

**PROTEOMIC ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN  
*Penaeus vannamei* HEMOCYTES UPON TAURA SYNDROME  
VIRUS INFECTION**

**PHATTARA-ORN CHONGSATJA**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในเม็ดเลือดของกุ้งขาวซึ่งติดเชื้อไวรัสทอราซินโครมในเชิง  
โปรตีโอม (PROTEOMIC ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN *Penaeus*  
*vannamei* HEMOCYTES UPON TAURA SYNDROME VIRUS INFECTION)

ภัทรอร จงส์จจา 4636872 MBMG/D

ปร.ด. (อณุปันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชาติชาย กฤตณัย, Ph.D., ALBERT J. KETTERMAN,  
Ph.D., กนกพร ไตรวิทยากร, Ph.D., วิชญ์ ธิระโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตอบสนองเชิงโมเลกุลของการติดเชื้อไวรัสทอราซินโครมในเม็ดเลือดของกุ้งขาว เพื่อค้นหาชนิดของโปรตีนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่ระยะเวลาต่างๆ ของการติดเชื้อ โดยการสกัดแยกโปรตีนจากเม็ดเลือดของกุ้งขาว และวิเคราะห์บนแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์แบบสองมิติ จากนั้นทำการระบุชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกด้วยแมสสเปกโตรเมทรี ผลการวิจัยเบื้องต้นพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนจำนวน 8 ชนิดเพิ่มขึ้นและ 5 ชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกนั้นมีบทบาทที่สำคัญแตกต่างกันออกไป เมื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับของ mRNA และโปรตีนชนิด 14-3-3 พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นมากและสอดคล้องกัน เป็นที่น่าสนใจว่า โปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกหลายแห่งบนแผ่นเจลเป็นส่วนต่างๆของ hemocyanin จากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรีพบว่าตำแหน่งทางฝั่งที่แสดงความเป็นกรดมีจุดของ hemocyanin ด้าน C- อยู่มากกว่าด้าน N- ซึ่งการทดลองนี้พบว่าสามในสี่ของ hemocyanin ด้าน C- มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่สองในสามของ hemocyanin ด้าน N- มีการแสดงออกที่ลดลง จากการทำนายพบว่า hemocyanin ด้าน C- มีตำแหน่งที่สามารถจับกับโปรตีน kinase (Erk D-domain) ได้ และมีกรดอะมิโน serine ซึ่งสามารถเติมหมู่ฟอสเฟตได้ 7 แห่ง ในขณะที่ hemocyanin ด้าน N- มีเพียง 2 แห่งเท่านั้น ผลการทดลองเหล่านี้ชี้แนะว่า hemocyanin ด้าน C- และ N- น่าจะแสดงบทบาทที่แตกต่างกันในกระบวนการทำงานของเม็ดเลือดกุ้ง ซึ่งการวิจัยเพิ่มเติมในประเด็นดังกล่าว จะนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับการตอบสนองเชิงโมเลกุลของเม็ดเลือดกุ้งต่อการติดเชื้อไวรัสทอราซินโครมที่มากขึ้น

PROTEOMIC ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN *Penaeus vannamei*  
HEMOCYTES UPON TAURA SYNDROME VIRUS INFECTION

PHATTARA-ORN CHONGSATJA                      4636872 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., ALBERT J.  
KETTERMAN, Ph.D., KANOKPORN TRIWITAYAKORN, Ph.D., WITON  
TIRASOPHON, Ph.D.

ABSTRACT

Taura Syndrome Virus (TSV) was isolated and partially purified from the hemolymph of infected *Penaeus vannamei* by using Ficoll® density gradients. TSV was detected in infected hemocytes after 4 hours post-infection by RT-PCR amplification. The detected quantity increased with longer times of infection, indicating propagation and accumulation of virus in the infected shrimp.

To understand the molecular responses of crustacean hemocytes to TSV infection, the study applied a gel-based proteomics approach to investigate changes in expression levels of hemocytic proteins in *P. vannamei* upon TSV infection. At 24 hours post-infection, quantitative intensity analysis of 2-D gel and nanoLC-ESI-MS/MS revealed that 11 forms of 8 proteins were significantly up-regulated, whereas 9 forms of 5 proteins were significantly down-regulated in the infected shrimp. These altered proteins are involved in host defense mechanisms (hemocyanin, catalase, carboxylesterase, transglutaminase and glutathione transferase), signal transduction (14-3-3 zeta), carbohydrate metabolism (acetylglucosamine pyrophosphorylase), cellular structure and integrity (beta-tubulin, beta-actin, tropomyosin and myosin), and ER-stress response (protein disulfide isomerase). Semi-quantitative RT-PCR and Western blot analysis confirmed the up-regulation of 14-3-3 at both mRNA and protein levels. Interestingly, several altered protein spots were identified as fragments of hemocyanin. Mass spectrometric analysis of the hemocyanin spots present at the more acidic region identified peptides covering residues only at the C-terminus of hemocyanin. In contrast, the hemocyanin spots present at the less acidic area had sequence coverage only at the N-terminus of hemocyanin. Bioinformatic calculation clearly confirmed that theoretical *pI* of a C-terminal hemocyanin fragment was more acidic (spot #7; *pI* = 4.81) than that of an N-terminal hemocyanin fragment (spot #15; *pI* = 5.64). As 3/4 of C-terminal fragments and 2/3 of N-terminal hemocyanin fragments were up- and down-regulated, respectively, these two terminal fragments could have different functional roles in a viral infected shrimp.

KEY WORDS: *Penaeus vannamei* / PROTEOMIC ANALYSIS / HEMOCYTES /  
TAURA SYNDROME VIRUS / VP1 / HEMOCYANIN / nanoLC-  
ESI-MS/MS

173 pp.