



เทคนิคทางโปรตีนโอมิกส์ในการระบุการแสดงออกของโปรตีนของ *Proteobacteria* ในน้ำเลือดปูทะเล (*Scylla serrata* Forsskal, 1775) ที่เป็นโรคท้องแดง

ธนเสกฐ์ ทองใสเกลี้ยง^{1, #}

¹ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพและอณูชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ นราธิวาส 96000

บทคัดย่อ: โรคท้องแดงในปูทะเล (*Scylla serrata* Forsskal, 1775) เป็นโรคที่ไม่สามารถหาสาเหตุได้อย่างแน่ชัดซึ่งส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทย การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการนำเสนอการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันในน้ำเลือดระหว่างปูทะเลอาการปกติกับปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงกลุ่ม I, II และ III ด้วยเทคนิคการแยกโปรตีน 1 มิติ (1-dimension sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่ามีโปรตีนขนาดมอลโมเลกุลประมาณ 7.0 และ 3.6 กิโลดาลตัน (kDa) แสดงออกในปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงกลุ่ม II และ III แต่ไม่พบในปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงกลุ่ม I และปูทะเลอาการปกติตามลำดับ โปรตีนสองขนาดดังกล่าวถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และนำโปรตีนไลเซต (protein lysate) ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry พบว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 7.0 kDa ประกอบด้วยชิ้นส่วนโปรตีน 2 ชิ้นมีลำดับกรดอะมิโน STFLDLAEGR และ YSMLVEDGVK ตามลำดับ ในขณะที่โปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 3.6 kDa ประกอบด้วยชิ้นส่วนโปรตีน 1 ชิ้นมีลำดับกรดอะมิโน TLEVEVSGPGSQR ซึ่งจากการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลใน NCBI พบว่าชิ้นส่วนโปรตีนที่ได้ทั้ง 3 ชิ้นมีความเหมือนกับโปรตีนที่ทำหน้าที่ในแบคทีเรียจีโนส *Proteobacteria* โปรตีนเป็นผลผลิตสุดท้ายของการแสดงออกของยีน ดังนั้นโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียที่ถูกลดพบในน้ำเลือดของปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค อย่างไรก็ตามการฉีดเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่คาดว่าจะสาเหตุของโรคเข้าสู่ปูทะเลปกติเพื่อค้นหาและระบุเชื้อต้นเหตุของโรคเป็นแนวทางของการหาทางป้องกันโรคท้องแดงต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ปูทะเล โรคท้องแดงในปูทะเล โปรตีนโอแมคที่เรีย SDS-PAGE LC MS/MS

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2563. 15(2): 141-150.

E-mail address: thanasetfdr@gmail.com

Proteomic Technique Identification of Differentially Expressed Proteins of Proteobacteria in Red Sternum Syndrome Mud Crab (*Scylla serrata* Forsskal, 1775) Hemolymph

Thanaset Thongsaiklaing^{1,#}

¹Biotechnology and Molecular Biology Laboratory (BMBL), Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University, Narathiwat 96000

Abstract: Red sternum syndrome mud crab (*Scylla serrata* Forsskal, 1775) is a poorly understood cause affecting mud crab aquaculture in Thailand. This study presented the differential protein expression in hemolymph between normal mud crab and red sternum syndrome mud crab group I, II and III using 1-dimension sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins with size approximately 7.0 and 3.6 kDa were presented in red sternum syndrome mud crab group II and III but were absent in red sternum syndrome mud crab group I and normal mud crab, respectively. The proteins were digested with trypsin and protein lysate were further analyzed by Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry techniques. The results showed 2 protein fragments of 7.0 kDa was consisted of the following amino acid sequences; STFLDLEAGR and YSMLEVEDGVK, respectively. The 3.6 kDa included of only 1 protein fragment, TLEEVSGPGSQK. The similarity analysis of amino acid sequence with NCBI database, showed all 3 protein fragments were similar to proteins of genus *Proteobacteria*. Protein is the end product of gene expression. Therefore, bacterial proteins were detected in hemolymph of red sternum syndrome mud crab may likely to be involved in the disease. However, injecting the target bacteria that are expected to cause of disease into normal crab in order to find and identify cause of the disease. Is a way to prevent red sternum syndrome mud crab in the future.

