จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การแยกและการศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพจากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

พฤศจิกายน 2552

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2550 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากรของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ว่าที่ร้อยตรี ดร. ปิติ อ่ำพายัพ นักวิจัยของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การแยกและการศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพจากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain*

ชื่อผู้วิจัย จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ พฤศจิกายน 2552

บทคัดย่อ

เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของมีชีวิตหลายชนิดโดยมีคุณสมบัติที่สามารถต่อต้านการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อจุลชีพได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full length cDNA) ของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน (CrusSp) ศึกษาลักษณะสมบัติของยีน รวมทั้งแยกและวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีน (genomicorganization) จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินจากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล (Scylla paramamosain) โดยเทคนิค expressed sequence tag (EST) และrapid amplification cDNA end (RACE) พบว่าประกอบด้วย ORF ขนาด 336 bp ที่สามารถถอดรหัสให้กรดอะมิโน 111 ตัว โดยมี signal peptide 21 ตัว เมื่อนำมาคำนวณมวลโมเลกุลของโปรตีนพบว่ามีขนาดประมาณ 10.27 kDa และมีค่า pI 8.54 จากการวิเคราะห์โดเมนของโปรตีน CrusSp พบว่าที่บริเวณปลาย C ประกอบด้วย whey acidic protein (WAP) domain จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่ายีน CrusSp ที่แยกได้มีความคล้ายกับกลุ่มของยีนครัสตินโดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินที่พบในปูCarcinus maenas จากการแยกและวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนพบว่ายีน CrusSp มีขนาด 999 bpซึ่งประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron โดยในบริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron เป็นไปตาม GT/AG rule เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน CrusSp ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูทะเล พบว่ายีน CrusSp มีการแสดงออกอย่างมากในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก ลำไส้ และกล้ามเนื้อ แต่ไม่พบการแสดงออกในตับและก้านตา เมื่อนำยีน CrusSp มาศึกษาการแสดงออกใน Escherichia coli พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ได้ เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพพบว่าโปรตีน CrusSp มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้

Project Title	Isolation and characterization of an antimicrobial peptide in hemocytes of the mud crab, *Scylla paramamosain*
Name of the Investigators	Chanprapa Imjongjirak
Year	November 2009

Abstracts

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the host innate immune response against microbial invasion. In the present study, we report the identification and characterization of a crustin (Crus*Sp*) from the hemocyte of mud crab, *Scylla paramamosain* using rapid amplification cDNA end (RACE) approach. Analysis of the nucleotide sequence revealed seven different variances of the Crus*Sp* cDNA in mud crab. The open reading frameencodes a protein of 111 amino acids with 21 residues signal sequence. The predicted molecular mass of the mature protein (90 amino acids) is 10.27 kDa with an estimated p*I* of 8.54. Analysis of the protein domain features indicated typical conserved cysteine residues containing a single WAP domain at the C-terminus. A neighbour-joining tree showed that *S. paramamosain* crustin is closely related to other crustin homologues, and displays the highest similarity to crustin antimicrobial peptide in shore crab *Carcinus maenas*. Four exons and three introns were identified within the 999 bp genomic DNA sequence of Crus*Sp*. Tissue distribution analysis showed that Crus*Sp* was highly expressed in hemocytes, gills, intestines and muscle but it was not expressed in hepatopancreas and eyestalks. To gain insight into the *in vitro* antimicrobial activities of Crus*Sp*, the mature peptide coding region was cloned into *Escherichia coli* for heterologous expression. The recombinant Crus*Sp* could inhibit the growth of gram-positive bacteria but had no inhibition activity against gram-negative bacteria. These results indicated the involvement of Crus*Sp* in the innate immunity of *S. paramamosain*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทที่	
1. บทนำ	1
2. การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3. วิธีการวิจัย	6
4. ผลการวิจัย	10
5. การอภิปรายผล	18
6. ข้อสรุป	20
7. ข้อเสนอแนะ	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	ลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ (full-length cDNA) และลำดับกรดอะมิโนของยีนครัสติน (Crus*Sp*)ใน hemocyte ของปูทะเล	9
2.	Multiple alignments ของครัสติน 7 ไอโซฟอร์ม (Crus*Sp*1a, Crus*Sp*1b, Crus*Sp*1c, Crus*Sp*2a, Crus*Sp*2b, Crus*Sp*2c and Crus*Sp*3) จากปูทะเล *S. paramamosain* และครัสตินจากปู *Carcinus maenas* (AJ237947) และ crustin-like peptide จากกุ้งกุลาดำ (EF654658)	10
3.	Phylogenetic tree ของยีน Crus*Sp* ของปูทะเล กับครัสตินจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ	12
4.	การจัดเรียงตัวของยีนครัสติน (genomic organization)	13
5.	การแสดงออกของยีน Crus*Sp* ของปูทะเลในเนื้อเยื่อ	14
6.	รีคอมบิแนนท์โปรตีนครัสตินที่แยกบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column chromatography และน้ำหนักโมเลกุลรีคอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MASS Spectrometry	15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ปูทะเล (*Scylla paramamosain*) เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่ง การที่ปูทะเลมีชื่อสามัญว่า mud crab เนื่องจากมีถิ่นที่อยู่อาศัยในป่าชายเลน มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตั้งแต่ทางตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแถบอินโดแปซิฟิก สำหรับในประเทศไทยพบการแพร่กระจายของปูทะเลอยู่บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกและภาคใต้ โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นพื้นที่ป่าชายเลน และปากแม่น้ำ

ปัญหาเรื่องโรคจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัสยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงปูทะเล การแก้ไขปัญหาโรคระบาดในสัตว์ทะเลในปัจจุบันมักจะใช้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ แต่จากการตรวจพบยาปฏิชีวนะบางชนิดตกค้างในสัตว์ทะเลที่ถูกส่งออกไปยังสหภาพยุโรปทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลในประเทศไทยได้รับความเสียหายเป็นอย่างมาก ดังนั้นการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเลจึงมีความสำคัญเพื่อที่จะช่วยให้สามารถเข้าใจหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อและนำไปสู่การหาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ อันจะส่งผลช่วยลดปัญหาโรคระบาดในปูทะเล ลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และช่วยให้อาชีพการเพาะเลี้ยงปูทะเลมีความมั่นคงและยั่งยืน

