

Abstract

Project Code : TRG5380002

Project Title : Functional characterization of recombinant protein of Pem-GIH and its antibody
in *Penaeus monodon*

Investigator : Miss Supattra Treerattrakool

Institute of Molecular Biosciences

Mahidol University Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170

E-mail Address : tsupattra@gmail.com, supattra.tre@mahidol.ac.th

Project Period : 31 May 2010-31 May 2012

In crustacean, ovarian maturation process is controlled by an eyestalk neurohormone, gonad-inhibiting hormone (GIH). GIH is presumed to inhibit the synthesis or release/uptake of vitellogenin (Vg). Vg is a precursor of yolk protein or vitellin (Vt) that is a key protein in ovarian maturation process. Accordingly, shrimp breeding usually employs unilaterally eyestalk-ablation technique to reduce the amount of GIH and to induce ovarian maturation. Therefore, the detailed studies on GIH are important to help improve the reproduction of economically important species such as the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. This project is aimed to study biological function of GIH in inhibition of vitellogenin synthesis and to investigate the exploitation of GIH antibody to inhibit GIH activity by *in vitro* bioassay. Finally, the relationship of GIH on ovarian maturation stages of female *P. monodon* broodstock will be determined by using anti-Pem-GIH antibody.

The recombinant protein of GIH of *P. monodon* (rPem-GIH) was successfully expressed in yeast *Pichia pastoris* expression system under the control of an alcohol oxidase promoter. The amount of total proteins secreted into the induction medium from the optimal expression conditions of rPem-GIH was approximately 0.5-1 mg/l. The rPem-GIH was successfully purified by one-step of reversed-phased chromatography with Sep-Pak cartridges (C₁₈). Biological activity of rPem-GIH was determined in primary ovary cell culture derived from previtellogenic *P. monodon* broodstock. The purified rPem-GIH significantly reduced vitellogenin mRNA level about 39% when compared with the non-treated group, which is similar to the effect of partially purified eyestalk extract. Our result demonstrated that rPem-GIH expressed in *P. pastoris* had biological activity to inhibit vitellogenin synthesis in primary cell culture of ovary from *P.*

monodon, and thus suggested that the rPem-GIH possesses gonad inhibiting activity as crude eyestalk extract.

Additionally, the polyclonal antiserum against rPem-GIH (called anti-Pem-GIH antibody) showed specificity to react with GIH from the partially purified eyestalk extract and did not cross react with structurally-related proteins such as rPem-CHH1 and rPem-MIH1. The anti-Pem-GIH antibody at dilution 1:500 was able to neutralize the activity of 28.75 nM rPem-GIH to about 31.2% by *in vitro* assay in primary cell culture of ovary, thus implying that anti-Pem-GIH antibody may be used as an alternative approach for induction ovarian maturation in female broodstock of *P. monodon*. Moreover, the anti-Pem-GIH antibody was used to study the localization of GIH by the immunohistochemistry (IHC) technique in this study. The GIH signal was observed only at the sinus gland (storage site) in the optic lobe of female broodstock of *P. monodon* at various stages of ovarian development. Further determination of the level of GIH in both the eyestalk and the hemolymph of *P. monodon* female broodstock at various stages of ovarian development will help in understanding the relationship between GIH and ovarian maturation. The knowledge from this study should lead to more thoroughly understanding of reproduction mechanism in *P. monodon* that may be applied to induce ovarian maturation without eyestalk ablation in the future.

Keywords : Black tiger shrimp, vitellogenin, Primary ovary cell culture

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5380002

ชื่อโครงการ: การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนลูกผสม GIH และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH ในกิ้งกูดดำ

ชื่อนักวิจัย: นางสาวสุพัตรา ตริรัตน์ตระกูล

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ต. ศาลายา อ.พุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

E-mail Address : tsupattra@gmail.com, supattra.tre@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 31 พฤษภาคม 2553 - 31 พฤษภาคม 2555