Keywords: Mud crab, Red sternum syndrome mud crab, *Proteobacteria*, SDS-PAGE, LC MS/MS

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2020 15(2): 141-150.

E-mail address: thanasetfdr@gmail.com

บทนำ

ปูทะเล (*Scylla serrata* Forsskal, 1775) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีรสชาติดี มีโภชนาการสูงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคและมีความราคาสูง จึงทำให้ผู้ประกอบการหันมาประกอบธุรกิจการทำฟาร์มปูทะเลเพิ่มมากขึ้นทั้งในรูปแบบปูทะเลขุนและปูทะเลน้ำจืด จากการสำรวจฟาร์มปูทะเลพบว่าปูทะเล

บางส่วนที่แสดงอาการผิดปกติ โดยลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้ชัดเจนคือ บริเวณส่วนอก ท้อง กระดอง และข้อต่อจะมีสีแดงปรากฏให้เห็นเป็นแถบๆ ลำตัวพองกระดองไม่แข็งเหมือนปูปกติ ไม่ค่อยกินอาหาร เคลื่อนไหวช้า ในที่สุดขาและก้ามไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ ไม่สามารถลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาดตัวได้และตายในที่สุด เมื่อตรวจดูอวัยวะภายในจะเสียสภาพไม่คงรูป เมื่อ

เจาะดูเลือดพบว่าสีของน้ำเลือดจะมีสีที่แตกต่างกัน ได้แก่ สีน้ำตาล สีส้มขุ่นและสีขาวขุ่นคล้ายนํ้านม ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีประมาณ 10% ของปูทะเลทั้งฟาร์ม (Salaenoi et al., 2006; Thongsaiklaing et al., 2013) โดยลักษณะโรคท้องแดงดังกล่าว Thongsaiklaing et al. (2013) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม I กลุ่ม II และ กลุ่ม III ตามความรุนแรงของอาการที่แสดงออก โดยมีระดับการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำเลือดอย่างชัดเจนคือ สีน้ำตาล สีส้มขุ่นและสีขาวนํ้านมตามลำดับ ในขณะที่ Areekijserree et al. (2010) ได้แบ่งสีของน้ำเลือดปูที่มีอาการท้องแดงออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 เลือดสีส้ม ระยะที่ 2 เลือดสีส้มขาว ระยะที่ 3 เลือดสีขาวนํ้านม และได้นำเนื้อเยื่อส่วนปกคลุมร่างกาย ตับ เหงือก กล้ามเนื้อท้อง ก้ามและหัวใจ รวมทั้งน้ำเลือดทั้ง 3 ระดับ ดังกล่าวมาศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและส่องกราด พบการติดเชื้อแบคทีเรียรูปร่างแท่งตรงหรือโค้งงอ หรือรูปร่างกลม ผนังเซลล์บางโดยรายงานไม่ได้ระบุประเภทของเชื้อที่พบ ซึ่งลักษณะอาการท้องแดงมีลักษณะคล้ายคลึงกับการเกิดโรค pink crab disease (PCD) ที่แสดงอาการ hyperpigmentation ในปู edible crab (*Cancer pagurus*) ที่ติดเชื้อ *Hematodinium* sp. (Stentiford et al., 2002) และ bitter crab disease (BCD) ในปู Alaska tanner crab, snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Meyers et al., 1987) และ blue crab (*Callinectes sapidus*) (Shields and Squyare 2000) เนื่องจากโรคท้องแดงในปูทะเลมีข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ 1-dimension sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis แยกขนาดของโปรตีนที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันในน้ำเลือดปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงกลุ่ม I, II และ III โดยเปรียบเทียบกับปูทะเลปกติ จากนั้นใช้ Liquid chromatography-mass

spectrometry/mass spectrometry เพื่อระบุชนิดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปูทะเลปกติและปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงกลุ่ม I, II และ III ที่มีขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 6.5-8.5 เซนติเมตร กลุ่มละ 3 ตัว 3 ตัว จากฟาร์มปู อ. ชลบุรี จ. จันทบุรี ทำให้สลบโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลาประมาณ 1 นาที จากนั้นใช้ผ้าซับตัวปูให้แห้ง เช็ดบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ด้วยเอทานอล 70% ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 เจาะและดูดน้ำเลือดแล้วนำตัวอย่างเลือดเก็บในหลอด 1.5 มิลลิลิตรที่มี 10% trisodium citrate (อัตราส่วน 1:5) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเลือดมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่เพื่อนำไปวิเคราะห์หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวัดปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างน้ำเลือดปูทะเลปกติและปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงทั้งสามกลุ่มมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ที่ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance) ที่ 595 นาโนเมตร ตามวิธีของ Bradford (1967) โดยใช้ BSA (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

การแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี 1-dimension SDS-PAGE

นำตัวอย่างน้ำเลือดที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 20 ไมโครกรัม ผสมกับ 3X SDS-sample buffer (1.0 Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที และนำไปวิเคราะห์บนเจล 12.5% SDS-PAGE โดยใช้วิธีของ Laemmli (1970) ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมสีใน staining solution (0.1% coomassie brilliant blue R-250,

40% methanol, 10% acetic acid) ซ้ำมคีน แล้วนำไปล้างสีออกใน destaining solution (40% methanol, 10% acetic acid) ประมาณ 10 ชั่วโมงหรือซ้ำมคีนและคำนวณหาพื้นที่โมเลกุลของโปรตีนโดยหา relative migration distance (R_f)

การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC-MS/MS

นำแถบโปรตีนขนาดประมาณ 7.0 และ 3.7 kDa บนเจล SDS-PAGE 1 มิติ มาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นนำโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินฉีดเข้าเครื่อง Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) รุ่น Finnigan LTQ linear ion trap mass spectrometer, LC separation and MS analysis, HPLC system: Finnigan Surveyor™ MS pump with a flow splitter, column: 0.18×100 mm C18 (Thermo Electron Cooperation), flow rate 200 μ l/min, mobile phase A: 0.1% formic acid ในน้ำ B: 0.1% formic acid ใน acetonitrile, gradient: 2-60%B 20 นาที 65-80% B 5 นาที และ 80-2% B 2 นาที Mass Spectrometer Finnigan LTQ, Ionization mode: NanoSpray, positive ion, capillary temperature 200, spray needle voltage 1.8 KV, mass range 400-1,600 m/z, scan sequence: Full-scan MS, MS/MS scan, acquisition modes: Normal, Data Dependent™ and Dynamic Exclusion™ ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Units) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC MS/MS มารวบรวมชนิดของโปรตีนด้วยซอฟต์แวร์ Turbo SEQUEST algorithm in the BioWorks™3. 1SR1

software package (Thermo Electron) จากฐานข้อมูล nr.fasta และ NCBI

ผลการทดลอง

1-dimension SDS-PAGE

จากการเปรียบเทียบโปรตีนในน้ำเลือดของปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงกลุ่ม I กลุ่ม II และ กลุ่ม III (Figure 1) โดยเปรียบเทียบกับน้ำเลือดปูปกติ โดยวิธี SDS-PAGE 1 มิติ (Figure 2) พบว่าแถบของโปรตีนในน้ำเลือดของปูปกติอยู่ในช่วงประมาณ 30-80 kDa ขณะที่ในน้ำเลือดปูที่มีอาการท้องแดงมีแถบของโปรตีนปรากฏอยู่ในช่วงประมาณ 3.7-90 kDa โดยมีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันในกลุ่มปูที่เป็นโรคท้องแดงคือ ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม II และ กลุ่ม III มีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.6 และ 7.0 kDa แต่กลุ่ม I และปูทะเลปกติไม่ปรากฏแถบโปรตีนอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าว

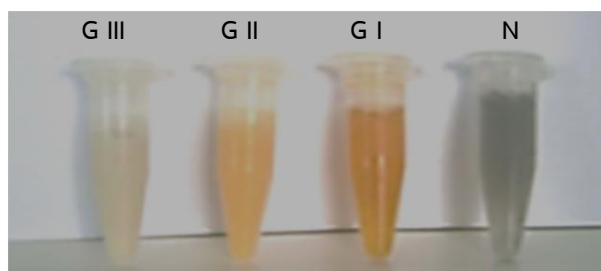


Figure 1 Hemolymph color comparison of normal crab (N), red sternum disease mud crab group I (G I), group II (G II) and group III (G III).

การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดย LC MS/MS

จากการนำแถบโปรตีนของปูทะเลที่มีอาการท้องแดงที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7.0 และ 3.6 kDa มาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและวิเคราะห์ชิ้นส่วนโปรตีนด้วยเครื่อง LC MS/MS พบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7.0 kDa ประกอบด้วยชิ้นส่วนโปรตีน 2 ชิ้นส่วนที่มีลำดับกรดอะมิโน STFLDAEGR และ

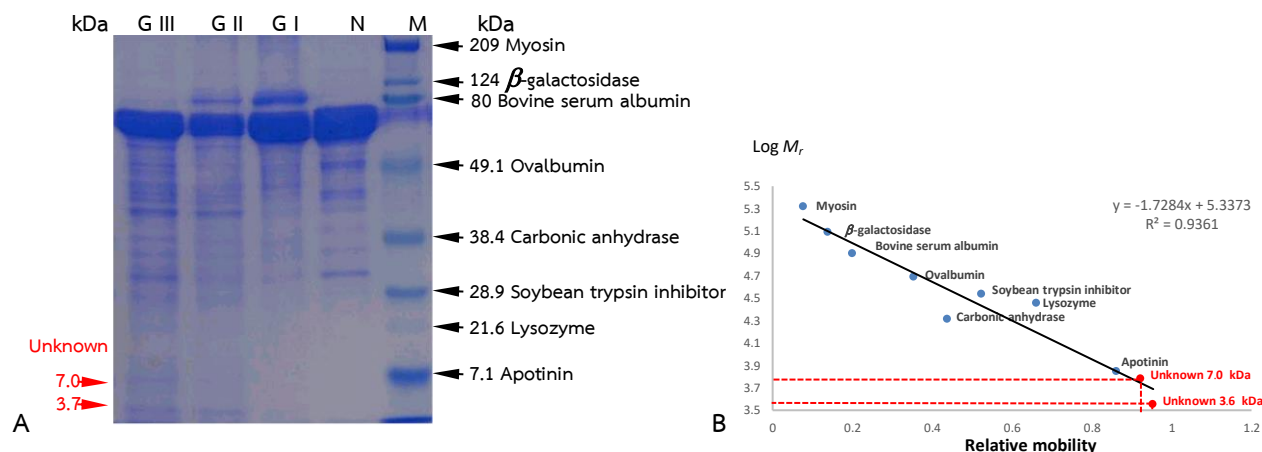


Figure 2 Differential expressed protein in hemolymph. (A) Protein expression of hemolymph on 12.5% SDS-PAGE marker (M), Normal crab (N), red sternum disease mud crab group I (G I), group II (G II) and group III (G III). (B) Relative migration mobility of protein marker and unknown proteins.

Table 1 The amino acid sequences of trypsin digestion fragments of 7.0 and 3.6 kDa from mud crab (*Scylla serrata* Forsskal, 1775)

Molecular weight (kDa)	Peptide fragment	Amino acid sequence
7.0	1	STFLLEAAGR
	2	YSMLVEDGVK
3.6	3	TLEEVSGPGSQR

YSMLVEDGVK ตามลำดับ ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.6 kDa ประกอบด้วยประกอบด้วยชิ้นส่วนโปรตีน 1 ชิ้นส่วนลำดับกรดอะมิโน TLEEVSGPGSQR (Table 1) และ (Figure 3)

การระบุชนิดของชิ้นส่วนโปรตีนบนฐานข้อมูล NCBI

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากชิ้นส่วนโปรตีนทั้ง 3 ชิ้น มาระบุความเหมือนกับโปรตีนบนฐานข้อมูล NCBI และ SwissProt (Table 2) จากการจัดลำดับความเหมือน 10 อันดับแรกพบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7.0 kDa ชิ้นที่ 1 มีความเหมือนกับโปรตีน SCO family Protein (*Rhodovarius lipocyclicus*), peroxiredoxin (*Chelatorans sp.* BNC1), glucosidase (*Streptomyces olivochromogenes*), Phytochrome (bacterium HR10), hypothetical protein

(*Rubellimicrobium roseum*), sensor domain-containing diguanylate cyclase (*Halomonas korlensis*), LysM peptideglycan-binding domain-containing protein (*Roseovarius aestuariivivens*), peroxiredoxin (Flavobacteriaceae), hypothetical protein BGO60_02300 (*Thiobacillus sp.* 65-1059) และ hypothetical protein ABS92_10480 (*Thiobacillus sp.* SCN 63-374) ตามลำดับ ชิ้นที่ 2 มีความเหมือนกับโปรตีน glutathione peroxidase (*Sorangium cellulosum*) (Accession number KYF86051, WP_129345615, WP_020733286, KYG07204, KYF81081 และ WP_129573494 ตามลำดับ), peroxiredoxin (*Roseovarius sp.* BRH_c41), Alkyl hydroperoxide reductase/Thiol

Table 2 Protein identification of tree protein fragments of 7.0 and 3.6 kDa respectively, using NCBI database.

