ว.วิทย. มข. 43(4) 726-737 (2558) KKU Sci. J. 43(4) 726-737 (2015)

คุณสมบัติของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว

Properties of Phenoloxidase and Its Response to Challenging by White Spot Syndrome Virus in *Litopenaeus vannamei*

นงเยาว์ เทพยา[1] *พันทิพา รุณแสง*[1] *พรรณี อัศวตรีรัตนกุล*[1] *และ ประภาพร อุทารพันธุ์*[1*]

บทคัดย่อ

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นรูปแบบที่ active ของโปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของครัสเตเชียน รวมทั้งกุ้งที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรค ในงานวิจัยนี้ ได้ทำให้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase, PO) บริสุทธิ์บางส่วนจากฮีโมไซท์ของกุ้งขาวโดยการแยกด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose และการทำโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม พบว่าเอนไซม์ PO บริสุทธิ์บางส่วนมีมวลโมเลกุล 457 kDa เมื่อวิเคราะห์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ และมีจลนศาสตร์แบบไฮเพอร์โบลา โดยมีค่า K_M และ V_{max} สำหรับ L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) เป็น 10 mM และ 0.014 A490/min ตามลำดับ และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท dopamine, catechol และ pyrogallol แต่ไม่จำเพาะต่อ tyrosine เอนไซม์ PO นี้ถูกกระตุ้นได้ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ลามินาริน ลิโพโพลีแซคคาไรด์และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ในการศึกษาการตอบสนองของเอนไซม์ PO ต่อการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) พบว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในฮีโมไซท์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย WSSV เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเพิ่มสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด แล้วมีค่าลดลง ในขณะที่กุ้งชุดควบคุมซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือมีระดับแอคทิวิทีไม่แตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์ PO สามารถถูกกระตุ้นได้ และอาจเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสก่อโรค

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

[*]Corresponding Author; E-mail: prapaporn.u@psu.ac.th

ABSTRACT

Phenoloxidase, an active form of prophenoloxidase (proPO), is a key enzyme of crustaceans including shrimp that plays an important role in defense mechanism against pathogenic infection. In this study, phenoloxidase from the hemocytes of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was partially purified by chromatography on Q-Sepharose column and subsequently by preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Partially purified enzyme had a molecular mass of 457 kDa determined by native PAGE. It had hyperbolar kinetics for L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) with K_M and V_{max} values of 10 mM and 0.014 A490/min, respectively. It also showed substrate specificity to dopamine, catechol and pyrogallol except tyrosine. Partially purified enzyme could be activated by trypsin, laminarin, lipopolysaccharide and sodium dodecyl sulfate. In order to study the response of this enzyme towards pathogens, white shrimp were challenged with white spot syndrome virus (WSSV). After WSSV injection, phenoloxidase activities in the hemocytes increased continuously to reach the maximum at 18 hour post-injection and then declined. In contrast, no significant differences of phenoloxidase activities were detected in the control shrimp which were injected with 0.85% NaCl in parallel. These results indicate that phenoloxidase is inducible and may be involved in a shrimp immune response against pathogenic viruses.

คำสำคัญ: เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กุ้งขาว เชื้อก่อโรค ไวรัสตัวแดงดวงขาว

Keywords: Phenoloxidase, *Litopenaeus vannamei*, Pathogen, White spot syndrome virus

บทนำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย กุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงกันมากในประเทศไทยในขณะนี้ คือ กุ้งขาว (Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*) ซึ่งเข้ามาแทนที่กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่มีการติดเชื้อก่อโรคจนทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ แต่ก็มีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยาก เพราะการเพาะเลี้ยงแบบนี้ทำให้กุ้งเครียดและอ่อนแอ จึงมักเกิดโรคระบาดที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกุ้งได้ง่าย ไวรัสที่แพร่ระบาดโดยทำให้กุ้งเกิดโรคในประเทศไทยคือโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ซึ่งก่อโรคในกุ้งขาวได้ด้วย ปัจจุบันเริ่มมีรายงานการเกิดโรคระบาดด้วยโรคตายด่วนของกุ้งขาว ซึ่งยังอยู่ในระหว่างการทำวิจัยเพื่อหาสาเหตุที่แน่ชัด แต่รายงานเบื้องต้นพบว่าน่าจะมาจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ปัจจุบัน โรคระบาดของกุ้งก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษาโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคหรือระบบอิมมูน (immune system) จึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีระบบไหลเวียนเลือด เรียกว่า ฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) เป็นแบบเปิด ระบบอิมมูนของสัตว์กลุ่มนี้ ประกอบด้วยการทำงานของเม็ดเลือดหรือเซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte) ได้แก่ การเกิดฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) หรือการกักล้อม (encapsulation) เชื้อจุลินทรีย์ที่บุกรุก เป็นต้น ครัสเตเชียนยังมีกลไกป้องกันตนเองโดยอาศัยสารน้ำ (humoral immunity) ที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด (Söderhäll and Cerenius, 1998) ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่อสัตว์เกิดการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น โปรตีนชนิดหนึ่งคือเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase, PO) ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของครัสเตเชียนจำพวกกุ้งและแมลง (Söderhäll and Cerenius, 1992) โดยเป็นเอนไซม์ในวิถีการผลิตเมลานิน (melanin) เพื่อตอบสนองด้วยการช่วยกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก ในแมลงพบเอนไซม์ PO ในฮีโมลิมฟ์ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดและพลาสมา (plasma) แต่ในครัสเตเชียนพบเอนไซม์นี้ในกรานูล (granule) ของเซลล์ฮีโมไซท์ เอนไซม์ PO มีบทบาทในการป้องกันตนเอง (Sugumaran, 1996; Söderhäll et al., 1996; Ashida and Brey, 1997) โดยการเปลี่ยนจากโปรตีนโปรฟีนอลออกซิเดสไปเป็นเอนไซม์ PO ด้วยเอนไซม์ serine protease ซึ่งถูกกระตุ้นได้ด้วยผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด เช่น เบตา-1,3-กลูแคน (β-1,3 glucan) (Hernandez-Lopez et al., 1996; Vargas-Albores et al., 1993; Medzhitov and Janeway, 2002) หรือลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopoly-saccharide, LPS) (Ashida et al., 1983) เอนไซม์ PO เร่งปฏิกิริยา *o*-hydroxylation และ oxidation ของ phenol ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดในวิถีการสร้างเมลานินและไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่บุกรุกต่อไป (Söderhäll and Cere-nius, 1992)

