โปรตีนกระตุ้นเซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอมในปลา

Phagocytosis Activating Protein in Fish

ภัทรพร คงมี*, **นเรศ ซ่วนยุก**, **ปัญชลิกา เดชะมาก และ วิไลวรรณ โชติเกียรติ**

Pataraporn Kongmee*, Naraid Saunyuk, Panchalika Dechamag and Wilaiwan Chotigeat

ภาควิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 90112

Department of Molecular Biotechnology and Bioinformatic, Faculty of science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, Thailand 90112

**Corresponding author: yaguza_jp@hotmail.com*

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน Ribosomal protein L26 (RPL26) หรือยีน Phagocytosis activating protein (PAP) ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน RPL26 ของปลาหลายชนิด งานวิจัยนี้ใช้ปลาคาร์ฟ *Cyprinus carpio* ซึ่งเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงเป็นกลุ่มตัวอย่าง และมักพบปัญหาการระบาดของโรค Motile Aeromonad Septicaemia (MAS) ที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดยผู้วิจัยได้ทำการทดลองกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาโดยฉีดเชื้อแบคทีเรียตัวตาย *A. hydrophila* จากนั้นทำ Reverse-transcription PCR (RT-PCR) เพื่อสังเกตการแสดงออกของยีน PAP พบว่ายีน PAP มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ การประยุกต์ใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยผลิตพลาส มิดลูกผสม PAP-phMGFP เป็นวัคซีนเพื่อฉีดเข้าสู่ตัวปลาที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 ไมโครกรัม เป็นเวลา 3 และ 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอวัคซีนมีการกระจายและสามารถแสดงออกในส่วนของเลือดและหัวใจได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ABSTRACT

The objective of this research is to study the gene of ribosomal protein L26 (RPL26) or phagocytosis activating protein (PAP) of *Penaeus monodon* that encodes of PAP to stimulate the immune system in shrimp. The findings indicated that there is a homologous of RPL26 gene in the several species of fishes. This research used one of the most the popular fish: common carp fish (*Cyprinus carpio*) as the sample to be examined. This study consisted simulation the immune system of fish by injecting the inactivated *Aeromonas hydrophila* then observed the PAP expression by using Reverse-transcription PCR (RT-PCR) method. The result showed that PAP gene had a higher expression in the infected fish compared with normal fish. Additionally, this research also applied biotechnology methods to produce the recombinant plasmid (DNA vaccine): PAP-phMGFP and injection into carp fish at the 20, 40, 80 μg / per fish. After 3 and 7 days of injection, the expression of the recombinant PAP in fish was determined. The experiment revealed that there was the high expression of PAP gene in blood and heart of carp fish.

คำสำคัญ: ยีน *PAP*, ระบบภูมิคุ้มกัน , ปลาคาร์ฟ, ดีเอ็นเอวัคซีน

Keywords: phagocytosis activating protein (PAP), immune system, carp fish, DNA vaccine

