

การระบุยีนที่แสดงออกในต่อมน้ำเหลืองของกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon* และที่
ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรครุนแรง



นางสาวราตรี วงศ์ปัญญา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-5293-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED IN LYMPHOID ORGANS OF
THE BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* AND IN RESPONSE TO
SEVERE PATHOGENS**

Miss Ratre Wongpanya

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biochemistry**

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-5293-8

481770

Thesis Title IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED IN LYMPHOID
ORGANS OF THE BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus
monodon* AND IN RESPONSE TO SEVERE PATHOGENS

By Miss Ratee Wongpanya

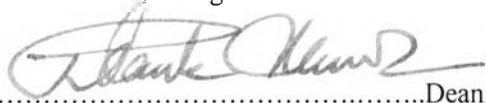
Field of study Biochemistry

Thesis Advisor Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.

Thesis Co-advisor Professor Takashi Aoki, Ph.D.

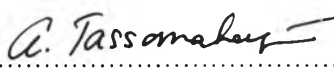
Thesis Co-advisor Associate Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.

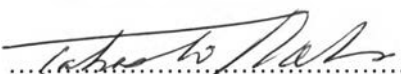
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Doctor's Degree



.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

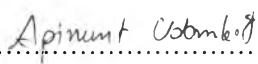

.....Chairman
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

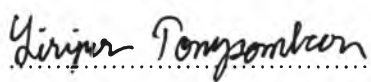

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Professor Takashi Aoki, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Apinunt Udomkit, Ph.D.)


.....Member
(Siriporn Pongsomboon, Ph.D.)

ราตรี วงศ์ปัญญา: การระบุยีนที่แสดงออกในต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* และที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรครุนแรง (IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED IN LYMPHOID ORGANS OF THE BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* AND IN RESPONSE TO SEVERE PATHOGENS) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.อัญชลี ทัศนขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ศ.ดร.Takashi Aoki และ รศ.ดร.วิเชียร ริมพณิชยกิจ: 164 หน้า ISBN 974-17-5293-8

การสร้างห้องสมุด cDNA จากลิมโฟซัยต์ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ปกติและกุ้งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* โอฮาไวอาเพื่อหา ยีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อดังกล่าวโดยอาศัยเทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) พบโคลนจากห้องสมุด cDNA ของกุ้งปกติและของกุ้งที่ถูกกระตุ้นจำนวน 3.2×10^7 และ 3.1×10^6 โคลน ตามลำดับ จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการสุ่มเลือกโคลนจำนวน 446 โคลน และ 642 โคลน จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งปกติและของกุ้งที่ถูกกระตุ้น แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า โคลนจำนวน 180 โคลน (40.4%) จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งปกติ และ 286 โคลน (44.5%) จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งที่ถูกกระตุ้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับยีนที่มีรายงานแล้วโดยเป็นยีนที่แตกต่างกัน 283 ยีน ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน 28 ชนิด เช่น ยีนในระบบโปรตีนออกซิเดส ยีนของสารต้านจุลชีพ โปรตีนเอสและตัวยับยั้งโปรตีนเอส และ โปรตีนฮิสซ็อก เป็นต้น นอกจากนี้ ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดกุ้งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสจุดขาวและเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* โอฮาไวอาด้วยเทคนิค cDNA microarray โดย cDNA chip ที่ใช้ประกอบด้วยยีนที่แยกได้จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งกุลาดำ จำนวน 718 ยีน และจากห้องสมุด cDNA ของกุ้งครุมา (*Marsupenaeus japonicus*) จำนวน 308 ยีน โดยทำการศึกษาในกุ้งที่ถูกกระตุ้นที่ 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ในกุ้งกุลาดำที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสจุดขาว มียีนที่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกจำนวนมากที่สุด (135 ยีน) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Vibrio* โอฮาไวอา มียีนที่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกจำนวนมากที่สุด (156 ยีน) ที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยในการศึกษานี้ได้เลือกยีนที่มีการแสดงออกสูง ได้แก่ ยีนคาโมดูลิน เอเซียโลไกลโคโปรตีนรีเซปเตอร์ และทูลิน และยีนของโปรตีนที่คาดว่าจับกับคาโมดูลิน ได้แก่ แคลซินูลิน ซิตซีโลคัลไคนอส 2 และ โปรตีนฟอสฟาเตส 1 มายืนยันการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค real time RT-PCR ซึ่งพบว่ายีนเหล่านี้มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในเม็ดเลือดของกุ้งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนคาโมดูลินในเม็ดเลือดกุ้งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไวรัสและแบคทีเรียด้วยเทคนิค *in situ* hybridization พบว่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดที่พบคาโมดูลินในกุ้งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสูงกว่าที่พบในกุ้งกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าเชื้อก่อโรครกระตุ้นให้กุ้งมีการสร้างคาโมดูลินในเลือดเพิ่มขึ้น การศึกษาโปรตีนคาโมดูลินโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะพบว่า มีโปรตีนคาโมดูลินในเม็ดเลือดซึ่งกระจายตัวอยู่ทั่วไปใน ส่วน cephalothorax ของกุ้งที่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย โดยเฉพาะในเหงือกและตับ นอกจากนี้ยังพบว่ามี การสร้างโปรตีนดังกล่าวอยู่บริเวณเซลล์ epithelium เช่น ลิมโฟซัยต์ เหงือกและตับด้วย ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้เป็นประโยชน์ในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งต่อไป