ระบบภูมิคุ้มกันในปูเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะซึ่งมีมาแต่กำเนิดหรือที่เรียกว่า innate immunity ซึ่งเหมือนกับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) และครัสเตเชียนอื่น ๆ คือไม่มีการสร้างแอนติบอดี หรือไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ดังนั้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอม เช่น lipopolysaccharides หรือ β-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อรา ระบบภูมิคุ้มกันซึ่งโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของเลือดจะถูกกระตุ้นให้มีการป้องกันตัวโดยกระบวนการต่าง ๆ เช่น การกลืนทำลาย การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม การแข็งตัวของเลือด รวมถึงการหลั่งสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพจากเม็ดเลือด เช่น antimicrobial peptides เพื่อเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอม

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) เป็นกลุ่มของเปปไทด์ขนาดเล็ก มีขนาดประมาณ 10 kDa สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทั้งในแบคทีเรีย โปรโตซัว พืช สัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเป็น defense molecules ที่กำลังได้รับความสนใจ และมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์จำพวกครัสเตเชียนเป็นอย่าง

ยิ่ง เนื่องจากถูกสังเคราะห์ได้รวดเร็วภายในเม็ดเลือด และปล่อยออกมาเพื่อต่อต้านการบุกรุกของจุลชีพ

จากการสร้างห้องสมุด EST จากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเลและจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากห้องสมุด EST ที่ได้ ผู้วิจัยพบยีนที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันและเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษายีนเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินโดยมีวัตถุประสงค์ที่จะแยกยีนที่สมบูรณ์ (full-length gene) ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน แยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติต่อการต้านจุลชีพของเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน โดยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้สามารถเข้าใจหน้าที่ของยีนนี้ต่อกลไกการสร้างภูมิต้านทานโรคของปูทะเลได้มากยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก โดยทั่วไปมีประจุบวก (cationic antimicrobial peptides) สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัสได้ (Power และคณะ 2003) เปปไทด์ต้านจุลชีพสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทั้งในแบคทีเรีย โปรโตซัว พืช และสัตว์ทั้งที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง (Bachere และคณะ, 2000) โดยเปปไทด์เหล่านี้จะไปทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคโดยการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเกิดรอยรั่ว ส่งผลให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกในที่สุด (Yount และ Yeaman, 2003) เปปไทด์ต้านจุลชีพมีการศึกษาเป็นครั้งแรกในสัตว์จำพวกแมลงซึ่งพบว่าเปปไทด์เหล่านี้มีประจุบวกและเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างปฐมภูมิ โครงสร้างทุติยภูมิรวมทั้งหน้าที่ที่คล้ายคลึงกันแล้วทำให้สามารถจำแนกเปปไทด์ต้านจุลชีพจากแมลงออกเป็น 4 แฟมิลี่ใหญ่ ๆ ได้แก่ (a) เปปไทด์สายตรงที่เกิดการพันม้วนกันทำให้เกิดเป็นโครงสร้าง Amphipathic-α-helices โดยที่ไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่ภายในโมเลกุล เปปไทด์ชนิดนี้มีหน้าที่หลักคือต่อต้านการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (b) เปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่ภายในพันธะไดซัลไฟด์ประมาณ 1-4 พันธะ โดยมีการจัดเรียงตัวในโครงสร้างที่เป็น Hairpin like-β-sheet และ α-helical-β-sheet ปะปนกันอยู่ เปปไทด์ชนิดนี้มีหน้าที่หลักในการต่อต้านการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและเชื้อราจำพวกเส้นใย (c) เปปไทด์ที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดโพรลีนเป็นจำนวนมากและ (d) เปปไทด์ที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีนเป็นจำนวนมาก (Bulet และคณะ, 1999)

ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพมากกว่า 750 ชนิด ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทั้งจากแมลง พืช สัตว์ และมนุษย์ โดยเริ่มแรกมีการค้นพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพในแมลง *Hyalophora cercropia* (Steiner และคณะ 1981; Bulet และคณะ 1999) ที่เรียกว่า cecropins ซึ่งมีขนาดประมาณ 3-4 kDa มีลักษณะเป็น amphipathic peptide และมีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัว แบคทีเรีย และเชื้อรา นอกจากแมลงแล้วในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังก็เป็นแหล่งสำคัญของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยเช่นกัน โดยใน horseshoe crab หรือแมงดาทะเล มีรายงานการค้นพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิด ได้แก่ tachyplesin, big defensin และ tachycitin (Iwanaga และคณะ 1998) ส่วนในหอย (*Mytilus sp.*) พบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น Mytilins, myticins, mytimicin และ defensin และในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ได้มีการแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิดเช่นกัน ตัวอย่างเช่น Penacidins, Crustins, Anti-lipopolysaccharide

factors (ALFs) และ Single whey acidic domain protein (SWD) (Amparyup และคณะ 2008, Supungul และคณะ, 2004 และ Somboonwiwat และคณะ, 2005) และพบว่า antimicrobial peptides เหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของของแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ส่วนรายงานการศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในปู เช่น proline-rich antimicrobial peptide (Schnapp และคณะ 1996), 11.5 kDa antimicrobial peptide (Relf และคณะ, 1999) จากปู shore crab (*Carcinus maenas*) เปปไทด์ต้านจุลชีพ callinectin จาก*Callinectes sapidus* (Khoo และคณะ, 1999), scygonadin จาก *Scylla serrata* (Wang และคณะ, 2007) และ antilipopolysaccharide factor จากปูทะเล *Scylla paramamosain* (Imjongjirak และคณะ, 2007) เป็นต้น

Cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein (Relf และคณะ, 1999) เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลดาลตัน ซึ่งพบครั้งแรกในปู shore crab (*Carcinus maenas*)จากการศึกษาพบว่าสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้หลายชนิด เช่นสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Aerococcus viridans* และ *Planococcus citreus* และ *Micrococcus luteus* ซึ่งเป็น pathogenic gram-positive bacteria ของกุ้ง lobster และปลา ตามลำดับ ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนี้เพิ่มเติมและเรียกชื่อเปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในปู *Carcinus maenas* นี้ว่าคาร์ซินิน (carcinin) (Brockton และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตามต่อมาได้มีการพบเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนี้ในครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ อีก เช่น ปู *Callinectes sapidus* และในกุ้งหลายชนิด ได้แก่ *P. monodon*, *Litopenaeus vannamei*, และ *Litopenaeus setiferus* และกุ้งมังกร European lobster, *Homarus gammarus* โดยพบว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพนี้มีบริเวณของกรดอะมิโนที่ conserve โดยเฉพาะบริเวณ C-terminal ซึ่งมีกรดอะมิโนซิสทีอีน conserve อยู่ 12 ตำแหน่ง และมี Whey Acidic Protein (WAP) domain ซึ่งเป็นลักษณะของเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความสำคัญต่อกลไกในการต้านทานหรือทำลายเชื้อจุลชีพที่พบในเปปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิด แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนี้ที่พบในปูและกุ้งน่าจะเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีหน้าที่สำคัญในการต่อต้านเชื้อในสัตว์จำพวกครัสเตเชียน (crustacean) จากรายงานการศึกษาของ Smith และคณะ 2008 ได้จัดเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนี้เป็น 3 กลุ่ม และเรียกเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนี้ซึ่งพบในสัตว์จำพวกครัสเตเชียนว่าเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน (crustin) โดยในกลุ่มแรกคือ Type I crustin พบได้ในปู (Crab) กุ้งมังกร (Lobster) และ กุ้ง Crayfish โดยในโปรตีนประกอบด้วย cysteine-rich region (4 cysteines) และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย C-terminus ส่วนในกลุ่มที่สองคือ Type II crustin พบได้กุ้ง Shrimp และ กุ้ง Crayfish โดยในโปรตีนประกอบด้วย Glycine-rich region ที่ปลาย N-terminus และ Cysteine-rich region (4 cysteines) และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย C-terminus และ

กลุ่มที่สามคือ Type III crustin พบได้กุ้ง Shrimp โดยในโปรตีนประกอบด้วย Proline-rich region ที่ปลาย N-terminus และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย C-terminus

จากการการค้นหายีนในห้องสมุด cDNA ของปูทะเล *S. paramamosain* (Imjongjirak และคณะ, 2007) พบยีนคาร์ซินินซึ่งมีความคล้ายกับยีนครัสตินในปูและครัสตินในกุ้ง อย่างไรก็ตามจากข้อมูลในปัจจุบันพบว่ายีนคาร์ซินินได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีนครัสตินที่พบในสัตว์จำพวกครัสเตเชียน ดังนั้นเพื่อมิให้สับสนในงานวิจัยนี้จึงเปลี่ยนชื่อยีนจากคาร์ซินินเป็นครัสตินและในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษายีนต้านจุลชีพครัสตินในปูทะเลโดยการโคลน หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ศึกษาลักษณะสมบัติของยีนครัสตินจากปูทะเลในประเทศไทย ศึกษาการผลิตโปรตีนโดยเทคนิครีคอมบิแนนท์โปรตีนและคุณสมบัติการต้านจุลชีพ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full length cDNA) และศึกษาลักษณะสมบัติของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินจากปูทะเล *S. paramamosain*
2. สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ของเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน
3. แยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติต่อการต้านจุลชีพของเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างปูทะเล (*Scylla paramamosain*) และสกัด total RNA และ mRNA จากเม็ดเลือดปูทะเล

เก็บตัวอย่างปูทะเลมาทำการดูดเลือด สกัด total RNA โดยใช้ Trizol Reagent (Gibco-BRL, USA) และกำจัด DNA ที่อาจปนเปื้อนมาโดยการย่อย DNA ด้วย RNase-free DNase I และสกัดแยก mRNA โดยใช้ Quick Prep mRNA purification kit (Amersham Biosciences, USA) วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ mRNA ด้วยเทคนิค spectrophotometry

3.2 การค้นหา full length cDNA ของยีนครัสตินในปูทะเล (*S. paramamosain*)

3.2.1 การสังเคราะห์ first-strand cDNA

นำ mRNA ปริมาณ 2 µg ที่แยกได้จากเม็ดเลือดมาสร้าง first-stand cDNA โดยใช้ SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) ซึ่งประกอบด้วย 2 µg mRNA, oligo(dT) primer และเอนไซม์ reverse transcriptase บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ first-strand cDNA ด้วยเทคนิค spectrophotometry

3.2.2 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน (full-length cDNA) โดยวิธี 5′ RACE-PCR และ3′ RACE-PCR

นำ cDNA ที่ได้มาทำ 5′ RACE-PCR และ 3′ RACE-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีนครัสติน ทำปฏิกริยา PCR ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยมี PCR profiles คือ denaturation 94 °C นาน 45 วินาที annealing 65 °C นาน 45 วินาที extension 72 °C นาน 1.30 นาที จำนวน 5 รอบ และ denaturation 94 °C นาน 45 วินาที annealing 60 °C นาน 45 วินาทีextension 72 °C นาน 1.30 นาที จำนวน 25 รอบ ตามด้วย final extension 72 °C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ วิเคราะห์ PCR product ใน agarose gel electrophoresis ตรวจสอบ DNA โดย UV transilluminator

3.2.3 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดแถบ DNA ของยีนครัสตินที่ได้จากการทำ 5′ และ 3′ RACE-PCR ออกจากอะกาโรสเจล แยกชิ้น DNA จากเจล โดยใช้ Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, USA) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อ

กับพลาสมิด pGEM®-T easy แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยวิธี electroporation หาขนาดของชิ้น DNA insert โดยวิธี colony PCR และการตัดด้วย restriction enzyme วิเคราะห์ขนาดของ DNA insert โดยวิธี agarose gel electrophoresis สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์โคลน แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ automated DNA sequencer

3.2.4 เพิ่มปริมาณของ full length cDNA ของยีนครัสติน

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5′ untranslated region (UTR) และบริเวณ 3′ UTR ของยีนครัสตินและนำมาทำ PCR โดยใช้ first-strand cDNA ที่เตรียมจาก total RNA ของเม็ดเลือดปูทะเลเป็น template วิเคราะห์ PCR product ใน agarose gel electrophoresis แยกชิ้น DNA ของ full length ของยีนครัสตินออกจากอะกาโรสเจล แล้วนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T easy แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน วิเคราะห์ขนาดของ DNA insert โดยวิธี colony PCR และ agarose gel electrophoresis สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.2.5 ศึกษาลักษณะสมบัติของยีนครัสติน

ศึกษาลักษณะสมบัติของยีนครัสตินจากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม GENETYX software (Software Development) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม *BLASTX* และ *BLASTN* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และเปรียบเทียบความเหมือนของ amino acid sequence โดยใช้โปรแกรม Clustal W และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

3.3 การแยกและศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนครัสติน

3.3.1 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเม็ดเลือดโดยใช้วิธี phenol-chloroform-sodium dodecyl sufate (SDS) วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค spectrophotometry และ agarose gel electophoresis

