นอกจากนี้ตัดตับจากกุ้งตัวเดียวกันของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม นำไปสกัด total RNA และติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีนฮีโมไซยานินในตับโดยวิธี Real-Time PCR โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะจาก cDNA ที่สร้างได้จากข้อ 8.4 ซึ่งติดฉลากด้วย fluorescent dye นำ PCR product ไปวิเคราะห์ปริมาณเปรียบเทียบกับ internal standard (18S rRNA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมาของกุ้งแชบ๊วย

เนื่องจากฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่พบมากสุด (80-95%) ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ของกุ้ง ในการศึกษาแบบแผนโปรตีนของฮีโมไซยานินในพลาสมาของกุ้งแชบ๊วยโดยการทำ Native PAGE พบว่าพลาสมาเริ่มต้นที่นำมาศึกษาปรากฏแถบโปรตีนที่ย้อมแบบซิลเวอร์ติดสีจางหลายแถบ แต่ที่ติดสีเข้มมากมีเพียง 1 แถบ (แถบ HC ในรูปที่ 1 แถวที่ 2) ซึ่งเมื่อเทียบแบบแผนโปรตีนกับของกุ้งขาว *P. vannamei* (Figueroa-Soto *et al.*, 1997) และของกุ้งกุลาดำ (Ellerton and Anderson, 1981) บ่งชี้ว่าแถบนี้เป็นแถบฮีโมไซยานิน ดังนั้นในการวิจัยทำให้สามารถติดตามแถบโปรตีนฮีโมไซยานินได้

จากการที่ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่จับอยู่กับคอปเปอร์และมีสีน้ำเงินจากการที่คอปเปอร์จับกับออกซิเจน (Rainer and Brouwer, 1993) ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A340) ในงานวิจัยนี้เมื่อแยกพลาสมาที่เตรียมได้จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยด้วยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ เก็บสารละลายเป็นส่วน ๆ ตามลำดับจากบนสุด (หลอดที่ 1) ไปจนถึงตะกอนก้นหลอด (หลอดที่ 14) และเมื่อนำสารละลายแต่ละหลอดไปหาปริมาณโปรตีนและวัดค่า A340 ของคอปเปอร์ พบว่าสารละลายหลอดที่ 13 มีปริมาณโปรตีนและค่า A340 มากสุด บ่งชี้ว่าสารละลายหลอดที่ 13 มีปริมาณฮีโมไซยานินมากกว่าสารละลายหลอดอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับสีของสารละลายหลอดที่ 13 ที่มีสีน้ำเงินเข้มของคอปเปอร์ และคล้ายกับผลการแยกฮีโมไซยานินจากพลาสมาของกุ้ง kuruma (*P. japonicus*) ด้วยวิธีอัลตราเซนตริฟิวจ์ที่พบฮีโมไซยานินถูกแยกอยู่ในส่วนก้นหลอด (Adachi *et al.*, 2001)

เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมไซยานินในสารละลายหลอดที่ 13 ปรากฏแบบแผนโปรตีนคล้ายกับพลาสมาของกุ้งแชบ๊วย แต่ความเข้มของแถบโปรตีนอื่นที่ไม่ใช้แถบโปรตีนฮีโมไซยานินติดสีย้อมจางลง (รูปที่ 1 แถวที่ 3) แสดงให้เห็นว่าการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์กำจัดโปรตีนปนเปื้อนออกได้บางส่วน เมื่อนำสารละลายหลอดที่ 13 ที่ได้จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ไปแยกต่อโดยวิธี preparative PAGE พบว่าสารละลายที่เตรียมได้ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อย้อมโปรตีนแบบซิลเวอร์ ณ ตำแหน่งของฮีโมไซยานิน (รูปที่ 1 แถวที่ 4) บ่งชี้ว่าการทำ preparative PAGE สามารถแยกฮีโมไซยานินได้บริสุทธิ์ โดยมีปริมาณโปรตีน 13.9 มิลลิกรัม และคิดเป็น 2.5 % ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น แบบแผนโปรตีนของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพลาสมาของกุ้งแชบ๊วยคล้ายกับแบบแผนโปรตีน

ของฮีโมไซยานินที่แยกได้จากครัสเตเซียนชนิดอื่น ซึ่งปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวใน Native PAGE อาทิเช่น ฮีโมไซยานินจากกุ้งขาว (Figueroa-Soto *et al.*, 1997) และจากปู (*Scylla olivacea*) (Chen *et al.*, 2007)