ภาควิชา.....ชีวเคมี
สาขาวิชา.....ชีวเคมี
ปีการศึกษา..... 2548

ลายมือชื่อนิติ.....ราตรี วงศ์ปัญญา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4472383723: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: *Penaeus monodon* / EXPRESSED SEQUENCE TAGS / REAL TIME RT-PCR / cDNA MICROARRAY / *in situ* HYBRIDIZATION

RATREE WONGPANYA: IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED IN LYMPHOID ORGANS OF THE BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* AND IN RESPONSE TO SEVERE PATHOGENS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: PROF. TAKASHI AOKI, Ph.D. AND ASSOC. PROF. VICHIEEN RIMPANITCHAYAKIT, Ph.D. 164 p. ISBN 974-17-5293-8.

Expressed sequence tag (EST) analysis was employed to identify genes from the two cDNA libraries of lymphoid organs of unchallenged and *Vibrio harveyi* challenged shrimps, *Penaeus monodon*. The number of clones were approximately 3.2×10^5 in the normal library and 3.2×10^6 in the challenged library. The 446 clones of the normal library and 642 clones of the challenged library were randomly picked and partially sequenced. One hundred and eighty (40.4%) EST clones of the normal library and 286 (44.5%) EST clones of the challenged library matched significantly with the deposited genes. Matched EST clones (466) of both libraries represented 283 different proteins. Sixty nine clones (6.34% of the total sequenced clones) representing 28 different genes were putative immune genes. These genes coded for the enzymes and proteins of the proPO system, the antimicrobial peptides, the proteinases and proteinase inhibitors, the heat shock proteins and the other immune molecules. To study the gene expression in haemocytes of white spot syndrome virus (WSSV) and *V. harveyi* challenged shrimps, the cDNA microarray analysis was employed. The cDNA chips composing of 718 unique genes from the black tiger shrimp and 308 unique genes from the kuruma shrimp were used in this study. The gene expression profiles were determined at 6, 24, 48 and 72 hours post-injection of the pathogens. The highest number of genes in response to WSSV challenge was observed (135 genes) at 24 hpi whereas those in response to *V. harveyi* challenge were observed (156 genes) at 6 hpi. Calmodulin (CaM), asialoglycoprotein receptor (ASGPR) and tubulin were the products of up regulated genes. The up regulation of these genes were further confirmed by real time RT-PCR along with the other genes including calcineurin, CDC like kinase 2 and protein phosphatase 1 genes, CaM binding and CaM candidate binding proteins. The results showed differential expression of them in *P. monodon* haemocytes upon pathogen challenge. The temporal expression of CaM in response to WSSV and *V. harveyi* challenge was studied by *in situ* hybridization. The result showed that the percentages of the CaM positive cells of WSSV and *V. harveyi* challenged shrimp haemocytes were higher than those of the control groups, suggesting that the invading pathogens somehow trigger an increase of CaM transcript in shrimp haemocytes. Moreover, immunohistochemistry showed that bacterial invasion resulted in the distribution of CaM expressing haemocytes throughout the shrimp cephalothorax, especially in gill and hepatopancreas. The CaM protein was also observed in shrimp epithelium cells, such as lymphoid organ, gill and hepatopancreas. The results obtained from the present study provided basic clues for further study on shrimp disease control and management.

