# 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

## วัสดุ

### กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษาคือ กุ้งแชบ๊วยที่มีขนาดลำตัวยาว 10-14 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 25 กรัม อายุ 150-180 วัน และไม่อยู่ในระยะลอกคราบ เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ ที่สถานีประมงชายฝั่งจังหวัดตรัง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

| สารเคมีที่ใช้ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Acrylamide | Fluka |
| Ammonium persulphate | Merck |
| Bisacrylamide (N,N′-methylene diacrylamide) | Fluka |
| Bovine serum albumin | Sigma Chemical Co. |
| Bromophenol blue | Merck |
| Calcium chloride | Ajex Chemicals |
| Citric acid | Ajex Chemicals |
| Concanavalin A-Sepharose 4B | Sigma Chemical Co. |
| Coomassie brilliant blue R-250 | Sigma Chemical Co. |
| DEAE-Sephacel | Sigma Chemical Co. |
| N, N′-Diacetylchitobiose | Sigma Chemical Co. |
| Dimethylsulphoxide | Lab scan |
| Ethanol | BDH AnalaR |
| Ethylenediaminetetraacetic acid | Fluka |

| สารเคมีที่ใช้ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Ethylene glycol monomethyl ether | Sigma Chemical Co. |
| Fast garnet GBC | Sigma Chemical Co. |
| Glycerol | Sigma Chemical Co. |
| Glycine | Fluka |
| Hydrochloric acid | Merck |
| Magnesium chloride | Univar |
| β-Mercaptoethanol | Fluka |
| Methanol | Merck |
| Methyl α-D-mannose | Sigma Chemical Co. |
| 4-Methylumbelliferyl N-acetyl -β-D-glucosaminide | Sigma Chemical Co. |
| N-Acetyl-D-galactosamine-agarose | Sigma Chemical Co. |
| N-Acetyl-D-glucosamine-agarose | Sigma Chemical Co. |
| Naphthol As-Bi N-acetyl-β-D-glucosaminide | Sigma Chemical Co. |
| *p*-Nitrophenol | Sigma Chemical Co. |
| *p*-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucopyranoside | Sigma Chemical Co. |
| *p*-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide | Sigma Chemical Co. |
| Phenylmethylsulphonyl fluoride | Fluka |
| Sephadex G-200 | Pharmacia |
| Silver stain Kit | Bio-Rad |
| Sodium carbonate | Carlo erba |
| Sodium citrate | Carlo erba |
| Sodium dodecyl sulphate | Riedel-de Haen |
| Tris (hydroxymethyl) aminomethane | Sigma Chemical Co. |
| Triton X-100 | Merck |

# อุปกรณ์

| อุปกรณ์ที่ใช้ | รุ่น | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง | GT410 | Ohaus |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง | AB204-5 | Mettler |
| Centrifuge | 5415C | Eppendorf |
| Centrifuge | 5804R | Eppendorf |
| Fast protein liquid chromatography | - | Pharmacia Biotech |
| Micropipette | - | Gilson |
| Microtube pump MP-3 | MP-3N | Eyela |
| Orbital shaker | OS 20 | Boeco |
| pH meter | Accumet 15 | Fisher Scientific |
| Power supply | 1000/500 | Bio-Rad |
| Slab gel electrophoresis apparatus | AE-6400 | Atto |
| UV-VIS spectrophotometer | 160A | Shimadzu |
| Vortex | G-560E | Scientific Industries |

# วิธีการ

## 2.1 การเตรียมซีรัมจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

ดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแชบ๊วยทันทีหลังจับขึ้นมาด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณ pericadium หรือขาเดินคู่ที่ 3 เก็บฮีโมลิมฟ์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัว นำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที เก็บส่วนใสหรือซีรัม (serum) ไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