Fragment number	Protein name	pI	Molecular weight	Max score	P-value	% identity	Bacteria Species	Bacteria group	Accession number
1/7.0 kDa	SCO family Protein	5.47	22621.96	33.7	1.6	100	<i>Rhodovarius lipocyclicus</i>	alpha-proteobacteria	WP_160119777
	peroxidase	7.80	17593.18	33.7	1.6	100	<i>Chelativans</i> sp. BNC1	alpha-proteobacteria	WP_011581124
	glucosidase	5.27	101135.99	31.2	13	100	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	high GC gram+	WP_067379457
	Phytochrome like protein cph1	5.78	79846.09	31.2	13	100	bacterium HR10	bacteria	GBC80945
	hypothetical protein	4.34	52091.70	31.2	13	100	<i>Rubellimicrobium roseum</i>	alpha-proteobacteria	WP_139083238
	sensor domain containing diguanylate cyclase	5.61	49807.00	31.2	13	100	<i>Halomonas kortensis</i>	gamma-proteobacteria	WP_089792534
	LysM peptide-glycan-binding domain-containing protein	4.29	41244.23	31.2	13	90	<i>Roseovarius nestluarivivens</i>	alpha-proteobacteria	WP_135506376
	peroxidase	5.12	42381.98	31.2	13	100	Flavobacteriaceae	CFB group bac	MAL60272
	hypothetical protein BGO60_02300	8.66	18066.05	31.2	13	100	<i>Thiobacillus</i> sp. 65-1059	beta-proteobacteria	OJW4565
	hypothetical protein ABS92_10480	6.61	17714.58	31.2	13	100	<i>Thiobacillus</i> sp. SCN 63-374	beta-proteobacteria	ODU42681
2/7.0 kDa	glutathione peroxidase	6.13	26605.39	39.2	0.022	100	<i>Sorangium cellulosum</i>	delta-proteobacteria	KYF86051
	glutathione peroxidase	5.64	26872.64	39.2	0.022	100	<i>Sorangium cellulosum</i>	delta-proteobacteria	WP_129345615
	glutathione peroxidase	6.22	26622.50	39.2	0.022	100	<i>Sorangium cellulosum</i>	delta-proteobacteria	WP_020733286
	glutathione peroxidase	6.22	26640.53	39.2	0.022	100	<i>Sorangium cellulosum</i>	delta-proteobacteria	KYG07204
	glutathione peroxidase	6.22	26626.50	39.2	0.022	100	<i>Sorangium cellulosum</i>	delta-proteobacteria	KYF81081
	glutathione peroxidase	6.00	26558.39	39.2	0.022	100	<i>Sorangium cellulosum</i>	delta-proteobacteria	WP_129573494
	peroxidase	6.06	20162.01	39.2	0.022	100	<i>Roseovarius</i> sp. BRH_c41	alpha-proteobacteria	KJ544604
	peroxidase	6.06	19769.55	39.2	0.022	100	<i>Roseovarius</i> sp. 217	alpha-proteobacteria	WP_050766368
	peroxidase	4.23	17750.09	39.2	0.022	100	<i>Lyngbya confervoides</i>	cyanobacteria	WP_039722898
	30S ribosomal protein S11	11.33	14171.35	35.8	0.52	92.31	<i>Rhizomicrobium</i> sp. SCGC AG-212-E05	alpha-proteobacteria	OAI44696
3/3.6 kDa	30S ribosomal protein S11	11.41	14138.95	35.8	0.52	92.31	Rhizobiales bacterium 64-17	alpha-proteobacteria	OJY42518
	30S ribosomal protein S11	10.76	13939.02	35.8	0.52	92.31	Alphaproteobacteria bacterium 64-11	alpha-proteobacteria	OJU12025
	30S ribosomal protein S11	10.77	13747.81	35.8	0.52	92.31	Alphaproteobacteria bacterium 62-8	alpha-proteobacteria	OJU58429
	30S ribosomal protein S11	11.32	14144.11	35.8	0.52	92.31	<i>alpha proteobacteriu</i> BAL199	alpha-proteobacteria	WP_007678293
	30S ribosomal protein S11	11.45	14058.95	35.8	0.52	92.31	<i>Caenispirillum bicanense</i>	alpha-proteobacteria	WP_097276954
	30S ribosomal protein S11	11.55	14042.85	35.8	0.52	92.31	<i>Caenispirillum salinarum</i>	alpha-proteobacteria	WP_009541251
	30S ribosomal protein S11	11.41	14013.83	35.8	0.52	92.31	<i>Labrys</i> sp. WJW	alpha-proteobacteria	WP_068292125
	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S11	11.41	14043.86	35.8	0.52	92.31	<i>Labrys</i>	alpha-proteobacteria	WP_105862638
	30S ribosomal protein S11	11.28	14016.83	35.8	0.52	92.31	<i>Pseudolabrys</i> sp. Root146	alpha-proteobacteria	WP_056910763