Department. Biochemistry.....

Student's signature.....

Ratree Wongpanya.

Field of study Biochemistry.....

Advisor's signature.....

Assoc. Prof. Anchalee Tassanakajon

Academic year 2005.....

Co-advisor's signature.....

Prof. Takashi Aoki

Co-advisor's signature.....

Assoc. Prof. Vichien Rimpantichayakit

ACKNOWLEDGEMENTS

The thesis would not have been done but all great supports. The first person who most inspired this work is Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon, my thesis advisor. Deepest appreciation for her every suggestion and her admirable characteristic, as the model of a good researcher, is expressed here. Another inspiring person to me is Professor Dr. Takashi Aoki and Associate Professor Dr. Vichien Rimpanitchayakit my thesis co-advisor. They are as well another big role model for students, including me, as a hard-working and devoting researcher.

Additional great appreciation is expressed to Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, Assistant Professor Dr. Apinunt Udomkit and Dr. Siriporn Pongsomboon, as being the committee for my thesis.

Thanks as well to all of my laboratory's members, especially all of post-doctoral researchers in R728 whose suggestions are very helpful and supportive to the work. Thanks as well to every other for being such good and caring friends. The time being in the lab will always be the bigger part in my precious memory because of all of you.

I wish to acknowledge contributions of the Royal Golden Jubilee Ph.D. program, Thailand Research Fund and the Development and Promotion of Science and Technology Talent Project of Thailand (DPST) for my fellowship and the National center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) for financial support.

Now, I would like to devote the final place here to my beloved family for being such a great support and the forever source of love and care to me. You are everything of mine. Thank you of being you.

CONTENTS

	Page
Thai Abstract	iv
English Abstract	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
List of Tables	xii
List of Figures.....	xiv
List of Abbreviations.....	xvii
Chapter I Introduction	1
1.1 General introduction.....	1
1.2 Taxonomy of <i>P. monodon</i>	4
1.3 Morphology	5
1.4 Life cycle.....	8
1.5 Distribution.....	9
1.6 Exploitation	9
1.7 Shrimp disease.....	10
1.7.1 Viral disease	11
1.7.2 Bacterial disease	14
1.8 Invertebrate Defense system.....	15
1.8.1 Blood cells.....	16
1.8.2 Lymphoid organ	17
1.9 Immune defense mechanism	18
1.9.1 The prophenoloxidase (proPO) system	18
1.9.2 The coagulation /the clotting system.....	20
1.9.3 Antimicrobial peptide or proteins.....	21
1.10 Expressed Sequence Tags.....	23
1.11 Microarray analysis	27
1.11.1 Probe.....	27
1.11.2 Slide surface chemistry.....	27
1.11.3 Spotting (arraying or printing).....	28