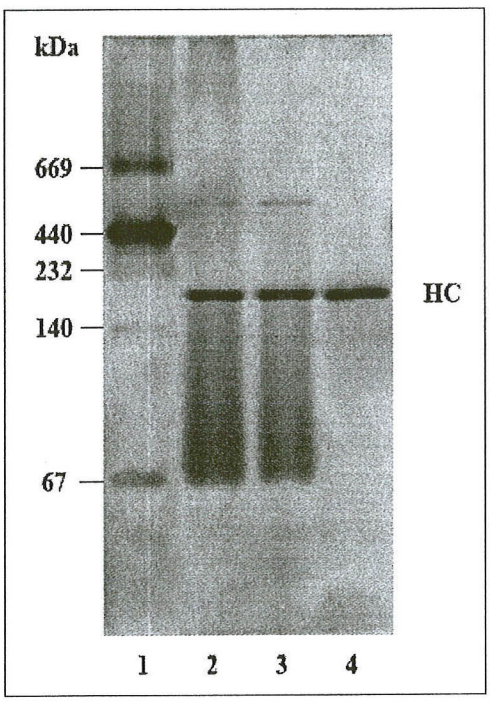

Fig. 1 Native PAGE of hemocyanin at various steps of purification. The gel was stained with a silver staining kit. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, plasma; lane 3, fraction 13 from ultracentrifugation, lane 4, purified hemocyanin (HC) from preparative PAGE.

2. การศึกษาคุณสมบัติของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

2.1 การหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

จากการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 FPLC เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด (รูปที่ 2) เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ได้ 215 kDa ดังแสดงผลในรูปที่ 2

มีรายงานเกี่ยวกับมวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในรูปไม่แปลงสภาพ (native form) น้อยมาก โดยส่วนใหญ่มักรายงานเป็นมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินใน SDS-PAGE

ถึงแม้การหามวลโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี Native PAGE จะไม่แม่นยำเพราะการวิเคราะห์ด้วยวิธี Native PAGE เป็นการแยกโปรตีนด้วย 3 ปัจจัยควบคู่กันคือประจุสุทธิ ขนาด และรูปร่างของโปรตีน แต่มีรายงานการวิเคราะห์ด้วยวิธี Native PAGE ว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้ง *Penaeus setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) และของกุ้งกุลาดำ (Ellerton and Anderson, 1981) มีมวลโมเลกุลเท่ากันคือ 471 kDa ส่วนของกุ้งขาวมีมวลโมเลกุล 400 kDa (Figueroa-Soto *et al.*, 1997) สำหรับฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของปู *S. olivacea* มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Chen *et al.*, 2007) ฮีโมไซยานินทั้งในพลาสมาและฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยมีมวลโมเลกุล 230 kDa ใน Native PAGE (รูปที่ 1) ในขณะที่ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 457 kDa เมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชันด้วยคอลัมน์ Superose 12 (รูปที่ 2) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับของกุ้งขาว (Figueroa-Soto *et al.*, 1997) กุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) กุ้งกุลาดำ (Ellerton and Anderson, 1981) และของปู *S. olivacea* (Chen *et al.*, 2007) บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยมีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่าของกุ้งอื่น ๆ จึงวิ่งไปหาขั้วบวกใน Native PAGE โดยไปอยู่ในตำแหน่งที่ไกลกว่าของกุ้งชนิดอื่นซึ่งมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับของกุ้งแชบ๊วย

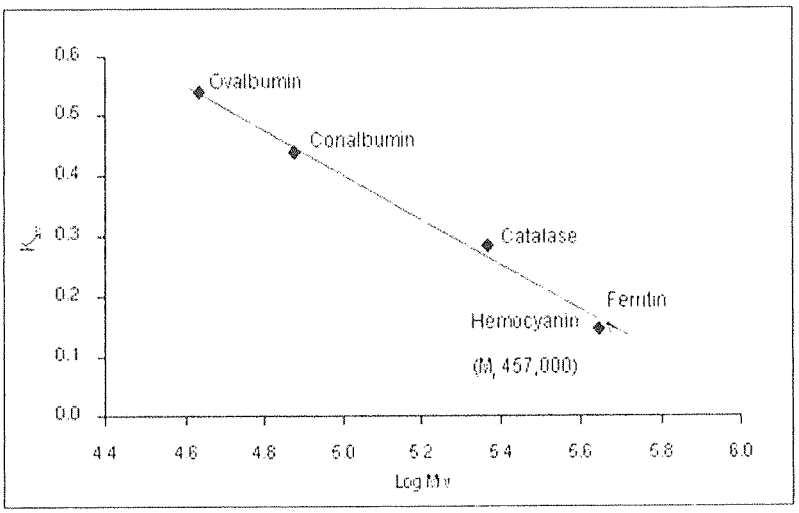

Fig. 2 Standard graph for M_r determination analyzed by Superose 12 column.

2.2 มวลโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินใน SDS-PAGE

เมื่อนำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วยไปวิเคราะห์ด้วยการทำ SDS-PAGE เพื่อหามวลโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาด และจากการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 8 ชนิด พบว่าคำนวณหามวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ได้ 79,400 และ 75,000 ดัลตัน (รูปที่ 3 แถวที่ 4) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินในกุ้งชนิดอื่น ๆ ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาด เช่นกัน อาทิเช่น ฮีโมไซยานินของกุ้ง

P. japonicus มีมวลโมเลกุล 77,000 และ 67,000 ดัลตัน (Adachi *et al.*, 2001) ของกุ้งขาวมีมวลโมเลกุล 82,000 และ 75,000 ดัลตัน (Figueroa-Soto *et al.*, 1997) ของกุ้ง *P. setiferus* มีมวลโมเลกุล 82,000 และ 77,000 ดัลตัน (Brouwer *et al.*, 1978) ในขณะที่ของกุ้งนาง (*P. leniusculus*) มีมวลโมเลกุล 75,000 และ 66,000 ดัลตัน (Lee *et al.*, 2004)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

