

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full length cDNA) ของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน (CrusSp) ศึกษาลักษณะสมบัติของยีน รวมทั้งแยกและวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีน (genomic organization) จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินจากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล (*Scylla paramamosain*) โดยเทคนิค rapid amplification cDNA end (RACE) พบว่าประกอบด้วย ORF ขนาด 336 bp ที่สามารถถอดรหัสให้กรดอะมิโน 111 ตัว โดยมี signal peptide 21 ตัว เมื่อนำมาคำนวณมวลโมเลกุลของโปรตีนพบว่ามีความขนาดประมาณ 10.27 kDa และมีค่า pI 8.54 จากการวิเคราะห์โดเมนของโปรตีน CrusSp พบว่าที่บริเวณปลาย C ประกอบด้วย whey acidic protein (WAP) domain จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า ยีน CrusSp ที่แยกได้มีความคล้ายกับกลุ่มของยีนครัสตินโดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินที่พบในปู *Carcinus maenas* จากการแยกและวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนพบว่ายีน CrusSp มีขนาด 999 bp ซึ่งประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron โดยในบริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron เป็นไปตาม GT/AG rule เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน CrusSp ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูทะเล พบว่ายีน CrusSp มีการแสดงออกอย่างมากในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก ลำไส้ และกล้ามเนื้อ แต่ไม่พบการแสดงออกในตับและก้ามตา เมื่อนำยีน CrusSp มาศึกษาการแสดงออกใน *Escherichia coli* พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ได้ เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพพบว่าโปรตีน CrusSp มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้

In this study, we report the identification and characterization of a crustin (CrusSp) from the hemocyte of mud crab, *Scylla paramamosain* using rapid amplification cDNA end (RACE) approach. Analysis of the nucleotide sequence revealed seven different variances of the CrusSp cDNA in mud crab. The open reading frame encodes a protein of 111 amino acids with 21 residues signal sequence. The predicted molecular mass of the mature protein (90 amino acids) is 10.27 kDa with an estimated pI of 8.54. Analysis of the protein domain features indicated typical conserved cysteine residues containing a single WAP domain at the C-terminus. A neighbour-joining tree showed that *S. paramamosain* crustin is closely related to other crustin homologues, and displays the highest similarity to crustin antimicrobial peptide in shore crab *Carcinus maenas*. Four exons and three introns were identified within the 999 bp genomic DNA sequence of CrusSp. Tissue distribution analysis showed that CrusSp was highly expressed in hemocytes, gills, intestines and muscle but it was not expressed in hepatopancreas and eyestalks. To gain insight into the *in vitro* antimicrobial activities of CrusSp, the mature peptide coding region was cloned into *Escherichia coli* for heterologous expression. The recombinant CrusSp could inhibit the growth of gram-positive bacteria but had no inhibition activity against gram-negative bacteria.