การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของแอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟคเตอร์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

นาย เอกรินทร์ อัชชะกุลวิสุทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5532-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION AND PARTIAL PURIFICATION OF ANTI-LIPOPOLYSACCHARIDE FACTOR OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*

Mr. Ekarin Achakunwisut

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5532-5

Thesis Title	Expression and partial purification of anti-lipopolysaccharide factor of black tiger shrimp *Penaeus monodon*
By	Mr. Ekarin achakulwisut
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Rath Pichyangkura, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกรินทร์ อัชชะกุลวิสุทธิ์ : การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของแอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟคเตอร์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Expression and partial purification of anti-lipopolysaccharide factor of black tiger shrimp *Penaeus monodon*) อ. ที่ปรึกษา : อ. ดร. รัฐ พิชญางกูร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. อัญชลี ทัศนาขจร, 104 หน้า. ISBN 974-17-5532-5

แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟคเตอร์ (Anti-LPS factor) เป็นโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเชียน ในแมงดาทะเลพบว่าโปรตีนชนิดนี้มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจำพวกแกรมลบ และสามารถจับกับเอนโดทอกซินหรือไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) แล้วขจัดพิษของเอนโดทอกซินได้ จากการแยกและวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบยีน anti-LPS factor จากห้องสมุด cDNA ที่เตรียมจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง โดยพบบริเวณ open reading frame ที่มีขนาด 372 bp ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 123 ตัว มีมวลโมเลกุลเป็นขนาด 13.7 กิโลดาลตัน ในการศึกษานี้เราได้ทำการโคลนยีนที่ให้โปรตีนอนุพันธ์ที่ขาดช่วงปลายอะมิโน (NH_2-terminal truncated derivative) และทำการแสดงออกในระบบการแสดงออกของแบคคูโลไวรัสและยีสต์ โดยระบบแบคคูโลไวรัสไม่พบการแสดงออกของโปรตีน อย่างไรก็ดีในระบบการแสดงออกของยีสต์ *Pichia pastoris* เราพบการแสดงออก โดยโปรตีนที่ผลิตได้จะถูกส่งออกสู่นอกเซลล์ เมื่อทดสอบสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* พบ 4 โคลนที่มีเปอร์เซนต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่มีการแสดงออกที่สูงที่สุดคือ โคลนหมายเลข 12 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ถึง 52.7 เปอร์เซนต์ ดังนั้น จึงนำโคลนหมายเลข 12 มาผลิตโปรตีนให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านแอฟฟินิตี้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งสามารถทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 65.5 เท่า มีแอคติวิตีคงเหลือ 40.9 เปอร์เซนต์และสามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกได้ 99.4 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นต่อไปทำการผ่านคอลัมน์โคมาโทกราฟีแบบคัดกรอง สามารถทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 12.5 เท่า และมีแอคติวิตีคงเหลือ 2.0 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่บริสุทธิ์บางส่วนมาทดสอบสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ 4 ชนิด พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน 10 ไมโครกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi, Escherichia coli, Strephylococcus aureus and Micrococcus luteus* ได้ 87.7, 81.7, 14.3 และ 39.8 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

ภาควิชา.....-..... ลายมือชื่อ นิสิต.....เอกรินทร์ อัชชะกุลวิสุทธิ์.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372504223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : *Penaeus monodon* / BLACK TIGER SHRIMP / ANTI-LPS FACTOR
EKARIN ACHAKUNWISUT : EXPRESSION AND PARTIAL PURIFICATION OF ANTI-LIPOPOLYSACCHARIDE FACTOR OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*. THESIS ADVISOR : RATH PICHYANGKURA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D., 104 pp. ISBN 974-17-5532-5

