บทคัดย่อ

ตอนที่ 1: การ Cloning การแสดงออก การศึกษาคุณสมบัติของ pro-apoptotic gene, caspase-3 ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ที่มาของงานวิจัยและวัตถุประสงค์ อะพอพโทซิส (apoptosis) พบในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และพบมากขึ้นตามเวลาที่มีการติดเชื้อ ยังไม่มีการพิสูจน์ว่าอะพอพโทซิสเป็นสาเหตุการตายของกุ้งที่ติดไวรัสหรือไม่ และ caspase-3 ยีนที่แสดงออกเมื่อเกิดขบวนการ apoptosis ก็ยังไม่มีการศึกษามาก่อน การศึกษานี้มุ่งที่จะคัดแยก โคลน และศึกษาคุณสมบัติของ caspase และศึกษาการแสดงออกของ caspase ในกุ้งที่ทำให้ติดเชื้อไวรัส WSSV โดยศึกษาตามเวลา

วิธีการวิจัย ทำการคัดหายีน caspase จากยีนห้องสมุดเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ชิ้นส่วน DNA ของ caspase ของกุ้ง *P.merguiensis* เป็น probe ทำการ clone และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน caspase ทำการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนใน E. coli และนำโปรตีนที่ได้มาสกัดบริสุทธิ์นำไปทดสอบคุณสมบัติการทำงานของ caspase-3 ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน caspase-3 ในกระต่าย นอกจากนี้ยังศึกษาการแสดงออกของ caspase-3 ที่ระดับ mRNA โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR และระดับโปรตีนโดยวิธี Western blot ในกุ้งกุลาดำที่ทำให้ติดเชื้อ ทำการเก็บตัวอย่างเหงือกของกุ้งที่เวลา 24 ชั่วโมง 36 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ โดยเทียบผลการทดลองกับกุ้งกลุ่มควบคุม คือไม่ได้ฉีดเชื้อ WSSV หาตำแหน่งของการแสดงออกของ caspase-3 ในเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งกุลาดำโดยวิธี immunohistochemistry

ผลการทดลอง นิวคลีโอไทด์ของยีน caspase ของกุ้งกุลาดำ ประกอบด้วย 1202 คู่เบส โดยมี 954 คู่เบสที่เป็น open reading frame ที่ให้ 317 อะมิโนเอสิค โปรตีนที่ได้มีตำแหน่ง QAC RG เป็ปไทด์ 5 ตัว ที่เป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีน caspase ลำดับอะมิโนเอสิคของ caspase ของกุ้งกุลาดำ มีความเหมือนกับ caspase ของกุ้ง *P. merguiensis* อยู่ 83% และเหมือนกับ ICE ของ drosophila melanogaster 30% โปรตีนที่ได้เมื่อทดสอบคุณสมบัติพบว่ามีคุณสมบัติเป็น caspase-3 การศึกษาโดยวิธี Western blot แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีมีปฏิกิริยากับ caspase ที่สกัดบริสุทธิ์ และส่วนของ lysate ของ E.coli ที่มี plasmid ที่ถูกกระตุ้นให้แสดงออก และโปรตีนสกัดจากเนื้อเยื่อกุ้งที่ขนาด 36 kDa และ 26 kDa ซึ่งเท่ากับขนาดของ procaspase และ proteolytic intermediate ของ caspase การแสดงออกของระดับ mRNA ของ caspase ในกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มากขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ และเวลากุ้งใกล้ตาย (moribund) ซึ่งสอดคล้องกับระดับของโปรตีนของ caspase ที่เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง การศึกษาโดยวิธี immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีต่อ caspase-3 ในเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV พบผลบวกในซัยโตพลาสซึมของเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสและเซลล์ที่รูปร่างปกติ

สรุป การศึกษานี้พบยีนที่มีลักษณะคล้าย caspase-3 ในกุ้งกุลาดำและยีนนี้มีการแสดงออกมากขึ้น ตามเวลาของการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ไวรัสนี้กระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิสโดยผ่านเส้นทาง caspase-3 และเป็นสาเหตุของการตายของกุ้ง

Abstract

Part I: Cloning, expression and characterization of pro-apoptotic gene, caspase-3 in the white-spot syndrome virus infected black tiger shrimp *Penaeus monodon*

Rationale and objectives: It was reported that apoptosis occurred progressively in the time course study of white spot syndrome virus (WSSV) infected shrimp, *Penaeus monodon (P. monodon)*. Whether apoptosis cause death in the WSSV-infected shrimp has not been elucidated as well as there is little report about apoptotic gene, caspase-3 in shrimp. Therefore, the recent study aimed to isolate, clone and characterize caspase-3, the executioner of apoptosis, in shrimp *P. monodon* and also studied the time course expression of caspase 3 of the shrimp upon WSSV-infection.

