



การศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วย  
**Characterization of Hemocyanin in Banana Shrimp**  
**(*Fenneropenaeus merguensis*)**

อาจารย์ เจียวก๊ก  
**Acharee Jiewkok**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements**  
**for the Degree of Master of Science in Biochemistry**  
**Prince of Songkla University**

**2552**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      การศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วย  
ผู้เขียน              นางสาวอัจจรรย์ เจียวก๊ก  
สาขาวิชา              ชีวเคมี

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์)

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์)

.....กรรมการ  
(ดร.รพีพร โสทธิพันธ์)

.....กรรมการ  
(ดร.จรงค์ อรรถรัฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินในกุ่มแซบวัย
ผู้เขียน	นางสาวอัจรีย์ เจียวก๊ก
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2551

## บทคัดย่อ

ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ พบในสัตว์กลุ่มมอลลัสต์และอาร์โทรพอด 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์เป็นฮีโมไซยานิน ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หลากหลาย เช่น ขนส่งออกซิเจน ขนส่งฮอร์โมนลอกคราบ ecdysone และเป็นสารตั้งต้นของสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา นอกจากนี้ฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นด้วย SDS ให้มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคล้ายกับเอนไซม์ที่ถูกแยกได้จากเซลล์ฮีโมไซท์ ฮีโมไซยานินมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในด้านความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนสมบัติทางเคมีกายภาพและมีหน้าที่คล้ายกัน เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีบทบาททางชีวภาพโดยเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียน บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินน่าจะเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองเช่นกัน

ได้ทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบวัยเป็นครั้งแรก โดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์และตามด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งมีมวลโมเลกุล 230 kDa และปรากฏหน่วยย่อย 2 ขนาด (79.4 และ 75 kDa) เมื่อวิเคราะห์ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส จากการวิเคราะห์โดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชันพบว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 215 kDa นอกจากนี้ฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบวัยปรากฏโปรตีน 1 แถบ (480 kDa) ที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ในขณะที่แถบฮีโมไซยานิน (230 kDa) ไม่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ บ่งชี้ว่าแถบโปรตีน 480 kDa อาจเป็นฮีโมไซยานินที่มีการรวมตัวแบบ hexamer ซึ่งมีปริมาณน้อยในฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบวัย

จากการกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ พบว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความจำเพาะสูงต่อฮีโมไซยานิน โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนอื่น ๆ ในฮีโมลิมฟ์ และยังสามารถพัฒนาเทคนิค ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) เพื่อใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ได้ โดยเมื่อทำการวัดตัวอย่างกุ่มแซบวัย 6 ตัวอย่าง

พบว่ากุ้งมีปริมาณฮีโมไซยานินคิดเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าผิดพลาดมาตรฐาน เป็น  $111.07 \pm 3.58$  มก./มล.ฮีโมลิมพ์ คิดเป็นปริมาณฮีโมไซยานิน 85.67% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมพ์ ซึ่งอยู่ในช่วงของฮีโมไซยานินที่มีรายงานว่า เป็น 80 - 95% ของโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของครัสเตเชียนต่าง ๆ

ในงานวิทยานิพนธ์นี้ ได้โคลน cDNA ของยีนฮีโมไซยานินบางส่วน (pHC) จาก cDNA library ของตับกุ้งแชบ๊วยโดยวิธี PCR ซึ่ง cDNA ที่โคลนได้มีขนาด 1,496 คู่เบส แปลเป็นสายเปปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 498 หน่วย ลำดับกรดอะมิโนของยีน pHC มีความเหมือน (identity) มากกับของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* 91%, กุ้ง *Marsupenaeus japonicus* (81%, 88%) และของกุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* 80% ยังพบว่ายีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับของยีนโปรตีนออกซิเดสของกุ้ง *Penaeus semisulcatus* 34%, กุ้งขาว *L. vannamei* 33% และของกุ้ง *M. japonicus* 32% บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินและโปรตีนออกซิเดสในฮีโมลิมพ์ของกุ้งที่เลี้ยงมีความเกี่ยวข้องกัน

**Thesis Title**            Characterization of Hemocyanin in Banana Shrimp  
*Fenneropenaeus merguensis*

**Author**                    Miss Acharee Jiewkok

**Major Program**        Biochemistry

**Academic Year**        2008

## ABSTRACT

Hemocyanin is a copper binding protein found in two phyla, mollusks and arthropods. Being the main protein component in hemolymph, hemocyanin typically represents up to 80-95% of the total amount of proteins. Hemocyanin has multifunctions such as oxygen carrying, ecdysone transporting and being a precursor of anti-fungal peptides. Furthermore, hemocyanin was converted to phenoloxidase like enzyme by sodium dodecyl sulphate (SDS) treatment as similar to phenoloxidase isolated from hemocytes. A close relationship between phenoloxidase and hemocyanin was deduced based on their similar amino acid sequences, physico-chemical properties and functions. Physiological role of phenoloxidase is involved in immune response of crustaceans. This suggests that hemocyanin may also play an important role in the immune response.

Hemocyanin was firstly purified from the hemolymph of banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* by ultracentrifugation and subsequently by preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Purified hemocyanin showed a single band with  $M_r$  of 230 kDa in non-denaturing PAGE. It is arranged in a doublet of 75 and 79.4 kDa in SDS-PAGE. By means of gel filtration chromatography, purified hemocyanin was estimated to have  $M_r$  of 215 kDa. In addition, the hemolymph showed a protein band with  $M_r$  of 480 kDa containing phenoloxidase activity as determined by non-denaturing PAGE whereas that of hemocyanin (230 kDa) did not. This suggested that the 480 kDa protein band may be a minor form of hemocyanin assembled in hexamer which is present in the hemolymph of *F. merguensis*.

Polyclonal antibody against purified hemocyanin was raised in an albino rabbit. Anti-hemocyanin antibody showed a high specificity to only hemocyanin without cross reaction to other proteins in the hemolymph of banana shrimp. Moreover, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was developed and used to quantify hemocyanin in the hemolymph. By ELISA analysis, hemocyanin in the hemolymph of 6 shrimps was determined as  $111.07 \pm 3.58$  mg/ml hemolymph, which was 85.67% of total protein. This finding was in the range of hemocyanin (80-95%) reported in other crustacean hemolymph.

