การจำแนกและลักษณะสมบัติของ cDNAs ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน จากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monoodon* โดยเทคนิค Expressed Sequence Tags

นางสาว เปรมฤทัย สุพรรณกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3304-6

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF cDNAs ENCODING IMMUNE-RELATED PROTEINS IN THE HAEMOCYTE OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* BY EXPRESSED SEQUENCE TAGS

Miss Premruethai Supungul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-3304-6

Thesis Title	Identification and characterization of cDNAs encoding immune-related proteins in the haemocyte of black tiger shrimp *Penaeus monodon* by expressed sequence Tags
By	Miss Premruethai Supungul
Field of Study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Rath Pichyangkura, Ph.D., Sirawut Klinbunga, Ph.D.

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

..... Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Vichien Rimphantitchayakit, Ph.D.)

..... Member

(Professor Uthairat Na-nakorn, Ph.D.)

เปรมฤทัย สุพรรณกูล : การจำแนกและลักษณะสมบัติของ cDNAs ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันจากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยเทคนิค Expressed Sequence Tags (IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF cDNAs ENCODING IMMUNE-RELATED PROTEINS IN THE HAEMOCYTE OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* BY EXPRESSED SEQUENCE TAGS.) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อัญชลี ทัศนาขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา, ดร. รัฐ พิชญางกูร 207 หน้า. ISBN 974-17-3304-6

ทำการสร้างห้องสมุด cDNA จาก mRNA ของกุ้งปกติ และกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* เพื่อแยกหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยอาศัยเทคนิค Expressed Sequence Taqs (ESTs) พบโคลนจากห้องสมุด cDNA ของกุ้งปกติ และของกุ้งติดเชื้อจำนวน 1.4×10^6 และ 2.5×10^5 โคลน ตามลำดับ จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการสุ่มเลือกโคลนจำนวน 615 โคลน จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งปกติ และ 447 โคลน จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งติดเชื้อ นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนที่รายงานแล้วใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn และ Blastx (NCBI Advanced Blast Search) พบว่า โคลนจำนวน 308 โคลน (50.1%) จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งปกติ และ 215 โคลน (48.1%) จากห้องสมุดของกุ้งติดเชื้อมีลำดับนิวคลิโอไทด์คล้ายกับยีนที่มีรายงานแล้วใน GenBank โดยเป็นยีนที่แตกต่างกัน 288 ยีน ยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันพบทั้งสิ้น 34 ชนิด ได้แก่ ยีนในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส ยีนในระบบการแข็งตัวของเลือด ยีนของสารต้านจุลชีพ ตัวยับยั้งโปรติเอส และโปรตีนฮีสช็อค เป็นต้น ซึ่งยีนของสารต้านจุลชีพพบมากที่สุด โดยแอนตี้ไลโพพอลิแซคคาไรด์แฟคเตอร์ พบมากเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อ นอกจากนี้ พบยีนที่ครบสมบูรณ์ของโปรตีน 6 ชนิด คือ แอนตีไลโพพอลิแซคคาไรด์แฟคเตอร์ พีเนียดิน ตัวยับยั้งโปรติเอส ครัสติน โปรตีนฮีสช็อค10 และ ไซโทโซลิกซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน 8 ชนิด โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR วัดระดับของ mRNA ในเลือดกุ้งปกติและติดเชื้อแบคทีเรีย ที่เวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังการฉีดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ของยีนแอนตี้ไลโพพอลิแซคคาไรด์แฟคเตอร์ โปรตีนฮีสช็อค 90 และ ไลโซไซม์ และการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ของยีนพีเนียดิน และครัสติน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนของตัวยับยั้งโปรติเอส โปรฟีนอลออกซิเดส และ โปรตีนฮีสช็อค 70

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2545..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4173834323 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : *Penaeus monodon* / black tiger prawn / ESTs / immune-related gene
PREMRUETHAI SUPUNGUL: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF cDNAs ENCODING IMMUNE-RELATED PROTEINS IN THE HAEMOCYTE OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* BY EXPRESSED SEQUENCE TAGS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : SIRAWUT KLINBUNGA, Ph.D. AND RATH PICHYANGKURA, Ph.D. 207 pp. ISBN 974-17-3304-6