Anti-lipopolysaccharide factor (Anti-LPS factor) is one of the major protein in the crustacean immune system. In horseshoecrab, this protein has an antibacterial effect on the growth of some Gram-negative bacteria. It can bind and neutralize bacterial endotoxin, lipopolysaccharide (LPS). In the black tiger shrimp *(Penaeus monodon),* a cDNA encoding anti-LPS factor has been isolated from the hemocytes cDNA library. It contains an open reading frame of 372 bp coding for 123 aa residues with a predicted molecular weight of 13.7 kDa. In this study, NH_2- terminal truncated derivative of anti-LPS factor, were cloned and expressed in baculovirus and yeast *Pichia pastoris* expression system. The bacovirus expression system did not yield any recombinant protein however, in *Pichia pastoris* expression system, expression of recombinant protein was observed. Four clones were found to have high expression of recombinant protein, which have inhibitory effect against *Escherichia coli* over 30%. The highest expression level was found in clone number 12, with 52.7 % inhibition from crude culture medium. Clone number 12 was used for production of the recombinant protein in large quantity for further purification. The purification was performed by affinity column chromatography, which purified the protein by 65.45 folds, with 40.9 % recovery, 99.4 % of others protein was removed in this step. Further purification was perform by gel filtration column chromatography which purified the protein further 12.5 folds, with a 2.0 %recovery. The partial purified recombinant protein was tested for antibacterial activity against 4 strains of bacteria. The addition of 10 μg of partially purified anti-LPS protein can inhibit *Vibrio harveyi, Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Micrococcus luteus* at 87.7, 81.7, 14.3 and 39.8 % respectively.

Department .....-..... Student's signature Ekarin Achakunwisut

Field of study....Biotechnology..... Advisor's signature .....

Academic year...2003..... Co- advisor's signature .....

Acknowledgement

I would like to express my deepest gratitude to my advisor Dr. Rath Pichyangkura, and my co-advisor, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon for their guidance, supervision, encouragement and supports throughout my study.

My gratitude is also extended to Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung and Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D for serving as thesis committees, for their available comments and also useful suggestions.

Thanks are also expressed to all my friends of the Biochemistry Department especially in R728, 709, 708, 618 and 604 for their helps in the laboratory and friendships that help me enjoy and happy through out my study.

Special thank to Chanprapa Injongjirak for 6XHis-tag major royal jelly protein.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents and members of my family for their love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

I wish to acknowledge to contributions of Local Graduate Scholarship (LGS), the National center for Genetic Engineering and biotechnology (BIOTEC) for my financial support.

Contents

	Page
Thai Abstract.....	iv
English Abstract.....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	x
List of Abbreviations.....	xii
Chapter I Introduction.....	1
1.1 General introduction.....	1
1.2 Taxonomy of *P. monodon*.....	5
1.3 Morphology.....	5
1.4 Life cycle.....	7
1.5 Shrimp disease.....	9
1.6 Invertebrate defense system	15
1.7 Expression system	24
Chapter II Materials and Methods.....	30
2.1 Equipments	30
2.2 Chemicals and Readgents.....	32
2.3 Enzymes.....	34
2.4 Bacterial strains.....	34
2.5 Expression of 6XHis Tag anti-LPS factor in the baculovirus expression system.....	35
2.6 Expression of 6X His Tag NH_2-terminal truncated an LPS factor in the yeast (*Pichia*) expression system.....	38
2.7 Purification of anti-LPS factor from recombinant yeasts.....	45

Contents (cont.)

	Page
Chapter III Results.....	47
3.1 Expression of 6XHis Tag anti-LPS factor in the baculovirus expression system.....	47
3.2 Expression of 6X His Tag NH_2-terminal truncated anti-LPS factor in the yeast (*Pichia*) expression system.....	52
3.3 Purification of anti-LPS factor from recombinant yeasts.....	62
Chapter IV Discussion	74
4.1 Expression of 6XHis Tag anti-LPS factor in the baculovirus expression system.....	75
4.2 Expression of 6X His Tag anti-LPS factor in the yeast (*Pichia*) expression system.....	77
4.3 Purification of anti-LPS factor from recombinant yeasts.....	78
Chapter V Conclusion.....	81
References	82
Appendeices.....	96
Biography	104