In this study, cDNA of partial hemocyanin gene (pHC) was cloned from the hepatopancreas cDNA library of *F. merguensis* based on polymerase chain reaction (PCR) method. It comprised 1,496 bp encoding a polypeptide of 498 amino acid residues. A sequence comparison showed that the deduced amino acid sequence of pHC had closely identity to that of *Litopenaeus vannamei* (91%), *Marsupenaeus japonicus* (81%, 88%) and *Fenneropenaeus chinensis* (80%). In addition, the deduced amino acid sequence of *F. merguensis* pHC gene was rather identical to those of prophenoloxidase genes of *Penaeus semisulcatus* (34%), *L. vannamei* (33%) and *M. japonicus* (32%), indicating that hemocyanin and prophenoloxidase in the hemolymph of penaeid shrimps may be related.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาเสียสละเวลาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่าง ๆ ความช่วยเหลือด้านการค้นคว้าข้อมูล การทำวิจัย การถ่ายทอดความรู้ และติดตามความก้าวหน้าอย่างสม่ำเสมอ ตลอดจนการเขียนและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล ประธานกรรมการสอบ ดร. รพีพร โสทธิพันธ์ และ ดร.จรงค์ อรรถรัฐ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์จากโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี ประจำปี 2549

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำที่อนุเคราะห์เชื้อและสถานที่เลี้ยงกุ้งแชบ๊วย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง ที่อำนวยความสะดวกในการจัดหาและดูแลสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบอาจารย์วนิดา ฤทธิเดช และคุณพีรพงษ์ พึ่งแย้ม ที่ช่วยสอนบางเทคนิค และคุณอรณิชา รัตนภรณ์ ที่ช่วยงานบางส่วน ตลอดจนขอขอบคุณพี่ ๆ และน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการ วท. 414 ตลอดจนเพื่อนๆ รหัส 49 ในภาควิชาชีวเคมีทุกคนที่เป็นกำลังใจช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ๆ และญาติๆ ที่อบรมสั่งสอนสนับสนุนทุนการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ผลสำเร็จและสิ่งที่เป็นประโยชน์ของงานวิจัยนี้ ขออุทิศแด่ผู้มีพระคุณที่กล่าวมาทุกท่านและสัตว์ทดลองทุกชีวิต

อาจารย์ เจียวก๊ก

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	25
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	26
วัสดุ	26
อุปกรณ์	30
วิธีการ	31
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์	46
บทที่ 4 สรุป	89
เอกสารอ้างอิง	91
ประวัติผู้เขียน	107



## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แอกทิวีทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของฮีโมไซยานิน	24
2	ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน	40
3	สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR	41
4	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR	42
5	การทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมา	48
6	ค่าความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกิ้งแชบ้วยกับของกิ้งพีเนียดชนิดอื่น	82
7	ค่าความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกิ้งแชบ้วยกับยีนโปรตีนฟีนอลออกซิเดสของครัสเตเชียนชนิดอื่น	86

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	กุ้งแชบ๊วย (Banana shrimp, <i>Penaeus merguensis</i> )	5
2	วงจรชีวิตของกุ้งในกลุ่มพีเนียด	7
3	ระบบโปรตีนออกซิเดสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน	10
4	การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นกระบวนการ opsonization และ phagocytosis (A) และ hemolysis (B)	12
5	การเกิดปฏิกิริยา Hydroxylation และ Oxidation ของไดฟีนอล โดยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส	15
6	โครงสร้างแบบตติยภูมิของฮีโมไซยานิน	18
7	การเกิดปฏิกิริยา Oxygenation ของฮีโมไซยานิน	19
8	แผนที่ลักษณะดีเอ็นเอพาหะ pGEM <sup>®</sup> -T Easy (Promega)	43
9	การแยกฮีโมไซยานินจากพลาสมาโดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์	47
10	แบบแผนโปรตีนใน Non-denaturing PAGE ของฮีโมไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์ใน ขั้นตอนต่างๆ และย้อมแบบซิลเวอร์	49
11	แบบแผนโปรตีนใน SDS-PAGE ของฮีโมไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ ที่ย้อมด้วยสีคумаซีบลู	52
12	กราฟมาตรฐานของการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Superose 12 HR 10/30	54
13	กราฟมาตรฐานของการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE	57
14	แถบโปรตีนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสใน Non-denaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคумаซีบลู (A) และย้อมแบบแอกทิวีที (B)	59
15	การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่าย	61
16	แบบแผนโปรตีนของฮีโมลิพและฮีไซยานินบริสุทธิ์ใน SDS-PAGE และย้อมด้วยสีคумаซีบลู (A) และใน Western blot ซึ่งบ่มด้วยแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ (B)	63
17	การเจือจางที่เหมาะสมของ 1 <sup>o</sup> Ab ในการทำ ELISA	65

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
18	การเจือจางที่เหมาะสมของ 2°Ab ในการทำ ELISA	67
19	การหา pH ที่เหมาะสมของการเคลือบฮีโมไซยานินกับเพลทในการทำ ELISA	69
20	การเจือจางที่เหมาะสมของฮีโมลิมฟ์ในการทำ ELISA	71
21	กราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในการวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบวัยโดยวิธี ELISA	72
22	แบบแผนดีเอ็นเอใน 1.5% Agarose gel electrophoresis ของยีนฮีโมไซยานินที่ได้จากการทำ PCR	75
23	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน ชั้นที่ 1 (HC1)	77
24	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินชั้นยีนที่ 2 (HC2)	78
25	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC	80
26	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ่มแซบวัยกับยีนฮีโมไซยานินของกุ่มพีเนียดชนิดอื่น	83
27	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ่มแซบวัยกับยีนโปรตีนออกซิเดสของคริสต์เขียนบางชนิด	87

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
A	=	absorbance
1°Ab	=	anti-hemocyanin antibody
2°Ab	=	anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated
bp	=	base pair
BSA	=	bovine serum albumin
CAC	=	cacodylate
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CM-cellulose	=	carboxymethyl-cellulose
DEAE-Sephacel	=	diethylaminoethyl-sephacel
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
x g	=	gravitation acceleration
HC	=	hemocyanin
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
mA	=	milliampere
K <sub>av</sub>	=	distribution coefficient
LB	=	Luria Bertani
L-DOPA	=	3,4-L-dihydroxyphenyl-L-alanine
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
mmole	=	millimole