specific antioxidant (*Roseovarius* sp. 217), peroxiredoxin (*Roseovarius* sp. 217) และ peroxiredoxin (*Lyngbya confervoides*) ส่วนชิ้นที่ 1 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3.6 kDa มีความเหมือนกับโปรตีน 30S ribosomal protein S11 ใน *Rhizomicrobium* sp. SCGC AG-212-E05, *Rhizobiales* bacterium 64-17, *Alphaproteobacteria* bacterium 64-11, *Alphaproteobacteria* bacterium 62-8, *alpha* proteobacterium BAL199, *Caenispirillum bisanense*, *Caenispirillum salinarum*, *Labrys* sp. WJW, MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S11 และ 30S ribosomal protein S11 *Pseudolabrys* sp. Root1462 ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนที่มีการแสดงออกในน้ำเลือดปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม I, II และ III กับปูทะเลปกติพบว่าปูทะเลที่มีอาการท้องแดงมีระดับการแสดงออกของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7.0 และ 3.6 kDa ที่แตกต่างกันปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน โดยที่ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม I มีความเข้มแถบโปรตีนดังกล่าวจางมากและค่อยๆเห็นชัดขึ้นในกลุ่ม II และ III ตามลำดับ Rameshthangam and Ramasamy (2005) ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในน้ำเลือด เหงือก ตับและกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำ (*Peneus monodon*) ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาว (white spot disease) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการแสดงออกของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลายตั้งแต่ขนาด 20 kDa ไปจนถึง 146 kDa ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน และจากการระบุชนิดของโปรตีนโดยวิธี western blot ยืนยันว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 53 kDa เป็น