## 2.2 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างด้วยชุดหาโปรตีน (Coomassie plus protein assay reagent kit) จากบริษัท Pierce ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายชุดหาโปรตีน 1 มิลลิลิตร โดยทำควบคู่ไปกับ BSA (bovine serum albumin) จากบริษัท Pierce ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเจือจาง BSA ให้มีปริมาณโปรตีน 3-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

## 2.3 การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase

### 2.3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol

เตรียมกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol โดยใช้สารละลาย 0.5 mM *p*-nitrophenol ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 และทำการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมให้มีปริมาณต่างกัน 5 ค่า คือ 20, 40, 60, 80 และ100 nmole ให้มีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมไปเติม 1 M $Na_2CO_3$ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (A420)

### 2.3.2 การหาแอคทิวิที

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase โดยใช้ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (*p*NP-NAG) เป็นสับสเตรท ดังนี้ ใช้สารละลายเอนไซม์ 25 ไมโครลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 mM *p*NP-NAG ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6 ปริมาตร 155 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M $Na_2CO_3$ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่า A420 ของผลผลิต คือ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น โดยใช้ *p*-nitrophenol ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งกำหนดให้แอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณ 1 μmole ของ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ต่อเวลา 1 นาที

## 2.4 การหาสภาวะที่เหมะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase

### 2.4.1 การหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิที

นำซีรัมของกุ้งแชบ๊วยไปเจือจาง 1:10 ด้วย 0.1 M citric acid-0.2 M $Na_2HPO_4$, pH 5.5 (CP, pH 5.5) จากนั้นใช้ซีรัมที่เจือจางปริมาตรต่าง ๆ กันในช่วง 5-20 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรแต่ละหลอดให้เป็น 180 ไมโครลิตร ด้วย CP, pH 5.5 นำไปทำปฏิกิริยากับ 5 mM *p*NP-NAG ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 50 °ซ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M $Na_2CO_3$ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้ววัดค่า A420

### 2.4.2 การหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ทำการเจือจางซีรัมจากข้อ 2.4.1 เป็น 1:20 จากนั้นใช้ซีรัมที่เจือจางปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปผสมกับสารผสมปฏิกิริยา บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ ที่เวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M $Na_2CO_3$ แล้ววัดค่า A420

### 2.4.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

นำซีรัมที่เจือจางเป็น 1:20 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยากับ 5 mM *p*NP-NAG ปริมาตร 20 ไมโครลิตรในบัฟเฟอร์ที่มี pH 3-9 ปริมาตร 155 ไมโครลิตร โดยช่วง pH 3-6 ใช้ 0.1 M Na acetate และ ช่วง pH 6-9 ใช้ 0.1 M Tris-HCl หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยา แล้ววัดค่า A420

### 2.4.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

นำซีรัมที่เจือจางเป็น 1:20 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยา แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 0, 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 และ 90 °ซ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M $Na_2CO_3$ แล้ววัดค่า A420

## 2.5 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส

(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel)

มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร

### 2.5.1 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 4-10% หรือ 6% ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

| Composition | Stacking gel 3% (5 ml) | Separating gel | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 4%(3 ml) | 6%(3 ml) | 10%(3ml) |
| 30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide | 0.5 ml | 0.40 ml | 0.60 ml | 1.00 ml |
| 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 | 0.63 ml | - | - | - |
| 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 | - | 1.50 ml | 1.50 ml | 1.50 ml |
| 10% Ammonium persulphate | 50 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |
| TEMED | 5 µl | 3 µl | 3 µl | 3 µl |
| Distilled water | 3.82 ml | 1.07 ml | 0.87 ml | 0.47 ml |

#### 2.5.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) เตรียมโปรตีนมาตรฐานเหมือนกับการเตรียมสารตัวอย่าง

#### 2.5.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่าง ปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลไปย้อมสี