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

$M_r$	=	apparent molecular weight
ng	=	nanogram
OPD	=	<i>o</i> -phenylenediamine dihydrochloride
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	=	polymerase chain reaction
PMSF	=	phenylmethanesulphonyl fluoride
PO	=	phenoloxidase
pH	=	$-\log$ hydrogen ion concentration
ppt	=	part per ton
PVDF	=	polyvinylidene difluoride
$R_f$	=	relative mobility
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
TBS	=	50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.15 M NaCl
TEMED	=	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TMB	=	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane
X-Gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microliter
$\alpha$	=	alpha
$\beta$	=	beta
%	=	percent

# บทที่ 1

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) โดยเฉพาะกุ้งเป็นสัตว์ที่มีผู้นิยมบริโภคมากทั้งภายในและต่างประเทศ จึงเป็นสินค้าอาหารทะเลที่ตลาดโลกมีความต้องการบริโภคสูง และเพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย, พ.ศ. 2548) เมื่อความต้องการการบริโภคมีมากขึ้นทำให้กุ้งทะเลจากธรรมชาติมีปริมาณลดลง ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ เนื่องจากมีปัจจัยที่เอื้ออำนวย เช่น สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสม มีพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่ดี จึงทำให้มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้น ในประเทศไทยนิยมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) เพราะสามารถเพาะเลี้ยงได้ในระบบหนาแน่น โตเร็ว และทำรายได้ให้แก่ผู้เพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว แต่ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ประสบปัญหาการขยายพื้นที่เลี้ยงได้น้อยลงเนื่องจากพื้นที่เลี้ยงเดิมมีสภาพเสื่อมโทรมจากการเกิดโรคระบาดที่ไม่สามารถควบคุมได้ ประกอบกับการผลิตกุ้งกุลาดำต้องอาศัยแม่พันธุ์กุ้งจากธรรมชาติที่แข็งแรงซึ่งในปัจจุบันมีปริมาณลดลงมากและมีราคาสูงทำให้ต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสูงขึ้น จึงเป็นสาเหตุให้เกษตรกรหันมาสนใจเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลชนิดอื่นแทนกุ้งกุลาดำ เช่น กุ้งแชบ๊วย เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตลูกกุ้ง เพราะกุ้งแชบ๊วยสามารถเจริญพันธุ์ได้รวดเร็วและสามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินในการผลิตลูกกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) หากสามารถเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ได้ขนาดที่ต้องการแล้วจะพบว่ากุ้งแชบ๊วยมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธี วัฒนสิงห์, 2543) ในปัจจุบันได้มีการเลี้ยงกุ้งขาว (white shrimp, *Penaeus vannamei*) กันอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชีย กุ้งขาวมีต้นกำเนิดในแถบตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิกของทวีปอเมริกาใต้ ในการเลี้ยงกุ้งขาวเกษตรกรต้องนำเข้าพ่อแม่พันธุ์แม่พันธุ์กุ้งขาวมาจากประเทศไต้หวันและมลรัฐฮาวายทำให้ต้นทุนสูงและกุ้งขาวที่นำเข้าอาจจะเป็นพาหะนำโรคต่าง ๆ เข้ามา ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเช่นเดียวกับที่เคยเกิดขึ้นมาแล้วในประเทศแถบลาตินอเมริกา ทำให้เกษตรกรหันมาสนใจเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีในท้องถิ่นแทนเพื่อลดปัญหาต้นทุนและอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อ (มาลินี วิชชาวุธ และ สมยศ

สิทธิโชคพันธ์, 2548)

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อสามัญว่า banana shrimp มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Fenneropenaeus merguensis* และมีชื่อที่ใช้เรียกทั่วไปว่า กุ้งขาว กุ้งแชบ๊วยจึงกลายเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีรสชาติดีเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ ลูกกุ้งแชบ๊วยมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ดูแลอนุบาลง่ายและโตเร็วกว่าลูกกุ้งกุลาดำในช่วงต้นของการเลี้ยง (ศรีรัตน์ สอดสุข และพนม กระจำพจน์, 2541) แต่ลูกกุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงนานกว่า 2 เดือน จะมีอัตราการเจริญช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำกว่ากุ้งกุลาดำ (ธวัช ศรีวีระชัย และฐานันดร ทัดตานนท์, 2538) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยยังต้องการหลักวิชาการที่ต่างจากกุ้งกุลาดำหลายประการ เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมการกินอาหารและนิสัยการว่ายน้ำต่างจากกุ้งกุลาดำ ปัจจุบันนักวิชาการและนักวิจัยจึงให้ความสนใจศึกษาและหาทางที่จะพัฒนาการเพาะฟักและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ดียิ่งขึ้น แต่ก็มีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยาก คือการเกิดโรคติดเชื้อในกุ้งซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น เชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย เมื่อกุ้งได้รับจะเกิดเป็นโรคเรืองแสง ทำให้กุ้งตาย ก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยง ทำให้ผู้เพาะเลี้ยงขาดทุนและการส่งออกกุ้งทะเลลดน้อยลง สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนส่วนใหญ่มีการป้องกันตัวเองโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันสามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นสองระบบ คือภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มักจะใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ (hemocyte) ในการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก โดยอาศัยกระบวนการกลืนกินเซลล์โดยวิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) อีกระบบคือภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด โดยอาศัยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) แตก ระบบโปรเฟโนลอกซิเดส (prophenoloxidase system) เป็นกลไกการป้องกันตนเองที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีโนลอกซิเดส (phenoloxidase) นำไปสู่การสังเคราะห์เมลานิน (melanin) ซึ่งหน้าที่ของเมลานินจะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบุกรุกได้ (Söderhäll and Cerenius, 1998)

ฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) ประกอบไปด้วยน้ำ เกลืออนินทรีย์ และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียนมีโปรตีนหลายชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเอง ประมาณ 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์เป็นโปรตีนฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ซึ่งพบได้ในสัตว์กลุ่มมอลลัสต์ (mollusk) และกลุ่มอาร์โทรพอด (arthropod) (Adachi *et al.*, 2005; Van Holde and Miller, 1995; Sellos *et al.*, 1997; Markl and Decker, 1992) ฮีโมไซยานินทำหน้าที่หลากหลาย เช่น ขนส่งออกซิเจน (Van Holde and Miller, 1995) เป็นตัวปรับแรงดัน (Paul and Pirow, 1998) ขนส่งฮอร์โมนลอกคราบ ecdysone (Jaenicke *et al.*, 1999) และสายโพลีเปปไทด์ต้านปลาย C ของฮีโมไซยานินมีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ (Lee *et al.*, 2003;

Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001; Destoumieux *et al.*, 1997) ฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นให้มีแอกทิวิตี (activity) หรือเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมฟ์ได้ (Adachi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Hristova *et al.*, 2008) จากสมบัติของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียน บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินก็น่าจะเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียนเช่นกัน

การศึกษาฮีโมไซยานินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังยังมีการศึกษาน้อยมาก โดยเฉพาะในครัสเตเชียนเช่น กุ้ง และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจที่จะศึกษาฮีโมไซยานิน เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมด้านข้อมูลและเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลต่อไปในอนาคต



## การตรวจเอกสาร

### 1. กุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Fenneropenaeus merguensis* มีชื่อสามัญว่า banana shrimp หรือ white prawn (รูปที่ 1) และมีชื่อภาษาไทยคือ กุ้งขาว กุ้งหางแดง กุ้งหางดอก (บุญศรี จารุธรรมโสภณ, 2537) โดยมีลำดับอนุกรมวิธานรายงานไว้ดังนี้ (Perez-Farfante and Kensley, 1997)

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Order Decapoda

Family Penaeidae

Subgenus *Fenneropenaeus*

Species *merguensis*

#### 1.1 ชีวิตวิทยาและลักษณะทั่วไป

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีลักษณะพิเศษคือ ลำตัวสีครีมหรือชมพู มีจุดสีเขียวย่นหรือสีน้ำตาลปนแดงกระจายอยู่ประปราย เปลือกหุ้มลำตัวเรียบเป็นมัน ลักษณะเปลือกบาง เนื้อนุ่ม ส่วนหัวมีเปลือกหัวหรือกรี ซึ่งมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมีพื้นประมาณ 6 - 7 ซี กรีด้านล่างมีพื้นประมาณ 4 - 5 ซี เปลือกคลุมหัวมีร่องตามยาวและร่องตามขวาง มีแพนหางสีน้ำตาลแดง ด้านข้างของหางไม่มีหนาม หนวดคู่ที่หนึ่งมีแถบสีน้ำตาล หนวดคู่ที่สองสีน้ำตาลไม่มีแถบขวาง ขาเดินและขาว่ายน้ำมีสีเหลืองบางครั้งมีสีน้ำตาลหรือสีชมพู (Grey *et al.*, 1983) กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดปานกลาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มที่มีลำตัวยาว 10 - 15 เซนติเมตร ขนาดใหญ่สุดอาจยาวถึง 25 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 50 - 400 กรัม



รูปที่ 1 กุ้งแชบ๊วย (Banana shrimp, *Fenneropenaeus merguensis*)

## 1.2 การแพร่กระจายและพฤติกรรมการกินอาหาร

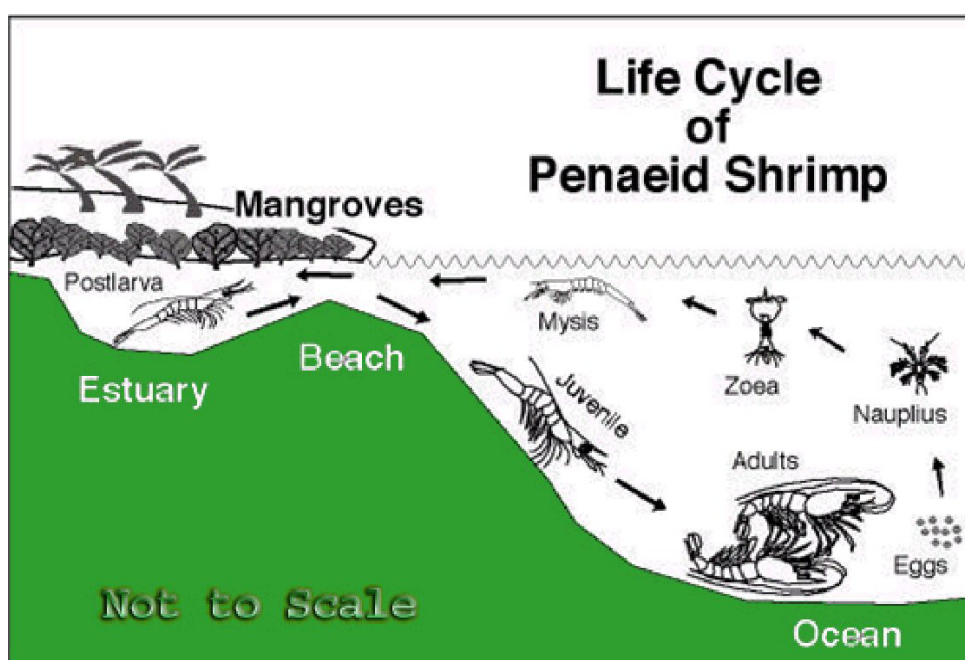
กุ้งแชบ๊วยเป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการแพร่กระจายอยู่ในเขตอินโดแปซิฟิกฝั่งตะวันตก (West-Indopacific coast) ตั้งแต่อ่าวเปอร์เซีย ชายฝั่งทะเลปาเกีสถาน อินเดีมาเลเซีย ไทย ตอนใต้ของจีน อินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย (วิวัฒน์ชัย พรหมสาขา ณ สกลนคร และสมพร โสสวัสดิ์กุล, 2532) พบกุ้งแชบ๊วยมากบริเวณน้ำตื้นปากอ่าวหรือปากแม่น้ำที่น้ำค่อนข้างขุ่น บางครั้งจะพบอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก พบลูกกุ้งระยะ post larva และ juvenile ได้ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลตรงที่มีพื้นดินเลนหรือพื้นดินโคลนปนทรายที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตและเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ โดยอาศัยอยู่ตั้งแต่ชายฝั่งจนถึงทะเลลึก พบทั้งในทะเลและเขตน้ำกร่อยที่มีความเค็มระหว่าง 10 - 36 ppt ส่วน pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.8 - 8.5 อุณหภูมิ 25 - 32 °C ตัวเต็มวัยจะวางไข่ในทะเลที่มีความลึกประมาณ 10 เมตรขึ้นไป สามารถจับได้ด้วยประมงอวนลากหรือโป๊ะอวน