3.3.2 แยกยีนครัสตินโดยใช้เทคนิค PCR

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีนครัสตินเพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนโดยใช้จีโนมิคดีเอ็นเอของปูทะเลเป็น template ทำการวิเคราะห์ PCR product ในอะกาโรสเจล และตัดแถบ DNA ของยีนครัสตินออกจากอะกาโรสเจล แยกชิ้น DNA ออกจาก

เจล จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T easy แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน วิเคราะห์ขนาดของ DNA insert โดยวิธี colony PCR และ agarose gel electrophoresis สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

สกัด total RNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูทะเล สร้าง First-stand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ วิเคราะห์ PCR products ใน 1.4% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับยีน EF1-α

3.5 ศึกษาการแสดงออกของยีนครัสตินใน *E. coli*

3.5.1 การสร้าง recombinant expression vector

สังเคราะห์ full length ของยีนครัสตินด้วย PCR ทำการโคลนชิ้นยีนเข้าสู่ expression vector pET28b ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนใน *E. coli* และนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-BLUE โดยวิธี electroporation คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนโดยวิธี colony PCR และหาขนาดของชิ้น DNA insert โดยการตัดด้วย restriction enzyme วิเคราะห์ขนาดของ DNA insert โดยวิธี agarose gel electrophoresis สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์โคลนและนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ automated DNA sequencer นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้นี้มา transformation เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3)pLysS โดยวิธี electroporation

3.5.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

ทำการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่อุณหภูมิ 37 °C และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1mM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนใน SDS-PAGE ตรวจสอบแถบโปรตีนด้วยการย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue

3.6 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column chromatography และวิเคราะห์โปรตีนใน SDS-PAGE นำโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ไป dialyzed ใน refolding buffer (50mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1mM reduced glutathione, 0.1 mM oxidized glutathione, 10% glycerol and 2M urea; pH 8.0) ที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึง dialyzed ใน sodium phosphate buffer, pH 5.8 จากนั้น

นำโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Mass spectrometry ด้วยเครื่องวิเคราะห์โปรตีน MALDI-TOF MS

3.7 ศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีนครัสติน

นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ หาค่า minimum inhibition concentration (MIC) และค่า minimum bacterial concentration (MBC)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full length cDNA ของยีนครัสติน

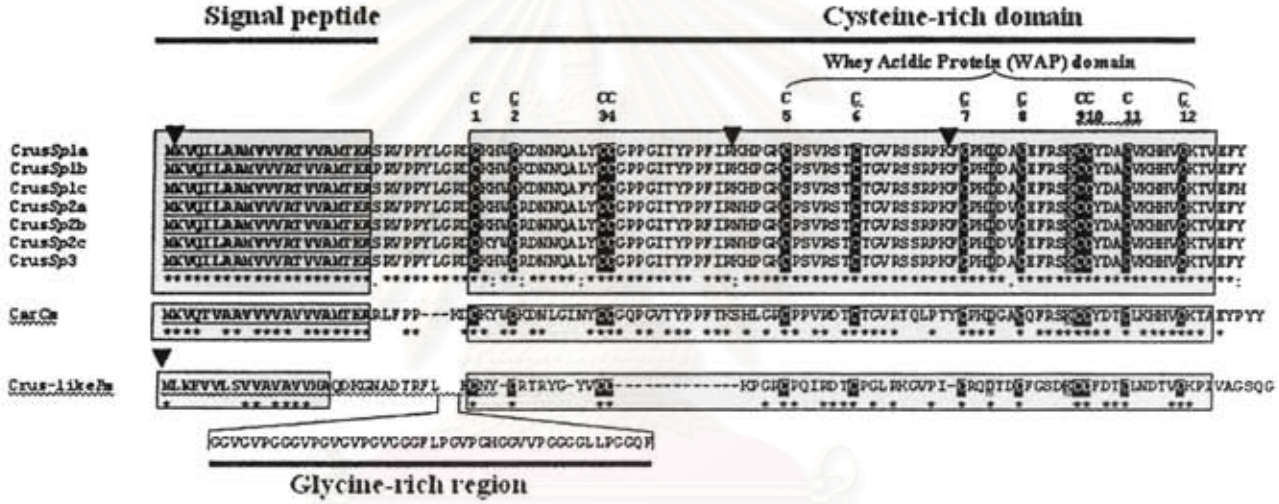
จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนครัสติน (Crus*Sp*)โดยใช้เทคนิค RACE-PCR พบยีนครัสติน 7 ไอโซฟอร์ม โดยยีนครัสตินมีความยาวทั้งหมด 581 bp ประกอบด้วยบริเวณ 5′-terminal untranslated region (UTR) ยาว 71 bp, บริเวณ open reading frame (ORF) ยาว 336 bp สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 111 ตัว และบริเวณ 3′-UTR ยาว 164 bp พบ putative polyadenylation signal sequence (AATAAA) อยู่ 1 ตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์บริเวณ signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) พบว่ามี signal peptide ยาว 21 กรดอะมิโน เมื่อคำนวณ molecular mass ของ mature proteins (90 amino acid) พบว่ามี molecular mass 10.27 kDa และค่า p*I* 8.54 (รูปที่ 1)

```
GAGAGCAGAATTAGACACTGTGGTGAACACACCTGCCTTTACCAACGGCTTCTTCAAGAA      60
CCTATTGAAATATGAAGGTGCAAATTTTAGCAGCCATGGTGGTTGTGGCTACCGTTGTGG     120
          M  K  V  Q  I  L  A  A  M  V  V  V  A  T  V  V

CCATGACGGAAGCATCCCGAGTACCTCCATATCTAGGTCGGGATTGTAAGCACTGGTGCA     180
A  M  T  E  A  S  R  V  P  P  Y  L  G  R  D  C  K  H  W  C

AAGACAACAATCAAGCACTCTACTGCTGCGGCCCTCCAGGAATTACCTATCCACCTTTTA     240
K  D  N  N  Q  A  L  Y  C  C  G  P  P  G  I  T  Y  P  P  F

TTAGAAAGCACCCTGGTAAATGTCCTTCAGTCCGCTCTACATGTACTGGTGTGAGGTCAT     300
I  R  K  H  P  G  K  C  P  S  V  R  S  T  C  T  G  V  R  S

CTAGACCAAAGTTCTGCCCCCACGATGATGCTTGTGAGTTTAGAAGCAAGTGTTGCTATG     360
S  R  P  K  F  C  P  H  D  D  A  C  E  F  R  S  K  C  C  Y

ACGCCTGTGTGAAGCACCACGTATGCAAGACTGTTGAATTCTACTAAACAACAATTACAC     420
D  A  C  V  K  H  H  V  C  K  T  V  E  F  Y  *

CAGACCTGAGCTGAAAATCTTTCACCAGTAAAAAATTTTCAACAAACTGTATTCACTGGA     480

TTTTTTTTAAACACTGAAGTATGGTTATGTTATACTGTATACATTTGTAAGCAACATCAA     540

CTAAACAATAAACACAACTGTATCTCTTGAGAAAAAAAAAA                        581
```

รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ (full-length cDNA) และลำดับกรดอะมิโนของยีนครัสติน (Crus*Sp*)ใน hemocyte ของปูทะเล ตัวอักษรสีดำเข้ม และขีดเส้นใต้แสดง putative signal peptide, start codon, stop codon และ putative poly (A) signal sequence

4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินโดยใช้โปรแกรม SMART analysis (**http://smart.embl-heidelberg.de/**) พบว่าครัสตินมี whey acidic protein (WAP) domain ที่ปลายด้าน *C*-terminus (รูปที่ 2) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของครัสตินโดยใช้โปรแกรม BLASTX พบว่าประกอบด้วย cysteine ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง โดย cysteine 8 ตัวสุดท้ายเป็นบริเวณของ WAP domain ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความคล้ายกับ crustin antimicrobial peptide ที่พบในสิ่งมีชีวิตจำพวก crustacean เช่น ปู และกุ้งหลายชนิด นอกจากนั้นพบว่าปลายด้าน *N*-terminus ของครัสตินไม่มีบริเวณ Glycine-rich region เหมือนที่พบในครัสตินในกุ้งหลายชนิด (รูปที่ 2)

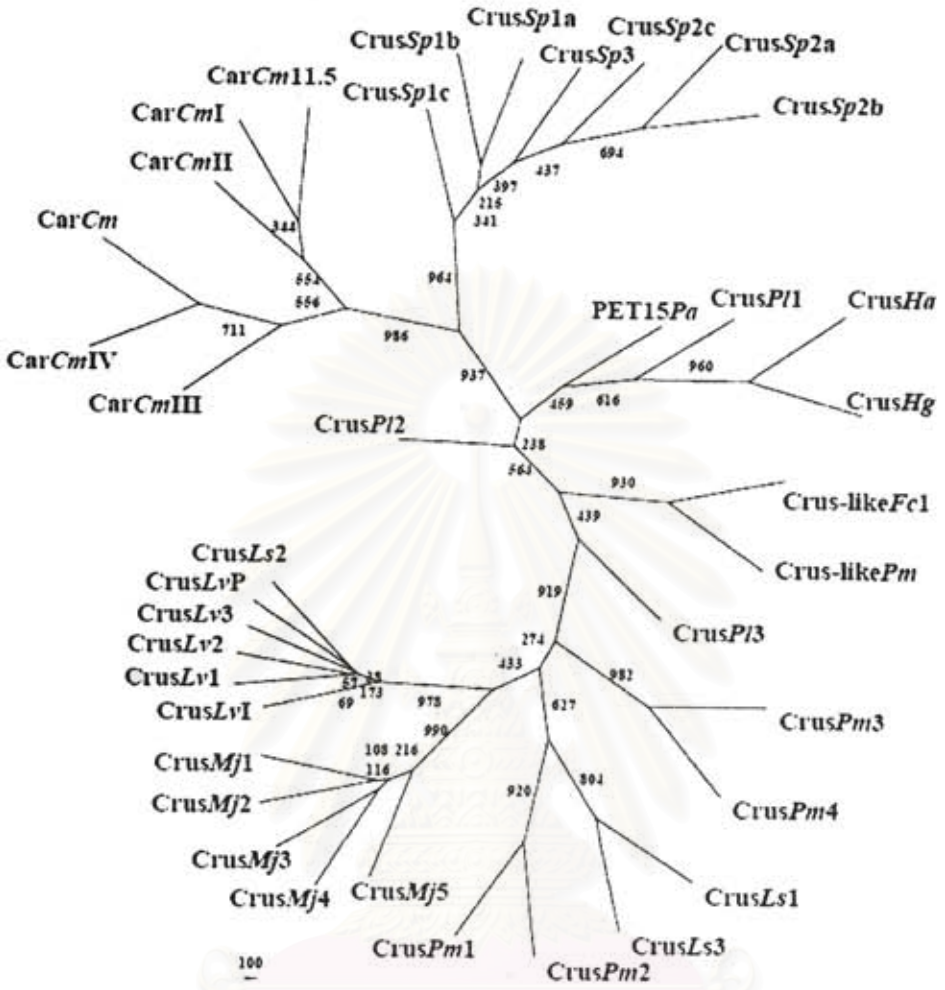


รูปที่ 2 Multiple alignments ของครัสติน 7 ไอโซฟอร์ม (Crus*Sp*1a, Crus*Sp*1b, Crus*Sp*1c, Crus*Sp*2a, Crus*Sp*2b, Crus*Sp*2c and Crus*Sp*3) จากปูทะเล *S. paramamosain* และครัสตินจากปู *Carcinus maenas* (AJ237947) และ crustin-like peptide จากกุ้งกุลาดำ (EF654658) ลูกศรแสดงบริเวณ splicing sites ตัวอักษรสีดำเข้มแสดงลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ และขีดเส้นใต้แสดง putative signal peptide