งานวิจัยนี้เลือกกุ้งขาวในการศึกษา และเลือก WSSV เป็นแบบจำลองของการติดเชื้อก่อโรคกุ้ง โดยมีจุด ประสงค์ที่จะศึกษาสมบัติระดับโปรตีนของเอนไซม์ PO ด้วยการทำบริสุทธิ์เอนไซม์นี้จากฮีโมไซท์ และติดตามการแสดงออกของเอนไซม์ PO ของกุ้งขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสก่อโรค ความรู้ที่ได้ในเบื้องต้นนี้อาจจะยังไม่สามารถนำไปแก้ปัญหาการติดโรคกุ้งโดยตรงได้ แต่จะเป็นข้อมูลวิจัยที่เป็นประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเซลล์ฮีโมไซท์จากเลือดของกุ้งขาว

ดูดเลือดจากกุ้งขาวแล้วผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA และ 10 mM HEPES, pH 7.5) (Gollas-Galvan et al., 1999) ทันทีในอัตราส่วน 1:1 นำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 700 x g ที่ 4 °ซ นาน 10 นาที ล้างตะกอนฮีโมไซท์ต่อโดยการแขวนลอยในบัฟเฟอร์ 10 mM sodium cacodylate, 0.45 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 26 mM $MgCl_2$, pH 7 แล้วเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง เก็บตะกอนที่ -80 °ซ เพื่อใช้ศึกษาเอนไซม์ PO ต่อไป

ในการเตรียมสารสกัดฮีโมไซท์ทำโดยโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ฮีโมไซท์ใน 10 mM sodium cacodylate, pH 7 เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 10 นาที นำส่วนใสหรือสารสกัดฮีโมไซท์ไปทำให้เอนไซม์ PO บริสุทธิ์หรือวัดแอคทิวิที (activity) ต่อไป

2. การวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ตัวอย่าง โดยใช้ L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) เป็นสับสเตรท (substrate) ดังนี้ ผสมเอนไซม์ตัวอย่างกับ 0.5 mg/ml Trypsin ในบัฟเฟอร์ CAC (10 mM cacodylate, pH 8 ที่มี 25 mM $CaCl_2$) ที่มีปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม 3 mg/ml L-DOPA ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มต่ออีก 45 วินาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ CAC ให้มีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (A_{490}) ทุกนาที นาน 5 นาที คำนวณหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO โดยกำหนดให้แอคทิวิทีของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit, U) คือค่า A_{490} ที่เปลี่ยนไป 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที

3. การย้อมแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ใน Native PAGE

เพื่อหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ PO นำเอนไซม์ตัวอย่างไปแยกด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native polyacrylamide gel electrophoresis, Native PAGE) (Davis, 1964) หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบ่งเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบลู (0.02% Coomassie blue R-250, 50% methanol, 7.5% acetic acid) เจลอีกส่วนย้อมแอคทิวิทีด้วยการแช่ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 ที่มี 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติม 10 mM L-DOPA บ่มปฏิกิริยาต่ออีก 60 นาที เมื่อเห็นแถบของเอนไซม์ชัดเจน ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น

4. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากสารสกัดฮีโมไซท์

ทำให้เอนไซม์ PO บริสุทธิ์จากสารสกัดฮีโมไซท์ด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose (ปริมาตรเจล 5 มิลลิลิตร) ที่ปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วยบัฟเฟอร์ TB (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) นำสารสกัดฮีโมไซท์ผ่านลงในคอลัมน์ Q-Sepharose ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ TB ที่มี 0-0.5 M NaCl ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ชะคอลัมน์ต่อด้วยบัฟเฟอร์ TB ที่มี 0.5 M NaCl ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO และหาปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976) รวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นและไดแอไลซ์ (dialyze) แล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย preparative PAGE (Auttarat et al., 2006) โดยแยกสารละลายเอนไซม์ PO เข้มข้นด้วย Native PAGE ในเจลทั้งแผ่น ตัดเจลเฉพาะแถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ PO นำชิ้นเจลที่ตัดไปโฮโมจีไนซ์เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 16,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ PO ด้วยการทำ Native PAGE และย้อมสีโปรตีนและย้อมแอคทิวิที

5. การทดสอบการฉีดกุ้งด้วย WSSV ที่มีผลต่อระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO

หัวเชื้อไวรัส WSSV ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ฉีดกุ้งด้วย WSSV (10^{-7} เท่าของหัวเชื้อ/ตัว) ที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง กุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ปริมาตรเท่ากัน ในการทดลองนี้ใช้กุ้ง 35 ตัวในแต่ละกลุ่มทดลอง และทำการทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำ จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ ดูดเลือดจากกุ้งแต่ละตัวที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เวลาละ 3-5 ตัว แล้วนำไปเตรียมสารสกัดฮีโมไซท์ตามวิธีข้อ 1 เพื่อหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO

ผลการวิจัย

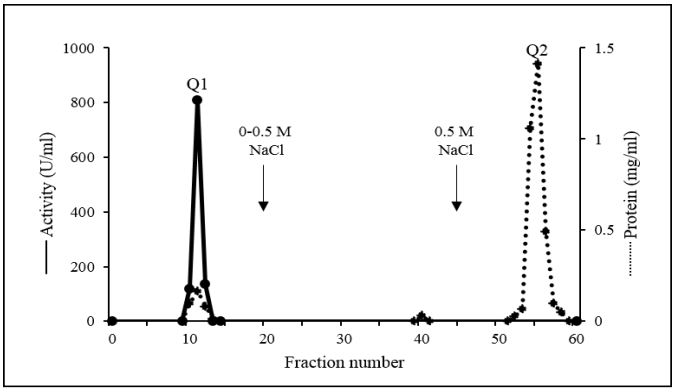
1. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO

ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากเซลล์ฮีโมไซท์ของกุ้งขาว โดยแยกสารสกัดฮีโมไซท์เริ่มต้นที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO 1,370 หน่วย/มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 1.61 มิลลิกรัม เตรียมจากเลือดกุ้งขาวปริมาตร 22 มิลลิลิตร ด้วยคอลัมน์ Q-Sepharose จากการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ TB พบว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ส่วนมาก (54%) หลุดออกมาจากคอลัมน์ในพีคแรก Q1 (peak Q1) (รูปที่ 1) เมื่อชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0-0.5 M NaCl พบว่าไม่มีเอนไซม์ PO หรือโปรตีนถูกชะออกมา แต่เมื่อชะคอลัมน์ต่อด้วย 0.5 M NaCl มีเอนไซม์ PO ถูกชะออกมาน้อยมาก ในขณะที่โปรตีนส่วนน้อย (0.17 มิลลิกรัม) ไม่จับกับคอลัมน์หลุดออกมาในพีค Q1 และโปรตีนเกือบทั้งหมดถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย 0.5 M NaCl ในพีค Q2 (รูปที่ 1) เมื่อคำนวณแอคทิวิทีจำเพาะ (specific activity) ของสารละลายเอนไซม์ PO ในพีค Q1 พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.7 เท่า และแยกเอนไซม์ได้ 54.2% ของเอนไซม์ในสารสกัดฮีโมไซท์เริ่มต้น (ตารางที่ 1) โดยพบแอคทิวิทีในพีค Q1 เป็นหลัก บ่งชี้ว่าเอนไซม์ PO ส่วนใหญ่ไม่จับกับคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีนปริมาณมากจับกับคอลัมน์ จึงเหมาะต่อการใช้คอลัมน์ Q-Sepharose เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำให้เอนไซม์ PO บริสุทธิ์

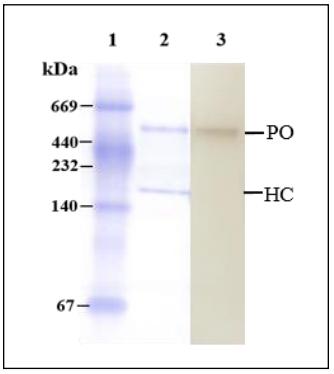
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Native PAGE พบว่าสารสกัดฮีโมไซท์เริ่มต้นปรากฏแถบโปรตีนหลักสองแถบ (รูปที่ 2 แถวที่ 2) คือแถบเอนไซม์ PO ที่ย้อมติดสีคูมาซีและสีของสับสเตรท ณ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ (แถบ PO ในรูปที่ 2) กับอีกแถบคือโปรตีนฮีโมไซยานิน (hemocyanin, HC) (รูปที่ 2) (อาจรีย์, 2552) ที่ไม่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO เมื่อนำสารละลายเอนไซม์พีค Q1 ที่มีปริมาณโปรตีนเหลือน้อยมาก ไปทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Native PAGE ปรากฏโปรตีนเพียงสองแถบคือแถบเอนไซม์ PO และยังมีแถบโปรตีนฮีโมไซยานินปนเปื้อนอยู่แม้จะมีปริมาณน้อยลง (ไม่ได้แสดงผลไว้) แสดงว่าคอลัมน์ Q-Sepharose สามารถกำจัดโปรตีนส่วนใหญ่รวมทั้งฮีโมไซยานินออกไป แต่ยังแยกไม่ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ จึงนำสารละลายเอนไซม์พีค Q1 ไปแยกต่อด้วยการทำ preparative PAGE ซึ่งพบว่าสามารถแยกเอนไซม์ PO ได้บริสุทธ์มากขึ้น เพราะมีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 6.5 เท่าของเอนไซม์ในสารสกัดฮีโมไซท์เริ่มต้น แต่ก็สูญเสียแอคทิวิทีไปมาก เพราะแยกเอนไซม์ได้เพียง 28.1% (ตารางที่ 1) รวมทั้งมีโปรตีนเหลือเพียง 0.07 มิลลิกรัม เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Native PAGE พบแถบเอนไซม์ PO และยังมีแถบฮีโมไซยานินที่ติดสีย้อมโปรตีนจาง ๆ (ไม่ได้แสดงผลเจลที่ย้อมโปรตีนไว้เพราะรูปไม่ชัด) บ่งชี้ว่างานวิจัยนี้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากฮีโมไซท์ของกุ้งขาวได้เพียงบางส่วน (partially purified PO หรือ ppPO) แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ ppPO ที่แยกได้แม้มีปริมาณโปรตีนน้อยแต่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO มาก (รูปที่ 2 แถวที่ 3 และตารางที่ 1) จึงนำไปศึกษาสมบัติของเอนไซม์ ppPO ในข้อต่อ ๆ ไป

ตารางที่ 1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากสารสกัดฮีโมไซท์ (เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ)

Preparation	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Hemocyte lysate	848	100	1
Q-Sepharose peak Q1	3,985	54.2	4.7
Preparative PAGE eluate	5,512	28.1	6.5



รูปที่ 1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากสารสกัดฮีโมไซท์โดยคอลัมน์ Q-Sepharose



รูปที่ 2 แบบแผนโปรตีนและแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ใน Native PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน; แถวที่ 2 สารสกัดฮีโมไซท์; แถวที่ 3 เอนไซม์ ppPO ที่ได้จากการทำ preparative PAGE และย้อมแอคทิวิที

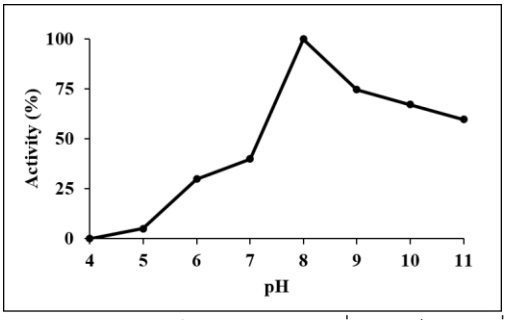
2. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ PO บริสุทธิ์บางส่วน (ppPO)

เนื่องจากเอนไซม์ ppPO ที่แยกได้มีปริมาณโปรตีนน้อยมาก จึงไม่สามารถหามวลโมเลกุลโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) ได้ งานวิจัยนี้จึงหามวลโมเลกุลของเอนไซม์ ppPO โดยวิธี Native PAGE ทำควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด คือ thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), lactate dehydrogenase (140 kDa) และ bovine serum albumin (67 kDa) พบว่าเอนไซม์ ppPO ของกุ้งขาวมีมวลโมเลกุล 457 kDa

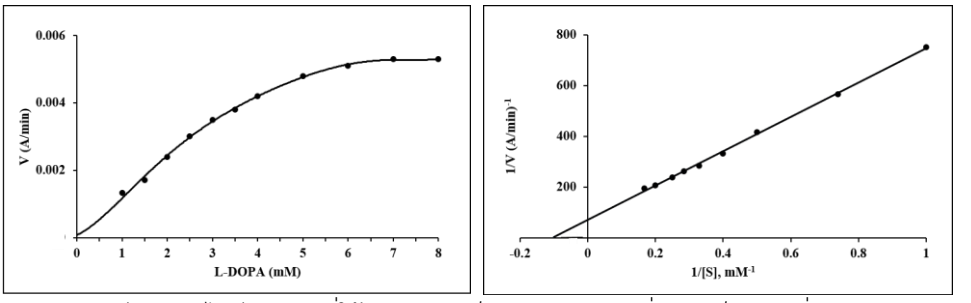
จากการศึกษาผลของ pH ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ ppPO ด้วยการวัดแอคทิวิทีในบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่าง ๆ ในระหว่าง pH 4-11 พบว่าเอนไซม์ ppPO ไม่มีแอคทิวิทีที่ pH 4 แต่มีแอคทิวิทีเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก pH 5 จนมีค่าสูงสุดที่ pH 8 แล้วมีแอคทิวิทีลดลง ที่ pH 9-11 (รูปที่ 3)

ในการศึกษาจลนศาสตร์และความจำเพาะของเอนไซม์ ppPO ต่อสับสเตรทโดยการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ ppPO เมื่อใช้สับสเตรท 5 ชนิด ได้แก่ L-DOPA, catechol, dopamine, tyrosine และ pyrogallol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วคำนวณหาค่า K_M และ V_{max} จากกราฟแบบ Lineweaver-Burk พบว่าเอนไซม์ ppPO สามารถเร่งปฏิกิริยาของ

สับสเตรท L-DOPA, catechol, dopamine, และ pyrogallol ได้ แต่ไม่สามารถใช้ tyrosine เป็นสับสเตรท โดยแสดงจลนศาสตร์ของสับสเตรททั้ง 4 ชนิดแบบ hyperbola (รูปที่ 4) ซึ่งมีค่า K_M และ V_{max} สรุปรวมอยู่ในตารางที่ 2 เอนไซม์ ppPO ของกุ้งขาวมีความ จำเพาะ (K_M) ต่อ pyrogallol มากสุดแล้วลดลงตามลำดับดังนี้คือ catechol, L-DOPA และ dopamine และเร่งปฏิกิริยาด้วยความเร็วสูงสุด (V_{max}) สำหรับ L-DOPA ได้ดีกว่าสับสเตรทอีก 3 ชนิด



รูปที่ 3 ผลของ pH ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ ppPO (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)



รูปที่ 4 จลนศาสตร์ของเอนไซม์ ppPO ที่ใช้ L-DOPA เป็นสับสเตรท (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)

ตารางที่ 2 ค่า K_M and V_{max} ของเอนไซม์ ppPO

Substrates	K_M (mM)	V_{max} (A/min)
L-DOPA	10.0	0.014
Dopamine	23.8	0.005
Catechol	5.0	0.002
Pyrogallol	2.4	0.007

ในการศึกษาผลของตัวกระตุ้น ด้วยการบ่มเอนไซม์ ppPO กับกระตุ้นแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เท่ากัน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้ววัดแอคทิวิทีเปรียบเทียบกับแอคทิวิทีในภาวะที่ไม่มีตัวกระตุ้น พบว่า LPS กระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ ppPO ได้ดีที่สุด (68.5 เท่า) รองลงมาตามลำดับคือ เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) (45 เท่า) SDS (23 เท่า) และลามินาริน (2.6 เท่า) ส่วน urea ไม่กระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ ppPO

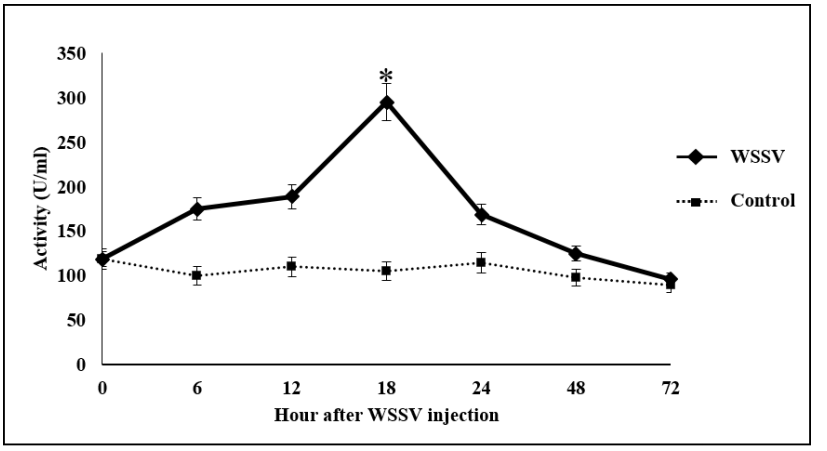
3. การศึกษาผลการฉีด WSSV ต่อระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในเลือดของกุ้งขาว

จากการศึกษาผลของการฉีดกุ้งขาวด้วย WSSV ปริมาณตัวละ 1×10^{-7} เท่าของปริมาณหัวเชื้อ ซึ่งเป็นปริมาณที่กระตุ้นให้กุ้งกุลาดำเกิดโรค (กิจการ

และคณะ, 2542) พบแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในฮีโมไซท์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากชั่วโมงที่ 0 จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 หลังการฉีด จากนั้นมีระดับลดลงตามลำดับที่ชั่วโมง 24-72 (รูปที่ 5) ในขณะที่เอนไซม์ PO ของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือมีแอคทิวิทีในฮีโมไซท์ไม่แตกต่างกันตลอดช่วงเวลา 0-72 ชั่วโมง บ่งชี้ว่า เอนไซม์ PO มีระดับแอคทิวิทีเปลี่ยนแปลงในฮีโมไซท์ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสก่อโรค