กุ้งแชบ๊วยมีนิสัยการกินอาหารแบบกัดแทะโดยจับชิ้นอาหารแล้วว่ายน้ำกัดกินไปเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่ต่างจากกุ้งกุลาดำที่จับอาหารแล้วหยุดกัดกินอาหารนิ่งอยู่กับที่ กุ้งแชบ๊วยปราดเปรียวและว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลาแม้แต่เวลาที่กินอาหาร อาหารธรรมชาติของกุ้งแชบ๊วยได้แก่ ตัวอ่อนสัตว์น้ำ แมลงน้ำ ซากพืช ซากสัตว์ สาหร่ายชนิดต่าง ๆ หอย ปลา ลูกกุ้ง ฟีชีน้ำ (เมธี วัฒนสิงห์, 2543)

## 1.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วย

กุ้งมีอวัยวะเพศภายนอกมองเห็นได้ชัดเจน และสามารถใช้ลักษณะความแตกต่างของอวัยวะเพศในการจำแนกชนิดได้ อวัยวะเพศผู้เรียกว่า petasma อวัยวะเพศเมียเรียกว่า ทิไลคัม (thelycum) อวัยวะเพศเมียเป็นระบบปิด (closed thelycum) จึงต้องมีการจับคู่ผสมเพื่อย้ายถุงน้ำเชื้อจากตัวผู้ไปสู่ตัวเมียและเก็บที่บริเวณหน้าอกในส่วนของทิไลคัมของตัวเมีย โดยจะเกิดขึ้นภายหลังจากตัวเมียลอกคราบ เมื่อเพศเมียมีไข่แก่จะปล่อยไข่ออกมาผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้และฟักเป็นตัว เจริญเติบโตภายนอกตัวกุ้ง (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) กุ้งแชบ๊วยสามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตลอดทั้งปี เดือนที่พบกุ้งระยะที่มีไข่แก่ตามธรรมชาติมากที่สุดได้แก่ เดือนมกราคม มิถุนายน กันยายน และธันวาคม (เมธี วัฒนสิงห์, 2543) โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกและเวลากลางคืน

การพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของกุ้งแชบ๊วยตั้งแต่แม่กุ้งวางไข่จนถึงระยะ first postlarva ใช้ระยะเวลาประมาณ 10 วัน โดยแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ nauplius, protozoa, mysis และ postlarva (รูปที่ 2) เมื่อเข้าสู่ระยะที่ 4 ลูกกุ้งเคลื่อนย้ายเข้าสู่บริเวณชายฝั่งทะเลที่เป็นน้ำกร่อย ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวเองอยู่บริเวณนี้จนโตใช้เวลาประมาณ 1 - 2 เดือน ขึ้นกับสภาพแวดล้อมของพื้นที่ จนถึงระยะ juvenile ซึ่งมีอายุประมาณ 2 - 3 เดือน จะเคลื่อนย้ายออกสู่บริเวณชายฝั่งน้ำตื้นจนเจริญเข้าสู่ระยะ subadult ซึ่งมีอายุประมาณ 3 - 4 เดือน จึงเคลื่อนย้ายออกสู่ทะเลเปิดเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ adult เพื่อทำการแพร่ขยายพันธุ์ต่อไป (มีทนา บุญยุบล, 2539)



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้งในกลุ่มพีเนียด (Bailey-Brock and Moss, 1992)

## 2. ระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน

สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนเป็นสัตว์ที่มีเปลือกภายนอกแข็งและไม่มีกระดูกสันหลัง ดังนั้นพวกครัสเตเชียนจึงต้องมีระบบป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพ เพื่อไม่ให้สิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคเข้ามาบุกรุกทำลายอวัยวะต่างๆของร่างกายในขณะที่เกิดบาดแผลหรือในช่วงที่มีการลอกคราบ สามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity system) และระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำ (humoral immunity system)

### 2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มักจะใช้เม็ดเลือดคือ เซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte) เป็นหลักในการต่อสู้สิ่งแปลกปลอมซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ การกลืนกินแบบฟาโกไซโทซิส การเกิดโนดูล การกักล้อมสิ่งแปลกปลอม ระบบกระตุ้นโปรเฟโนลอกซิเดส (prophenoloxidase activating system) และการแข็งตัวของเลือด (จรีพร เรืองศรี, 2546) ถ้าสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กและจำนวนน้อยจะถูกกำจัดโดยการกลืนกินแบบฟาโกไซโทซิสซึ่งเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีพาราไซต์หรือสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย วิธีในการกลืนกินเซลล์สิ่งแปลกปลอมจะมีการยื่นไซโทพลาซึม (cytoplasm) ไปล้อมสิ่งแปลกปลอมแล้วไลโซโซม (lysosome) จะหลั่งสารช่วยย่อยซึ่งมีทั้งสารต่อต้านแบคทีเรียและเอนไซม์ย่อยสลาย (hydrolytic enzyme) หลังการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายออกมานอกเซลล์ สำหรับการเกิดโนดูลจะเกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการกักล้อมสิ่งแปลกปลอมจะเกิดกับสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่ (เอ็ดมอนด์ อินทรผาด, 2545)

การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดแตกต่างกันจึงสามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิดคือ

1. อะกรานูโลไซท์ (agranulocyte) หรือเซลล์ไฮยาลิน (hyaline cell) เป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มีกรานูลน้อย

มากหรือไม่มีกรานูล (granule) ในไซโทพลาซึม และเป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด เซลล์ชนิดนี้สามารถกลืนกินทำลายสิ่งแปลกปลอมในร่างกายนองกุ้งโดยเกิดการฟาโกไซโทซิส

2. เซลล์ฮีโมไซท์แบบเซมิกรานูลาร์ (semigranular hemocyte) เซลล์เม็ดเลือดกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรานูลรูปร่างหลายแบบคือ รูปร่างกลม รูปไข่ รูปกระสวย เซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยการย่อยสารที่อยู่ในกรานูลและจับกับสิ่งแปลกปลอมหรือการเกิดโหนด (Söderhäll and Cerenius, 1998) โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ของเชื้อก่อโรค เช่น สารลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) และเบตา-1,3-กลูแคน ( $\beta$ -1-3-glucan) โดยปล่อยสารที่อยู่ในกรานูลและชักนำให้เกิดกระบวนการกักล้อม

3. เซลล์ฮีโมไซท์แบบกรานูลไซท์ (granulocyte) หรือฮีโมไซท์แบบลาร์จกรานูล (large granular hemocyte) เป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดที่มีกรานูลขนาดใหญ่ มีหน้าที่หลักในระบบกระตุ้นโปรเฟโนออกซิเดส (Johansson and Söderhäll, 1989) โดยเป็นแหล่งเก็บเอนไซม์โปรเฟโนออกซิเดสที่อยู่ในไซโทพลาซึม