Two cDNA libraries were constructed from haemocytes of healthy and *Vibrio harveyi* infected shrimp *Penaeus monodon* to identify genes associated with immunity by the Expressed Sequence Taqs (ESTs) technique. The number of clones were approximately 1.4×10^6 in the normal library and 2.5×10^5 in the infected library. Six hundreds and fifteen clones of the normal library and 447 clones of the infected library were randomly picked and partially sequenced. These sequences were compared with the previous sequence data in the GenBank by using the Blastn and Blastx programs (NCBI Advanced Blast Search). Three hundreds and eight (50.1%) of the EST clones of the normal library and 215 (48.1%) EST clones of the infected library matched significantly with the deposited genes. Five hundreds and thirty-two matched EST clones of both libraries represent 288 different proteins. One hundred and fifteen clones (10.8% of total sequencing clones) representing 34 different genes were putative immune genes. These genes are composed of those coding for enzymes and proteins of clotting system and the prophenoloxidase system, antimicrobial peptides, serine proteinase inhibitors, and heat shock proteins. Of these immune genes, the antimicrobial molecules were the most abundant (44.3% of immune genes). Interestingly, the EST coding for putative anti-lipopolysaccharide factor (ALF), an anti-Gram negative bacterial protein was predominate in the *V. harveyi* infected library. In addition, full-length ESTs encoding 6 different proteins were isolated. These are ALF, penaeidin, serine proteinase inhibitor, crustin, heat shock protein 10 and cytosolic manganese superoxide dismutase.

A semmiquantitarive RT-PCR was used to examine expression level of 8 immune genes in response to bacterial infection. A time course of mRNA expression on total RNA from haemocytes of unchallenged and *Vibrio* challenged shrimps at 3, 6, 12, 24 and 48 hr post injection showed significant increase in the expression level of ALF, heat shock protein 90 and lysozyme ($p<0.05$) but significant decrease of penaeidin and crustin ($p<0.05$). No change in the expression level of serine proteinase inhibitor, prophenoloxidase and heat shock protein 70 was observed.

Department ...Biochemistry..... Student's signature P. Supungul

Field of study....Biochemistry..... Advisor's signature A. Tassanka

Academic year....2002..... Co- advisor's signature

Co- advisor's signature

Acknowledgement

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

My gratitude is also extended to Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Associate Professor Siriporn Sittipraneed and Assistant Professor Chainarong Wongteerasupaya for serving as thesis committee, for their available comments and also useful suggestions.

My appreciation is also expressed to Dr. Stephen Moore and Vicki Whan for their help and suggestion during my stay in Australia.

Thanks are also expressed to all my friends of the Biochemistry Department especially in R707 for their helps in the laboratory and friendships that help me enjoy and happy through out my study. Collaboration and kindness that help me enjoy and happy throughout my study.

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 Graduate Research and Education Consortium (GREC), the National Science and Technology Development Agency, NSTDA for my financial support.

Contents

Contents (cont.)

Contents (cont.)

Contents (cont.)

List of Tables

List of Tables (cont.)

List of Figures

List of Figures (cont.)

List of Figures (cont.)

List of Figures (cont.)

List of Figures (cont.)

LIST OF ABBREVIATIONS

ALF	anti-lipopolysaccharide factor
bp	base pair
°C	degree Celcius
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
EtBr	ethidium bromide
LPS	Lipopolysaccharide
HSP10	heat shock protein 10
HSP 70	heat shock protein 70
HSP 90	heat shock protein 90
M	Molar
ml	Millilitre
MT	metric ton
$MgCl_2$	magnesium chloride
mg	Milligram
mM	Millimolar
ng	Nanogram
O.D.	optical density
PCR	polymerase chain reaction
pfu	Plaque forming unit
proPO	Prophenoloxidase
proppA	prophenoloxidase activating enzyme
RNA	Ribonucleotide

RT	Reverse transcription
SPI	serine proteinae inhibitor
µg	Microgram
µl	Microlitre
µM	Micromolar