Methods: Caspase *(Pm*Casp*)* had been screened from *P. monodon* hemocyte library using *P. merguiensis* caspase as a probe. The caspase containing clones were sequenced and 5' RACE was performed to obtain full-length cDNA of *Pm*Casp. *Pm*Casp was constructed and expressed in *E. coli*, and the recombinant protein was purified and determined the caspase-3 activity. Recombinant protein was used to produce polyclonal antibody against *Pm*Casp in rabbit. To determine the expression of *Pm*Casp in WSSV infected shrimp, the black tiger shrimp, *P. monodon* were divided into two experimental groups, the vehicle control and the WSSV-injected groups. Gills were collected at 24, 36, 48 h post injection (pi). Semiquantitative RT-PCR was performed by using specific primers for caspase3. Rabbit antiserum against *Pm*Casp protein was used in western blot analysis and immunohistochemistry.

Results: Caspase cDNA has been identified from *P. monodon* hemocyte library. The full-length of *Pm*Casp consists of 1,202 bp with a 954-bp open reading frame, encoding 317 amino acids. The deduced protein contains a potential active site QACRG pentapeptide that found in most caspases. The deduced PmCasp protein sequence shows significant (83%) identity with that of P. erguiensis and 30% identity with ICE protein of Drosophila melanogaster, and xhibits caspase-3 activity in vitro. By western blot analysis, the antiserum reacted with purified recombinant *Pm*Casp, lysates of *E. coli* containing the expressed plasmid, and shrimp crude proteins at 36-kDa and 26-kDa bands likely to correspond to the deduced inactive procaspase and proteolytic intermediate form, respectively. The study of expression of *Pm*Casp-3 in WSSV-infected shrimp by semi-quantitative RT-PCR revealed that *Pm*Casp-3 was up-regulated at 48 h p.i. and at moribund. It was supported by western blot analysis, the levels of *Pm*Casp-3 protein were relative increased at 24 h and 48 h p.i. when compared to the normal control. Immunohistochemical analysis in gills from WSSV-infected shrimp demonstrated that the immunoreactivity was localized in the cytoplasm of normal-looking cell as well as apoptotic cells.

Conclusion: The present study demonstrates that caspase-3 like gene is conserved in shrimp *P. monodon* and expressed with the progressively after WSSV infection. WSSV induced apoptosis in *P. monodon* might cause death of the shrimp and mediated via caspase-3 pathway.

บทคัดย่อ

ตอนที่ 2: การศึกษา apoptosis ในปูทะเลที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ที่มาของงานวิจัยและวัตถุประสงค์ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (Whit spot syndrome virus, WSSV) ก่อให้เกิดโรคติดต่อระบาดในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย และอีกหลายประเทศในเอเชีย กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะตายทั้งบ่อภายใน 3-7 วัน มีสัตว์ในกลุ่ม crustacean และ arthropod หลายชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกันในบ่อกุ้ง และบริเวณใกล้บ่อกุ้ง เป็นพาหะและเป็นที่สะสมของไวรัสชนิดนี้ได้ เป็นที่น่าสนใจว่า ปูทะเล (mud crab, *Scylla serrata*) ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้โดยไม่แสดงอาการของโรคและสามารถมีชีวิตอยู่ได้ มีรายงานว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจะเกิดการกระตุ้นการฆ่าตัวตายของเซลล์ (apoptosis) และ apoptosis อาจเป็นสาเหตุการตายของกุ้ง การวิจัยนี้มุ่งศึกษาปูทะเลที่ได้รับเชื้อไวรัสจะเกิดภาวะ apoptosis และการที่ปูทะเลทนต่อการติดเชื้อไวรัสมีความเกี่ยวข้องกับ apoptosis หรือไม่

วิธีการทดลอง ฉีดเชื้อไวรัส WSSV ให้กับปูทะเลแล้วสังเกตอัตราการตายของปูเป็นเวลา 8 วัน เก็บเหงือกของปูมาศึกษาที่เวลา 24 ชั่วโมง 68 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อ นำเหงือกไปผ่านขั้นตอนการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและ RT-PCR ทำการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี H & E เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและศึกษาการเกิด apoptosis โดยวิธี TUNEL การศึกษาการแสดงออกของ caspase 3 gene และ caspase โปรตีนโดยวิธี RT-PCR และ western blot โดยใช้ไพร์เมอร์ และแอนติบอดีที่ได้จากกุ้งกุลาดำ