### 2.5.2 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (6-18%) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

| Composition | Stacking gel | Separating gel | |
|---|---|---|---|
| | 3% (5 ml) | 6% (3ml) | 18% (3 ml) |
| 30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide | 0.5 ml | 0.60 ml | 1.80 ml |
| 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 | 1.25 ml | - | - |
| 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 | - | 0.75 ml | 0.75 ml |
| 0.2 M EDTA | 50 µl | 30 µl | 30 µl |
| 10% SDS | 50 µl | 30 µl | 30 µl |
| 10% Ammonium persulphate | 50 µl | 30 µl | 30 µl |
| TEMED | 5 µl | 3 µl | 3 µl |
| Distilled water | 3.10 ml | 1.56 ml | 0.36 ml |

#### 2.5.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู ในกรณีที่ทำ SDS-PAGE สภาพรีดิวซ์ (reduce) ทำโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ดังข้างต้น แต่มี 1% เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) ด้วย จากนั้นต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที

#### 2.5.2.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ใช้ 0.025 M Tris-0.192 M glycine-0.1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่ง

สีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ นำเจลไปย้อมสี

**2.5.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE)**

Preparative PAGE เป็น nondenaturing PAGE แต่มีการเตรียมเจลให้มีขนาด 10 x 12เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 4-10% เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่างเพียงช่องเดียว ขนาด 0.1 x 9 เซนติเมตร จากนั้นผสมสารละลายเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้เติมลงในช่องใส่สารตัวอย่าง แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ จากนั้นตัดเจลตรงกลาง ขอบซ้าย และขอบขวาเป็นแถบกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาวตลอดแผ่นเจล นำเจลทั้ง 3 ชิ้นไปย้อมด้วยชุดย้อมสีบลู (gel code blue stain kit) ของบริษัท Pierce เมื่อปรากฏแถบโปรตีนนำไปเทียบกับเจลซึ่งไม่ย้อมสีแล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบโปรตีนที่ต้องการ แล้วทำการชะโปรตีนนั้นออกจากชิ้นเจล โดยนำชิ้นเจลที่ต้องการใส่ในถุงไดแอไลซ์ แล้วนำไปวางตามขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอน ซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ (submarine) เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA เมื่อครบ 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดแอไลซ์ ทำให้เข้มข้น

**2.5.4 การย้อมสีโปรตีนแบบซิลเวอร์ (Silver stain)**

หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำเจลไปตรึงโปรตีนด้วย 40% เมธานอล (methanol)-10% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลาย 10% เอธานอล (ethanol) -5% กรดน้ำส้ม นาน 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นใช้ชุดย้อมซิลเวอร์ (silver stain kit) ของบริษัท Bio-Rad โดยเติมสารละลายออกซิไดเซอร์ (oxidizer solution) เขย่านาน 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน (deionized water) ครั้งละ 5 นาที จนกระทั่งสีเหลืองในเจลหมดไป จากนั้นแช่เจลในน้ำยาซิลเวอร์ (silver reagent) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดไอออนนาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีวีโลเปอร์ (developer) เขย่าและเปลี่ยนสารละลายเมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ และเมื่อปรากฏแถบของโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% เมธานอล-10% กรดน้ำส้ม

**2.5.5 การหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ NAGase ใน Nondenaturing PAGE**

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นจากคอลัมน์ Sephadex G-200 (จากข้อ 2.6.2) ไปทำ nondenaturing PAGE ใน 4-10% เจล หลังจากนั้นตัดแผ่นเจลออกเป็น 2 ส่วน นำส่วนแรกไปย้อมสีโปรตีนแบบซิลเวอร์ตามวิธีการข้อ 2.5.4 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนของสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, $R_f$) แผ่นเจลส่วนที่ 2 นำไปตัดเป็นชิ้นตามขวางขนาด 2 มิลลิเมตร นำแต่ละชิ้นเจลบดใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 2.3 จากนั้นนำแถบเจลที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ไปคำนวณค่า $R_f$ เทียบกับค่า $R_f$ ของเจลส่วนแรกที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ จากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าโปรตีนแถบใดเป็นเอนไซม์ NAGase

**2.5.6 การย้อมแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase**

**2.5.6.1 การย้อมแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ใน Nondenaturing PAGE**

เตรียมสารละลายย้อมแอคทิวิที ตามวิธีการของ Peters และคณะ (1998) โดยละลาย naphthol-AS-Bi-N-acetyl-β-D-glucosaminide 13 มิลลิกรัมใน ethylene glycol monomethyl ether ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และละลาย Fast Garnet GBC 45 มิลลิกรัมใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 ชนิดผสมกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 นำเจลที่ได้จากการทำ nondenaturing PAGE ไปบ่มในสารละลายที่เตรียมได้ ที่ 50 °ซ นาน 2 ชั่วโมง จะปรากฏแถบของเอนไซม์ NAGase สีน้ำตาลเข้ม จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 25% เมธานอล-10% กรดน้ำส้ม นาน 5 นาที

**2.5.6.2 การย้อมแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ใน SDS-PAGE**

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นจากคอลัมน์ Sephadex G-200 (จากข้อ 2.6.2) ไปทำ SDS- PAGE ใน 6-18% เจล แบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน จากนั้นขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลทั้ง 2 ส่วน ลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ตามวิธีของ Towbin *et al*. (1979) โดยทำในบัฟเฟอร์ Towbin (0.025

mM Tris-0.192 mM glycine-10% เมธานอล, pH 8.3) และใช้กระแสไฟที่ 500 mA นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นไนโทรเซลลูโลสจากเจลส่วนแรกไปย้อมด้วยสี Amido Black B (1% Amido Black B-40% ethanol-5% glacial acetic acid) จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีน จากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แผ่นไนโทรเซลลูโลสจากเจลส่วนที่ 2 นำไปย้อมแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 2.5.6.1

## 2.6 การทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากซีรัม

### 2.6.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เตรียม DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.6 x 9 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซิน (resin) เป็น 50 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ ด้วย 0.2 M sodium citrate-0.2% Triton x-100 (Wallace, 1965) แล้วปรับคอลัมน์ให้สมดุลย์ (equilibrate) ด้วย TB (25 mM Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติมซีรัม 4.8 มิลลิลิตร (โปรตีน 676 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการไดแอไลซ์ (dialyse) ด้วยบัฟเฟอร์ TB-PMSF (TB-1 mM PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride) แล้วล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกล้างออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ล้างคอลัมน์จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง (linear gradient) ในช่วง 0-0.5 M ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม (50 มิลลิลิตร + 50 มิลลิลิตร) ชะในทำนองเดิมต่อด้วย 0.5-1.0 M NaCl (100 มิลลิลิตร + 100 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิม และเก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาแอคทิวิที ทำการรวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นทำให้เข้มข้นในถุงไดแอไลซ์ (dialysis bag) ด้วย CM-cellulose จนสารละลายในถุงไดแอไลซ์เหลือเพียงเล็กน้อย นำไปไดแอไลซ์ด้วย TB นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำไปหาแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีนและทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE และแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200

**2.6.2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-200**

ล้างและปรับคอลัมน์ Sephadex G –200 (1.6 x 84 เซนติเมตร) ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 170 มิลลิลิตร ให้สมดุลย์ด้วย TBS-PMSF (25 mM Tris-HCl, pH 7.5-150 mM NaCl-1 mM PMSF) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นจากคอลัมน์ DEAE-sephacel ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร (โปรตีน 4.86 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF นาน 20 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ มาแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ปรับให้มีอัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาค่าแอคทิวิที ทำการรวมหลอดที่มีแอคทิวิทีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น แล้วไดแอไลซ์ด้วย TB นาน 20 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำไปหาแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีน และทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE และนำสารละลายที่ได้ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ N-acetyl-α-D-galactosamine-agarose หรือคอลัมน์ N-acetyl-D-glucosamine-agarose หรือคอลัมน์ Concanavalin A-Sepharose 4B และ preparative PAGE