บทนำ

Cyprinus carpio (Linn) หรือปลาคาร์ฟ เป็นปลาที่นิยมเลี้ยงเพราะมีสีสันและรูปร่างที่สวยงามเฉพาะกันไปในแต่ละสายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงต้องให้การดูแลเอาใจใส่เป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นปลาที่อาศัยในน้ำที่มีคุณภาพและระบบจัดการน้ำที่ดี แต่มักพบโรค Motile Aeromonad Septicaemia (MAS) มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* เมื่อปลาติดเชื้อจะมีอาการคั่งของของเหลวภายในช่องท้อง ตาบวม ผิวหนังมีสีเข้มขึ้น เกล็ดพอง ไตทำงานผิดปกติ เกิดแผลเป็นรูที่ผิวหนัง และนิยมรักษาจะเน้นไปในทางการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะซึ่งมีราคาแพงและตกค้างในปลาทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อโรคซึ่งมีผลเสียในระยะยาว ปัจจุบันความรู้ทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (Molecular biology) สามารถตอบโจทย์การแก้ไขปัญหาต่างๆ ในระดับชีวโมเลกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพ บทบาทและความสำคัญดังกล่าวจึงนำไปสู่แนวคิดในการแก้ไขปัญหานี้ โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ดีเอ็นเอวัคซีนถือเป็นวิธีที่ได้ผลในการป้องกันและควบคุมโรคติดเชื้อในปลา ไม่ส่งผลกระทบสร้างปัญหาตกค้างในปลาและมลพิษทางน้ำ วัคซีนเหล่านี้สามารถกระตุ้นให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมีความแข็งแรงและอยู่ได้อย่างยาวนานในร่างกาย โดยระบบภูมิคุ้มกันของปลาจะมีรูปแบบการต่อต้านเชื้อโรคอย่างจำเพาะและตอบสนองต่อสิ่งต่างๆ ในธรรมชาติอย่างไม่จำเพาะ หนึ่งกระบวนการสำคัญที่มีบทบาทป้องกันร่างกายคือ phagocytosis ซึ่งเป็นกระบวนการของ phagocytic cells ที่จะคอยจับกินสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการศึกษา phagocytosis activating protein (PAP) ซึ่งเป็นยีนที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ *(P. monodon)* ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบการแสดงออกที่สูงขึ้นของยีน PAP เมื่อกุ้งถูกกระตุ้นด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาว เชื้อ *Vibrio harveyi* ที่อ่อนแรง และสาร fucoidan (Deachamag et al., 2006) และยังพบว่าโปรตีน PAP มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน alpha-2-macro-globulin (α2M) การเกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) เพิ่มมากขึ้น เมื่อบ่มเซลล์เม็ดเลือดกับโปรตีน GST-PAP และเมื่อฉีดโปรตีน GST-PAP แล้วฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ากุ้งมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (Chotigeat et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของ PAP-phMGFP ในรูปแบบดีเอ็นเอวัคซีน พบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันไวรัสและแบคทีเรียในกุ้งขาวได้ (*Litopenaeus vannamei)* (Khimmakthong et al., 2011) ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา ดีเอ็นเอวัคซีนในรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอ(PAP-phMGFP) ในการป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในปลาคาร์ฟ (*C. carpio* (Linn)) เพื่อผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำไปปรับใช้ในเชิงพาณิชย์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. **การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน PAP จากปลาคาร์ฟ**

สกัด RNA จากเลือดของปลาคาร์ฟ แล้วจึงทำการสังเคราะห์ cDNA ที่ได้จะนำมาทำการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) จาก PCR product ที่ได้จะเชื่อมเข้าสู่ pGEM®-T easy vector (Promega, USA) และTransform เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 ต่อมาจึงทำการสกัดพลาสมิด และนำมาตรวจหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้จากปลาคาร์ฟจากห้องสมุด cDNAs กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นโดยการ BlastN และ BlastX จากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

2. **เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ** PAP-phMGFP

เลี้ยง *Escherichia coli* ที่มี Recombinant DNA phMGFP และ PAP-phMGFP ในอาหารเหลว Luria Bertaini (LB) ที่มี Ampicillin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำไปหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วจึงนำไปตรวจสอบขนาดของพลาสมิดเทียบกับเวกเตอร์ phMGFP ด้วย Agarose gel electrophoresis

3. **ศึกษาการแสดงออกของยีน PAPในปลาคาร์ฟโดยวิธีReverse-transcriptionPCR(RT-PCR)**

เตรียมสัตว์ทดลองโดยใช้ปลาคาร์ฟ (*C. carpio*) แล้วนำเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ผ่านการให้ความร้อนโดยการต้มเพื่อให้เซลล์ตาย (Inactivated cell) ฉีดเข้าช่องท้องปลาคาร์ฟปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างเลือดปลาที่เวลา 6 ชั่วโมง ,1, 2, 5, 7 วัน ตามลำดับ แล้วทำ Reverse-transcription PCR (RT–PCR) โดยใช้ Specific primers ของยีน PAP (Forward primer: 5’ CAATGTCCGTGCCATGC 3’ และ Reverse primer: 5’ CCGACCAGCAGCCTTGTT 3’) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ ACTIN เป็น internal control (Forward primer: 5’ CAGATCATGTTYGAGACCTTC 3’ และ Reverse primer : 5’ GATGTCCACGTCR CACTTCAT 3’)

4. **ศึกษาการกระจายตัวของดีเอ็นเอวัคซีน (PAP-phMGFP) ในอวัยวะต่าง ๆของปลาคาร์พ ด้วยการนำ PAP-phMGFP เข้าสู่ปลาคาร์พ โดยวิธีการฉีด**

แบ่งป็น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำๆละ 6 ตัว โดยฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอ PAP-phMGFP 20, 40, 80 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS โดยทำการฉีดเข้าสู่ตัวปลาบริเวณช่องท้องปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดและหัวใจในวันที่ 3 และ 7 ภายหลังการฉีดดีเอ็นเอ สกัด RNA แล้วตรวจสอบการแสดงออกของดีเอ็นเอวัคซีน (PAP-phMGFP) โดยพิจารณาจากยีน GFP-PAP โดยใช้ primer: (Forward primer: 5’ CAATGTCCGTGCCATGC 3’ และ Reverse primer: 5’ CAGATTCCCTGGTC CTCG 3’) โดยวิธี RT-PCR โดยจะเปรียบเทียบกับกลุ่ม PBS

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน PAP ของปลาคาร์ฟ**

เมื่อทำการตรวจหาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีนมีขนาด 250 bp ที่ได้จากปลาคาร์ฟเปรียบเทียบกับห้องสมุด cDNAs โดย BlastN ใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน PAP หรือยีน Ribosomol protein L26 (RPL26) ในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Accession : AY680836.1) ถึง 98% โดยมีค่า E-value เท่ากับ 7e-121 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้จากปลาคาร์ฟไปทำการ BlastX เพื่อหาความเหมือนของกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ Ribosomal protein L26 ของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) 82% โดยมีค่า E-value เท่ากับ 1e-37 นอกจากนี้ยังพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ Ribosomal protein L26 ของปลาม้าลาย (*Denio rerio*) 61% โดยมีค่า E-value เท่ากับ 6e-26

2. **การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอPAP-phMGFP**

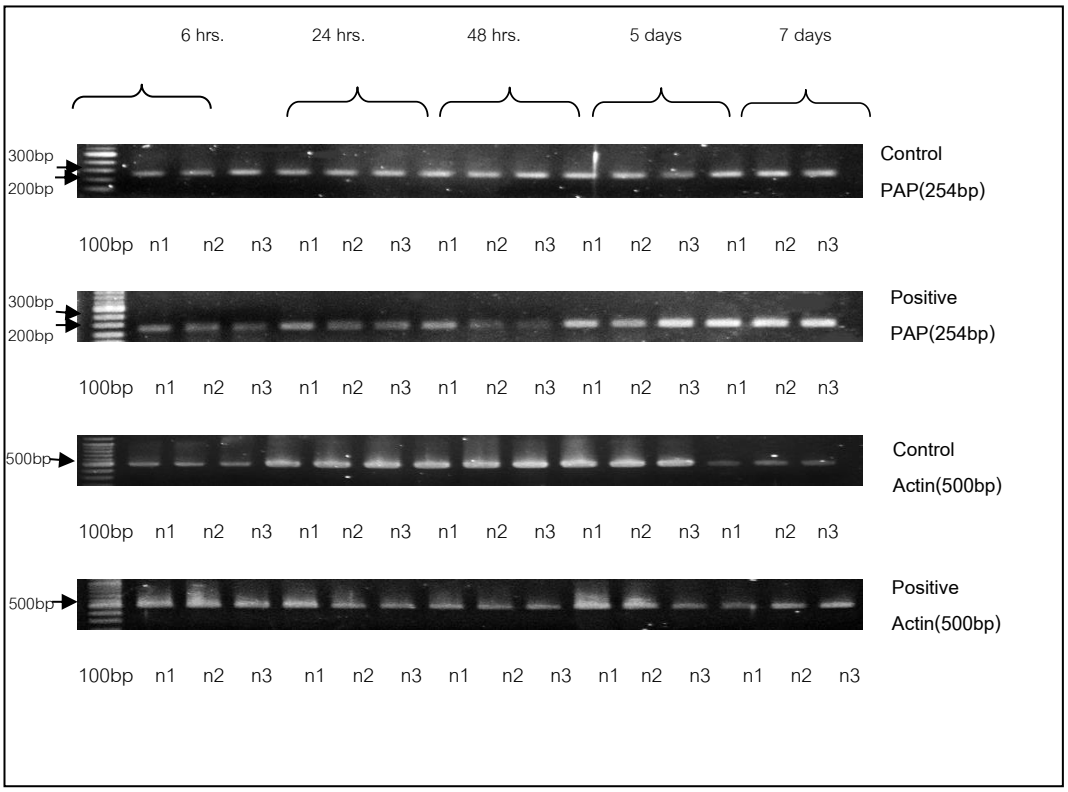
สามารถผลิตพลาสมิดดีเอ็นเอวัคซีนได้โดย PAP-phMGFP มีขนาด 5,260 bp และพลาสมิด phMGFP มีขนาด 4,707 bp

3. **ศึกษาการแสดงออกของยีนPAPในปลาคาร์ฟโดยวิธีReverse-transcription PCR(RT-PCR)**