ผลการทดลอง จากการศึกษาอัตราการตายของปูทะเลหลังรับเชื้อ WSSV พบการตายของปูเพียง 10% ในช่วงเวลาทำการทดลอง 8 วัน ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเซลล์ที่มีการติดเชื้อ จากการศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อเหงือกปูที่ฉีดเชื้อไวรัส WSSV พบลักษณะของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ คือมีนิวเคลียสที่ขยายขนาดใหญ่ขึ้นและมีอินคลูชั่นอยู่ภายในพบจำนวนมากขึ้นตามเวลา ไม่พบลักษณะของเซลล์ที่มีนิวเคลียสขดตัวแน่นหรือเซลล์ที่มีการแตกของนิวเคลียสซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis แต่เมื่อศึกษาด้วยวิธี TUNEL พบเซลล์ที่ให้ผลบวกในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส คือเซลล์ที่มีลักษณะนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น การศึกษาด้วยวิธี RT-PCR และ western blot ที่ใช้ไพร์เมอร์ และแอนติบอดีที่ได้จากกุ้งกุลาดำ ไม่พบแถบของ DNA หรือโปรตีนที่ตำแหน่งใดกับ RNA หรือโปรตีนที่สกัดจากปู แต่เมื่อใช้แอนติบอดีต่อ cleaved caspase-3 ที่ได้จากมนุษย์ สามารถทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนที่มีขนาดที่คาดว่าเป็น cleaved caspase

สรุป ปูที่ติดเชื้อ WSSV กระตุ้นให้เกิดภาวะ apoptosis ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส แต่ไม่เกิดการขดตัวแน่นของนิวเคลียส หรือการแตกของนิวเคลียสเป็นไปได้ว่า apoptosis อาจมีผลต่อการที่ปูทนต่อการติดเชื้อไวรัส WSSV

Abstract

Part II: The study of apoptosis in white-spot syndrome virus infected mud crab *Scylla serrata*

Rationale and objectives: White spot syndrome virus (WSSV) is the cause of a widespread epizootic in cultured shrimp in Thailand and many other countries in Asia. A number of crustacean and other arthropod species have been proposed as reservoirs for the virus including the mud crab, *Scylla serrata*. The mud crab infected with WSSV showed tolerance to the virus and show no mortality. It has been reported that apoptosis occurs in WSSV-infected shrimp and may cause death of the shrimp. This study was carried out to determine whether apoptosis occur in the mud crab *Scylla serrata* experimentally infected with WSSV and study the if it related to the tolerance of the crab upon virus infection.

Methods: WSSV were experimentally injected to mud crab, *Scylla serrata* and the animals were observed for the mortality rate. Gills of the WSSV-infected crab were collected at 24, 65 and 96 h post injection (pi) and processed for histological study and RT-PCR. Histopathology of the crab after WSSV injection was investigated by light microscopy with H&E staining and apoptosis was determined by the DeadEnd colorimetric TUNEL system. The transcript level of caspase in the crab was performed by RT-PCR using the *Pm*Casp primers and the expression of protein level of caspase was investigated using anti *Pm*Casp antibody and anti-human cleaved caspase-3 as primary antibody.

Results: By histological study, gills of WSSV-infected crab showed the sign of WSSV infection and progressively increase in infection was observed at 65h and 96 h pi. However, WSSV infection in the crab did not lead to mortality even though the sign of heavy infection found. WSSV-infected mud crab showed cumulative mortality only 10% at 8 pi which was not significantly from that of uninfected control. The condensed and fragmented nuclei, the apoptotic morphology, were not observed in gills of WSSV-infected crab. However, by the specific methods to detect apoptosis TUNEL assay, the TUNEL positive cells were observed in WSSV-infected cells or in normal looking cells. The specific primers of *Pm*Casp did not give expected band with crab RNA extract by RT-PCR and anti *Pm*Casp antibody did not react with any band in western blot analysis. However a positive band at expected size of cleaved caspase-3 was detected when anti-human cleaved caspase-3 was used to immunoblot with the crab protein extract.

Conclusion: Based on the results of this study, the mud crab, *Scylla serra*ta as the WSSV reservoirs are able to carry the infection and WSSV induce apoptosis but not show morphological sign of apoptosis, condensed and fragmented nuclei. The tolerance of this crab to the virus infection may be correlated with apoptosis.