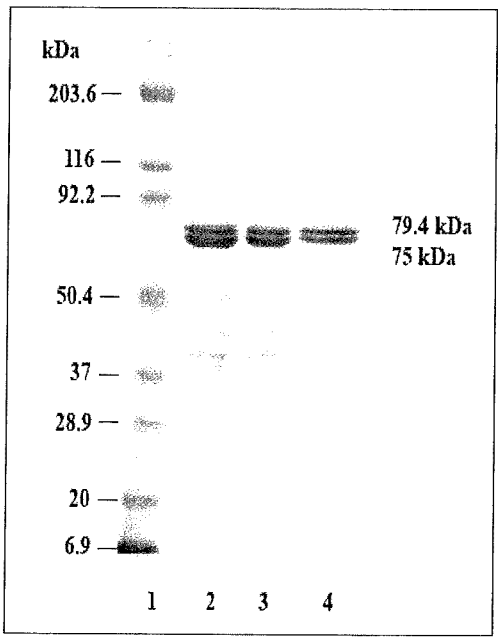

Fig. 3 SDS-PAGE of hemocyanin at various steps of purification. The protein bands were visualized by staining with Coomassie Blue. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, plasma; lane 3, fraction 13 from ultracentrifugation, lane 4, purified hemocyanin from preparative PAGE.

2.3 ทดสอบการมีแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของฮีโมไซยานิน

จากการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ตามวิธีการข้อ 7.4 ไม่พบการมีแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส แม้จะเพิ่มฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณต่าง ๆ กัน ซึ่งมีรายงานการพบฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเฉพาะในกุ้ง *P. japonicus* เท่านั้น (Adachi *et al.*, 2001)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 16 มิ.ย. 255
เลขทะเบียน 244885
เลขเรียกหนังสือ

2.4 การหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายเอ็นของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

เมื่อนำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ไปแยกโดยวิธี SDS-PAGE สามารถนำไปหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นของหน่วยย่อยฮีโมไซยานินได้ แต่ไม่สามารถเปรียบเทียบกับของฮีโมไซยานินของกุ้งชนิดอื่น เพราะไม่มีรายงานปรากฏ แต่ลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่หาได้เหมือนกับของยีนฮีโมไซยานินที่โคลนได้ (รูปที่ 8)

3. การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วย และทดสอบการมีแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ได้หลังจากการฉีดสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 4 หลุม C) และมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นหลังจากการฉีดสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ตามลำดับ (รูปที่ 4 หลุม D และ E) ทั้งนี้ไม่พบแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่ายก่อนการฉีดแอนติบอดี (รูปที่ 4 หลุม A) จะเห็นได้ว่ากระต่ายมีการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อถูกระตุ้นด้วยแอนติเจน

เมื่อนำซีรัมของกระต่ายไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50% แล้วแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาในพีคแรก (Wallance, 1965) แอนติบอดีที่ผ่านการตกตะกอนหรือที่แยกด้วยคอลัมน์เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ได้ดีเช่นเดียวกับซีรัมกระต่ายก่อนผ่านคอลัมน์ ดังแสดงผลในรูปที่ 4 หลุม F และ G

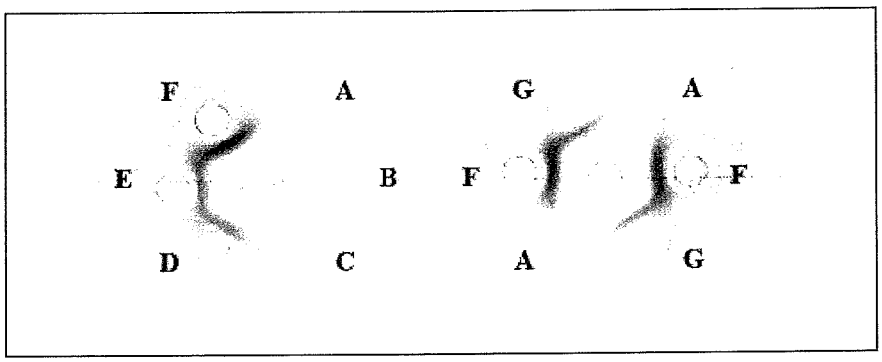

Fig. 4 Ouchterlony double immunodiffusion of anti-hemocyanin antibody.
Well A, pre-immune serum; well B-E, serum at week 2, 4, 5 and 6 post-injection, respectively; well F, ammonium sulphate precipitated serum; well G, purified antibody from DEAE-Sephacel column.

