

พัฒนาการเจริญพันธุ์ของกุ้งเพศเมียถูกแสดงออกโดยการเพิ่มขนาดของรังไข่ซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมไวเทลลินที่เป็นโปรตีนหลักของโปรตีนโพลีในไข่กุ้งแช่บ๊วย ในครัสเตเชียน ไวเทลลินอาจถูกสร้างในรังไข่และบางส่วนอาจได้มาจากไวเทลโลจีนิที่สร้างในตับผ่านทางฮีโมลิมพ์ ในงานวิจัยนี้ ได้ทำให้ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์จากฮีโมลิมพ์ของแม่กุ้งแช่บ๊วยด้วยวิธีอัลตราเซนตริฟิวจ์ และตามด้วยการทำโพลีอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE) ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 432 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 จากการทำให้ SDS-PAGE พบว่าไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยหลักขนาด 87 และ 78 kDa และ 2 หน่วยย่อยรอง (200 และ 104 kDa) ไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์ยังเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อไวเทลลินบริสุทธิ์ (Anti-Vt) เมื่อวิเคราะห์โดย Western blot

เพื่อศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของไวเทลโลจีนิจากตับของกุ้งแช่บ๊วย ได้โคลน cDNA ที่ encode ไวเทลโลจีนิ โดยใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นของหน่วยย่อย 78 kDa ของกุ้งแช่บ๊วยและ conserved sequence ของยีนไวเทลลิน/ไวเทลโลจีนิของกุ้งชนิดอื่น full-length Vg cDNA ที่ได้รับการทำให้ RT-PCR ของ RNA ที่สกัดมาจากตับและด้วยวิธี 5'- และ 3'-RACE ประกอบด้วย 7,958 nucleotide มี 1 open reading frame ซึ่ง encode เปปไทด์ยาว 2,587 amino acid ยีนไวเทลโลจีนิยังมีตำแหน่ง R-X-K/R-R 1 ตำแหน่ง และมีหลาย dibasic motif (RTRR) ที่ถูกตัดได้โดยเอนไซม์ endoprotease กลุ่ม subtilisin การตัดสายเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ทำให้ได้สายเปปไทด์ขนาด 87 kDa /78 kDa และ 200 kDa หน่วยย่อยหลักขนาด 87 และ 78 kDa ของไวเทลโลจีนิบริสุทธิ์อาจมาจากการตัดสายเปปไทด์เดียวกันเนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นเหมือนกัน แต่มีขนาดต่างกันอาจเกิดจากการตัดแปลงหลังการสร้างโปรตีน หน่วยย่อย 104 kDa อาจได้มาจากการตัดภายในสายเปปไทด์ 200 kDa เพราะมีลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นเหมือนกัน โครงสร้างปฐมภูมิของยีนไวเทลโลจีนิจากตับมีความเหมือนกับยีนไวเทลลินในรังไข่ของกุ้งแช่บ๊วย 98.7% บ่งชี้ว่าเป็นยีนเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีความเหมือนกับยีนของกุ้ง *Penaeus chinensis* มากที่สุด 94% และคล้ายกับของกุ้งพีเนดชนิดอื่นๆ ในช่วง 91.4 - 64%

