN5* may have protected shrimps from WSSV infection as the suppression of *PenmonPEN5* gene transcript levels resulted in an increase in the viral infection load in shrimps. So far, antilipopolysaccharide factor (ALF) is the only shrimp AMP which has been demonstrated to be involved in protection against shrimp viral pathogens. However, a few studies report the upregulation of penaeidin transcripts in WSSV-challenge shrimps (Rojtinnakorn et al., 2002; Pongsomboon et al., 2010), whilst a significant activity of penaeidins against human herpes simplex virus type 1 (HSV-1) has been reported (Carriel-Gomes et al., 2007). Therefore, it seems likely that AMP in the penaeidin family could play a crucial function in the shrimp antiviral immunity. Due to the high negative impact of viruses on commercial shrimp production, the identification of candidate molecules that possibly play an important role in antiviral immunity is of great importance and so they should be further characterized to unveil the shrimp's immune mechanisms towards viral infections.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Sujint Thammasart, D.V.M. at Charoen Pokphand Foods PCL, for his kind assistance on the detection of WSSV copy number. We also thank Dr. Robert Douglas John Butcher at the Publication Counseling Unit (PCU), Faculty of Science, Chulalongkorn University, for English language corrections of this manuscript. This work was supported by research grants from Thailand National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the National Research University Project of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (FW643A) and the Thailand research Fund (grant no. TRG5280019). We also acknowledge the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture.

References

- Barracco, M.A., de Lorigeril, J., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic Brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 117–120.
- Carriel-Gomes, M.C., Kratz, J.M., Barracco, M.A., Bachère, E., Barardi, C.R.M., Simões, C.M.O., 2007. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 102 (4), 469–472.
- Chen, J.Y., Pan, C.Y., Kuo, C.M., 2004. Molecular cloning and sequencing of shrimp (*Penaeus monodon*) penaeidin-5 cDNA. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 665–670.
- Cuthbertson, B.J., Büllsbach, E.E., Fievet, J., Bachère, E., Gross, P.S., 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochem. J.* 381, 79–86.
- Cuthbertson, B.J., Büllsbach, E.E., Gross, P.S., 2006. Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi. *Chem. Biol. Drug Des.* 68, 120–127.
- Cuthbertson, B.J., Deterdung, L.J., Williams, J.G., Tomer, K.B., Etienne, K., Blackshear, P.J., Büllsbach, E.E., Gross, P.S., 2008. Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 167–181.
- Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S., 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics* 54, 442–445.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., Bachère, E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 272, 28398–28406.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A., Bachère, E., 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.* 266, 335–346.
- Durand, S.V., Lightner, D.V., 2002. Quantitative real-time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish. Dis.* 25, 381–389.
- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25 (7), 565–577.
- Gueguen, Y., Garnier, J., Robert, L., Lefranc, M.P., Mougenot, I., de Lorigeril, J., Janech, M., Gross, P.S., Warr, G.W., Cuthbertson, B., Barracco, M.A., Bulet, P., Aumelas, A., Yang, Y., Bo, D., Xiang, J., Tassanakajon, A., Piquemal, D., Bachère, E., 2006. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 283–288.
- Hancock, R.E.W., 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 1, 156–164.
- Hancock, R.E.W., Sahl, H.G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24, 1551–1557.
- Ho, S.H., Song, Y.L., 2009. Cloning of penaeidin gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol.* 27, 73–77.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511.
- Kang, C.J., Xue, J.F., Liu, N., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2007. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.* 44, 1546–1554.
- Kiatpathomchai, W., Boonsaeng, V., Tassanakajon, A., Wongteerasupaya, C., Jitrapakdee, S., Panyim, S., 2001. A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 47, 235–239.
- Li, C.Y., Yan, H.Y., Song, Y.L., 2010. Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) penaeidin possesses cytokine features to promote integrin-mediated granulocyte and semi-granulocyte adhesion. *Fish Shellfish Immunol.* 28 (1), 1–9.
- O'Leary, N.A., Gross, P.S., 2006. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeidin gene family from *Litopenaeus vannamei*. *Gene* 371, 75–83.
- Pongsomboon, S., Tang, S., Boonda, S., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A., 2010. A cDNA microarray approach for analyzing transcriptional changes in *Penaeus monodon* after infection by pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* doi:10.1016/j.fsi.2010.10.015.
- Reese, M.G., 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* 26, 51–56.
- Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Itami, T., 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 69–83.
- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Jitrapakdee, S., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A., 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar. Biotechnol.* 4 (5), 487–494.
- Tassanakajon, A., Amparyup, P., Sombonwivat, K., Supungul, P., 2010. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.* 12, 487–505.
- Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Paunglarp, N., Rimphanitchayak, V., Udomkit, A., Jitrapakdee, S., Sritunyaluksana, K., Phongdara, A., Pongsomboon, S., Supungul, P., Tang, S., Kuphanumart, K., Pichyangkura, R., Lursinsap, C., 2006. *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. *Gene* 384, 104–112.
- Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Boonsaeng, V.V., 1998. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 249–254.
- Tassanakajon, A., Vatanavicharn, T., Supungul, P., Tang, S., Amparyup, P., Sombonwivat, K., Tharntada, S., Takahashi, J., Toyohara, H., 2008. Biotechnology of marine invertebrates—recent advances in shrimp and shellfish. In: Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T.D., Kaiser, M.J. (Eds.), *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress 2008. TERRA-PUB, Tokyo, pp. 221–239.
- Zaslloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.