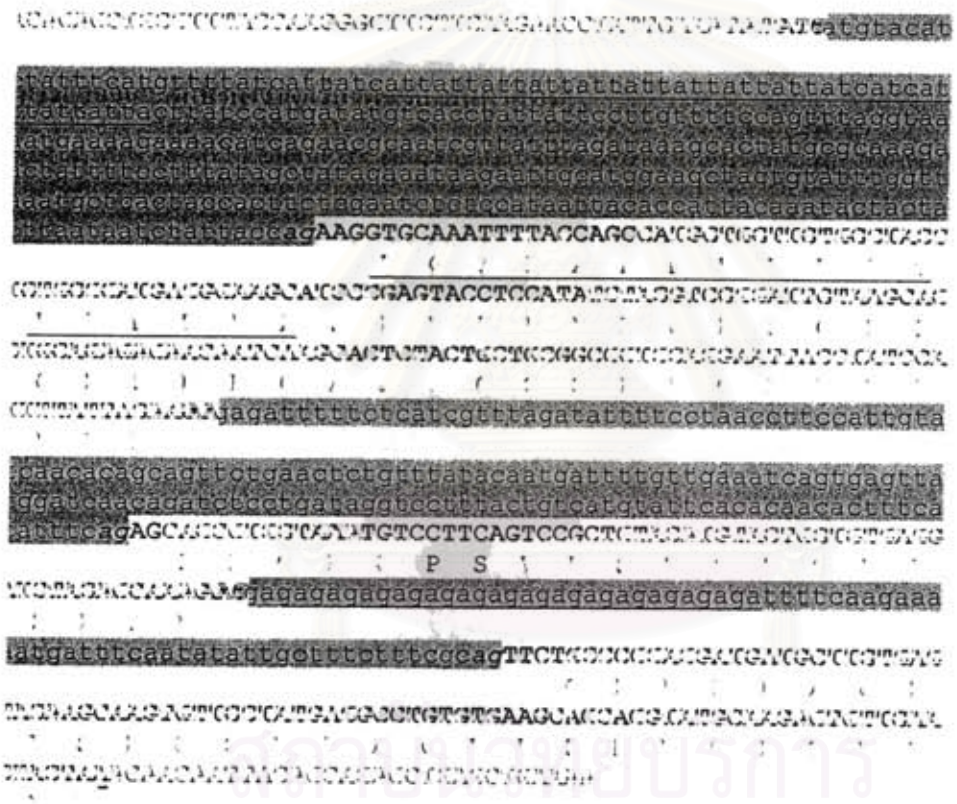
4.3 การเปรียบเทียบความเหมือนและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนครัสตินไปเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่มีรายงานไว้ พบว่ามีความเหมือนกับยีนครัสตินของปู *Carcinus maenas* (CAH25399) (79%), crustin 2 ของ crayfish *Pacifastacus leniusculus* (ABP88043) (48%), crustin-like peptide ของกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* (BAD150623) (48%) และของปู *Portunus pelagicus* (ABM65762) (46%) และจากการสร้าง phylogenetic tree ของยีนครัสตินจากสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานไว้พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของครัสตินที่มีรายงานในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มแรกเป็นครัสตินจากปู กลุ่มที่ 2 เป็นครัสตินจากกุ้ง และกลุ่มที่ 3 เป็นครัสตินจาก crayfish และ lobster จากผลที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่ายีน Crus*Sp* จากปูทะเลมีความใกล้ชิดกับยีนครัสตินที่พบในปู *Carcinus maenas* มากกว่าในกุ้ง crayfish และ lobster

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 Phylogenetic tree ของยีน CrusSp ของปูทะเล กับครัสตินจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ประกอบด้วย *C. maenas* (Car*Cm*; AJ237947: Car*Cm*; AJ427538: Car*Cm*-I; AJ821886; Car*Cm*-II: AJ821887: Car*Cm*-III; AJ821888: Car*Cm*-IV; AJ821889), *H. americanus* (Crus*Ha*; CN853187), *H. gammarus* (Crus*Hg*; CAH10349), *Pacifastacus leniusculus* (Crus*Pl*1; EF523612: Crus*Pl*2; EF523613: Crus*Pl*3; EF523614), *Panulirus argus* (PET15Pa; AAQ15293), *P. monodon* (Crus-like*Pm*; EF654658), *F. chinensis* (CrusLike*Fc*1; DQ097703), *P. monodon* (Crus*Pm*1; CF415873: Crus*Pm*2; BI018072: Crus*Pm*3; BI018073: Crus*Pm*4; CF415873), *M. japonicus* (Crus*Mj*1; AB121740: Crus*Mj*2; AB121741: Crus*Mj*3; AB121742: Crus*Mj*4; AB121743: Crus*Mj*5; AB121744), *L. vannamei* (Crus*Lv*1; AF430071: Crus*Lv*2; AF430072: Crus*Lv*3; AF430073: Crus*Lv*I; AY488492: Crus*Lv*P; AY488494), and *L. setiferus* (Crus*Ls*1; AF430077: Crus*Ls*2; AF430078: Crus*Ls*3; AF430079).

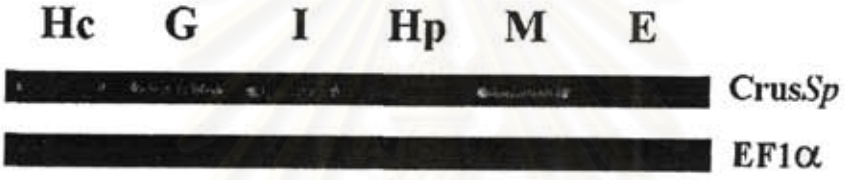


ร.1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ exon (exon organization) ด้วยโปรแกรม FGENESH ที่ใช้ข้อมูลจากพืช ในการวิเคราะห์ exon ของยีนที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence) ที่ตำแหน่งนี้ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ exon ต้นและ exon ปลายมาต่อกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Crus*Sp* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูทะเล ได้แก่ เม็ดเลือด เหงือก ลำไส้ ตับ กล้ามเนื้อและก้านตาโดยใช้เทคนิค RT-PCR และใช้ EF1α เป็น internal control (รูปที่ 5) พบว่ายีน Crus*Sp* มีการแสดงออกอย่างมากในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก ลำไส้ และกล้ามเนื้อ แต่ไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อตับและก้านตา ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ยีน Crus*Sp* ของปูทะเลเป็นยีนที่มีการสร้างจากเม็ดเลือด

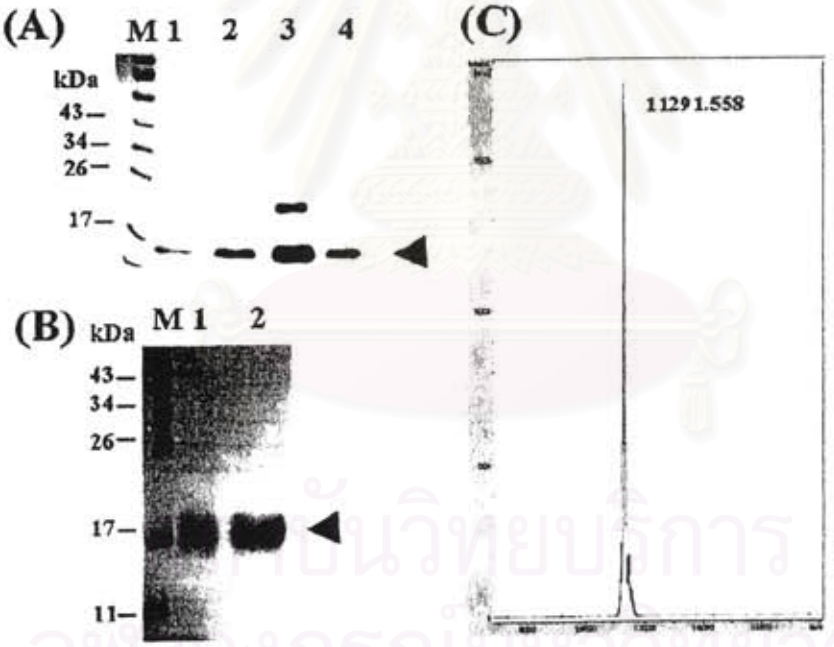


รูปที่ 5 การแสดงออกของยีน Crus*Sp* ของปูทะเลในเนื้อเยื่อ haemocytes (Hc), gill (G), intestine (I), hepatopancreas (Hp), muscle (M) และ eyestalk (E)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนครัสติน

จากการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนพบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนครัสตินได้มากที่สุดที่เวลา 3 ชั่งโมงหลังเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG เมื่อทำการ sonication เพื่อทำให้เซลล์แตก พบรีคอมบิแนนท์โปรตีนอยู่ในรูป inclusion bodies และจากการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column chromatography และทำการ refold โปรตีน แล้ววิเคราะห์แถบโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE พบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 11.4 kDa (รูปที่ 6 A และ B) และเมื่อนำโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้มาวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MASS Spectrometry เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล (MW) ของโปรตีน จากผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 11.291558 kDa (รูปที่ 6C)



รูปที่ 6 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนครัสติน (A) SDS-PAGE รีคอมบิแนนท์โปรตีนครัสตินที่แยกบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column chromatography และชะออกมาใน fraction ที่ 1-4 (Lane 1–4) (B) SDS-PAGE รีคอมบิแนนท์โปรตีนครัสตินที่ได้จากการ refold (Lane 1–2) (C) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย MALDI-TOF MASS Spectrometry

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
การอภิปรายผล

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนครัสติน (Crus*Sp*)โดยใช้เทคนิค RACE-PCR พบยีนครัสติน 7 ไอโซฟอร์ม โดยยีนครัสตินมีความยาวทั้งหมด 581 bp ประกอบด้วย ORF ขนาด 336 bp ที่สามารถถอดรหัสให้กรดอะมิโน 111 ตัว เมื่อนำมาคำนวณมวลโมเลกุลของโปรตีน พบว่ามีขนาดประมาณ 10.27 kDa เมื่อวิเคราะห์โดเมนของยีนพบว่าครัสตินมี WAP domain ที่ปลาย *C*-terminus และจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่ายีน Crus*Sp* ที่แยกได้มีความคล้ายกับยีนครัสตินที่มีรายงานในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเปปไทด์ด้านจุลชีพครัสตินที่พบในปู *Carcinus maenas*

จากรายงานการศึกษาของ Smith และคณะ 2008 ได้จัดยีนครัสตินออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) Type I crustin พบได้ในปู (Crab) กุ้งมังกร (Lobster) และ กุ้ง Crayfish โดยโปรตีนประกอบด้วย cysteine-rich region (4 cysteines) และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย *C*-terminus; (2) Type II crustin พบได้กุ้ง Shrimp และ กุ้ง Crayfish โดยโปรตีนประกอบด้วย Glycine-rich region ที่ปลาย *N*-terminus และ Cysteine-rich region (4 cysteines) และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย *C*-terminus และ (3) Type III crustin (หรือ SWD) พบได้กุ้ง Shrimp โดยโปรตีนประกอบด้วย Proline-rich region ที่ปลาย *N*-terminus และ WAP domain (8 cysteines) ที่ปลาย *C*-terminus ผลจากการศึกษานี้พบว่ายีน Crus*Sp* จัดอยู่ในกลุ่มของ Type I crustin ที่พบในปู กุ้งมังกร และกุ้ง Crayfish

จากการแยกและวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนพบว่ายีน Crus*Sp* มีขนาด 999 bp ซึ่งประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron โดยในบริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron เป็นไปตาม GT/AG rule อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบโครงสร้างการจัดเรียงตัวของยีน Crus*Sp* กับยีนในกลุ่ม Crus-like*Pm* และ SWD ในกุ้งกุลาดำ (Amparyup และคณะ, 2008) ซึ่งพบว่ายีนครัสตินจากกุ้งกุลาดำและปูทะเล มีลักษณะการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างกันซึ่งอาจมีการควบคุมการทำงานที่แตกต่างกัน

การศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ พบว่ายีน Crus*Sp* มีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด ผลจากการทดลองนี้สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน Crustin*Pm*1 ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Supungul และคณะ, 2004) และยีน Crustin-like protein ของ กุ้งจีน *F. chainensis* (Zhang และคณะ, 2007) และยีน SWD ของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Vergas-Albores และคณะ, 2004) ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกในเม็ดเลือด ซึ่งแสดงว่าเม็ดเลือดอาจเป็นแหล่งสร้าง mRNA

ของยีน Crus*Sp* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bachère ในปี 2000 ที่พบว่าในเม็ดเลือดของสิ่งมีชีวิตจำพวกกุ้งและครัสตาเซียนจะเป็นแหล่งสร้างและเก็บโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด

เมื่อทำการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนโดยการสร้างโปรตีนรีคอมบิแนนท์และนำมาทดสอบสมบัติทางชีวภาพในการต้านจุลชีพ (antimicrobial activity) ผลจากการทดลองพบว่าโปรตีน Crus*Sp* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีน Crus*Sp* เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล

ทั้งนี้จากรายงานการศึกษาสมบัติการต้านจุลชีพของโปรตีน Crustin ที่แยกบริสุทธิ์จากปู *Carcinus maenas* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Relf และคณะ, 1999) สอดคล้องกับรายงานการศึกษา Crustin ในกุ้งซึ่งพบว่าโปรตีนรีคอมบิแนนท์ crustin*Pm*1 ของกุ้งกุลาดำมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Supangul และคณะ, 2008) ในขณะที่โปรตีนรีคอมบิแนนท์ Crustin-like *Fc* ของกุ้งจีน *Fenneropenaeus chinensis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Zhang และคณะ, 2007)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
ข้อสรุป