4. การทำ Western blot

เพื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ นำพลาสมาของกุ้งแชบ๊วย สารละลายหลอดที่ 13 ที่ได้จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ และฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ไปทำ SDS-PAGE และทดสอบต่อด้วยการทำ Western blot ปรากฏเฉพาะแถบโปรตีน 2 แถบ ที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีในทั้ง 3 ตัวอย่าง (รูปที่ 5B) คือพลาสมา (แถวที่ 6) สารละลายหลอดที่ 13 (แถวที่ 7) และฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ (แถวที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งกับแถบโปรตีนในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (รูปที่ 5A แถวที่ 2-4) พบว่าตำแหน่งของแถบโปรตีน 2 แถบ ที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีเป็นตำแหน่งของฮีโมไซยานินซึ่งมีมวลโมเลกุล 79.4 และ 75 kDa บ่งชี้ว่าแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีความจำเพาะสูงเพราะเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับฮีโมไซยานินเท่านั้น แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนอื่น ๆ ในพลาสมาหรือในสารละลายหลอดที่ 13 รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงผลในรูปที่ 5B แถวที่ 5

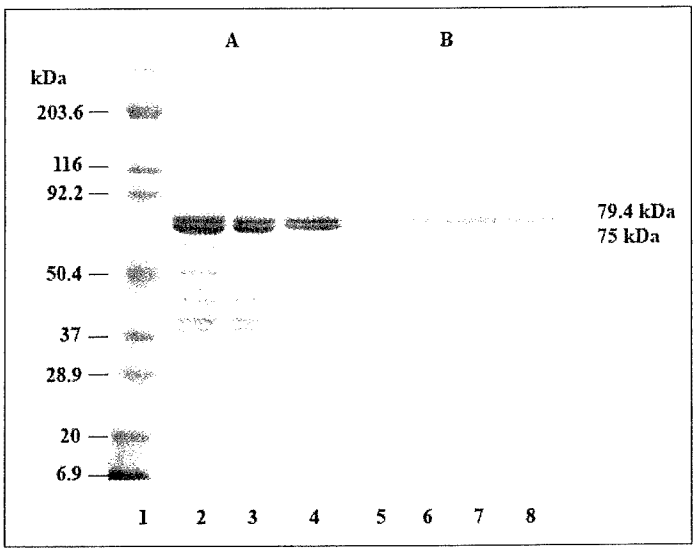

Fig. 5 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) of hemocyanin. The gel was stained by Coomassie Blue. Lane 1 and 5, molecular weight markers; lane 2 and 6, plasma; lane 3 and 7, fraction 13 from ultracentrifugation, lane 4 and 8, purified hemocyanin.

5. การพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์

5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA ต้องอาศัยหลายปัจจัยในการทำ ได้แก่การใช้ปริมาณฮีโมไซยานิน ปริมาณแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ (1°Ab) และปริมาณแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (2°Ab) ที่เหมาะสม นอกจากนี้ในการติดตามปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกิด ก็ต้องใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท OPD และ H_2O_2 รวมทั้งระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสม ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ โดยการใช้ปัจจัยแต่ละตัวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วเลือกค่าที่เหมาะสม ซึ่งจากทดลองดังกล่าวพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA เป็นดังนี้ ใช้ฮีโมลิมฟ์, 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:200, 1:2,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 30 นาที

5.2 การทำกราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

เนื่องจากฮีโมไซยานินมีปริมาณมากในฮีโมลิมฟ์ ดังนั้นการทำกราฟมาตรฐานจึงได้เลือกทำในช่วงที่มีค่า A492 ครอบคลุมการวัดหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ ซึ่งในการทำกราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินเพื่อใช้ในการวัดปริมาณของฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย ได้จากการนำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปริมาณต่าง ๆ ในช่วง 5-69 ไมโครกรัมต่อหลุม เคลือบเพลท จากนั้นทำ ELISA ต่อตามภาวะที่เหมาะสมในข้อ 5.1 แล้วพล็อตกราฟระหว่างค่า A492 กับ log ของปริมาณฮีโมไซยานินที่ใช้ ผลการทดลองแสดงค่า A492 เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามปริมาณของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 10-69 ไมโครกรัม การใช้ฮีโมไซยานินปริมาณ 5 ไมโครกรัม จะให้ค่า A492 ที่เบี่ยงเบนออกจากเส้นตรง (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงใช้ปริมาณฮีโมไซยานินในช่วง 10-69 ไมโครกรัมต่อหลุม เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยวิธี ELISA ต่อไป

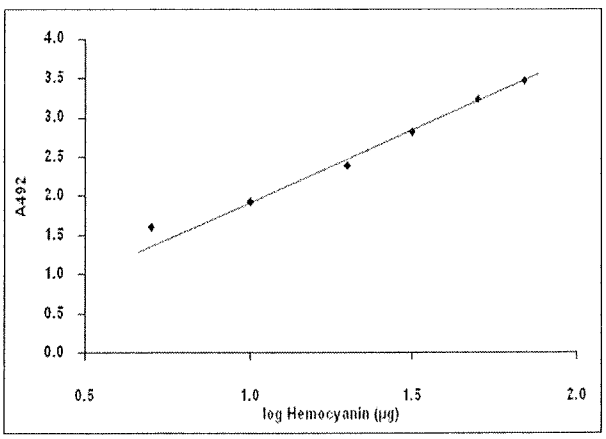

Fig. 6 Standard hemocyanin for ELISA.