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พบการแสดงออกของ Vg mRNA ทั้งในตับและรังไข่ของแม่กุ้งแช่บ๊วย ไม่พบในเนื้อเยื่ออื่นของแม่กุ้งหรือในตับของพ่อกุ้ง ผลวิจัยนี้บ่งชี้ว่ามีการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนิเฉพาะในแม่กุ้งแช่บ๊วย และทั้งตับและรังไข่เป็นแหล่งสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิ/ไวเทลลิน ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของ Vg mRNA ด้วยวิธี real-time PCR พบว่า Vg mRNA มีระดับต่ำในระยะ 1 ก่อนการสะสมไวเทลลิน และมีระดับเพิ่มขึ้นจนสูงสุดในรังไข่ในช่วงเริ่มการสะสมไวเทลลิน (ระยะ 2) หรือสูงสุดในตับในช่วงการสะสมไวเทลลิน (ระยะ 3) ก่อนระดับ Vg mRNA ลดลงเมื่อไข่เจริญพันธุ์ (ระยะ 4) มีการแสดงออกของ Vg mRNA ในรังไข่สูงกว่าในตับมากตลอดช่วงพัฒนาการเจริญพันธุ์ทุกระยะ ซึ่งสอดคล้องกับการพบปริมาณไวเทลลินในรังไข่สูงกว่าปริมาณไวเทลโลจีนิในฮีโมลิมพ์ตลอดช่วงของการพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ บ่งชี้ว่ารังไข่เป็นเนื้อเยื่อหลักในการสร้างไวเทลลินในกุ้งแช่บ๊วย

Ovary maturation in female shrimp is characterized by a rapid increase of gonad size resulted from the accumulation of the major egg yolk protein, vitellin (Vt). In crustacean, vitellin is synthesized in ovary and some may be derived from vitellogenin which is synthesized in hepatopancreas and transported to the ovary via hemolymph. In this study, vitellogenin (Vg) was purified from the hemolymph of mature females of the banana shrimp (*Penaeus merguensis*) using ultracentrifugation and preparative PAGE. Native Vg had an apparent molecular weight of 432 kDa as determined by Superdex 200 column. From SDS-PAGE, purified Vg is composed of two major subunits of 87 and 78 kDa and two faint band (200 and 104 kDa). Anti-Vt polyclonal antibody raised against purified Vt shows cross reactivity with purified Vg in Western blotting.

In order to determine the primary structure of *P. merguensis* Vg, a cDNA encoding Vg was cloned based on the N-terminal amino acid sequence of the major 78 kDa subunit of purified Vg and conserved sequences of Vg/Vt from other crustacean species. The complete nucleotide sequence of Vg cDNA was achieved by RT-PCR and 5'-and 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches. The full-length Vg cDNA consisted of 7,958 nucleotides. The open reading frame of this cDNA encoding a precursor peptide was comprised of 2,587 amino acid residues, with a putative processing site (R-X-K/R-R) and multiple dibasic motif (RTRR), recognized by subtilisin-like endoproteases. Enzymatic cleavages of Vg produced 2 subunits of 87 kDa/78k Da and 200 kDa. Two subunits (87 and 78 kDa) of purified Vg may be derived from the same peptides since their N-terminal amino acid sequences were identical but their different sizes may be due to post translational modification. In similar, internal cleavage of 200 kDa may result in 104 kDa subunit since their N-terminal amino acid sequences were identical. The deduced primary structure of Vg from the hepatopancreas was 98.7% identical to Vt from the ovary of *P. merguensis*, indicating that they may be the same genes. Moreover, *P. merguensis* Vg sequence was highest identical (94%) to the Vg of *Penaeus chinensis* and was also related to the Vg sequences of 6 other penaeids with identities that ranged from 91.4 to 64%.

Results from RT-PCR analysis showed that Vg mRNA expression was present in both the ovary and hepatopancreas of vitellogenic females but was not detected in other tissues of females or in the hepatopancreas of mature males. These results indicate that the Vg gene may

be expressed only by mature *P. merguensis* females and that both the ovary and hepatopancreas are sites for Vg synthesis in this species of shrimp. The different expression patterns of Vg mRNA were determined by real-time PCR. Vg mRNA levels were maintained at low levels during the previtellogenic stage (stage 1) and they increased as vitellogenesis progressed to reach a peak at the early vitellogenic stage (stage 2) in the ovary or at the vitellogenic stage (stage 3) in the hepatopancreas, and thereafter, levels decreased. Expression of Vg mRNA was much higher in the ovary compared to the hepatopancreas at all stages of ovarian development. This is consistent with the presence of much higher Vt contents in the ovary than Vg levels in the hemolymph during ovarian development, implying that the ovary is mainly responsible for Vt synthesis in *P. merguensis*.