บทคัดย่อ

244985

ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ พบมากในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียน ฮีโมไซยานินถูกพบเป็นสารตั้งต้นของสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราหรือถูกเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเชียน บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้วย ในงานวิจัยนี้ได้ทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธีอัลตราเซนตริฟิวจ์และโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (PAGE) แบบเตรียม ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 1 แถบ ใน PAGE แบบไม่แปลงสภาพ และมีหน่วยย่อย 2 ขนาด (79.4 และ 75 kDa) ใน SDS-PAGE จากการวิเคราะห์โดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชันพบฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 457 kDA แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีความจำเพาะสูงต่อฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์และถูกใช้ในการพัฒนาเทคนิค ELISA จากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA พบฮีโมไซยานินมีปริมาณคิดเป็น 85% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งปกติ

ได้โคลนยีนฮีโมไซยานินจากตับของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี RT-PCR และ 5' และ 3' RACE พบว่า cDNA สายเต็มของยีนฮีโมไซยานินประกอบด้วย 2,128 คู่เบส มี 1 open reading frame ที่ยาว 1,983 คู่เบส ซึ่ง encode สายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 661 หน่วย โครงสร้างปฐมภูมิของยีนฮีโมไซยานินมี signal peptide 1 สายที่มีกรดอะมิโน 20 หน่วย และมี histidine 6 หน่วย ที่ใช้ยึดตำแหน่งจับ Cu^{2+} 2 ตำแหน่ง จากการ BLAST พบ cDNA ของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยเหมือนกับของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* มากที่สุด (90%) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR เชิงปริมาณ พบยีนฮีโมไซยานินมีการแสดงออกเฉพาะในตับ ไม่พบในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เพื่อศึกษาการตอบสนองของยีนฮีโมไซยานินต่อการเหนี่ยว นำด้วยเชื้อก่อโรค ได้บ่มชิ้นตับด้วย *Vibrio harveyi* พบการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 2.5 ชั่วโมง หลังการบ่ม จากการฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* พบการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้น และโปรตีนฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด จากผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้และอาจเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเพื่อตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรค

Abstract

244885

Hemocyanin is a copper binding protein present mainly in hemolymph of crustaceans. It is found to be a precursor of anti-fungal peptides or converted to contain phenoloxidase activity. Physiological role of phenoloxidase is involved in the innate immune system of crustaceans. These suggest that hemocyanin may also play a role in immune response. In this study, hemocyanin (HC) was purified from hemolymph of banana shrimp *Penaeus merguiensis* by ultracentrifugation and preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Purified HC showed a single band in Native PAGE and arranged in a doublet of 79.4 and 75 kDa in SDS-PAGE. It was estimated to have M_r of 457 kDa by gel filtration chromatography. Polyclonal antibody raised against purified HC was highly specific to HC in hemolymph and used to develop enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). By ELISA analysis, HC content was 85% of total hemolymph protein of normal shrimp.

HC gene was cloned from hepatopancreas of *P. merguiensis* by means of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA of HC gene consists of 2,128 bp with one 1,983 bp open reading frame, encoding 661 amino acids. Its deduced amino acid sequence contains a putative signal peptide of 20 amino acids and 6 histidine residues that stabilize 2 Cu^{2+} binding sites. By BLAST analysis, *P. merguiensis* HC cDNA showed closely identity to that of *Penaeus vannamei* (90%). RT-PCR analysis revealed that HC transcript was expressed only in hepatopancreas, but not in other tissues. To study the responses of HC gene in *Vibro harveyi* challenge, the hepatopancreas fragments were incubated with the bacterium. A semi-quantitative RT-PCR demonstrated that the expression of HC increased and reached the maximum at 2.5 h post-incubation. After challenging whole shrimp by injection with *V. harveyi*, the expression of HC gene was up-regulated. Moreover, HC protein content in the hemolymph also increased to the highest at 12 h post-injection. These results indicate that HC is inducible and may be involved in a shrimp immune response to pathogenic bacteria.