5.3 การหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยวิธี ELISA

จากการวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปกติ 6 ตัวอย่าง โดยเจือจางฮีโมลิมฟ์ด้วยอัตราส่วน 1:200 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี ELISA ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พบว่าปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์มีค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าผิดพลาดมาตรฐาน เป็น 111.07 $\pm$ 3.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของฮีโมลิมฟ์ ขณะที่โปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์มีค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าผิดพลาดมาตรฐาน เป็น 129.65 $\pm$ 4.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของฮีโมลิมฟ์ ดังนั้นปริมาณฮีโมไซยานินที่หาด้วยวิธี ELISA ของกุ้งแชบ๊วยจึงคิดเป็น 85.67% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียนเป็นฮีโมไซยานิน อาทิเช่น ในกุ้งขาว (Cariolou and Flytzanis, 1993) และในกุ้ง *P. japonicus* (Chen and Cheng, 1993)

6. การสร้าง Full-length cDNA และศึกษาสมบัติของยีนฮีโมไซยานิน

จากการออกแบบ forward และ reverse primer จากลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นและจากข้อมูล conserved sequence ของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งพีเนียดที่มีใน Genbank ได้ใช้ H280 F1 และ H1180 R1 สำหรับเป็น forward และ reverse primer ในการโคลน cDNA ของยีนฮีโมไซยานินชิ้นที่ 1 (HC1) และใช้ H660 F2 และ H1780 R2 เป็น forward และ reverse primer ในการโคลน cDNA ของยีนฮีโมไซยานินชิ้นที่ 2 (HC2) ซึ่งสามารถโคลนได้ชิ้น HC1 และ HC2 ที่มีขนาด 923 และ 1,118 bp ตามลำดับ จากนั้นได้โคลน cDNA ชิ้นปลาย 5' และ 3' ด้วยวิธี 5' และ 3' RACE แล้วนำไปสร้างยีนฮีโมไซยานินสายเต็ม (รูปที่ 7) พบว่ามีขนาด 2,128 bp ที่ประกอบด้วย 1 signal peptide ที่มีกรดอะมิโน 20 หน่วย มีหนึ่ง 5' untranslated region (UTR, 30 bp) มีหนึ่ง 3' UTR (112 bp) และมี 1 open reading frame (ORF) ยาว 1,983 bp ซึ่ง encode สายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 661 หน่วย

จากการแปลง full-length ORF cDNA ของยีนฮีโมไซยานินไปเป็น deduced amino acid sequence พบว่าฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยมีตำแหน่งจับกับ Cu^{2+} (Cu^{2+} binding site) 2 ตำแหน่ง โดยยึดไว้ด้วยกรดอะมิโน histidine 6 หน่วย อันเป็นคุณลักษณะของฮีโมไซยานิน (รูปที่ 8) และมีมวลโมเลกุล 73,100 ดัลตัน ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับหน่วยย่อยฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่วิเคราะห์โดย SDS-PAGE ยีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยคล้ายกับของกุ้งอื่น ดังเช่น ยีนฮีโมไซยานินสายเต็ม (full-length) ของกุ้งขาวที่โคลนจาก cDNA library ที่เตรียมจากตับ ยาว 2,095 bp มีขนาด 73,500 ดัลตัน (Sellos *et al.*, 1997) มีการโคลนยีนฮีโมไซยานินจากกุ้ง *P. japonicus* ได้ 2 ยีน คือ PjHcL และ PjHcY ประกอบด้วยกรดอะมิโน 678 และ 664 หน่วย มีมวลโมเลกุล 75,000 และ 73,000 ดัลตันตามลำดับ และมีตำแหน่งจับกับ Cu^{2+} (Lei *et al.*, 2007) นอกจากนี้ จากการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยเปรียบเทียบกับของกุ้งชนิดอื่น พบว่ายีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยมีความเหมือน (identity) กับของกุ้งขาวมากที่สุด (90%) เหมือนกับของกุ้ง *P. japonicus* 83% และ 74% และของกุ้ง *F. chinensis* 75% (ตารางที่ 1)