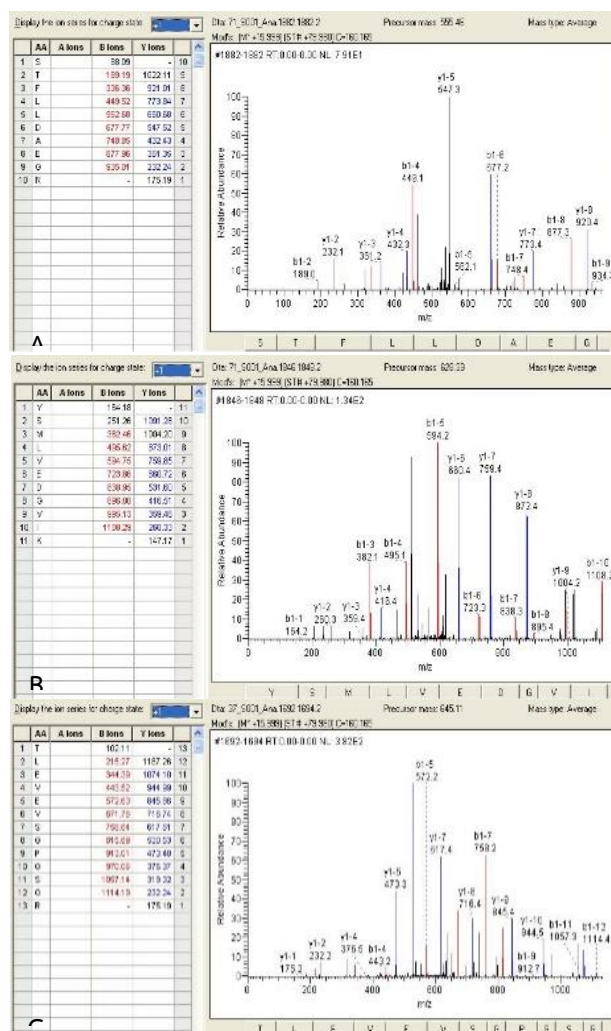


Figure 3 Mass spectrum of protein fragments of red sternum syndrome mud crab (A) peptide fragment 1, (B) peptide fragment 2 of 7.0 kDa and (C) peptide fragment 1 of 3.6 kDa.

envelope protein ของ WSSV ในขณะที่ Wang et al. (2007) พบว่ากุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) WSSV ที่ติดเชื้อ WSSV มีการแสดงออกของโปรตีน ICP11 ของไวรัส WSSV ซึ่งมีขนาดประมาณ 9.2 kDa และได้ยืนยันผลโดยใช้เทคนิค microarray และ EST ทั้งนี้ความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7.0 และ 3.6 kDa ที่มีการแสดงออกในน้ำเลือดของปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงทั้งสามกลุ่มมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการที่ปรากฏ โดยเป็นไปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนทั้งสอง

แถบดังกล่าวมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำให้ระดับการ แสดงออกของโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นด้วยเป็นลำดับ

ผลจากการ blast ชิ้นส่วนโปรตีนที่ได้ทั้ง 3 ชิ้น จากฐานข้อมูล NCBI พบว่าเกือบทั้งหมดเป็นโปรตีนของ แบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria* โดยชิ้นส่วนโปรตีนที่ 1, 2 ของโปรตีนขนาด 7.0 kDa และโปรตีนชิ้นที่ 1 ของ โปรตีนขนาด 3.6 kDa ประกอบด้วย alpha- proteobacteria, beta- proteobacteria, delta- proteobacteria และ gamma- proteobacteria โดยเฉพาะชิ้นส่วนโปรตีนชิ้นที่ 2 ความเหมือนกับโปรตีน peroxiredoxin และ Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant ซึ่งเป็นเชื้อ แบคทีเรียในจีนัส *Roseovarius* 100% แบคทีเรียในจีนัส นี้ Boettcher et al. (2005) และ Maloy et al. (2007) ได้รายงานว่าเป็นเชื้อก่อโรค *Roseovarius* Oyster Disease (ROD) ในหอยนางรมที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Roseovarius crassostreae* ซึ่ง อยู่ใน ไฟลัม proteobacteria ส่วน Eddy et al. (2007) ได้ตรวจสอบ และระบุการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปู *Carcinus maenus* โดยวิธี *in situ* hybridization พบการ แสดงออกของ 16S rRNA ของแบคทีเรียในไฟลัม alpha- proteobacteria Fu et al. (2019) ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและเทคนิค reverse transcription-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง เพื่อศึกษาสาเหตุของโรค hepatopancreas browned disease (HPBD) ในปู Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) ซึ่งได้เสนอว่าปูที่เป็นโรค HPBD น่าจะเกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากการ รายงานของ Getchell, 1989; Stewart, 1993 พบว่า แบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ครึ่งตะเขยนอยู่ในจีนัส *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Spirillum*, *Moraxella*, *Pasteurella* และ *photobacterium* จากความเหมือน ของลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนโปรตีนขนาด 7.0 และ

3.6 kDa ในปูทะเลที่เป็นโรคท้องแดงกับแบคทีเรียใน ไฟลัม *Proteobacteria* และการรายงานของ Areekijseer et al. (2010) ที่พบว่าปูทะเลที่เป็นโรค ท้องแดงมีการติดเชื้อแบคทีเรีย พอจะอนุมานคร่าวๆ ได้ ว่าเชื้อก่อโรคที่ทำให้ปูทะเลเป็นโรคท้องแดงอาจจะเกิด จากเชื้อแบคทีเรีย ดังที่กล่าวมางานวิจัยเรื่องนี้เป็น การตรวจสอบเบื้องต้นของการแสดงออกของโปรตีนในปู ทะเลที่เป็นโรคท้องแดง ซึ่งผลที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการวิจัยเชิงลึกต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการระบุชนิดของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล ประมาณ 7.0 และ 3.6 kDa ที่มีการแสดงออกในปูทะเล ที่เป็นโรคท้องแดงโดยใช้ 1-dimension SDS-PAGE และ LC MS/MS พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ โปรตีนที่ทำหน้าที่ในแบคทีเรียไฟลัม *Proteobacteria*

