PROTEOMIC ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN MUD CRAB (*Scylla olivacea*) HEMOCYTES UPON WHITE SPOT SYNDROME VIRUS INFECTION

SUNSANEE YOOJUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในเม็ดเลือดปูทะเลที่ติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว
(PROTEOMIC ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN MUD CRAB (*Scylla olivacea*) HEMOCYTES UPON WHITE SPOT SYNDROME VIRUS INFECTION)

ศันสนีย์ อยู่จันทร์ 4837235 MBMG/M
วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชาติชาย กฤตนัย, Ph.D., กัลยาณ์ ศรีธัญญลักษณา, Ph.D., วิฑูรย์ ถิระโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

ไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (WSSV) สามารถก่อให้เกิดโรคติดต่อในสัตว์น้ำจำพวก crustacean โดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งในจีนัส penaeid เป็นผลให้กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเกิดการตายอย่างรวดเร็วและเกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลกและในปัจจุบันโรคนี้ยังไม่มีการรักษาที่ได้ผล ปรากฏการณ์หนึ่งที่น่าสนใจได้แก่การพบว่าปูทะเลสามารถติดเชื้อไวรัสนี้ได้แต่ไม่แสดงอาการหรือเกิดการตายจากโรคดังเช่นในกุ้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงการตอบสนองของระบบภูมิกันของปูทะเลที่มีต่อการติดเชื้อ WSSV

จากการฉีดเชื้อ WSSV เข้าทางกล้ามเนื้อของปูทะเล (*Scylla olivacea*) และทำการตรวจสอบโดยการวิเคราะห์แบบ Nested-PCR และ Western blot พบว่าผลของ Nested-PCR ในตัวอย่างน้ำเลือดของปูแสดงถึงการติดเชื้อในระดับรุนแรงตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 13 หลังการฉีดเชื้อแต่ไม่มีการแสดงอาการของโรค อย่างไรก็ตามผลจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot พบโปรตีน VP28 ในเม็ดเลือดของปูที่มีการติดเชื้อ WSSV ระดับรุนแรงตั้งแต่วันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อ และพบว่ามีปริมาณมากขึ้นเมื่อการติดเชื้อนานขึ้น ผลการทดลองเหล่านี้ได้ยืนยันถึงการติดเชื้อไวรัสและลักษณะการเป็นตัวพาหะของ WSSV ในปู

เพื่อศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปูต่อการติดเชื้อ WSSV การแสดงออกของโปรตีนในเม็ดเลือดปูระหว่างสภาวะติดเชื้อ WSSV และสภาวะควบคุมได้ถูกนำมาเปรียบเทียบเพื่อศึกษาชนิดและปริมาณที่มีความแตกต่างกันผลโดยการวิเคราะห์ทางด้าน Proteomic พบว่ามีโปรตีน 5 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นภายหลังการติดเชื้อ เมื่อทำการระบุชนิดของโปรตีนเหล่านี้ด้วยเทคนิค nanoLC-ESI MS/MS พบว่าโปรตีน 2 ชนิด ถูกระบุว่าเป็น cryptocyanin และ tropomyosin เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีนของโปรตีนทั้งสองนี้โดยการวิเคราะห์ Semi-quantitative RT-PCR พบว่าระดับ mRNA ของทั้งสองยีนมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แม้ว่าหน้าที่ของทั้งสองโปรตีนอาจจะไม่ได้เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยตรงแต่จากการศึกษานี้คาดว่าหน้าที่ของโปรตีนทั้งสองอาจจะมีส่วนสำคัญที่เอื้อต่อการอาศัยของไวรัส WSSV ในปูทะเลที่เป็นพาหะ

96 หน้า

Copyright by Mahidol University

PROTEOMIC ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN MUD CRAB (*Scylla olivacea*) HEMOCYTES UPON WHITE SPOT SYNDROME VIRUS INFECTION

SUNSANEE YOOJUN 4837235 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., KALLAYA SRITUNYALUCKSANA, Ph.D., WITOON TIRASOPHON, Ph.D.

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is a highly infectious pathogen for many crustacean species, especially for penaeid shrimps. Currently, there is no effective treatment of the disease available. While the virus can result in high mortality and economic loss in shrimp culture worldwide, WSSV infection in a carrier host such as mud crabs causes neither clinical symptoms nor significant mortality. The immune mechanism is known to prevent and reduce any damage from disease agent invasion. Thus, the immune response of the crab upon WSSV infection was investigated in this study.

The WSSV infection with intramuscular injection in the mud crab (*Scylla olivacea*) was determined by Nested-PCR and Western blot analysis. The WSSV detection in the crab hemolymph with Nested-PCR showed a severe level of WSSV infection from 1 to 13 dpi without exposing signs of the disease. In addition, VP28 signal in Western blot was observed in the hemocytes of the severely infected crabs since 7 dpi and obviously increased at the extended infection time. These results imply the susceptibility and carrier property of the crab to WSSV infection.

To investigate the defense response of the crab to WSSV infection, the protein expression of crab hemocytes between WSSV infected and control condition was investigated by proteomic analysis. Three protein spots revealed significantly up-regulated of 1.8 fold. Two protein spots were presented only in infected-WSSV hemocytic protein profiles. One of the up-regulated proteins spots was identified as cryptocyanin using nanoLC-ESI MS/MS technique. In addition, tropomyosin was also identified only in the WSSV-infected condition. These proteins were further examined in transcriptional level for both conditions in the crab hemocytes by semi-quantitative RT-PCR analysis. The result revealed up-regulated mRNA levels of cryptocyanin and tropomyosin, respectively. Although the known functions of the tropomyosin and cryptocyanin are not directly involved in immune mechanism, the potential roles of these proteins may enhance accommodation of WSSV in the mud crab.

KEY WORDS : WHITE SPOT SYNDROME VIRUS/ PROTEOMIC ANALYSIS/ MUD CRAB/ HEMOCYTES

96 pp.

Copyright by Mahidol University