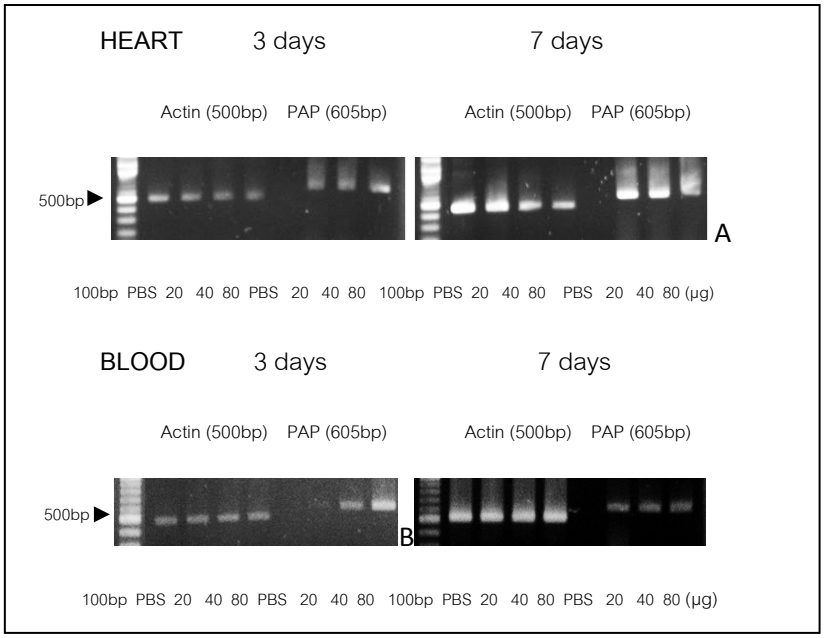
เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน PAP ของปลาคาร์ฟที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียตัวตายด้วยวิธี Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) จากเลือดปลา โดยส่วนของยีน PAP มีขนาดประมาณ 250 bp พบว่ามีการแสดงออกของยีนสูงในวันที่ 5 และ 7 (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าเมื่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาถูกกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม ปลามีการแสดงออกของยีน PAP เพิ่มมากขึ้น

4. **ศึกษาการกระจายตัวของดีเอ็นเอวัคซีน (PAP-phMGFP) ในอวัยวะต่าง ๆของปลาคาร์ฟ ด้วยการนำ PAP-phMGFP เข้าสู่ปลาคาร์พ โดยวิธีการฉีด**

จากการศึกษาตรวจสอบโดยดูการแสดงออกของ GFP-PAP ซึ่งมีขนาดประมาณ 605 bp พบว่าดีเอ็นเอวัคซีน (PAP- phMGFP) มีการกระจายตัวและสามารถแสดงออกในหัวใจและเลือด โดยในวันที่ 3 ของการทดลองจะแสดงออกใกล้เคียงกันยกเว้นในเลือดที่ความเข้มข้น 20 μg ส่วนในวันที่ 7 ของการทดลองพบการแสดงออกในทุกความเข้มข้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน PAP กลุ่มควบคุม (PBS) และกลุ่ม *A. hydrophila*



รูปที่ 2 แสดงการกระจายตัวและการแสดงออกของ Plasmid DNA PAP-phMGFP

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจในปลาคาร์ฟ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน PAP ของกุ้งกุลาดำ พบว่าปลาที่ถูกกระตุ้นด้วย Inactivated *A. hydrophila* มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงขึ้น และเมื่อทำการฉีดพลาสมิดดีเอ็นเอวัคซีน PAP-phMGFP พบว่าพลาสมิดมีการกระจายตัวและแสดงออกในเลือดและหัวใจของปลาคาร์ฟ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มว่าพลาสมิดดีเอ็นเอวัคซีน PAP-phMGFP อาจมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในปลาได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนวิจัยมหาวิทยาลัยแห่งชาติ (National Research Universities) รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร. นเรศ ซ่วนยุก กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพวิทยาและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์งบประมาณ วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chotigeat, W., Dechamag, P. and Phongdara A. Identification of a protein binding to the Phagocytosis activating protein (PAP) in immunized black tiger shrimp. Aquaculture 2007; 271: 112-120.

Deachamag, P., Intaraphad, U., Amonrat, P. and Chotigeat, W. Expression of a Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. Aquaculture 2006; 255: 165-172.

Khimmakthong, U., Deachamag, P., Phongdara, A., Chotigeat, W. Stimulating the immune response of *Litopenaeus vannamei* using the phagocytosis activating protein (PAP) geneFish & Shellfish Immunology 2011; 31: 415–422.