ระบบโปรเฟโนออกซิเดส (prophenoloxidase system, proPO system) เป็นระบบป้องกันตัวที่สำคัญของสัตว์กลุ่มอาร์โทรพอด ซึ่งสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ (Söderhäll and Cerenius, 1998) โดยจดจำส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan, PG) และ เบตา-1,3-กลูแคน ( $\beta$ -1-3-glucan, BG) โดยอาศัยโมเลกุลจดจำที่จำเพาะได้แก่ โปรตีนที่จับจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคน (BGBP,  $\beta$ -1-3-glucan binding protein) และโปรตีนที่จับจำเพาะกับลิโปโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน (LGBP, LPS- and  $\beta$ -1-3-glucan binding protein) (Duvic and Söderhäll, 1990; Lee *et al.*, 2000) โมเลกุล BGBP ถูกสังเคราะห์ที่ตับ ในขณะที่โมเลกุล LGBP ถูกสังเคราะห์ในเซลล์ฮีโมไซท์ เมื่อ BGBP จับกับเบตา-1,3-กลูแคน โปรตีนนี้จะไปจับตัวกับผิวของเซลล์ฮีโมไซท์ (Barracco *et al.*, 1991; Duvic and Söderhäll, 1990) การที่ BGBP-glucan complex จับกับเซลล์ฮีโมไซท์สามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ตามมามากมาย เช่น การแผ่ขยายและการสลายกรานูลของเซลล์ฮีโมไซท์ (Barracco *et al.*, 1991) สนับสนุนให้เซลล์ไฮยาลินมีอัตราการกลืนกินเร็วขึ้น (Thornqvist *et al.*, 1994) การสลายเซลล์ฮีโมไซท์ชนิดกรานูลทำให้เกิดการหลั่งสารที่เป็นองค์ประกอบของระบบ proPO และสารอื่นๆ ที่สำคัญในการป้องกันตัวออกมาจากกรานูล ดังแสดงในรูปที่ 3 การกระตุ้นระบบ proPO ถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ serine proteinase (Söderhäll, 1982; Söderhäll and Cerenius, 1998) และเรียกเอนไซม์นี้ว่า ppA (prophenoloxidase activating enzyme) ในกุ้งนาง (crayfish, *Pacifastacus leniusculus*) เอนไซม์ ppA เป็น trypsin-like proteinase ซึ่งถูกเก็บไว้ในรูป inactive ภายในกรานูล เอนไซม์

นี้จะหลั่งออกมาพร้อมกับโปรฟีโนลออกซิเดส (prophenoloxidase, proPO) และเปลี่ยนเป็นรูป active ที่สามารถเปลี่ยนโปรตีนโปรฟีโนลออกซิเดสไปเป็นเอนไซม์ฟีโนลออกซิเดส (prophenoloxidase, PO) (Aspan and Söderhäll, 1991; Aspan *et al.*, 1995) เอนไซม์ฟีโนลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (melanization) (Söderhäll และ Cerenius, 1998) โดยเมลานินจะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรียได้ (Söderhäll และ Cerenius, 1998; Knaap, 1993)

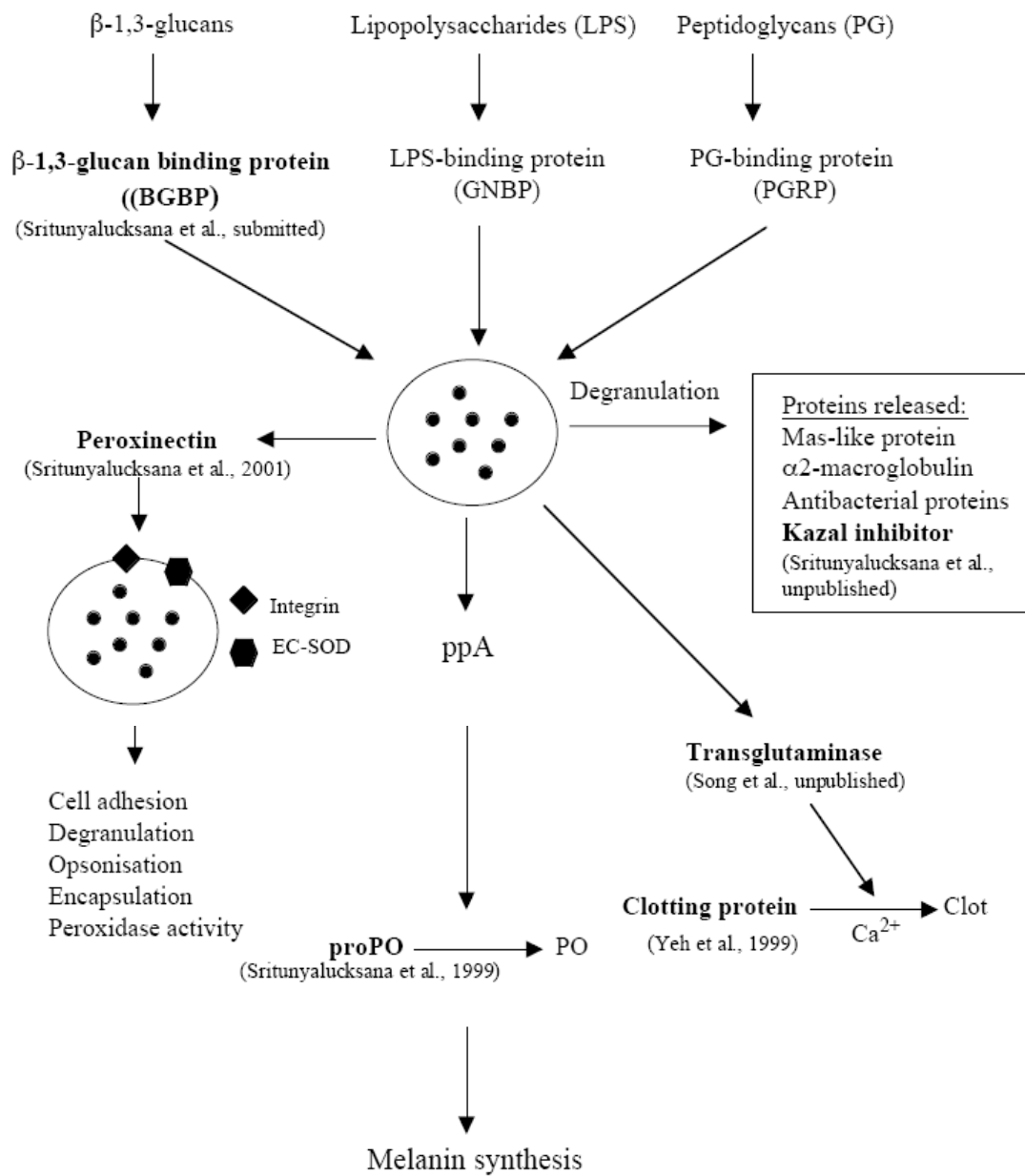



Figure 1: The prophenoloxidase activating system in crustaceans. Proteins isolated from shrimp, *P. monodon* are indicated in bold letters.  : granules-containing hemocyte

**รูปที่ 3 ระบบโปรฟีโนลออกซิเดสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน**  
(Sritunyalucksana, 2001)

**2.2 ระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำ**



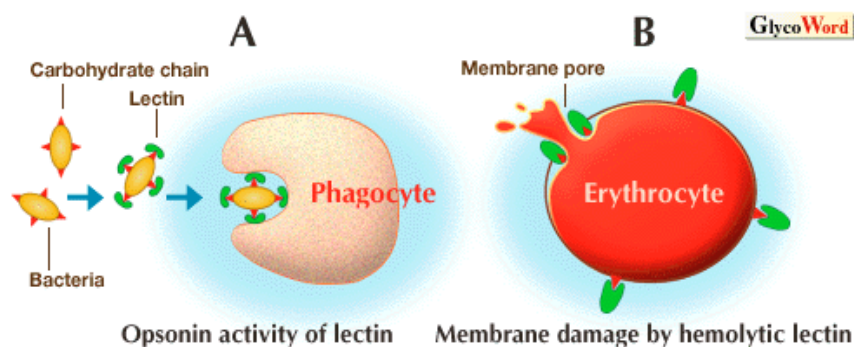
ระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำประกอบด้วยโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ เลคติน สารประกอบต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial compound) และ reactive oxygen intermediates (ROIs)

เลคติน (lectin) เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ โดยเลคตินมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันคือการกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโต (metamorphosis) และทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อต่างๆ (Takahashi *et al.*, 1996) จากคุณสมบัติที่เลคตินสามารถจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตและโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของผนังเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เลคตินจึงเป็นตัวละครสำคัญในระบบการรับรู้ถึงการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอม (Ratcliffe *et al.*, 1985) ในสัตว์จำพวกกุ้ง เนื่องจากเลคตินสามารถทำให้เซลล์จุลินทรีย์เกิดการเกาะกลุ่ม จึงไม่สามารถแพร่กระจายไปยังที่ต่างๆ นอกจากนี้เลคตินยังจับระหว่างจุลินทรีย์และเซลล์เม็ดเลือดก่อให้เกิดการกลืนกินแบบฟาโกไซโทซิสของจุลินทรีย์ที่บุกรุกได้ (Sritunyalucksana *et al.*, 2001) มีรายงานว่าเมื่อเลคตินจับกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นให้มีการจับของเซลล์ฟาโกไซท์ (phagocyte) ในกระบวนการออปโซไนซ์ (opsonization) เพื่อทำลายเซลล์แปลกปลอม (รูปที่ 4A) เลคตินที่จำเพาะกับกรดไซอะลิก (sialic acid) จากแมงดาทะเล (horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotunda cauda*) (Dorai *et al.*, 1981) และเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) จากปลิงทะเล (*Acropora echinata*) สามารถทำลายเมมเบรน (membrane) และทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและกระต่ายแตกได้ โดยเมื่อเลคตินจับกับคาร์โบไฮเดรตบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เมมเบรนเกิดรูพรุน (pore) และทำให้เซลล์แตก (รูปที่ 4B) กล่าวได้ว่าการทำลายเซลล์แปลกปลอมจะขึ้นกับชนิดของเซลล์แปลกปลอมและปริมาณของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของสัตว์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นตัวชักนำให้เกิดการกำจัดเซลล์แปลกปลอมได้ดีและเร็วขึ้น (Hatakeyama *et al.*, 1995)

มีรายงานการศึกษาเลคตินที่มีความจำเพาะกับกรดไซอะลิกในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยที่เพิ่มสูงขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* (ปีนณา ลิมพานิช, 2550) นอกจากนี้ยังสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคกุ้งได้แก่ *V. harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* เกาะกลุ่ม แต่ไม่ทำให้แบคทีเรียไม่ก่อโรคกุ้งคือ *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhi* เกิดการเกาะกลุ่ม (Utarabhand *et al.*, 2007) ขณะนี้ได้มีการศึกษาระดับยีนเลคตินของกุ้งแชบ๊วยแล้ว (Rattanaporn, 2008) ซึ่งจะเป็นการยืนยันว่าเลคตินเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำของกุ้งแชบ๊วยต่อไป

ในซีรัมของกุ้งกุลาดำ พบเลคตินที่จำเพาะกับกรดไซอะลิกทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่เลือด O เกาะกลุ่ม และทำให้แบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; 1992) ส่วน Vazquez และคณะ (1993) พบว่า

เลคตินของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกได้ เป็นเพราะเลคตินสามารถจับจำเพาะต่อ O-keto และ O-methyl ของน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติก (acetyl group) จากโพลีแซคคาริไรด์บนผนังเซลล์แบคทีเรียเหล่านั้นได้ สำหรับในสัตว์บางชนิดอาศัยความเป็นพิษของเลคตินเพื่อป้องกันตัวเช่น เลคตินที่เป็นพิษในหนามของหอยเม่นทะเล (*Toxopneustes pileolus*) (Seike *et al.*, 1992)



รูปที่ 4 การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นกระบวนการ opsonization และ phagocytosis (A) และ hemolysis (B) (Hatakeyama *et al.*, 1995)

ไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำอีกชนิดหนึ่งที่ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกแยกออก เอนไซม์นี้มีฤทธิ์เล็กน้อยโดยไม่สามารถทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบเกิดการแยก แต่ช่วยทำให้แบคทีเรียมีความไวต่อการกระทำของสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นมากขึ้น ส่วน reactive oxygen intermediates (ROIs) ได้แก่อนุมูลของซูเปอร์ออกไซด์ ( $O_2^-$ ) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) อนุมูลของไฮดรอกซิล ( $OH^-$ ) ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษกับเซลล์โดยไปยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคและทำลายโครงสร้างเซลล์ของสิ่งแปลกปลอม จากการทดลองในหอยสองฝา พบว่าปริมาณของ ROIs ที่ปล่อยจากเม็ดเลือดจะสัมพันธ์กับความเครียด การเกิดบาดแผลและการติดเชื้อซึ่งเป็นกลไกที่ป้องกันการฉวยโอกาสและลดการติดเชื้อโรค (Adema *et al.*, 1991)