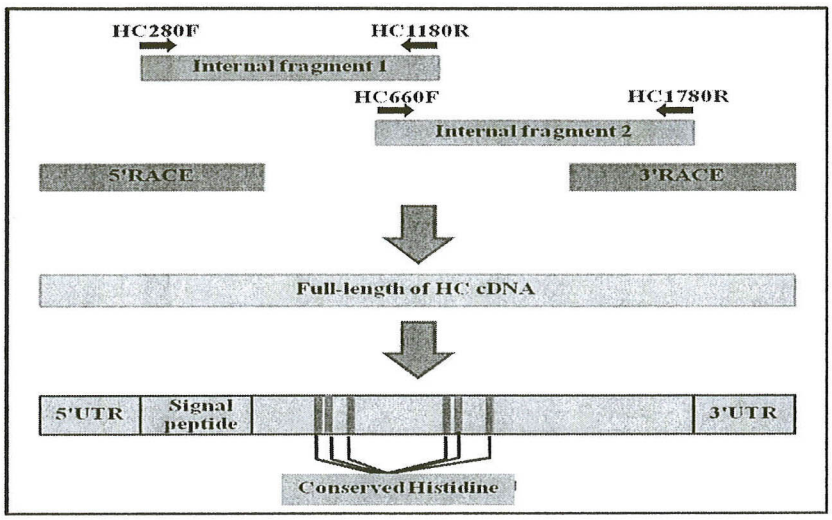

Fig. 7 Cloning strategy and structure of the full-length cDNA of HC gene. Internal cDNAs (HC1 and HC2) were cloned by using hepatopancreas RNA and two pairs of primers, H280 F1 and H1180 R1 for HC1 and H660 F2 and H1780 R2 for HC2. The 5' and 3' RACE approach was used to clone the 5' and 3' ends of the cDNA. The full-length HC sequence was reconstructed from the overlapping of these sequences.

```
  1 MRVLVVLGLI AAAAFQVVSA DVQKQKDVLY LLHRIYGDIQ DADLLATANS
 51 FDPAGGSYSD GGAAVQRLLK GLNDGRLLEQ KHWFSLFNTR HRNEALLLFD
101 VLIHSSDWAT FVGNAAFFRQ KINEGEFVYA LYVAVIHSPL TEDVVLPPLY
151 EITPHLFTNS EVIEAAYRAK QKQTPGKFES TFTGTKKNPE QRVAYFGEDI
201 GLNTHHVTWH MEFPFWWDDE YGHHLDRKGE NFFWVHHQLT VRFDAERLSN
251 YLDPVGELHW YKPIVDGFAP HTTYKYGGQF PARPDNVKFE DVDDVARIRD
301 MVIVESRIRD AIAHGYIIDS HGKQIDISNE KGIDILGDVI ESSLYSPNVQ
351 YYGALHNTAH IVLGRQGDPH GKFDLPPGVL EHFETATRDP SFFRLHKYMD
401 NIFKEHKDSL PPYTKADLEF SGVSISEVNV VGELETYFED FEYNLINAVD
451 DAEGIPDVDI STYVPRLNHK EFTFKIDIEN GGSPRLATVR IFAWPHKDNN
501 GIEFTFDEGR WNAIELDKFW VSLAGGKNSI ERKSTESSVT VPDVPSIDTL
551 FAKTAAGGDG LSEFASATGL PNRFLLPKGN DKGLEFDLVV AVTDGDADAA
601 VPDLHLNTKY NHYGANGVYP DKRPHGYPLD RRVPDERVFE ELPNFKHIQV
651 KVFNHGEHIH S
```

Fig. 8 The deduced amino acid sequence of hemocyanin. The putative signal peptide is bold. Six histidine residues that are involved in two Cu^{2+} binding sites are bold and underlined.

Table 1. The percentage ratios of the overall nucleotide identity among the nucleotide sequences of HC of four shrimp species.

	F. merguiensis	*F. chinensis*	*P. japonicus* L	*P. japonicus* Y	*P. vannamei*
F. merguiensis	100	75	74	83	90
F. chinensis		100	82	75	75
P. japonicus L			100	75	74
P. japonicus Y				100	84
P. vannamei					100

7. การแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี RT-PCR โดยวิเคราะห์ผลผลิต PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์จำเพาะของยีนฮีโมไซยานิน พบว่า cDNA probe มีขนาด 1,118 bp และใช้ β-actin เป็น internal standard พบการแสดงออกของ HC mRNA เฉพาะในตับ ไม่พบการแสดงออกของ HC mRNA ในเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ หัวใจ ลำไส้ กระเพาะ เซลล์ฮีโมไซท์ และ lymphoid ของกุ้งแชบ๊วย (รูปที่ 9) เช่นเดียวกับยีนฮีโมไซยานินของกุ้งนาง (Lee *et al.*, 2004) และของกุ้ง *P. japonicus* (Lei *et al.*, 2007) ที่แสดงออกในตับเช่นกัน บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยถูกสังเคราะห์ในตับ (Spindler *et al.*, 1992)

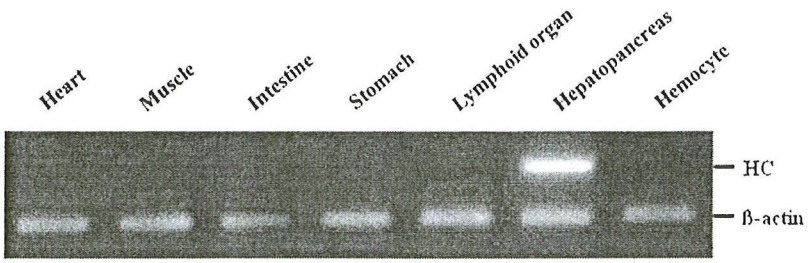

Fig. 9 RT-PCR analysis of the expression of HC mRNA in different tissues. Total RNA was extracted from various tissues. RT-PCR products were amplified by using the primers that were specific to the HC gene and β-actin. The RT-PCR of β-actin transcript was a control to demonstrate that the same amount of RNA template was used in each sample.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

8. **การแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในตับของกุ้งที่บ่มด้วย *V. harveyi***