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนครัสตินโดยใช้เทคนิค RACE-PCR พบยีนครัสติน 7 ไอโซฟอร์ม โดยยีนครัสตินมีความยาวทั้งหมด 581 bp ประกอบด้วย ORF ขนาด 336 bp ที่สามารถถอดรหัสให้กรดอะมิโน 111 ตัว เมื่อนำมาคำนวณมวลโมเลกุลของโปรตีนพบว่ามีขนาดประมาณ 10.27 kDa เมื่อวิเคราะห์โดเมนของยีนพบว่าครัสตินมี WAP domain ที่ปลาย *C*-terminus และจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่ายีน Crus*Sp* ที่แยกได้มีความคล้ายกับยีนครัสตินที่มีรายงานในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินที่พบในปู *Carcinus maenas* จากการแยกและวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของยีนพบว่ายีน Crus*Sp* มีขนาด 999 bp ซึ่งประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron โดยในบริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron เป็นไปตาม GT/AG rule เมื่อนำยีนครัสตินมาศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* โดยเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนโดยใช้ IPTG และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ได้ และพบว่ามีการแสดงออกสูงสุดในช่วง 3 ชั่วโมง เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนครัสตินมาแยกบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column chromatography และวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MASS Spectrometry เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 11.291558 kDa และเมื่อนำโปรตีน Crus*Sp* มาตรวจสอบสมบัติการต้านจุลชีพพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก จากผลที่ได้สามารถสรุปได้ว่ายีน Crus*Sp* เป็นยีนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในปูทะเล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7
ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Crus*Sp* ในปูทะเล รวมทั้งคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของเปปไทด์ Crus*Sp* จะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการศึกษาเกี่ยวกับยีนในระบบภูมิคุ้มกันในปูทะเลต่อไปในอนาคต นอกจากนี้เปปไทด์ Crus*Sp* ที่ได้นี้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น พัฒนาเป็นแผ่นฟิล์มที่ใช้ในการห่อหุ้มอาหารเพื่อช่วยยับยั้งการเจริญของจุลชีพต่าง ๆ ได้ เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Amparyup, P., Donpudsa, S., and Tassanakajon, A. (2008). Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 1497-1509.

Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. (2008). Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol.* 45: 1085-1093.

Bachère, E., Destoumieux, D., and Bulet, P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191: 71-88.

Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S., and Warr, G.W. (2002). Crustins,homologues of an 11.5 kDa antimicrobial peptide, from two species of penaeid shrimp , *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 4: 278-293.

Brockton, V., Hammond, J.A., Smith, V.J. (2007). Gene characterisation, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. *Molecular Immunology* 44: 943–949.

Bulet, P., Hetru, C., Dimareq, J., and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides from insects: structure and function. *Dev. Comp Immunol.* 23: 329-344.

Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A. and Sittipraneed, S. (2007). Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: Molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. *Mol. Immunol.* 44: 3195-3203.

Iwanaga, S., Kawabata, S., and Muta, T. (1998). New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J. Biochem.* 123: 1-15.

Khoo, L., Robinette, D.W., and Noga, E.J. (1999) Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Mar. Biotechnol.* 1: 44–51.

Powers, J.P.S. and Hancock, R.E.W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681-1691.

Relf, J.M., Chisholm, J.R.S., Kemp, G.D., and Smith, V.J. (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular hemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* 264: 350-357.

Schnapp, D., Reid, C.J., and Harris, A. (1998). Localization and expression of human-defensin-1 in the pancreas and kidney. *J. Pathol.* 186: 99-103.

Somboonwiwat, K., Marcos, C., Tassanakajon A., Klinbunga, S., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G., and Bachere, E. (2005). Recombinant expression and antimicrobial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 29 : 841-851.

Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., and Boman, H.G. (1981). Sequence and specificty of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.

Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. (2004). Antimicrobial peptides discovered in the Black Tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach *Dis. Aquat. Org.* 61: 123-135.

Supungul, P., Tang, S., Maneeruttanarungroj, C. Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon, A. (2008). Cloning, expression and antimicrobial activity of crustin*Pm*1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 61-70.

Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., Jimenez-Vega, F., and Ávila-Villa, A. (2004) Structural and functional differences *of Litopenaeus vannamei* crustins. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 138: 415–422.

Wang, K.J., Huang, W.S., Yang, M., Chen, H.Y., Bo, J., Li, S.J., and Wang, G.Z. (2007) A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrata*. *Mol. Immunol.* 44: 1961–1968.

Yount, N.Y and Yeaman, M.R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 7363-7368.

Zhang, J., Li, F., Wang, Z., and Xiang, J. (2007) Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J. Biotech.* 127: 605–614.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้

Primer	Sequence (5′– 3′)
5CrusSp-R1	5′–TTAGTAGAATTCAACAGTCTTGCATACG–3′
5CrusSp-R2	5′–TCACACAGGCATCATAGCAACACT–3′
3CrusSp-F1	5′–ATCCCGAGTACCTCCATATCTAGGTC–3′
3CrusSp-F2	5′–GATTGTAAGCACTGGTGCAAAGAC–3′
SoCarN-F	5′–GAGAGCAGAATTAGACACTGT–3′
SoCarN-R	5′–ATATAGTATAACATAACCATACTTC–3′
SoCar-F	5′–GAACACACCTGCCTTTACCAAC–3′
SoCar-R	5′–TTTTCAGCTCAGGTCTGGTGTA–3′
NcoICar-F	5′–CATGCCATGGGCCATCATCATCATCATCATATGTCCCG AGTACCTCCATATCTAGGTC–3′
NotICar-R	5′–ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTAGAATTCAACAGTCTTG CATACG–3′
EF1α-F	5′–GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC–3′
EF1α-R	5′–CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG–3′
pUC1	5′–CCGGCTCGTATGTTGTGTGGA–3′
pUC2	5′–GTGGTGCAAGGCGATTAAGTTGG–3′

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ

1. **Imjongjirak, C.**, Amparyup, P., Tassnakajon, A. and Sittipraneed, S. (2008). Characterization and nucleotide sequencing of crustin antimicrobial peptide in hemocytes of the mud crab (*Scylla paramamosain*). The Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference, January 29 – February 1, Bangkok, Thailand, pp. 187-192.

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Imjongjirak, C.**, Amparyup, P., Tassanakajon, A. and Sittipraneed, S. (2008). Antimicrobial peptide of mud crab *Scylla paramamosain* : Molecular cloning and the antimicrobial activity. World Aquaculture 2008, The Annual International Conference and Exposition of the World Aquaculture Society. May 19 – 23, 2008, Busan, Korea, p. 265.

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. **Imjongjirak, C.**, Amparyup, P., Tassanakajon, A. and Sittipraneed, S. (2009). Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab (*Scylla paramamosain*). *Molecular Biology Reports* 36: 841- 850.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย