

การศึกษาสมบัติของโดเมนจดจำคาร์โบไฮเดรตของเลคตินแบบ C
จากกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*)

Characterization of Carbohydrate Recognition Domain of C-type
Lectin from Banana Shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*)

พันทิพา รุณแสง อรณิชา รัตนภรณ์ และ ประภาพร อุทารพันธุ์*

Phanthipha Runsaeng Onnicha Rattanaporn and Prapaporn Utarabhand*

อาจารย์ประจำหลักสูตรชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90112

Lecturer in Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla, 90112 Thailand

*Corresponding author, E-mail: prapaporn.u@psu.ac.th

บทคัดย่อ

เลคตินแบบ C เป็นโปรตีนจดจำรูปแบบชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เลคตินแบบ C มีโดเมนจดจำคาร์โบไฮเดรต (CRD) อย่างน้อย 1 โดเมน ภายในแต่ละโดเมนมีโมทีฟที่จำเพาะสำหรับการจับกับน้ำตาล ที่อยู่บนผิวของเชื้อก่อโรค ส่งผลให้แต่ละ CRD สามารถจับกับเชื้อก่อโรคได้ต่างกัน การศึกษาก่อนหน้านี้มีการได้โคลนยีนเลคตินแบบ C (LC) จากกุ้งแชบ๊วยที่มี CRD 2 โดเมน (CRD1 และ CRD2) มีโมทีฟ QPD และ EPN ตามลำดับ เพื่อศึกษาความจำเพาะของแต่ละ CRD จึงได้ผลิตโปรตีนลูกผสมของ CRD1 (rLCRD1) และ CRD2 (rLCRD2) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนลูกผสมของเลคติน LC ทั้งโมเลกุล (rLC) rLC มีขนาด 55 kDa ในขณะที่ rLCRD1 และ rLCRD2 มีขนาด 35.8 kDa และ 35.4 kDa ตามลำดับ ยังพบว่าโปรตีนลูกผสมทั้งสามสามารถเหนี่ยวนำให้ *Vibrio harveyi* เกาะกลุ่มได้ โดย rLCRD2 เหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบคทีเรียได้ดีที่สุด นอกจากนี้ผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่า rLCRD1 (มี QPD motif) มีความจำเพาะในการจับกับกาแลคโตส ในขณะที่ rLCRD2 (มี EPN motif) มีความจำเพาะต่อการจับกับแมนโนส ซึ่งการศึกษครั้งนี้บ่งชี้ว่า LC มีบทบาทเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโดยตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค ผ่านการทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มและความจำเพาะต่อน้ำตาลของแต่ละ CRD

คำสำคัญ: โดเมนจดจำคาร์โบไฮเดรต เลคตินแบบ C โปรตีนลูกผสม

Abstract

C-type lectin is one of the pattern-recognition proteins that play an important role in innate immunity of shrimp. C-type lectin comprises at least one carbohydrate recognition domain (CRD) which each CRD contains an amino acid motif for specific sugar-binding to cell surfaces of pathogens, thus each CRD could bind to different

invading pathogens. In previous study, a C-type lectin (LC) with dual CRD domains was cloned from *Fenneropenaeus merguensis*. CRD1 comprised of a QPD motif while CRD2 consisted of an EPN motif. In order to characterize the affinity of CRDs, recombinant proteins of CRD1 (rLCRD1) and CRD2 (rLCRD2) were produced to compare the properties of recombinant protein with whole LC (rLC). The molecular mass of rLC was 55 kDa whereas those of rLCRD1 and rLCRD2 were 35.8 kDa and 35.4 kDa, respectively. All purified recombinant proteins could induce *Vibrio harveyi* agglutination. In addition, rLCRD2 induced the agglutination of *V. harveyi* better than the others. Besides, the inhibitory agglutination assay revealed that rLCRD1 (contained QPD motif) had a binding specificity for galactose while rLCRD2 (contained EPN motif) had a binding specificity for mannose. The results indicated that LC was involved in shrimp innate immune response against pathogens via the bacterial agglutination and sugar binding specificity of CRDs.