เพื่อศึกษาการตอบสนองของยีนฮีโมไซยานินที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้ง ทำการบ่มตับของกุ้งแชบ๊วยด้วย *V. harveyi* แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของ HC mRNA ที่เวลาต่าง ๆ ในช่วง 0-4 ชั่วโมง พบว่ายีนฮีโมไซยานินมีการแสดงออกเริ่มเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มนาน 0.5 ชั่วโมง และมีค่าเพิ่มสูงสุดที่ 2.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลงที่ 3 ชั่วโมง ในขณะที่ตับชุดควบคุมที่บ่มกับ K-199 อย่างเดียวมีการแสดงออกคงที่ไม่แตกต่างกันตลอด 4 ชั่วโมง (รูปที่ 9) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อบ่มตับกุ้งกับ *V. harveyi* โดยตรง จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินซึ่งตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค

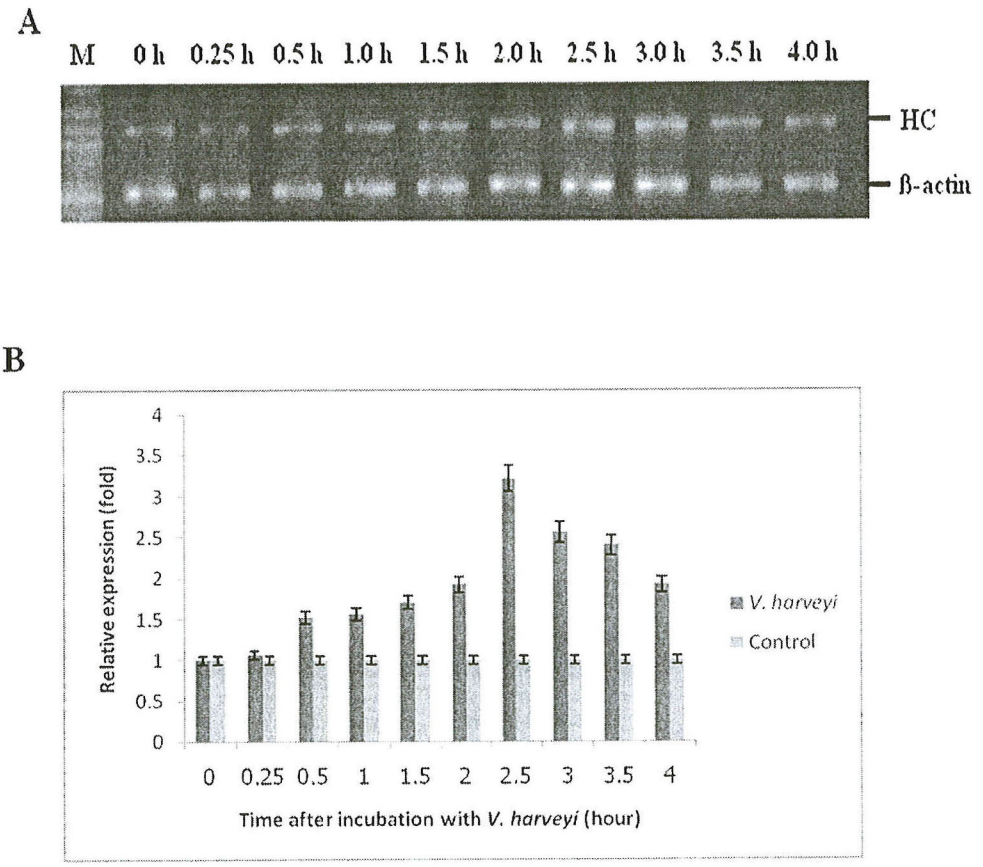

Fig. 10 Expression of HC mRNA in hepatopancreas at different time intervals in response to *V. harveyi* challenge. Time-course expression of HC in the hepatopancreas fragment after incubating with *V. harveyi*, was revealed by electrophoresis (A) and determined by semi-quantitative RT-PCR (B) using β-actin as an internal control.

9. การตอบสนองของฮีโมไซยานินในกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi*

9.1 การแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi*

เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยมีการแสดงออกของ HC mRNA ในตับ จึงได้ติดตามการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในตับของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลาต่าง ๆ ในช่วง 0 - 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time PCR และใช้ยีน 18S rRNA เป็น internal standard เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นที่ชั่วโมง 0 ก่อนฉีด พบว่า HC mRNA ของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือมีการแสดงออกไม่แตกต่างกันตลอดช่วงเวลา 0 - 24 ชั่วโมง หลังการฉีด ในขณะที่กุ้งที่ฉีดด้วยแบคทีเรียก่อโรคมีการแสดงออกของ HC mRNA เพิ่มขึ้นที่ชั่วโมง 6 เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ก่อนฉีด และมีค่าเพิ่มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นมีค่าลดลงที่ 18 และ 24 ชั่วโมงหลังการฉีด จนมีค่าเท่ากับชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 11A)