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

		Page
Table 1.1	The world estimates on shrimp aquaculture production	2
Table 1.2	Thai Frozen Shrimp Export in 2001.....	4
Table 3.1	Percent inhibition of expression culture supernatant in 6th days clone 2-5, 7-20, 27 and 28 against *Escherichia coli* strain XL-I blue.....	61
Table 3.2	Percent inhibition of bounded proteins from Hitrap chelating column of clone 12, 14 and 18 against *Escherichia coli* strain XL-I blue.....	68
Table 3.3	Purification of 6XHis Tag NH_2-terminal truncated anti-LPS factor from *Pichia* expression system.....	72
Table 3.4	Percent inhibition of peak 2 proteins from Sephacryl S-100 HR column against 4 types of bacteria.....	73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

		Page
Figure 1.1	shrimp aquaculture production during1992-2001.....	3
Figure 1.2	Major producers of aquaculture shrimp in the world	3
Figure 1.3	Lateral view of *P. monodon* showing important parts	6
Figure 1.4	Life cycle of penaeid shrimp.....	8
Figure 1.5	The blue-green color of light emission form *Vibrio harveyi*.....	14
Figure 1.6	Shrimp with luminous disease.....	14
Figure 1.7	proPO activation model.....	20
Figure 1.8	Haemolymph coagulation cascade in *Tachypleus tridentatus*.....	21
Figure 1.9	Schematic ribbons representation of LALF with the ends of secondary structure elements numbered.....	27
Figure 2.1	Western transfer cassette.....	36
Figure 3.1	Expression of anti-LPS factor in Sf9 insect cells analyzed by SDS-PAGE.	48
Figure 3.2	Western blot analysis of anti-LPS factor expressed in Sf9 insect cells.....	50
Figure 3.3	Dot blot analysis of anti-LPS factor gene in the HΔNAL virus genome.....	51
Figure 3.4	Agarose gel electrophoresis of 6X His-Tag NH2-tenninal truncated anti-LPS factor (HΔNAL) gene amplified by PCR.....	53
Figure 3.5	Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of 6X His-Tag NH_2-terminal truncated anti-LPS factor (HΔNAL) gene amplified by PCR.....	54

List of Figures (cont.)

		Page
Figure 3.6	Agarose gel electrophoresis of recombinant HΔNAL transfer vector digested with restriction enzyme *Eco* RI and *Xba* I.	56
Figure 3.7	Screening of yeast clones for insertion of gene by colonies PCR.....	57
Figure 3.8	Expression of recombinant HΔNAL in *Pichia* supernatant analyzed by Tricine-SDS-PAGE.....	59
Figure 3.9	Purification of recombinant HΔNAL from clone 11 by Hitrap chelating column.....	63
Figure 3.10	Purification of recombinant HΔNAL from clone 12 by Hitrap chelating column.....	64
Figure 3.11	Purification of recombinant HΔNAL from clone 14 by Hitrap chelating column.....	65
Figure 3.12	Purification of recombinant HΔNAL from clone 18 by Hitrap chelating column.....	66
Figure 3.13	Purification of recombinant HΔNAL from clone 12, 14 and 18 supernatant analyzed by Tricine-SDS-PAGE.....	67
Figure 3.14	Purification of recombinant HΔNAL by Sephacryl S-100 HR column.....	70
Figure 3.15	Purification of recombinant HΔNAL from each step of purification analyzed by Tricine-SDS-PAGE.....	71

LIST OF ABBREVIATIONS

ALF	anti-lipopolysaccharide factor
bp	base pair
°C	degree Celcius
Cfu	colony forming units
DEPC	diethylpyrocarbonate
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
EtBr	ethidium bromide
FL	full-length
LPS	lipopolysaccharide
HSP10	heat shock protein 10
HSP 70	heat shock protein 70
HSP 90	heat shock protein 90
kb	kilobase
kDa	kilodalton
M	molar
MCS	multiple cloning sites
ml	millilitre
MT	metric ton
$MgCl_2$	magnesium chloride
mg	milligram
mM	millimolar
ng	nanogram
nm	nanometre
ΔN	NH_2-terminal truncated
O.D.	optical density

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit
proPO	prophenoloxidase
proppA	prophenoloxidase activating enzyme
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPI	serine proteinae inhibitor
μg	microgram
μl	microlitre
μM	micromolar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย