

**Project Code :** TRG5480004

**Project Title :** Characterization of membrane proteome in various hemocytic cell types of *Penaeus monodon* during Yellow Head Virus infection

**Investigator :** Dr. Phattara-orn Havanapan

**E-mail Address :** phattaraorn.hav@mahidol.ac.th

**Project Period :** June 2011 - June 2013

The molecular events mediating for viral infection and host defense mechanism in crustacean remain unclear, especially in virus – hemocyte interaction and their immune responses. We have speculated that distinct types of immune cells play different roles in response to virus entry and different cell mediators. Chemically biotinylation was performed for hyaline (agranular) and granule-containing hemocytes using Biotin-NSH-LC. Biotinylated protein was extracted and resolved by two-dimensional gel electrophoresis. Electro-transferred proteins on a nitrocellulose membrane were probed with streptavidin-HRP complex to detect biotinylated proteins whereas the purified biotinylated proteins were resolved on SDS-PAGE. Relative quantification analysis and tandem mass spectrometry were utilized to identify protein. The 6 and 8 proteins have been identified according to the differential protein expression found only in hyaline and granule-containing hemocytes, respectively, whereas 5 proteins were commonly found in both groups resulting from purification approach. Based on the classification of subcellular localization, these identified proteins were not restricted to the cell surface proteins. Currently, most of them can be revealed as membrane-associated proteins. It might be possible that some of these proteins could be located more than one subcellular localization for specific function. This present work provides the first data on the proteome of hemocyte subtypes by cell surface biotinylation technique. The possible functions of these membrane-associated proteins of hemocyte have been discussed. It was necessary to investigate the interaction of these proteins with shrimp virus to provide novel insight on the roles for these proteins in mediating internalization in hemocyte subtypes.

**Keywords:** *P. monodon*, Biotinylation, Hyaline, Granule-containing hemocytes

รหัสโครงการ: TRG5480004

ชื่อโครงการ: การศึกษา membrane proteome ของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำชนิดต่างๆในภาวะติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง

ชื่อนักวิจัย: ดร. ภัทรอร หาวนพันธ์

E-mail Address : phattaraorn.hav@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: มิถุนายน 2554 – มิถุนายน 2556

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาโปรตีนบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดกึ่งกลาดำชนิดที่ไม่มีแกรนูล (Hyaline hemocytes) และ ชนิดที่มีแกรนูล (semigranular และ granular hemocytes) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เฉพาะเซลล์เม็ดเลือดกึ่งชนิดที่มีแกรนูลเท่านั้น ที่สามารถจับกับอนุภาคของไวรัสหัดเหลืองได้ จึงเป็นไปได้ว่าที่บริเวณผิวเซลล์ของเม็ดเลือดกึ่งชนิดที่มีและไม่มีแกรนูล น่าจะมีการแสดงออกรวมทั้งการตอบสนองของโปรตีน โดยเฉพาะที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการติดฉลากโปรตีนที่ผิวเซลล์ทั้งสองชนิดด้วยอนุพันธ์ไบโอติน (Biotin-NHS-LC) ซึ่งวิธีการติดฉลากด้วยอนุพันธ์ไบโอตินนี้ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่อการคัดเลือกเฉพาะโปรตีนส่วนที่อยู่บนผิวเซลล์เท่านั้น โปรตีนที่มีการติดฉลากเรียบร้อยแล้วจะนำมาผ่านกระบวนการแยกโปรตีนแบบสองมิติ และสามารถตรวจพบโปรตีนที่มีการติดฉลากได้ด้วย streptavidin-HRP complex นอกจากนั้นโปรตีนที่มีการติดฉลากส่วนหนึ่งจะถูกทำให้บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์บนแผ่นพอลิอะคริลไมด์ หลังจากนั้นทำการระบุชนิดของโปรตีนที่มีการติดฉลากด้วยแมสสเปกโตรเมตรี ผลวิจัยเบื้องต้นพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนจำนวน 6 และ 8 ชนิดที่พบในเม็ดเลือดกึ่งชนิดที่ไม่มีแกรนูลและมีแกรนูลเท่านั้น ตามลำดับ และโปรตีนจำนวน 5 ชนิดซึ่งสามารถพบได้ทั้งเม็ดเลือดกึ่งทั้งชนิดที่ไม่มีและมีแกรนูล ซึ่งพบว่าโปรตีนทั้งหมดที่สามารถระบุชนิดได้นี้ มีไซโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับบริเวณที่ผิวเซลล์ จึงเป็นไปได้ว่าโปรตีนเหล่านี้น่าจะมีตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์ได้มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง เพื่อการทำหน้าที่เฉพาะอย่างที่แตกต่างกันออกไป โดยผู้วิจัยหวังว่าข้อมูลต่างๆจากแต่ละส่วนของการวิจัยในครั้งนี้จะนำไปสู่ความรู้ ความเข้าใจในระดับโมเลกุลต่อการติดเชื้อไวรัส และแนวทางในการป้องกันต่อไป

คำหลัก : กึ่งกลาดำ, เซลล์เม็ดเลือดกึ่ง, แกรนูล, อนุพันธ์ไบโอติน