

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti
Malaysia Terengganu in fulfilment of the requirement for the
degree of Master of Science

**EFFECT OF SERINE PROTEASE CATALYSIS AND EXPRESSION LEVEL
OF SERINE PROTEASE INHIBITOR GENES IN REGULATING
COAGULATION OF *TACHYPLEUS* AMEBOCYTE LYSATE**

KWONG XINN XIAN

2024

Main Supervisor: Professor Dr. Noraznawati Ismail, PhD

Co-Supervisor: Dr. Fisal Ahmad

School/ Institute: Institute of Climate Adaptation and Marine Biotechnology

Horseshoe crabs as living fossils, have a unique immune system that is widely used in enzyme research. However, the effect of serine protease catalysis and its inhibitor in regulating coagulation under the induction of lipopolysaccharide is still unclear. Therefore, the current study aims to determine the effect of divalent cation and pH of buffer on the degree of gelation and proteolytic activity of trypsin-like serine protease in wild and captive of horseshoe crab blood, to compare the profiling of the TAL protein, to identify the target protein after protein profiling and to determine expression levels of serine protease inhibitor (SERPIN) genes in horseshoe crab blood during lipopolysaccharide (LPS) induction. In this study, the gel clotting method was used to determine the degree of gelation of TAL, SDS-PAGE for protein profiling, Orbital Nano LC-MS/MS for identifying target protein, and RT-PCR to determine expression levels of SERPIN genes. The current study showed that wild horseshoe crab lysate (June-1, July-1 and August-1) exhibited higher clotting levels in 1 EU/mL, 5 EU/mL, and 10 EU/mL control standard endotoxin concentration, while for the captive lysate (June-2, July-2, and August-2) showed low clotting levels in all endotoxin concentration. Among 35 different combinations of divalent cation concentration, the divalent cation of 0.15 M $MgCl_2$ + 0.15 M $CaCl_2$ had higher clotting levels for the wild batch TAL (June-1, July-1 and August-1) compared to the captive batch of TAL. In addition, the batch of TAL collected from wild horseshoe crab blood showed high proteolytic activity, and the LC-MS data of the trypsin-digested sample showed seven major proteins were detected in TAL. The expression level of SERPIN gene from July batch blood reach 5.17-fold in relative SERPIN mRNA expression with LP primer and significant increase five times compare with Jun batch which was 1 relative expression. In conclusion, wild batches of TAL in different divalent cation concentration values gave significant changes in the clotting process, which is associated with higher protein levels indicating of effect the quality of TAL decrease in captivity.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti
Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk
Ijazah Sarjana Sains

**KESAN PEMANGKINAN SERINE PROTEASE DAN
ARAS EKSPRESI GEN PERENCAT SERINE PROTEASE
DALAM MENGAWAL PENGGUMPALAN LISAT
TACHYPLEUS AMEOBOSIT**

KWONG XINN XIAN
2024

Penyelia Utama: Professor Dr. Noraznawati Ismail, PhD

Penyelia Bersama: Dr. Fisal Ahmad

Sekolah/ Institut: Institut Adaptasi Iklim dan Bioteknologi Marin

Belangkas merupakan sejenis fosil hidup yang mempunyai sistem imun yang unik dan digunakan secara meluas di dalam kajian enzim. Walau bagaimanapun, kesan katalisis serine protease dan perencatnya dalam mengatur penggumpalan dibawah aruhan lipopolisakarida masih belum difahami. Oleh itu, kajian ini adalah untuk menentukan kesan divalen kation dan pH penampakan kepada darjah pembentukan gel dan aktiviti proteolitik tripsin serine protease daripada darah belangkas liar dan terkurung, untuk membandingkan profil protein TAL, untuk pencirian protein sasaran selepas profil protein, dan untuk menentukan aras pengekspresan gen aruhan serine protease (SERPIN) dalam darah belangkas semasa aruhan lipopolisakarida (LPS). Dalam kajian ini, kaedah penggumpalan gel digunakan untuk menentukan darjah penggumpalan dalam TAL, SDS-PAGE pula digunakan untuk memprofil protein, Orbitrap Nano LC-MS/MS digunakan untuk menentukan sasaran protein dan RT-PCR digunakan untuk menentukan darjah ekspresi gen (SERPIN). Kajian ini telah menunjukkan lisat belangkas liar (Jun-1, Julai-1 dan Ogos-1) mempunyai darjah penggumpalan yang tinggi dalam aras kepekatan kawalan piawai endotoksin 1 EU/mL, 5 EU/mL dan 10 EU/mL, sementara itu, lisat belangkas terkurung (Jun-2, Julai-2 dan Ogos-2) pula menunjukkan darjah penggumpalan yang rendah dalam semua kepekatan lipopolysakarida. Sebanyak 35 kepekatan divalent kation, 0.15 M MgCl₂ +0.15 M CaCl₂ menunjukkan darjah penggumpalan yang tinggi bagi lisat belangkas liar (Jun-1, Julai-1 dan Ogos-01) berbanding dengan belangkas di dalam kurungan. Bukan itu sahaja, lisat daripada Jun-1, Julai-1 dan Ogos-1 menunjuk aktiviti protein yang tinggi dan keputusan LC-MS/MS telah menunjukkan tujuh protein utama di dalam TAL. Aras pengekspresian gen SERPIN bagi bulan Julai mencapai kadar 5.17 lebih tinggi sebanyak lima kali ganda berbanding dengan aras ekspresi bulan Jun iaitu 1 kali relatif dengan LP primer. Kesimpulannya, TAL dari belangkas liar dengan nilai kepekatan divalen kation berbeza memberi perubahan yang jelas di dalam proses penggumpalan yang berkaitan dengan aras protein tinggi. Ini menunjukkan kesan kurungan memberi penurunan dari segi kualiti TAL.