Keywords: Carbohydrate recognition domain, C-type lectin, Recombinant prote

1. บทนำ

กุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*) เป็นกุ้งที่ได้รับความนิยมในการบริโภคมาก จึงมีความพยายามเพาะเลี้ยงในรูปแบบพัฒนา แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมที่เลี้ยงยากและอ่อนแอต่อโรค ทำให้จำเป็นต้องมีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งมากขึ้น ซึ่งจะเป็นพื้นฐานในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งในอนาคต

กุ้งเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์มักใช้เซลล์เม็ดเลือดเป็นหลักในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมผ่านวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การเกาะกลุ่ม (agglutination) การกลืนกินเซลล์ด้วยวิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การสร้างนodule (nodule formation) และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) ในขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ อาศัยการทำงานของโปรตีนหลายชนิดประสานกัน เช่น โปรตีนลอลอกซิเนส เอนไซม์ไลโซไซม์ และ เลคติน

เลคตินถือเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญมากในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เนื่องจากเลคตินถูกออกแบบมาเพื่อจดจำรายละเอียดเล็ก ๆ น้อย ๆ ที่บอกถึงความแตกต่างของเชื้อก่อโรคแต่ละชนิด โดยที่โครงสร้างของเชื้อต่าง ๆ จะมีรูปแบบที่เฉพาะตัว เรียกว่า Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) และในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตยังมีโปรตีนที่สามารถจดจำโมเลกุลเหล่านี้ได้เรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs) โดย PRP ทำหน้าที่จดจำและจับจำเพาะกับโมเลกุล PAMP ที่อยู่บนผิวเซลล์เชื้อก่อโรค แล้วกระตุ้นระบบต่าง ๆ ให้มีการทำงานเพื่อกำจัดเชื้อก่อโรค เช่น กระตุ้นระบบโปรตีนลอลอกซิเนส ให้มีการสร้างเมลานิน เป็นต้น

เลคตินแบบ C เป็นเลคตินที่ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในการเกิดปฏิกิริยา มีโดเมนจดจำคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate recognition domain, CRD) อย่างน้อย 1 โดเมน ภายในแต่ละ CRD จะมีโมทีฟ (motif) ที่สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตที่อยู่บนผิวเชื้อก่อโรคได้ จากรายงานของ Wang และ Wang (2013) แสดงให้เห็นว่าเลคตินในกุ้งนั้นมีอยู่หลายชนิด ซึ่งเลคตินแต่ละชนิดจะมี

บทบาทหน้าที่และความจำเพาะแตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามสำหรับเลคตินในกุ้งแชบ๊วยยังมีการศึกษาน้อยมาก โดยก่อนหน้านี้มีการค้นพบเลคตินในฮีโมลิฟของกุ้งแชบ๊วยที่จำเพาะต่อกรดไซอะลิก (sialic acid) ซึ่งเป็นเลคตินที่ต้องการใช้ Ca^{2+} ในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย อีกทั้งเลคตินชนิดนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* เกิดการเกาะกลุ่ม ในขณะที่แบคทีเรียไม่ก่อโรคไม่เกิดการเกาะกลุ่ม (Utarabhand et al., 2007; Rittidach et al., 2007) ต่อมา มีการโคลนยีนเลคตินแบบ C จากกุ้งแชบ๊วย (LC) โดย Rattanaporn, O., & Utarabhand, P. (2011) พบว่ายีน LC เป็นเลคตินที่มี CRD 2 โดเมน โดยมีโมทีฟ QPD และ EPN อยู่ภายใน CRD1 และ CRD2 ตามลำดับ จากการศึกษาละอองในกุ้งหรือครัสเตเชียนอื่น ๆ พบว่า โมทีฟ QPD และ EPN สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลที่พบบนผิวเซลล์เชื้อก่อโรคได้ต่างกัน โดยโมทีฟ QPD จับจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) ในขณะที่โมทีฟ EPN จับจำเพาะกับน้ำตาลแมนโนส (mannose) มีรายงานการศึกษา เลคตินแบบ C ในกุ้ง ทั้งที่มี CRD 1 หรือ 2 โดเมน เช่นในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*), กุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*), กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งครุมมา (*Marsupenaeus japonicus*) (Wang and Wang, 2013) ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของเลคตินต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกันอย่างแพร่หลาย เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการป้องกันและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้ง ในการศึกษาครั้งนี้ทีมผู้วิจัยสนใจศึกษาความจำเพาะของ CRD ทั้ง 2 โดเมนของยีน LC ในการเข้าจับกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์เชื้อก่อโรค เพื่อเปรียบเทียบกับเลคติน LC ทั้งโมเลกุล โดยได้ผลิตโปรตีนลูกผสมของ CRD1 และ CRD2 ของยีน LC แล้วศึกษาคุณสมบัติเปรียบเทียบกับโปรตีนลูกผสม rLC ที่เคยผลิตได้ก่อนหน้านี้

