

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5380020

ชื่อโครงการ สมบัติการต้านไวรัสของโปรตีนต้านจุลชีพจากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

ชื่อนักวิจัย ดร.ศิรินิตย์ ธารธาดา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : sirinit.t@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 15 มิถุนายน 2553 – 14 ธันวาคม 2557

โปรตีนต้านจุลชีพทั้งแอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ไอโซฟอร์ม-2 (anti-lipopolysaccharide factor-6, ALFPm6) และ สไทลิซิน (*PmStylicin*) ถูกพบในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพด้วยเทคนิค PCR และพบว่า ALFPm6 นั้นประกอบด้วย 3 exon และ 2 intron ในขณะที่ *PmStylicin* ประกอบด้วย 2 exon และ 1 intron เพื่อที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนต้านจุลชีพทั้งสองชนิดในสภาวะที่กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) จึงได้นำเทคนิค RT-PCR มาติดตามการแสดงออกของยีนในแต่ละช่วงเวลาเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน ALFPm6 จะเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV ซึ่งแตกต่างจากการแสดงออกของยีน *PmStylicin* ที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส WSSV โปรตีนรีคอมบิแนนท์ของสไทลิซิน (*rPmStylicin*) ถูกผลิตโดยอาศัยระบบ *Escherichia coli* จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะด้วยนิกเกิล โปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วจะถูกนำไปทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส พบว่าโปรตีน *rPmStylicin* ที่ความเข้มข้น 143 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการ propagation ไวรัส WSSV ได้ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งของเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้บางส่วน นอกจากนี้โปรตีน *rPmStylicin* ที่ความเข้มข้น 64 ไมโครโมลาร์ ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus haemolyticus* ได้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของ *Bacillus megaterium*

คำหลัก : โปรตีนต้านจุลชีพ; สมบัติการต้านไวรัส; ไวรัสตัวแดงดวงขาว; กุ้งกุลาดำ; *Penaeus monodon*

Abstract

Project Code : MRG5380020

Project Title : Antiviral properties of antimicrobial peptides from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

Investigator : Dr. Sirinit Tharntada Kasetsart University

E-mail Address : sirinit.t@ku.ac.th

Project Period : 15 June 2010 – 14 December 2014

Many antimicrobial peptides (AMPs) including anti-lipopolysaccharide factor-6 (ALFPm6) and *PmStylicin* have been identified in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In this study, the genomic structures of AMP genes were analyzed by using PCR amplification. The results showed that ALFPm6 gene contained three exons interrupted by two introns whereas *PmStylicin* gene consisted of two exons interrupted by one intron. To determine the expression of both AMPs in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection, a time course study of each gene expression in shrimp upon WSSV-challenge was performed by the RT-PCR. The expression of ALFPm6 gene was up-regulated in shrimp after WSSV infection. A different expression was observed for *PmStylicin* gene. The *PmStylicin* transcripts decreased in shrimp after WSSV infection. The expression of the recombinant *PmStylicin* (*rPmStylicin*) protein performed in *Escherichia coli* expression system and subsequently purified by nickel affinity chromatography. The purified *rPmStylicin* protein was characterized the antimicrobial activity against bacteria, fungi and virus. The *rPmStylicin* protein exhibited about 45% inhibition of WSSV propagation at 143 μ M. Also the *rPmStylicin* at 143 μ M showed partial inhibitory effect on the growth of *Fusarium oxysporum*. Moreover the purified protein at 64 μ M exhibited about 40% growth inhibition of *Staphylococcus haemolyticus* and induced bacterial agglutination of *Bacillus megaterium*.

Keywords : antimicrobial peptide, antiviral activity, white spot syndrome virus, black tiger shrimp, *Penaeus monodon*