1.11.4	Experimental samples (Target).....	29
1.11.5	Target labeling strategies.....	30
1.11.6	Hybridization and washing.....	31
1.11.7	Image capture and data extraction.....	32
1.12	Real-Time PCR analysis.....	35
1.13	<i>In Situ</i> hybridization.....	37
1.14	Immunohistochemistry or immunocytochemistry.....	39
1.15	Objectives of the thesis.....	40
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....		41
2.1	Materials.....	41
2.1.1	Equipments.....	41
2.1.2	Software.....	42
2.1.3	Chemicals and reagents.....	42
2.1.4	Enzymes.....	44
2.1.5	Bacterial strains.....	44
2.1.6	Virus.....	45
2.1.7	Kits.....	45
2.2	Samples.....	45
2.3	Preparation of <i>Vibrio harveyi</i> challenged shrimps.....	46
2.4	Preparation of white spot syndrome virus challenged shrimp.....	46
2.5	Lymphoid organ collection and total RNA preparation.....	47
2.6	Formaldehyde-agarose gel electrophoresis.....	47
2.7	DNase treatment of the total RNA samples.....	48
2.8	Preparation of mRNA.....	49
2.9	Preparation of host bacteria XL 1 blue MRF' and SOLR.....	49
2.10	Construction of the cDNA libraries.....	50
2.10.1	Construction of a lymphoid organ cDNA library from unchallenged shrimps.....	50
2.10.1.1	cDNA synthesis.....	50
2.10.1.2	Cloning and packaging the λ ZAP.....	51
2.10.1.3	Titering of the phage library.....	51
2.10.1.4	<i>In vivo</i> excision.....	52

2.10.1.5 Amplification of the cDNA library	52
2.10.2 Construction of a lymphoid organ cDNA library from the <i>V. harveyi</i> infected shrimps.....	53
2.10.3 Plasmid DNA preparation	53
2.10.4 Determination of the DNA insert sizes by colony PCR.....	54
2.10.5 Agarose gel electrophoresis.....	54
2.10.6 DNA sequencing and data analysis	56
2.11 Microarray analysis	57
2.11.1 Preparation of cDNA microarray	57
2.11.2 Shrimp sample preparation.....	58
2.11.3 Haemocyte collection and total RNA preparation.....	58
2.11.4 Preparation of cDNA probe.....	59
2.11.5 Microarray hybridization and scanning.....	60
2.11.6 Microarray data mining	61
2.12 Quantitative real-time RT-PCR.....	61
2.12.1 Total RNA isolation and DNase treatment.....	61
2.12.2 First strand cDNA synthesis.....	61
2.12.3 Real-time RT-PCR	62
2.12.4 Data analysis of real-time RT-PCR.....	63
2.12.5 Determination of the PCR efficiency	64
2.13 Gene expression analysis using in situ hybridization.....	65
2.13.1 Haemocyte preparation.....	65
2.13.2 Riboprobe preparation	65
2.13.3 Prehybridization treatment	66
2.13.4 Riboprobe hybridization.....	67
2.13.5 Riboprobe detection.....	67
2.13.6 Control.....	68
2.14 Immunohistochemistry	68
2.14.1 Tissue preparation	68
2.14.2 Immunodetection.....	69
CHAPTER III RESULTS.....	70
3.1 Lymphoid organ and total RNA preparation.....	70

3.2	Construction of lymphoid organ cDNA libraries	70
3.2.1	The normal library	70
3.2.2	The infected library	72
3.3	EST analysis	72
3.3.1	Homology search.....	72
3.3.2	Classification of the putative identified clones	76
3.3.2.1	Gene expression, regulation and protein synthesis.....	77
3.3.2.2	Internal/external structure and motility	79
3.3.2.3	Metabolism	79
3.3.2.4	Defense and homeostasis.....	80
3.3.2.5	Signaling and communication	81
3.3.2.6	Cell division/DNA synthesis, repair and replication	81
3.3.2.7	Ribosomal protein and rRNA	84
3.3.2.8	Mitochondrial protein.....	84
3.3.2.9	Transport.....	84
3.3.2.10	Miscellaneous function.....	87
3.3.2.11	Unidentified (hypothetical)-similar to other cDNA/DNA	87
3.3.2.12	Unknown genes	87
3.4	Microarray analysis	90
3.4.1	Shrimp cDNA microarray preparation	90
3.4.2	Fluorescent labeled cDNA probe preparation	90
3.4.3	Microarray hybridization.....	90
3.4.4	cDNA microarray data mining	93
3.4.4.1	Calmodulin (CaM).....	104
3.4.4.2	Asialoglycoprotein receptor (ASGPR).....	104
3.4.4.3	β -Tubulin	106
3.5	Verification of microarray analysis by real-time RT-PCR.....	106
3.6	Localization of calmodulin (CaM) transcript and protein	115
3.6.1	Localization of CaM transcripts in shrimp haemocytes by <i>in situ</i> hybridization.....	115
3.6.2	Localization of CaM protein	117
CHAPTER IV DISCUSSIONS.....		121