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสมของ CRD1 และ CRD2 ของ LC โดย *Escherichia coli*

2.2 เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อก่อโรคโดยโปรตีนลูกผสม

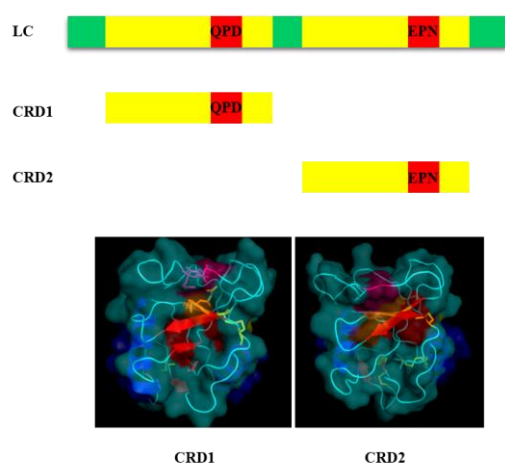
2.3 เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเชื้อก่อโรคโดยน้ำตาล

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การผลิตโปรตีนลูกผสมของ CRD1 และ CRD2 (rLCRD1 และ rLCRD2) โดย *Escherichia coli*

เพิ่มจำนวน DNA เฉพาะบริเวณ CRD1 หรือ CRD2 ของยีน LC (รูปที่ 1) ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XhoI* ด้วยวิธี PCR นำชิ้นยีนที่ได้เชื่อมต่อ (ligate) กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด ตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นยีน CRD1 หรือ CRD2 ด้วยวิธี blue-white screening สกัดพลาสมิด ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันว่าพลาสมิดดังกล่าวมีชิ้นยีน CRD1 หรือ CRD2 จากนั้นย่อยพลาสมิดที่ได้และเวกเตอร์ pET32a(+) ที่ใช้เป็น expression vector ด้วย *EcoRI* และ *XhoI* แล้วเชื่อมต่อชิ้นยีน CRD1 หรือ CRD2 เข้ากับ expression vector ด้วยเอนไซม์ DNA T4 ligase และขนถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 Star (DE3) กระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนด้วย 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ทดสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE (Laemmli, U. K., 1970) จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 10 นาที สกัดโปรตีนออกจากเซลล์ ย่อย DNA และ RNA ที่

ปนเปื้อนมาด้วย DNase I และ RNase A ตามลำดับ นำโปรตีนทั้งส่วนที่ละลายและไม่ละลายน้ำ (soluble and insoluble protein) ไปวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE เพื่อการแสดงผลของโปรตีน ถ้าโปรตีนที่สนใจมีการแสดงออกอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ นำโปรตีนดังกล่าวไป dialyze เพื่อให้โปรตีนกลับอยู่ในสภาวะธรรมชาติ



รูปที่ 1 แผนผังจำลองโครงสร้างและรูปร่าง โปรตีนก่อนกลม (globular protein) ของเลคตินบริเวณ CRD1 และ CRD2

3.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม

นำ crude protein ที่มีโปรตีนลูกผสม rLCRD1 และ rLCRD2 ไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) จะ rLCRD1 และ rLCRD2 ออกจากคอลัมน์ด้วย 250 mM imidazole ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้ด้วย 12% SDS-PAGE วัดปริมาณโปรตีนที่ได้ตามวิธีของ Bradford, M. M. (1976) โดยทำควบคู่ไปกับ BSA (bovine serum albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.3 การคำนวณมวลโมเลกุลของ rLC บริสุทธิ์ โดยใช้ SDS-PAGE

คำนวณมวลโมเลกุลของ rLCRD1 และ rLCRD2 บริสุทธิ์ โดยการเปรียบเทียบกับค่าการ

เคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, Rf) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างใน SDS-PAGE

3.4 การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสม

เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของโปรตีนลูกผสมที่สามารถทำให้ *V. harveyi* เกาะกลุ่มได้ นำ rLC (พันทิพา รุณแสง และคณะ, 2557) rLCRD1 และ rLCRD2 บริสุทธิ์ที่ทราบความเข้มข้น ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เจือจาง 1:2 ตามลำดับ (2-fold serially dilution) ในบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียม (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂) จากนั้นนำสารละลายโปรตีนลูกผสมบ่มกับ *V. harveyi* ความเข้มข้น 2×10^9 CFU/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นาน 1 ชั่วโมง เขย่าเป็นระยะ สังเกตการเกาะกลุ่มแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

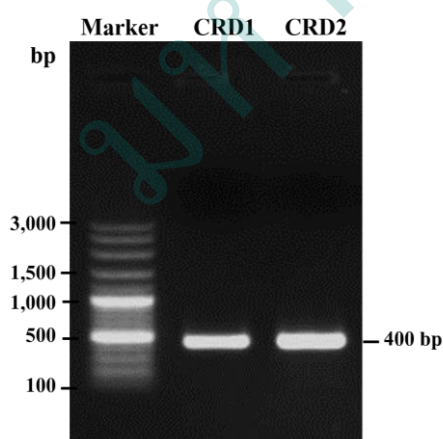
3.5 การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียด้วยน้ำตาล

เพื่อหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียได้ นำสารละลายน้ำตาลแมนโนส กาแลคโตส หรือสารละลายผสมระหว่างแมนโนสและกาแลคโตส ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เจือจาง 1:2 ตามลำดับ ในบัฟเฟอร์ที่มีแคลเซียม จากนั้นนำสารละลายน้ำตาลบ่มกับ rLC rLCRD1 หรือ rLCRD2 บริสุทธิ์ ที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เป็นเวลา 45 นาที จึงเติม *V. harveyi* ความเข้มข้น 2×10^9 CFU/ml ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่อ 1 ชั่วโมง เขย่าเป็นระยะ สังเกตการเกาะกลุ่มแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

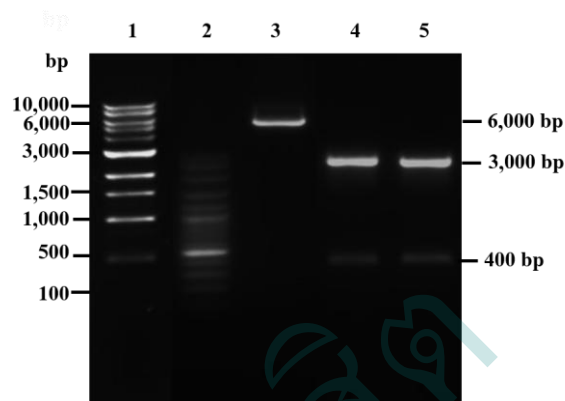
4. ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

4.1 การผลิตโปรตีนลูกผสมของ CRD1 และ CRD2

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นขึ้นบริเวณ CRD1 และ CRD2 ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XhoI* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส (รูปที่ 2) จากนั้นเมื่อนำพลาสมิดที่มีชิ้นขึ้นส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าพลาสมิดดังกล่าวมีชิ้นขึ้น CRD1 หรือ CRD2 แทรกอยู่ขนาด 424 คู่เบส เมื่อนำพลาสมิดดังกล่าวและเวกเตอร์ pET32a(+) ย่อยด้วย *EcoRI* และ *XhoI* พบว่าชิ้นขึ้นที่ถูกย่อยออกจากพลาสมิดมีขนาดประมาณ 3,000 และ 400 คู่เบส (รูปที่ 3) และชิ้น DNA ที่ถูกย่อยออกจากเวกเตอร์ pET32a(+) มีขนาดประมาณ 6,000 และ 50 คู่เบส จากนั้นจึงนำชิ้นขึ้น CRD1 หรือ CRD2 ที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส เชื่อมกับชิ้นของเวกเตอร์ที่มีขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส นำพลาสมิดที่ได้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวสามารถถอดรหัส และแปลรหัสไปเป็น CRD1 หรือ CRD2 ของ LC ได้ จึงขนถ่ายพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 Star (DE3)