**2.6.3 โดยคอลัมน์ N-Acetyl-α-D-galactosamine-agarose**

ล้างและปรับคอลัมน์ N-acetyl-α-D-galactosamine-agarose (NAcGal-agarose) ขนาด 1.4 x 4 เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 6 มิลลิลิตร ให้สมดุลย์ด้วย TB-PMSF ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นจากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร (โปรตีน 93 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ NAcGal-agarose ปรับให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาค่าแอคทิวิที ทำการรวมหลอดที่มีแอคทิวิทีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น จากนั้นนำไปหาค่าแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีน และทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE

**2.6.4 โดยคอลัมน์ N-Acetyl-D-glucosamine-agarose**

ล้างและปรับคอลัมน์ N-Acetyl-D-glucosamine-agarose (NAcGlc-agarose) ขนาด 1.4 x 4 เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 6 มิลลิลิตร ให้สมดุลย์ด้วย Sephadex G-200 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (โปรตีน 116 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อด้วย

คอลัมน์ NAcGlc-agarose โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ในคอลัมน์ นาน 24 ชั่วโมง ล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF ให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำต่อตามวิธีการ ข้อ 2.6.3

**2.6.5 โดยคอลัมน์ Concanavalin A-Sepharose 4B**

**2.6.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Methyl α-D-mannose ในการชะเอนไซม์**

ใช้ซีรัมที่เจือจาง 1: 20 เท่า ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มกับ Concanavalin A-Sepharose 4B (Con A-Sepharose) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรในแต่ละหลอดทำเหมือนกัน 5 หลอด นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเรซินด้วย TBS-1 mM $CaCl_2$-1 mM $MgCl_2$ (TBS-CaMg) ครั้งละ 400 ไมโครลิตร ล้าง 2 ครั้ง จากนั้นบ่มแต่ละหลอดด้วย methyl α-D-mannose (MetMan) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 M ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิมปริมาตรหลอดละ 500 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000 x g นาน 3 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปหาแอคทิวิทีของเอนไซม์

**2.6.5.2 การแยกเอนไซม์ NAGase ด้วย Concanavalin A-Sepharose 4B**

ปรับคอลัมน์ Con A-Sepharose ขนาด 1.6 x 5 เซนติเมตร ที่มีปริมาตรเรซิน 10 มิลลิลิตร ด้วย TBS ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นจากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (โปรตีน 70 ไมโครกรัม) บ่มในคอลัมน์ นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย TBS-CaMg ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกล้างออกมาหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า A280 ล้างคอลัมน์จนกระทั่ง A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นบ่มคอลัมน์ต่อด้วย MetMan ที่ความเข้มข้นเหมาะสมตามวิธีการข้อ 2.6.5.1 นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างคอลัมน์ด้วย TBS-CaMg เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร วัด A280 หาแอคทิวิที ทำการรวมหลอดที่มีแอคทิวิทีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น ไดแลไลซ์ จากนั้นนำไปหาค่าแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีน และทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE

### 2.6.6 โดย Preparative PAGE ครั้งที่ 1

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (47 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ตามวิธีการข้อ 2.5.3 โดยตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบเอนไซม์ NAGase ซึ่งทราบได้จากการทดลองในวิธีการข้อ 2.5.5 จากนั้นทำการชะเอนไซม์ NAGase ออกจากชิ้นเจล โดยนำชิ้นเจลที่ต้องการใส่ในถุงไดแอไลซ์ แล้วนำไปวางตามขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอน ซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA เมื่อครบ 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดแอไลซ์ ทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีน หาแอคทิวิทีและทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase โดยวิธี nondenaturing PAGE

### 2.6.7 โดย Preparative PAGE ครั้งที่ 2

นำสารละลายเข้มข้นที่แยกได้จาก preparative PAGE ครั้งที่ 1 ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ครั้งที่ 2 อีกครั้งตามวิธีการข้อ 2.6.6 จากนั้นหาปริมาณโปรตีน หาแอคทิวิทีและทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase

## 2.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ NAGase

### 2.7.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase โดยใช้คอลัมน์ Superdex 200 HR ขนาด 0.5 x 40 เซนติเมตร ปริมาตรเรซิน 24 มิลลิลิตร ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC (fast protein liquid chromatography) ซึ่งปรับคอลัมน์ให้สมดุลย์ก่อนด้วย TB แล้วเติมสารละลายเอนไซม์เข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร บลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, $M_r$ 2,000,000) $K_2Cr_2O_7$ ($M_r$ 294) และโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (thyroglobulin, $M_r$ 669,000) เฟอร์ริติน (ferritin, $M_r$ 440,000) คาทาเลส (catalase, $M_r$ 232,000) อัลโดเลส (aldolase, $M_r$ 158,000) BSA ($M_r$ 67,000) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase, $M_r$ 44,000) และโอวัลบูมิน (ovalbumin, $M_r$ 43,000) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจล (void volume, $V_o$) จากค่าปริมาตร

ชะของบลูเด็กซ์แตรนที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และปริมาตรทั้งหมด (total volume, $V_t$) ของคอลัมน์จากค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 หาปริมาตรชะ (elution volume, $V_e$) ของแต่ละโปรตีน แล้วคำนวณหาค่า distribution coefficient ($K_{av}$) ของโปรตีนแต่ละชนิดจากสมการ $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$

นำค่าที่ได้เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า $K_{av}$ ของโปรตีนมาตรฐาน และคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase

**2.7.2 การศึกษาจลนศาสตร์**

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ NAGase ต่อสับสเตรท โดยใช้เอนไซม์ NAGase ไปทำปฏิกิริยากับ *p*NP-NAG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 mM จากนั้นนำไปหาแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 2.3 แล้วหาค่า $K_m$ และ $V_{max}$ จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า 1/V และ1/[S]

**2.7.3 การหาความจำเพาะต่อสับสเตรท**

นำเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ ไปทำปฏิกิริยากับสับสเตรทชนิดต่าง ๆ คือ 5 mM 4-methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 5 mM *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucopyranoside, 5 mM N, N′-diacetylchitobiose และ 5 mM *p*-nitrophenyl- N-acetyl-β-D-glucosaminide ที่เตรียมใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 โดยหาแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 2.3

**2.7.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา**

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ ในสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0,25, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 และ 90 °ซ นาน 15 นาที แล้วทำต่อตามวิธีการข้อ 2.3

**2.7.5 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา**

ทำการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ในสารผสมปฏิกิริยาที่มีบัฟเฟอร์ pH แตกต่างกันในช่วง pH 3-9 โดยใช้ 0.1 M Na acetate ในช่วง pH 3-5 และ 0.1 M Tris-HCl ในช่วง pH 6-9 แล้วทำในต่อตามวิธีการข้อ 2.3

### 2.7.6 การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ

นำเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 °ซ นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปหาแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 2.3 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ซึ่งเก็บไว้ที่ 0 °ซ

### 2.7.7 การศึกษาผลของแคทไอออนและ EDTA ต่อแอคทิวิที

เพื่อศึกษาความต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน (divalent cation) หรือ EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์ NAGase นำเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์และซีรัมของกุ้งแชบ๊วยไปหาแอคทิวิทีในสารผสมปฏิกิริยาตามวิธีการข้อ 2.3 เมื่อมี $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ หรือ EDTA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

## 2.8 การศึกษาบทบาททางชีวภาพเบื้องต้นของเอนไซม์ NAGase

### 2.8.1 การศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์ NAGase ในกุ้งที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่าง ๆ

