221347

นวนิตย์ คล่องแคล่ว 2552: การศึกษาคุณลักษณะ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน Anti-lipopolysaccharide Factors ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ, Ph.D. 124 หน้า

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน Anti-lipopolysaccharide factor (ALF) ในกุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACEs) และการสืบค้นในห้องสมุด Complementary DNA (cDNA) ที่ได้จากเม็ดเลือดและ Androgenic gland ของกุ้งก้ามกราม ทำให้สามารถค้นพบ cDNAs ของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามอย่างน้อย 3 Isoforms คือ Mr-ALF1, Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNAs เท่ากับ 794, 959 และ 833 bp และเป็นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open reading frame, ORF) ขนาด 345, 399 และ 366 bp โดยเป็นลำดับของกรดอะมิโน 114, 132 และ 121 Residues ตามลำดับ เมื่อนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNAs ดังกล่าว มาทำนายโครงสร้างของโปรตีนจะพบตำแหน่งของ LPS binding motif ซึ่งมีความสำคัญในการจับกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ที่อยู่ระหว่างกรดอะมิโน Cysteine 2 ตำแหน่งที่จับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide อยู่ภายในโมเลกุล อีกทั้งยังมีบริเวณที่เป็น Consensus pattern [(W/T/R)CP(G/S)W(T/A)] เช่นเดียวกับยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งของ Glycosylation จำนวน 1 ตำแหน่งในลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 อีกด้วย การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF ทั้งสาม Isoforms ของกุ้งก้ามกราม พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF1 จะมีความคล้าย คลึงกับ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ส่วน Mr-ALF2 จะมีความคล้าย คลึงกับ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*) และ Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) มากที่สุด และ Mr-ALF3 จะมีความคล้ายคลึงกับ American lobster (*Homarus americanus*) และ Bristled river shrimp (*M. olfersii*) มากที่สุด นอกจากนี้การศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่ายีน Mr-ALF1 มีการแสดงออกมากที่สุดในเซลล์เม็ดเลือด หัวใจ ทางเดินอาหารส่วนกลางและตับและตับอ่อน ส่วนการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 มีการแสดงออกมากที่สุดในกลุ่มของเม็ดเลือด ก้านตา ทางเดินอาหารส่วนต้น เหงือกและหัวใจ และเมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภาย หลังจากทำการฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และให้กินอาหารผสมสาร β-glucan ในอัตรา 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR พบว่าในวันที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 จะเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ Mr-ALF2 เท่านั้นจะมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 และวันที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนระดับการแสดง ออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ภายหลังจากให้กินอาหารผสมสาร β-glucan นั้นจะไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัย สำคัญ ($P\geq0.05$)

221347

Nawanith Klongkleaw 2009: Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression of Anti-lipopolysaccharide Factor Genes in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoome, Ph.D. 124 pages.

Full length of complementary DNAs (cDNAs) encoded for anti-lipopolysaccharide factor (ALF) genes of giant freshwater prawn were isolated using Rapid Amplification of cDNA Ends (RACEs) technique and surveying in cDNA libraries of haemocytes and androgenic gland. At least 3 diffent isoforms (Mr-ALF1, Mr-ALF2 and Mr-ALF3) of ALF were discovered. cDNAs of these isoforms contained nucleotide sequences of 794, 959 and 833 bp respectively. The open reading frames of these cDNAs were 345, 399 and 366 bp (114, 132 and 121 amino acid residues) respectively. Amino acid sequence analysis indicated that these cDNAs bearing the LPS binding motif which actually use to bind cell wall components of pathogens were identified. This motif was observed to situate between two conserved cysteines at the middle part of the protein molecules. The consensus patten [(W/T/R)CP(G/S)W(T/A)] which similar to those of invertebrates ALFs was also found in Mr-ALF1, Mr-ALF2 and Mr-ALF3. In addition, one glycosilation site was shown in only Mr-ALF2 and Mr-ALF3. Nucleotide and amino acid sequence analysis demonstrated that Mr-ALF1 was closely similar to bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*), corresponding to phylogenetic tree analysis. Mr-ALF2 was more similar to white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) and kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*), while Mr-ALF3 relatively homologued to american lobster (*Homarus americanus*) and bristled river shrimp (*M. olfersii*). Tissues expression analysis of Mr-ALF1 and Mr-ALF2 gene investigated by RT-PCR indicated that Mr-ALF1 gene was highly expressed in haemocytes, heart, mid gut and hepatopancreas. On the contrary, Mr-ALF2 gene was observed to be expressed lightly in heamocytes, eyestalk, fore gut, gills and heart. Transcriptinal responses of giant freshwater prawn Mr-ALF1 and Mr-ALF2 to *Aeromonas hydrophila* and β-glucan were investigated by quantitative real-time PCR. Mr-ALF1 was showed to be significantly up-regulated only in day 1 after injected with *A. hydrophila*. Interestingly, Mr-ALF2 showed the expression levels higher than that of control ($P<0.05$) at day 1, 3 and 7 after injection. Transcriptional levels of Mr-ALF1 and Mr-ALF2 were also determined in prawns that experimentally fed with β-glucan supplemented and normal feed for 14 days. No significant differences of these ALFs between two prawn groups were observed during experimental periods ($P\geq0.05$).