รูปที่ 2 แบบแผนดีเอ็นเอใน agarose gel electrophoresis ของ PCR product ของ CRD1 และ CRD2 ของชิ้น LC

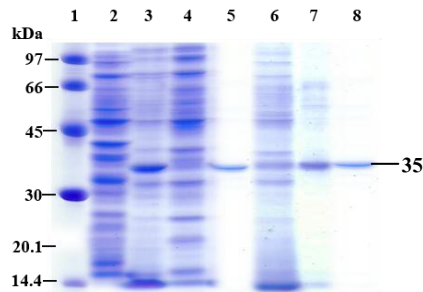


รูปที่ 3 แบบแผนดีเอ็นเอใน agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kbp, แถวที่ 2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 3 เวกเตอร์ pET32a(+) ที่ถูกย่อยด้วย *EcoRI* และ *XhoI*, แถวที่ 4-5 พลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้น CRD1 และ CRD2 และถูกย่อยด้วย *EcoRI* และ *XhoI* ตามลำดับ

เมื่อกระตุ้นเซลล์ *E. coli* ดังกล่าวให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG นาน 4 ชั่วโมง พบว่ามีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 35 kDa มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นปริมาณมากเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการกระตุ้นด้วย IPTG (รูปที่ 4) โดยพบแถบโปรตีน rLCRD1 ในส่วนของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (soluble protein fraction) ในขณะที่โปรตีน rLCRD2 พบอยู่ในส่วนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble protein fraction) จึงนำโปรตีน rLCRD2 ไป dialyze เพื่อให้โปรตีนกลับอยู่ในสภาพธรรมชาติก่อนที่จะนำไปใช้เป็น crude protein ในการทำบริสุทธิ์ต่อไป

4.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสม

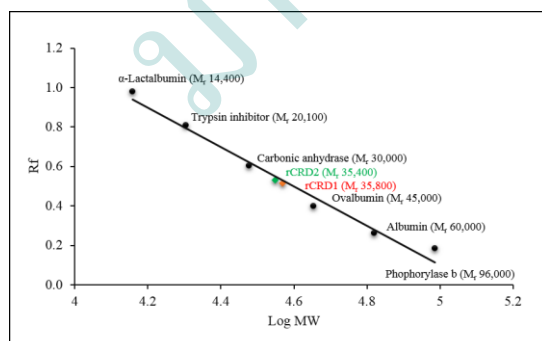
เมื่อนำ crude protein ไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ โดยวิธีการผลิตโปรตีนลูกผสมดังกล่าวสามารถผลิตโปรตีนบริสุทธิ์ได้ในปริมาณมากเพียงพอสำหรับการนำไปศึกษาคุณสมบัติและใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต



รูปที่ 4 แบบแผนโปรตีนใน SDS-PAGE ของ rLCRD1 และ rLCRD2 แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน, แถวที่ 2 โปรตีนที่ไม่มีการกระตุ้นด้วย IPTG, แถวที่ 3-5 โปรตีนที่สกัดจากเซลล์ที่มีการกระตุ้นด้วย IPTG ให้มีการแสดงออกของ rLCRD1 โดยแถวที่ 3 โปรตีนที่ละลายน้ำ, แถวที่ 4 โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ, แถวที่ 5 rLCRD1 บริสุทธิ์, แถวที่ 6-8 โปรตีนที่สกัดจากเซลล์ที่มีการกระตุ้นด้วย IPTG ให้มีการแสดงออกของ rLCRD2 โดยแถวที่ 6 โปรตีนที่ละลายน้ำ, แถวที่ 7 โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ, แถวที่ 8 rLCRD2 บริสุทธิ์

4.3 การคำนวณมวลโมเลกุลของ rLC บริสุทธิ์ โดยใช้ SDS-PAGE

เมื่อนำแถบของโปรตีน rLCRD1 และ rLCRD2 บริสุทธิ์วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE คำนวณน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน พบว่าโปรตีนที่ผลิตได้น้ำหนักโมเลกุลขนาด 35.8 kDa และ 35.4 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของการหามวลโมเลกุลของโปรตีน ลูคัสบริสุทธิ์

4.4 การทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีน ลูคัส

จากการทดสอบการเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ด้วยโปรตีนลูคัส rLC rLCRD1 หรือ rLCRD2 พบว่าโปรตีนทั้งสามสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรีย *V. harveyi* เกิดการเกาะกลุ่มได้ โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของโปรตีนลูคัสที่สามารถทำให้ *V. harveyi* เกาะกลุ่มได้แสดงในตารางที่ 1 จะเห็นว่า rLCRD2 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ดีที่สุดโดยใช้โปรตีนเพียง 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

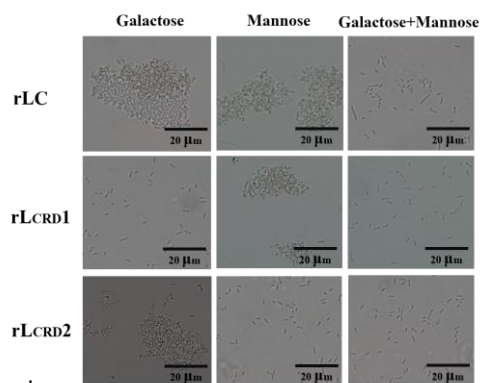
ตารางที่ 1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนลูคัสที่น้อยที่สุดที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบคทีเรีย *V. harveyi*

Recombinant protein	Minimal agglutinating concentration (μg/ml)
rLC	35
rLCRD1	70
rLCRD2	25

4.5 การทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีนลูคัสด้วยน้ำตาล

จากการทดสอบการยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ที่เหนี่ยวนำโดยโปรตีนลูคัส rLC rLCRD1 หรือ rLCRD2 ด้วยน้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลผสมระหว่างกาแลคโตสและแมนโนส พบว่าน้ำตาลผสมระหว่างกาแลคโตสและแมนโนส ที่ความเข้มข้น 125 mM สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคที่เหนี่ยวนำโดยโปรตีนลูคัสทั้ง 3 ชนิดได้ ในขณะที่น้ำตาลกาแลคโตส ความเข้มข้น 125 mM สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียที่เหนี่ยวนำโดย rLCRD1 เท่านั้น และน้ำตาลแมนโนส ความเข้มข้น 125 mM สามารถ

ยับยั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียที่เหนียวน้ำโดย rLCRD2 เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสม เลคตินแบบ C ด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

5. การอภิปรายผล

ในปัจจุบันนี้ มีรายงานการศึกษาในเลคตินแบบ C ในกุ้งมาแล้วหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือยีน LC ที่มี CRD 2 โดเมน ซึ่งมีโมทีฟในการจดจำน้ำตาลที่ต่างกัน ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนก่อนกลมของทั้ง 2 โดเมนมีความแตกต่างกันเล็กน้อย (รูปที่ 1) ในการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ผลิตโปรตีนลูกผสม rLC จาก *E. coli* ซึ่งสามารถเหนียวน้ำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรค ในงานวิจัยจึงได้ผลิตโปรตีนลูกผสมของแต่ละ CRD ของ LC โดยได้ทำการผลิตแยกเฉพาะบริเวณ CRD1 และ CRD2 พบว่าโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้มีขนาดใหญ่กว่าขนาดที่คาดคะเนไว้ 20 kDa เนื่องจากมีส่วนของ fusion protein ติดอยู่ด้วย เช่น Trx-Tag (Thioredoxin), His-Tag และ S-Tag ถ้าตัดส่วนของ fusion protein ออกไปขนาดของโปรตีนลูกผสมที่ได้จะมีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดคะเนไว้ อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้โปรตีนลูกผสมที่ไม่ผ่านการตัดส่วน fusion protein ออก ในการศึกษาคุณสมบัติของเลคติน เนื่องจากการสร้างโปรตีนลูกผสมของโปรตีน Thioredoxin ซึ่งเป็น

fusion protein พบว่า ไม่สามารถเหนียวน้ำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคได้ (ไม่แสดงข้อมูล) รวมถึงไม่สามารถเหนียวน้ำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วย ในขณะที่โปรตีนลูกผสม rLC rLCRD1 และ rLCRD2 สามารถเหนียวน้ำให้เกิดการเกาะกลุ่มของทั้งแบคทีเรียก่อโรคและเม็ดเลือดแดงกระต่าย (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสมของเลคตินที่ผลิตได้ สามารถนำมาใช้ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเลคตินได้โดยไม่จำเป็นต้องตัดส่วนของ fusion protein ออก นอกจากนี้ในการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสมเลคตินอื่น ๆ ที่เคยมีรายงานก็ไม่ตัด fusion protein ออกเช่นกัน ตัวอย่างเช่น rFcLec2 ของกุ้งขาวจีน rLvCTLD ของกุ้งขาว rPcLT ของเครย์ฟิช (*Procambarus clarkii*) เป็นต้น

ความจำเพาะในการจับของ CRD ทั้ง 2 โดเมนของ LC สามารถยืนยันได้จากผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคด้วยน้ำตาล ซึ่งพบว่ากาแลคโตสสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียที่เหนียวน้ำด้วย rLCRD1 แสดงให้เห็นว่า rLCRD1 สามารถจับจำเพาะกับกาแลคโตสที่อยู่บนผิวเซลล์เชื้อก่อโรคได้ เช่นเดียวกับแมนโนสที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียที่เหนียวน้ำโดย rLCRD2 ได้แสดงว่า rLCRD2 สามารถจับจำเพาะกับแมนโนสที่อยู่บนผิวเซลล์เชื้อก่อโรค ส่งผลให้จำเป็นต้องใช้น้ำตาลผสมระหว่างกาแลคโตสและแมนโนสจึงจะสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคที่เหนียวน้ำด้วย rLC ได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากน้ำตาลเพียงชนิดเดียวไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มแบคทีเรียที่เหนียวน้ำโดย LC ทั้งโมเลกุล เนื่องจาก rLC มี CRD 2 โดเมน เมื่อแอกทิวิตีของ CRD หนึ่งถูกยับยั้ง จะยังคงมีอีกหนึ่ง CRD ที่สามารถจับกับน้ำตาลที่อยู่บนผิวเซลล์เชื้อก่อโรคเพื่อเหนียวน้ำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบคทีเรียได้

เนื่องจาก LC เป็นเลคตินที่มี CRD 2 โดเมนที่สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์ได้ต่างชนิดกัน ส่งผลให้ rLC สามารถจับกับแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด ดังที่มีการรายงานไปก่อนหน้านี้ว่า rLC สามารถเหนี่ยวนำให้ *V. parahaemolyticus*, *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าความสามารถของ rLC rLCRD1 และ rLCRD2 ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียมีความต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความหลากหลายของน้ำตาลที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคและความจำเพาะในการจับกับน้ำตาลของแต่ละ CRD ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของโปรตีนลูกผสมที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียมีค่าต่างกัน

6. บทสรุป

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถผลิต โปรตีนลูกผสมของ CRD1 และ CRD2 ของ LC ได้ โดยโปรตีนดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* และแสดงให้เห็นว่า CRD1 และ CRD2 ของ LC มีความจำเพาะในการจดจำและจับจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแมนโนส ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้ยังบ่งชี้ว่า LC มีบทบาทเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโดยตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค ผ่านการทำให้แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่ม

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากโครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

8. เอกสารอ้างอิง

- พันทิพา รุณแสง สุพัตรา เทพณรงค์ อธิชา รัตนารักษ์ และ ประภาพร อุทาร์พันธุ์. (2557). การผลิตโปรตีนลูกผสมเลคตินแบบ C (rLC) จากกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*) โดย *Escherichia coli*. การประชุมหาดใหญ่วิชาการระดับชาติและนานาชาติครั้งที่ 5. ประเทศไทย. 16 พฤษภาคม 2557: 673-682.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Rattanaporn, O., and Utarabhand, P. (2011). Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: early gene up-regulation after *Vibrio harveyi* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 196-204.
- Rittidach, W., Paijit, N., and Utarabhand, P. (2007). Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770: 106-114.
- Utarabhand, P., Rittidach, W., and Paijit, N. (2007). Bacterial agglutination by Sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the Banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. *Science Asia.* 33: 41-46.

Wang, X. W., and Wang, J. X. (2013). Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 39: 27-38.

มหาวิทยาลัยรังสิต