นำ รังไข่ , ตับอ่อน หรือ กล้ามเนื้อของกุ้งที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่าง ๆ อย่างละประมาณ 1 กรัม ไปโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ใน 0.25 M Tris-HCl, pH 6.0 จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6,000 x g นาน 30 นาที ที่ 4 °ซ เก็บสารสกัดเนื้อเยื่อส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีนและหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 2.3 เปรียบเทียบกับในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งตัวเดียวกัน

จำแนกระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ของแม่กุ้งแชบ๊วยตามวิธีของ Quinitio และคณะ (1989), Tuma (1967) และของ Primavera (1988) โดยดูลักษณะขนาดและสีของรังไข่ โดยแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

- ระยะที่ 1 รังไข่อ่อนเป็นรังไข่ที่บาง ใส มองผ่านเปลือกแข็งทางด้านหลังไม่เห็น ลักษณะเหมือนกับรังไข่ระยะหลังการวางไข่
- ระยะที่ 2 รังไข่ระยะเจริญพันธุ์มีสีขาวจนถึงสีเขียวมะกอก มองเห็นเป็นแถบเส้นตรง ในไข่มีโยล์คกรานูล (yolk granule) ไข่มีขนาดประมาณ 177 ไมครอน (micron)

- ระยะที่ 3 รังไข่ระยะเจริญพันธุ์ขั้นปลายมีสีเขียวเข้มขึ้น มีขนาดหนาและกว้างขึ้น ไข่มีขนาดประมาณ 215 ไมครอน

- ระยะที่ 4 รังไข่ระยะเจริญพันธุ์สมบูรณ์มีสีเขียวเข้มมากและมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเปลือกแข็งด้านบน ไข่มีขนาดประมาณ 215 ไมครอน เป็นไข่สุกที่มีโยล์คสะสมอยู่มาก

**2.8.2 การศึกษาระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ต่อการติดเชื้อของแบคทีเรียที่ก่อโรคกุ้ง**

**2.8.2.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้ง**

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Vibrio harveyi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tryptic soy agar ที่มี 1.5 % NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารเหลว (tryptic soy broth) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นำเชื้อไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียใน 0.85% NaCl นำไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตะกอนและเตรียมแบคทีเรียในบัฟเฟอร์ดังกล่าวให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.9 หน่วย แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ต่อไป

**2.8.2.2 การวัดระดับของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi***

เลี้ยงกุ้งเพศผู้ในถังพลาสติคกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกุ้งดังนี้ ล้างถัง ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อปริมาตรประมาณครึ่งถัง ลงในถัง ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 อาทิตย์ แล้วนำกุ้งเพศผู้ที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 25 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 4-5 ตัว โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถัง นาน 1 อาทิตย์ โดยสังเกตพบว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงไว้ใน tryptric soy broth (จากข้อ 2.8.2.1) ไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตกตะกอนด้วยน้ำ

เกลือ (0.85% NaCl) และเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น $8.8x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ หลังการฉีดสังเกตอาการกุ้งเป็นระยะ ๆ นาน 20 วัน แล้วเจาะฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อหรือกลุ่มควบคุม ปล่อยให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัว (ตามวิธีข้อ 2.1) จากนั้นทำการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ตามวิธีการในข้อ 2.3 เปรียบเทียบระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม สำหรับตัวกุ้งทั้ง 2 กลุ่มนำไปทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธีตรวจสอบการเรืองแสงของเชื้อในที่มืดโดยดัดแปลงวิธีของ Jiravanichpaisal และคณะ (1994) ซึ่งทำโดยชั่งน้ำหนักตับ 0.1 กรัม นำไปบดและเจือจางในสารละลาย 1.5% NaCl ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง TCBS (thiosulphate citrate bile salt) ที่มี 1.5% NaCl แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นดูการเรืองแสงสีเขียวของเชื้อในที่มืด

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในข้อ 2.8.1 และ 2.8.2 โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (one way analysis of variance, ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์ความสัมพันธ์ SPSS (statistical package for the social science)