CHAPTER V CONCLUSIONS	130
REFERENCES	132
APPENDIX	152
BIOGRAPHY	164

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1. <i>Penaeus monodon</i> production in various countries in 2004.....	4
1.2. Top 10 organisms represent in dbEST (number of EST sequence entries as of January 20, 2006.....	26
2.1. Primer pairs and conditions for the real-time RT-PCR.....	63
3.1. Summary of the homology search results of the two cDNA libraries from the shrimp lymphoid organs	75
3.2. Matched ESTs in each functional category	77
3.3. The putative gene transcripts in the gene expression, regulation and protein synthesis category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	78
3.4. The putative gene transcripts in the internal/external structure and motility category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	79
3.5. The putative gene transcripts in the metabolism category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	80
3.6. The putative gene transcripts in the defense and homeostasis category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	82
3.7. The putative gene transcripts in the signaling and communication category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	83
3.8. The putative gene transcripts in cell division/DNA synthesis, repair and replication category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	84
3.9. The putative gene transcripts in the ribosomal protein and rRNA category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	85
3.10. The putative gene transcripts in the group of mitochondrial protein, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	86

3.11.	The putative gene transcripts in the transport category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	86
3.12.	The gene transcripts in the miscellaneous function category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	88
3.13.	The gene transcripts in the unidentified (hypothetical)-similar to other cDNA/DNA category, isolated from the normal and <i>V. harveyi</i> -infected <i>P. monodon</i> lymphoid organs	88
3.14.	The numbers of up- and down-regulated genes in haemocytes of the black tiger shrimp after injection with WSSV and <i>V. harveyi</i>	92
3.15.	List of genes responded to white spot syndrome virus challenge at different time points	94
3.16.	List of genes responded to <i>V. harveyi</i> challenge at different time points	99
3.17.	The PCR efficiency for each amplified gene, and the melting temperature (T_m) of its product.....	112
3.18.	Percent of positive cell of the CaM expressing haemocytes at 0, 6, 24, 48 and 72 hour post injection	118

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1. Cultured shrimp production in Thailand from 1993 – 2005 (Source: Thai Customs Department cited in Shrimp Culture Newsletter).....	3
1.2. The values of black tiger shrimp and white shrimp production in Thailand from 2002 to 2005 (Source: http://www.shrimpcenter.com).....	3
1.3. Lateral view of the external morphology of <i>Penaeus monodon</i> (Anderson, 1993).....	6
1.4. Lateral view of the internal anatomy of a female <i>Penaeus monodon</i> (Primavera, 1990).....	7
1.5. The life cycle of <i>Penaeus monodon</i> shrimp. (Baily-Brook & Moss, 1992).....	9
1.6. Location of hematopoietic tissue and lymphoid organ of penaeid shrimp.....	17
1.7. Overview of the arthropod prophenoloxidase (proPO)-activating system.....	19
1.8. Basic procedure of cDNA clone tagging.....	25
1.9. The 1 st strand cDNA Labeling Strategies; Direct incorporation (A) and Indirect incorporation (B).....	31
1.10. Basic procedure of cDNA microarray analysis.....	34
1.11. SYBR green in real time RT-PCR analysis.....	36
1.12. Graphical summary of Immunohistochemistry technique.....	40
2.1. The circular map (A) and the multiple cloning sites (B) of the pBluescript II SK (+/-) vector.....	55
3.1. Total RNA from lymphoid organs of <i>V. harveyi</i> infected shrimps at various times post-injection (6-48 hours) electrophoresed on a 1% formaldehyde agarose gel.....	71
3.2. Determination of the insert size of the recombinant clones from normal library, using colony PCR.....	73
3.3. Determination of the insert size of the recombinant clones from <i>V. harveyi</i> -injected library, using colony PCR.....	73
3.4. The possibility to isolate newly unique sequences of the normal cDNA library (●) and <i>V. harveyi</i> -infected library (◆) as determined by the relationship	