ข้อเสนอแนะ

ผลงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการใช้ลำดับกรดอะมิโนระบุ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่อาจก่อให้เกิดโรคท้องแดงในปู ทะเลเบื้องต้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปทดสอบการ ติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุ ของโรคเข้าสู่ปูทะเลปกติเพื่อหาเชื้อสาเหตุและเพื่อเป็น แนวทางในการป้องกันและรักษาโรคท้องแดงในปูทะเล ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Areekijseer, M., T. Chuen-Im, and B. Panyarachun. 2010. Characterization of red sternum syndrome in mud crab farms from Thailand. *Biologia*. 65(1): 150-156.
- Boettcher, K. J., K. K. Geaghan, A. P. Maloy, and B. J. Barber. 2005. *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the

- Roseobacter clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1531–1537.
- Bradford, M. M. 1967. 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.
- Eddy, F., A. Powell, S. Gregory, L. M. Nunan, D. V. Lightner, P. J. Dyson, A. F. Rowley, and R. J. Shields. 2007. A novel bacterial disease of the European shore crab, *Carcinus maenas*—molecular pathology and epidemiology. *Microbiology.* 153: 2839-2849.
- Fu, L., T. Gao, H. Jiang, F. Qiang, Y. Zhang, and J. Pan. 2019. *Staphylococcus aureus* causes hepatopancreas browned disease and hepatopancreatic necrosis complications in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquac. Int.* 27: 1301–1314.
- Getchell, R. G. 1989. Bacterial shell disease in crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 8: 1-6.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the larvae of the head of bacteriophage T. *Nature.* 227: 680-685.
- Maloy, A. P., S. E. Ford, R. C. Karney, and K. J. Boettcher. 2007. *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture.* 269: 71–83.
- Meyers, T.R., T.M. Koeneman, C. Botelho, and S. Short. 1987. Bitter crab disease: a fetal dinoflagellate infection and marketing problem for Alaska tanner crabs *Chionoecetes bairdi*. *Dis. Aquat. Organ.* 3: 195-126.
- Rameshthangam, P. and P. Ramasamy. 2005. Protein expression in white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon* fabricius. *Virus Res.* 110(1–2): 133-141.
- Salaenoi, J., A. Sangcharoen, A. Thongpan, and M. Mingmuang. 2006. Morphology and Haemolymph composition changes in red sternum mud crab (*Scylla serrata*). *Kasetsart J. (Nat. Sci.).* 40: 158-166.
- Shields, J. D. and C. M. Squyers. 2000. Mortality and hematology of blue crabs, *Callinectes sapidus*, experimentally infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii*. *Fish. Bull.* 98: 139-152.
- Stentiford, G. D., M. Green, K. Bateman, H. J. Small, D. M. Nail, and S. W. Feist. 2002. Infection by a *Hematodinium*-like parasitic dinoflagellate causes Pink Crab Disease (PCD) in the edible crab *Cancer pagurus*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 201-209.
- Stewart, J. E. 1993. Infectious disease of marine crustaceans, pp. 319-342. *In* J. A. Couch and J. W. Fournie, eds. *Pathobiology of Marine and Estuarine Organism*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Tongsakling, T., J. Salaenoi, and M. Mingkwan. 2013. Ca²⁺ATPase, carbonic anhydrase and alkaline phosphatase activities in red

sternum mud crabs (*Scylla serrata*).

Kasetsart J. (Nat. Sci.). 47: 252–260.

Wang, H. C., H. C. Wang, G. H. Kou, C. F. Lo, and
W. P. Huang. 2007. Identification of icp11,
the most highly expressed gene of shrimp
white spot syndrome virus (WSSV). Dis.
Aquat. Organ. 74: 179–189.