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากฮีโมไซท์ของกุ้งขาวได้เพียงบางส่วน (ppPO) และแม้จะมีโปรตีนฮีโมไซยานินปนเปื้อนอยู่บ้าง แต่ฮีโมไซยานินของกุ้งขาวไม่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO (รูปที่ 2 แถวที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับของกุ้งคุรุมา (Kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*) ที่รายงานโดย Masuda et al. (2012) หรือของหอยแครง (*Chlamys farreri*) (Xing et al., 2012) ที่พบว่าฮีโมไซยานินไม่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ดังนั้นการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ ppPO จึงสะท้อนสมบัติของเอนไซม์ PO จริง ไม่ใช่ของโปรตีนฮีโมไซยานินที่ปนเปื้อน มีรายงานการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งนาง (crayfish *Pacifastacus leniusculus*) โดยคอลัมน์ Blue-Sepharose ตามด้วยคอลัมน์ Phenyl-Sepharose และคอลัมน์ Superose 6 FPLC (Aspan and Söderhäll, 1991) มีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากหอยสองฝา (*Ruditapes philippinarum*) โดยคอลัมน์ Q-Sepharose ตามด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-100 (Cong et al., 2005) และ Gollas-Galvan et al. (1999) ทำบริสุทธิ์โปรฟีนอลออกซิเดสจากกุ้ง *Penaeus californiensis* ได้โดยวิธี ultracentrifugation และต่อด้วยคอลัมน์ Blue-Sepharose นอกจากนี้ มีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO จากพลาสมาของกุ้งคุรุมาด้วยการตกตะกอนด้วย ammouim sulfate ตามด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุและเจลฟิลเทรชัน ตามลำดับ แต่รายงานดังกล่าวไม่ได้แสดงรายละเอียดของผลการแยกเอนไซม์ PO ไว้ (Masuda et al., 2012) จะเห็นว่าการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ PO ส่วนมากใช้หลายขั้นตอน งานวิจัยนี้ไม่ได้ทำบริสุทธิ์ต่อจนได้เอนไซม์บริสุทธิ์เพราะทำให้สูญเสียเอนไซม์ไปในแต่ละขั้นตอนมาก



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในฮีโมไซท์ของกุ้งที่ฉีดด้วย WSSV หรือกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ (*มีนัยสำคัญที่ระดับ $p<0.5$)

จากการหามวลโมเลกุลของเอนไซม์ ppPO ของกุ้งขาวโดยวิธี Native PAGE พบว่ามีขนาด 457 kDa ในกรณีที่โปรตีนมีขนาดใหญ่มาก การหามวลโมเลกุลโดย Native PAGE เป็นที่ยอมรับในวารสารระดับนานาชาติ (Auttarat et al., 2006) มีรายงานเกี่ยวกับมวลโมเลกุลของเอนไซม์ PO ในรูปไม่แปลงสภาพ (native form) น้อยมาก มีรายงานมวลโมเลกุลของเอนไซม์ PO บริสุทธิ์ที่หาโดยวิธีเจลฟิลเทรชันเฉพาะของกุ้งคุรุมาเท่านั้น ซึ่งมีขนาด 509 kDa (Masuda et al., 2012) รายงานส่วนมากหามวลโมเลกุลของเอนไซม์ PO ด้วยวิธี SDS-PAGE อย่างไรก็ตาม พบว่าเอนไซม์ PO ของกุ้งขาวมีขนาดเล็กกว่าของกุ้งคุรุมา ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากเอนไซม์ ppPO ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์ จึงไม่สามารถหามวลโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ PO ที่ทำให้บริสุทธิ์จากครัสเตเชียนส่วนใหญ่ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวของหน่วยย่อยที่เป็นโมโนเมอร์ (monomer) ซึ่งมีมวลโมเลกุลในช่วง 60-77 kDa ใน SDS-PAGE (Hara et al., 1993; Fujimoto et al., 1993; Liu et al., 2006) เช่นเอนไซม์ PO ของกุ้งนางเป็นโมโนเมอร์ขนาด 76 kDa (Aspan and Söderhäll, 1991) เอนไซม์ PO บริสุทธิ์จากกุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) เป็นโมโนเมอร์ขนาด 133 kDa (Fan and Wang, 2002) สำหรับของกุ้ง *P. californiensis* เป็นโมโนเมอร์ขนาด 114 kDa และพบเป็น aggregated form ที่มีขนาด 205 kDa (Gollas-Galvan et al., 1999) ส่วนเอนไซม์ PO ของกุ้งคุรุมาปรากฏแถบเดียวที่มีขนาด 80 kDa ใน SDS-PAGE บ่งชี้ว่า native form (509 kDa) ของเอนไซม์ PO ของกุ้งคุรุมาจัดเป็น hexamer (Masuda et al., 2012)

จากการศึกษาผลของ pH พบว่าเอนไซม์ ppPO ของกุ้งขาวทำงานได้ดีสุดที่ pH 8 คล้ายกับเอนไซม์ PO บริสุทธิ์ของกุ้ง *P. californiensis* (Gollas-Galvan et al., 1999) และกุ้ง *Penaeus setiferus* (Simpson et al., 1987) ที่มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 8.0 และ pH 7.5 ตามลำดับ ในหอยสองฝา (*R. philippinarum*) มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 7.0 (Cong et al., 2005) ส่วนเอนไซม์ของกุ้งกุลาดำทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 (Rolle et al., 1991) กล่าวได้ว่าเอนไซม์ PO สามารถทำงานได้ดีที่ pH เป็นกลางและเป็นเบส

เอนไซม์ ppPO ของกุ้งขาวมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็น L-DOPA, catechol, dopamine และ pyrogallol และมีค่า K_M และ V_{max} ต่อสับสเตรทเหล่านี้คล้ายกับของกุ้งอื่น ๆ อาทิเช่น เอนไซม์ PO ของกุ้ง *P. californiensis* มีค่า K_M ต่อสับสเตรท L-DOPA, catechol และ tyrosine เป็น 2.50, 2.89 และ 4.15 mM ตามลำดับ (Gollas-Galvan et al., 1999) เอนไซม์ PO ของกุ้งคุรุมาและกุ้งขาวจีนมีค่า K_M ต่อ L-DOPA เป็น 3.45 mM และ 1.99 mM ตามลำดับ (Fan and Wang, 2002) เช่นเดียวกับเอนไซม์ PO ของ brine shrimp (*Artemia sinica*) มีค่า K_M ต่อ L-DOPA และ catechol เท่ากับ 4.20 และ 10.9 mM ตามลำดับ (Fan et al., 2011) ของปูม้า (*Charybdis japonica*) เมื่อใช้สับสเตรท L-DOPA และ catechol มีค่า K_M เป็น 3.41 และ 7.97 mM ตามลำดับ (Liu et al., 2006) ในหอยสองฝา (*R. philippinarun*) เอนไซม์ PO มีความจำเพาะต่อสับสเตรท L-DOPA และ tyrosine โดยมีค่า K_M เท่ากับ 2.2 mM และ 6.0 mM ตามลำดับ (Cong et al., 2005) แต่เอนไซม์ ppPO ของกุ้งขาวไม่สามารถใช้ tyrosine (monophenol) เป็นสับสเตรทได้ บ่งชี้ว่าเป็น diphenol oxidase ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ PO ในกุ้งจัดเป็น diphenol oxidase มากกว่าเป็น monophenol oxidase (Gollas-Galvan et al., 1999)

เอนไซม์ ppPO ของกุ้งขาวถูกกระตุ้นได้โดย LPS ดีกว่าเอนไซม์ทริปซิน SDS และลามินาริน โดยไม่ถูกกระตุ้นโดย urea ซึ่งต่างจากรายงานของ Lai et al. (2005) ที่พบว่า SDS กระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในกุ้งขาวได้ดีที่สุด ส่วนเอนไซม์ทริปซินกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ได้ดีกว่าลามินารินและ LPS (Lai et al., 2005) และต่างจากเอนไซม์ PO ของกุ้ง *P. californiensis* ที่แอคทิวิทีถูกกระตุ้นได้โดยลามินาริน แต่ไม่ถูกกระตุ้นโดย LPS (Hernandez-Lopez et al., 1996) งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์ทริปซิน ลามินาริน (หรือ เบตากลูแคน) และ LPS รวมทั้ง SDS สามารถกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ของกุ้งขาวได้

จากการศึกษาผลของการฉีดกุ้งขาวด้วยไวรัสก่อโรคกุ้งชนิด WSSV (Lightner, 1999) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ในขณะที่แอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ในฮีโมไซท์ของกุ้งที่ฉีดด้วย WSSV มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 หลังการฉีด บ่งชี้ว่าระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ PO ที่เปลี่ยนแปลงเป็นการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสก่อโรค โดยมีรายงานรูปแบบการตอบสนองในทำนองคล้ายกันของเอนไซม์ PO ที่เพิ่มขึ้นและลดลงตามเวลาจากการฉีดกุ้งก้ามกราม (*Macrobra-chium rosenbergii*) ด้วยแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* (Arockiaraj et al., 2013) หรือการแสดงออกของยีน proPO ที่เพิ่มขึ้นและลดลงตามเวลาจากการฉีดกุ้งนางด้วย WSSV (Liu et al., 2013) จากผลการทดลองบ่งชี้ว่ายีน PO และเอนไซม์ PO มีบทบาทในระบบอิมมูนเพื่อช่วยป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคของครัสเตเชียนรวมทั้งกุ้ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน และขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และโครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาแก่นางสาวนงเยาว์ เทพยา

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ. (2542). เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

อาจรีย์ เจียวก๊ก. (2552). การศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา: 110 หน้า.

Arockiaraj, J., Gnanam, A.J., Pothikasalam, G., Milton, J., Pasupuleti, M., Bhatt, P., Palani-samy, R., Kumaresan, V., Kuppusamy, M., Thirumalai, K., Arasu, A., Sathyamoorthi, A. and Prabha, N. (2013). A novel prophenoloxidase, hemocyanin encoded copper containing active enzyme from prawn: Gene characterization. Gene 524: 139-151.

Ashida, M., Ishizaki, Y. and Iwahana, H. (1983). Activation of prophenoloxidase by bacterial cell walls or β-1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem Biophys Res Commun. 113: 562-568.

Ashida, M. and Brey, P.T. (1997). Recent advances in research on the insect prophenol-oxidase cascade. *In* Molecular Mechanism of Immune Responses in Insects. London: Chapman and Hell. pp. 135-172.

Aspan, A. and Söderhäll, K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells. and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect Biochem. 21: 363-373.

Auttarat, J., Phiriyangkul, P. and Utarabhand, P. (2006). Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguiensis*. Comp Biochem Physiol. 143B: 27-236.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.

Cong, R.S., Sun, W.J., Liu, G.X., Fan, T.J., Meng, X.H., Yang, L.L. and Zhu, L.Y. (2005). Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish Immunol. 18: 61-70.

Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis: II. Method and application to human serum protein. Ann New York Acad Sci. 121: 404-427.

Fan, T., Jing, Z., Fan, X., Yu, M. and Jiang, G. (2011). Purification and characterization of phenoloxidase from brine shrimp *Artemia sinica*. Acta Biochim Biophyc Sinica 43: 722-728.

Fan, T.J. and Wang, X.F. (2002). Purification and partial biochemical characterization of phenoloxidase from *Penaeus chinensis*. Acta Biochim Biophyc Sinica 34: 589-594.

Fujimoto, K., Masuda, K., Asada, N. and Ohnishi, E. (1993). Purification and characterization of prophenoloxidase from pupae of *Drosophila melanogaster*. J Biochem. 113: 285-291

Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J. and Vargas-Albores, F. (1999). Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comp Biochem Physiol. 122B: 77-82.

Hara, T., Miyoshi, T. and Tsukamoto, T. (1993). Comparative studies on larval and pupal phenoloxidase of the housefly, *Musca domestica* L. Comp Biochem Physiol. 106: 287-292.

Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvin, T. and Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the pro-phenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp Biochem Physiol. 113C: 61-66.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structure protein during as sembly of head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lai, C.-Y., Cheng, W. and Kuo, C.-M. (2005). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 18: 417-430.

Lightner, D.V. (1999). The Penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV: Current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. J App Aquacul. 9: 27-52.

Liu, G., Yang, L., Fan, T., Cong, R., Tang, Z., Sun, W., Meng, X. and Zhu, L. (2006). Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. Fish Shellfish Immunol. 20: 47-57.

Liu, Y.-T., Chang, C.-I, Hseu, J.-R., Liu, K.-F. and Tsai, J.-M. (2013). Immune responses of prophenoloxidase and cytosolic manga-nese superoxide dismutase in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* against a virus and bacterium. Mol Immunol. 56: 72-80.

Masuda, T., Otomo, R., Kuyama, H., Momoji, K., Tonomoto, M., Sakai, S., Nishimura, O., Sugawara, T. and Hirata, T. (2012). A novel type of prophenoloxidase from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* contributes to the melanization of plasma in crustaceans. Fish Shellfish Immunol. 32: 61-68.

Medzhitov, R. and Janeway, Jr.C.A. (2002). Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. Science 296: 298-300.

Rolle, R.S., Guizani, N., Chen, J.S., Marshall, M.R., Yang, J.S. and Wei, C.I. (1991). Purification and characterization of phenoloxidase from Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). J Food Biochem. 15: 17-32.

Simpson, B.K., Marshall, M.R. and Otwell, W.S. (1987). Phenoloxidase from shrimp (*Penaues setiferus*): Purification and some properties. J Agri Food Chem. 35: 918-921.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. Ann Rev Fish Dis. 2: 3-23.

Söderhäll, K., and L. Cerenius. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr Opin Immunol. 10: 23-28.

Söderhäll, K., Cerenius, L. and Johansson, M.W. (1996). The prophenoloxidase activating system in invertebrates. *In* New Directions in Invertebrates Immunology. New Jersey: SOS Publications. pp. 229-254.

Sugumaran, M. (1996). Role of the insect cuticle in host defense reaction. *In* New Directions in Invertebrates Immunology. New Jersey: SOS Publications. pp. 355-374.

Vargas-Albores, F., Guzman-Murillo, M.A. and Ochoa, J-L. (1993). An anticoagulant solution for hemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp Biochem Physiol. 106A: 299-303.

Xing, J., Jiang, J. and Zhan, W. 2012. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: Purification and antibacterial activity of its reaction products generated in vitro. Fish Shellfish Immunol. 32: 89-93.

❑❑❑❑❑