between the numbers of sequenced clones and the accumulative numbers of unique sequences.....	75
3.5. The analysis of gene expression profile of black tiger shrimp at 6 hours post WSSV (a) and <i>Vibrio harveyi</i> (b) injection.....	92
3.6. Hierarchical clustering analysis of the 96 genes in haemocytes of WSSV-challenged shrimps at 4 time points (6, 24, 48 and 72 hpi).....	103
3.7. Multiple alignments of the deduced amino acid sequence of shrimp calmodulin (CaM) homologue with human, bovine and mouse CaMs.....	105
3.8. The three-dimensional structure of calmodulin showing an EF-hand motif that binds a calcium ion (source: http://www.bmb.psu.edu/faculty/tan/lab/gallery).....	105
3.9. Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequence of shrimp asialoglycoprotein receptor (ASGPR) homologues with the human and mouse ASGPRs.....	107
3.10. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of shrimp β -tubulin homologues with urchin and silk moth β -tubulin.....	107
3.11. Amplification efficiency curves of the target genes. Calmodulin (CaM, A-B), tubulin (C-D), asialoglycoprotein receptor (ASGPR, E-F), and reference gene elongation factor 1-alpha (EF-1 α , G-H) for WSSV (A, C, E and G) and <i>V. harveyi</i> (B, D, F and H) challenge experiments.....	109
3.12. Amplification efficiency curves of calcineurin (A-B), CDC like-kinase 2 (C-D), and protein phosphatase 1 (E-F) for WSSV (A, C and E) and <i>V. harveyi</i> (B, D and F) challenge experiments.....	110
3.13. The dissociation curves of the target genes; CaM, tubulin, ASGPR, calcineurin, CDC like-kinase 2, and protein phosphatase 1 and the reference gene EF-1 α	111
3.14. Verification of the highly expressed genes in WSSV- (A, C, E) and <i>V. harveyi</i> - (B, D, F) challenged shrimp haemocytes using real-time PCR.....	113
3.15. Time course analyses of calcineurin, CDC like-kinase 2 and protein phosphatase 1 transcripts in WSSV- (A, C, E) and <i>V. harveyi</i> - (B, D, F) challenged shrimp haemocytes using real-time PCR.....	114

- 3.16. *In situ* hybridization of haemocytes at different time points of *V. harveyi*-challenged shrimps, probed with DIG-labeled CaM-antisense riboprobe (A) and -sense riboprobe (B)..... 116
- 3.17. Time-course analyses of the CaM expressing haemocytes after WSSV (A) and *V. harveyi* (B) challenge 118
- 3.18. Immunohistochemical detection of CaM protein in the cephalothorax of *V. harveyi* and NaCl injected shrimps at 0, 6, 24, 48 and 72 hour post injection. 119

LIST OF ABBREVIATIONS

ALF	anti-lipopolysaccharide factor
ASGPR	asialoglycoprotein receptor
bp	base pair
°C	degree Celcius
Cfu	colony forming units
CaM	calmodulin
CN	calcineurin
DEPC	diethylpyrocarbonate
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
EtBr	ethidium bromide
EST	Expressed Sequence Taq
hpi	hour-post injection
ISH	<i>in situ</i> hybridization
LPS	lipopolysaccharide
kb	kilobase
kDa	kilodalton
M	molar
MCS	multiple cloning sites
ml	millilitre
MgCl ₂	magnesium chloride
mg	milligram
mM	millimolar
ng	nanogram

nm	nanometre
O.D.	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
proPO	prophenoloxidase
proppA	prophenoloxidase activating enzyme
µg	microgram
µl	microlitre
µM	micromolar
WSSV	white spot syndrome virus