กระบวนการพัฒนารังไข่ของสัตว์จำพวกครัสเตเชียควบคุมด้วยฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (Gonad-inhibiting hormone; GIH) ที่อยู่บริเวณก้านตา GIH เกี่ยวข้องในกระบวนการควบคุมระบบสืบพันธุ์ โดยทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างโปรตีนไวเทลโลจีนิ (Vg) ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้นขององค์ประกอบหลักในเซลล์ไข่ การตัดตาเพื่อกำจัด GIH จึงถูกนำมาใช้เพื่อเร่งการพัฒนาของรังไข่ แม้ว่าเทคนิคการตัดก้านตานี้จะส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพของไข่น้อยลงและแม่พันธุ์กึ่งอ่อนแอในเวลาต่อมาก็ตาม ดังนั้นการศึกษาองค์ความรู้ของ GIH จึงมีความสำคัญที่จะช่วยในการกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ของสัตว์เศรษฐกิจเช่นกิ้งกูดดำให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหน้าที่ของ GIH โดยอาศัยโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จากยีสต์มาทำการทดสอบหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของไวเทลโลจีนิในระดับ mRNA ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ และทำการศึกษาค้นคว้าเบื้องต้นเกี่ยวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH แล้วนำแอนติบอดีต่อ GIH ไปทดสอบผลในการกระตุ้นการแสดงออกของไวเทลโลจีนิในระดับ mRNA ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ นอกจากนั้นจะใช้แอนติบอดีต่อ GIH ในการตรวจสอบตำแหน่งของฮอร์โมน GIH จากเนื้อเยื่อที่มีการสร้าง GIH ในกิ้งกูดดำแม่พันธุ์ที่มีระยะการพัฒนารังไข่ต่างๆ โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กึ่งในช่วงระยะต่างๆ

ในการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนลูกผสม GIH ในกิ้งกูดดำ ได้ผลิตโปรตีนลูกผสมของ GIH ของกิ้งกูดดำ (rPem-GIH) ในยีสต์ *P. pastoris* (*Pichia* expression system) ซึ่งเป็นระบบที่เหมาะสมในการผลิตฮอร์โมนลูกผสมของ eukaryotes โปรตีนลูกผสมของ GIH ที่ผลิตได้จะมีการม้วนพับที่ถูกต้องและอยู่ในรูปที่สามารถทำหน้าที่ได้ ที่มีขนาดประมาณ 9 kDa โดยมีการแสดงออกได้ดีที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 3% (v/v) เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยสามารถผลิตโปรตีนที่หลั่งออกนอกยีสต์เซลล์ได้ในปริมาณ 0.5-1 มิลลิกรัม จากเซลล์เจ้าบ้านที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จากนั้นจึงทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยหลักการ Reverse-phase chromatography โดยวิธี Solid Phase

Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่มี packing เป็น C₁₈ จากนั้นนำโปรตีนลูกผสมของ GIH บริสุทธิ์ไปทำการตรวจสอบหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนิน (Vg) ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ของ กุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ พบว่า โปรตีนลูกผสมของ GIH บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 57.5 nM สามารถลดระดับการ แสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ได้อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ประมาณ 38.6% เมื่อ เทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ GIH ที่ได้จากการ สกัดจากก้านตา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนลูกผสม GIH ที่ได้จากการแสดงออกจากยีสต์ *P. pastoris* สามารถยับยั้งการสร้าง Vg โปรตีนในเซลล์ปฐมภูมิจากรังไข่ ซึ่งบ่งชี้ว่าโปรตีนลูกผสม GIH มี หน้าที่เป็นฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนาของรังไข่เช่นเดียวกับสารสกัดที่ได้จากก้านตา ในการศึกษา ความสามารถของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH ได้เริ่ม จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH พบว่า แอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH มีความจำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม GIH และไม่สามารถจับกับโปรตีนลูกผสม CHH และ MIH ที่มีลักษณะ โครงสร้างคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีต่อ GIH มีความจำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ในก้าน ตากุ้งกุลาดำ การศึกษาเบื้องต้นพบว่าแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 สามารถจับอย่าง จำเพาะกับฮอร์โมน GIH ที่ความเข้มข้น 28.75 nM ส่งผลให้สามารถยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน ลูกผสม GIH ได้ประมาณ 31.2% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีแอนติบอดีต่อ GIH จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ แอนติบอดีต่อ GIH ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH และนำไปสู่การพัฒนารังไข่ในกุ้งกุลาดำแม่ พันธุ์ นอกจากนี้ได้ตรวจหา GIH ในเนื้อเยื่อก้านตาของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ ต่างๆโดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา และพบว่าสามารถตรวจพบตำแหน่งของ GIH บริเวณ sinus gland ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นแหล่งสะสมฮอร์โมน GIH

ในอนาคต จึงควรมีการศึกษาปริมาณฮอร์โมน GIH ในกระแสเลือดและที่สะสมที่บริเวณ sinus gland ใน optic lobe ในระยะต่างๆของการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ เพื่อที่จะเข้าใจ ความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมน GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ จะช่วยนำไปสู่ความเข้าใจ เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ และนำข้อมูลที่ได้ไปบูรณาการสู่การประยุกต์แอนติบอดีต่อ GIH ใน การกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยไม่ต้องตัดตากุ้ง

คำหลัก : กุ้งกุลาดำ, ไวเทลโลจีนิน, เซลล์ปฐมภูมิของรังไข่