

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION  
OF POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST  
BLACK TIGER PRAWN AMINERGIC RECEPTORS**

**SUTHASINEE SOMYONG**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2004**

**ISBN 974-04-5507-7  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**การสร้างและศึกษาโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อตัวตอบรับสารสื่อประสาทในกลุ่มเอมีนจากกุ้งกุลาดำ  
(PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF POLYCLONAL ANTIBODIES  
AGAINST BLACK TIGER PRAWN AMINERGIC RECEPTORS)**

สุธาสินี สมยง 4536673 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เฉลิมพร อ่องสวรรค์ โสภณ, Ph.D., วิฑูรย์ ธีระโสภณ, Ph.D.,  
กุศล ภูธนกิจ, Ph.D.

**บทคัดย่อ**

ซีโรโตนินเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของรังไข่ขณะที่ออกโทปามีนเกี่ยวข้องกับการบีบตัวของกล้ามเนื้อรังไข่ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน สารสื่อประสาทเหล่านี้แสดงบทบาทหน้าที่โดยผ่านตัวตอบรับของมัน การเข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ตัวตอบรับเหล่านี้จึงมีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตกุ้งกุลาดำได้ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อรูปที่สามด้านในของตัวตอบรับซีโรโตนินและออกโทปามีนของกุ้งกุลาดำเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนและบทบาทหน้าที่ของตัวตอบรับเหล่านี้ในกุ้งกุลาดำ ดังนั้นดีเอ็นเอของรูปที่สามด้านในของตัวตอบรับซีโรโตนิน (329 คู่เบส) และออกโทปามีน (363 คู่เบส) ถูกโคลนเข้าไปในอี๊กเพรสชันเวกเตอร์ โปรตีนรูปที่สามด้านในของตัวตอบรับซีโรโตนินที่มีขนาด 12 กิโลดาลตันและฟิวชันโปรตีน GST-i3-OA ที่มีขนาด 41 กิโลดาลตันถูกนำไปใช้ในการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีในหนู โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อรูปที่สามด้านในของตัวตอบรับซีโรโตนินถูกนำไปศึกษาในกุ้งกุลาดำ จากผลของ western blot analysis พบว่าแอนติบอดีตัวนี้สามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาด 45-50 กิโลดาลตันของรังไข่แต่ละช่วงของกุ้งกุลาดำ โดยที่ระดับการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจากช่วงที่หนึ่งถึงช่วงที่สี่แล้วลดลงหลังจากกุ้งวางไข่ นอกจากนี้แล้วแอนติบอดีตัวนี้สามารถจับกับโปรตีนที่มีขนาดเดียวกันที่อวัยวะอื่นๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ เส้นประสาทส่วนอก หัวใจ กระเพาะ และ ลิมฟอยด์ หลังจากนั้นยังสามารถระบุตำแหน่งการแสดงออกของตัวรับซีโรโตนินในระดับเซลล์ของแต่ละช่วงการเจริญเติบโตของรังไข่โดยใช้ immunohistochemistry ทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าตัวตอบรับของซีโรโตนินน่าจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการเจริญเติบโตของรังไข่รวมทั้งหน้าที่อื่นๆในกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อรูปที่สามด้านในของตัวตอบรับออกโทปามีนมีระดับไโตเตอร์ต่ำ จึงไม่สามารถนำมาใช้ศึกษาในกุ้งกุลาดำ

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST BLACK TIGER PRAWN AMINERGIC RECEPTORS**

SUTHASINEE SOMYONG 4536673 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D., WITON TIRASOPHON, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D.

**ABSTRACT**

Serotonin (5-HT) induces ovarian maturation whereas octopamine (OA) induces ovarian muscle contraction in crustaceans. Both neurotransmitters mediate their physiological functions through their aminergic receptors. Thus, understanding both aminergic receptors is essential for improving prawn production. This research is intended to generate polyclonal antibodies against the third intracellular loop (i3) of putative 5-HT and OA receptors from *P. monodon* and to use them for localization and characterization their functions in *P. monodon*. The i3 loops of 5-HT (329 bp) and OA (363 bp) receptors were cloned into an expression vector. Polyclonal antibodies against the i3-5-HT<sub>1P<sub>em</sub></sub> receptor and against the i3-OA<sub>P<sub>em</sub></sub> receptor were generated by immunizing mice with i3-5-HT protein (12 kDa) and OA fusion protein (41 kDa), respectively. The antibody against the i3-5-HT<sub>1P<sub>em</sub></sub> receptor was successfully characterized in *P. monodon*. Western blot analysis showed the antibody bound specifically to a membrane protein about 45 to 50 kDa of the ovary of *P. monodon* undergoing stage I, II, III, IV and the spent phase of ovarian maturation. The expression of the 5-HT receptor protein was progressively increased from stage I to IV and reduced during the spent phase. In addition, the 5-HT receptor protein was expressed in muscle, thoracic ganglia, heart, stomach and lymphoid. Immunohistochemistry on the paraffin sections of ovary undergoing stage I to IV demonstrated positive signal of 5-HT receptor expression. It is suggested that the 5-HT receptor may be involved in ovarian maturation and other physiological functions in *P. monodon*. In contrast, the antibody against the i3-OA<sub>P<sub>em</sub></sub> receptor has very low titer. Therefore, it was not successfully characterized in *P. monodon*.

**KEY WORDS: 5-HT RECEPTOR / OCTOPAMINE RECEPTOR / POLYCLONAL ANTIBODIES / PENAEUS MONODON**