9.2 ปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi*

โปรตีนฮีโมไซยานินมีรูปแบบที่ตอบสนองต่อการฉีดเชื้อ *V. harveyi* สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับยีนฮีโมไซยานิน กล่าวคือปริมาณโปรตีนฮีโมไซยานินที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 จนเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมง 12 แล้วมีค่าเริ่มลดลงเท่าระดับก่อนฉีด ณ ชั่วโมงที่ 18 หลังการฉีด ในขณะที่ปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งชุดควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันในช่วง 0 - 24 ชั่วโมง (รูปที่ 11B)

เนื่องจากไม่มีรายงานการศึกษาการตอบสนองของฮีโมไซยานินต่อการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งชนิดอื่น ๆ โดยการบ่มตับหรือฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรียก่อโรคในทำนองเดียวกันนี้ แต่จากการศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินในตับกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* พบว่ามีการแสดงออกของยีนเลคตินเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มสูงสุด 3.6 เท่า ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีด โดยเลคตินเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Rattanaporn and Utarabhand, 2011) นอกจากนี้มีรายงานพบเปปไทด์ด้านปลาย C ของฮีโมไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งขาวตอบสนองต่อการฉีดด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งคือแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* หรือรา *Fusarium oxysporum* ณ ชั่วโมงที่ 3 และเพิ่มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 หลังการฉีด (ไม่ได้ทำการทดลอง ณ ชั่วโมงที่ 12) จากนั้นมีค่าลดลงที่ชั่วโมง 24, 48 และ 72 ตามลำดับ (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001) บ่งชี้ว่าเปปไทด์ด้านปลาย C ของฮีโมไซยานินมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อก่อโรคกุ้ง รวมทั้งยังพบฮีโมไซยานินของกุ้งกุลาดำมีฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคกุ้งชนิด white spot syndrome virus (WSSV) (Zhang *et al.*, 2004) จากผลงานวิจัยเหล่านี้บ่งชี้ว่ายีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพื่อสังเคราะห์ฮีโมไซยานินหรือหลั่งโปรตีนนี้จากตับมากขึ้น ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคกุ้ง ฮีโมไซยานินจึงเป็นโปรตีนหนึ่งที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง ซึ่งควรมีการศึกษากลไกโดยละเอียดต่อไป

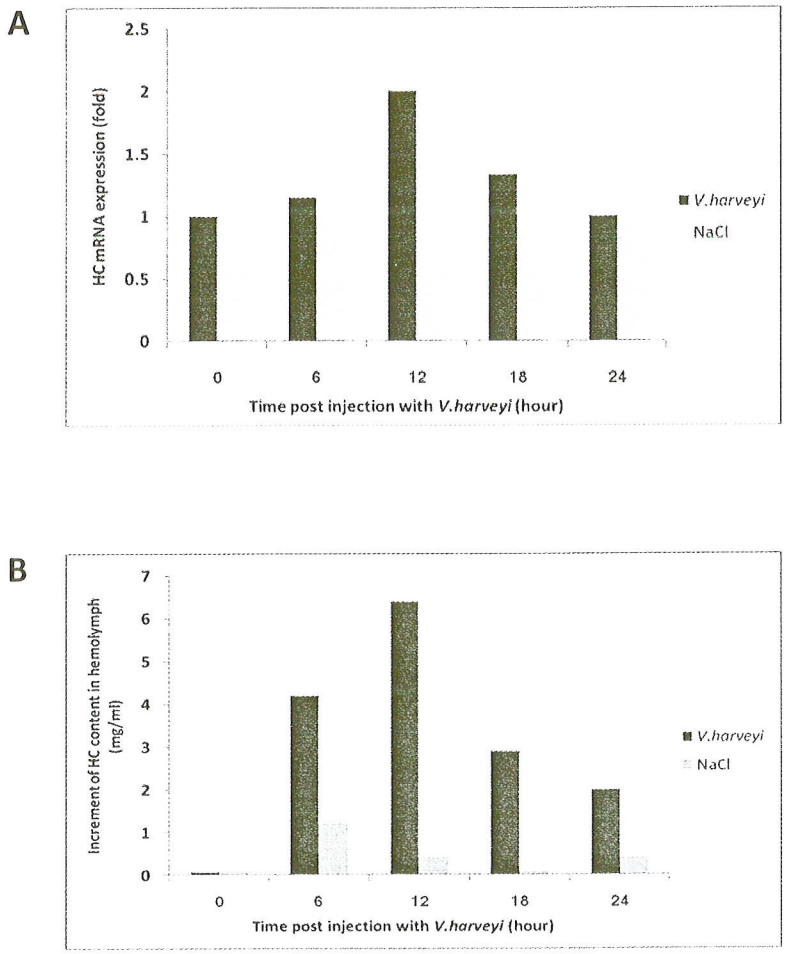

Fig. 11 Expression of HC mRNA in hepatopancreas and HC levels in hemolymph at different time intervals in response to *V. harveyi* challenge. (A) Time-course expression of HC mRNA in the hepatopancreas of shrimp injected by *V. harveyi*, was analyzed by real-time PCR using 18S rRNA as a standard. (B) Hemocyanin level in the hemolymph of the same shrimp was determined by ELISA.