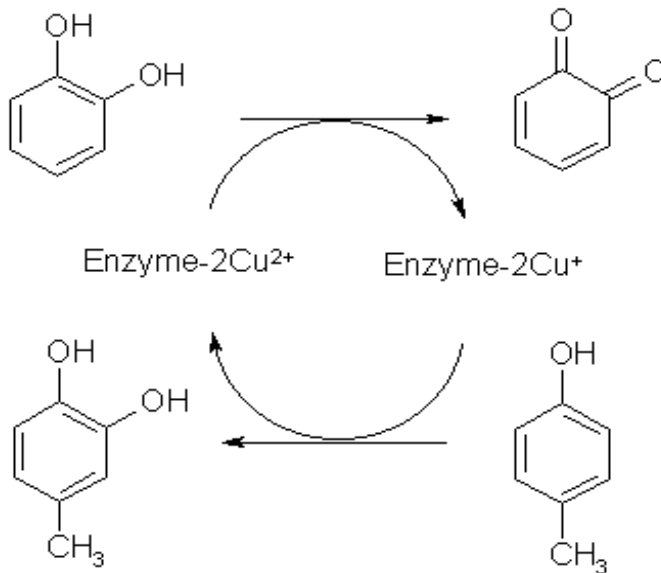
เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ( $\beta$ -1,3-glucanase) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกแบบเบตา-1,3 ( $\beta$ -1,3-glycosidic bond) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Hrmova and Fincher, 1993) ส่วนเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามิไนเดส (N-acetyl glucosaminidase, NAGase) หรือโคโตไบเอส (chitobiase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคติน (chitin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของจุลินทรีย์เช่นกัน มีการศึกษาระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกกระตุ้นให้มีการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active โดยการฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรีย  $5 \times 10^9$  เซลล์ต่อตัวกุ้ง พบว่ามีค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 2.57 และ 1.97 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับระดับของเอนไซม์ของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ในทำนองเดียวกัน ระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่ติดเชื้อ *V. harveyi* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 1.99 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุม ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มสูงขึ้นในฮีโมลิมฟ์และในตับน่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย แต่จากการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ inactive หรือฉีดด้วยเชื้อไม่ก่อโรคในกุ้งแชบ๊วย เช่น *E. coli*, *V. cholerae* และไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) พบระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของทั้งเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับไม่แตกต่างจากกุ้งชุดควบคุม (อรัญญา คงแก้ว, 2549)

### 3. เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase, PO)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีคอปเปอร์ (copper, Cu) เป็นองค์ประกอบ ตรวจพบได้ในฮีโมลิมฟ์ ใน coelom และในคิวติเคิล (cuticle) ของอาร์โทรพอด (Söderhäll and Cerenius, 1998) ในสิ่งมีชีวิตจำพวกกุ้งพบแอกทีวิตีของเอนไซม์ในระบบโปรตีนออกซิเดส จะมีมากในเวสิเคิล (vesicle) ซึ่งอยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ฮีโมไซท์ เช่น ใน *Astacus astacus* และในกุ้งนาง *Procambarus clarkia* (Lanz *et al.*, 1993; Johansson and Söderhäll, 1989; Smith and Söderhäll, 1983b) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกายกุ้ง เช่น เป็นตัวเร่งให้เลือดแข็งตัว มีความว่องไวในการเกาะผิวของสิ่งแปลกปลอมและดึงดูดให้เซลล์เม็ดเลือดมาจับกินได้เร็วขึ้น ในขณะที่การศึกษาของ Sung และคณะ (1996) และ Perazzolo และ Barracco (1997) พบว่าเอนไซม์โปรตีนออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) และกุ้งขาว (*P. Vanamai*) ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ฮีโมไซท์แบบกรานูลาร์ (granular hemocyte) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง (Söderhäll *et al.*, 1990; Söderhäll, 1983; Hose *et al.*, 1987)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มาจากระบบโปรตีนออกซิเดสมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Söderhäll และ Cerenius, 1998) โดยเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (O-hydroxylation) ที่ตำแหน่งออร์โธ (ortho) ของสับสเตรทแบบฟีนอล (phenolic substrate) เช่นโมโนฟีนอล (monophenol) ให้เป็นไดฟีนอล (diphenol) และออกซิไดซ์ (oxidize) ฟีนอลไปเป็นควิโนน (quinone) (รูปที่ 5) รวมทั้งเอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็น dihydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยน DOPA ไปเป็น DOPA-quinone (Sugumaran, 1996) โดยปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดในวิถีการสร้างเมลานิน เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และความร้อนสามารถกระตุ้นให้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีแอกทีวิตีเพิ่มสูงขึ้นได้ โดยทำหน้าที่กระตุ้นในลักษณะเดียวกับ serine proteinase (Söderhäll, 1981; Leonard *et al.*, 1985) ซึ่งสามารถกระตุ้นเอนไซม์โปรตีนออกซิเดสที่ไม่ active ไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ active ได้ และทำให้เกิดการสร้างเมลานิน โดยเห็นเป็นจุดสีดำบริเวณคิวติเคิลของอาร์โทรพอด (Söderhäll and Ajaxon, 1982; Sugumaran and Kanost, 1993) เมลานินที่ถูกสังเคราะห์จะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรีย (Söderhäll และ Cerenius, 1998; Knaap, 1993)

มีการศึกษาระดับแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมป์ของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active โดยการฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรีย  $5 \times 10^9$  เซลล์ต่อตัวกุ้ง พบว่าแอกทิวิตี (หน่วย/มล.ฮีโมลิมป์) และแอกทิวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมป์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามเวลาจาก ชั่วโมงที่ 0 (ก่อนฉีด) ณ ชั่วโมงที่ 6, 12 และเพิ่มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 18 ในขณะที่แอกทิวิตีของเอนไซม์นี้ในฮีโมลิมป์ของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือมีระดับไม่แตกต่างกัน ณ เวลาต่างๆ บ่งชี้ว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมป์ของกุ้งแชบ๊วยถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นตามเวลาตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นรายงานที่ช่วยยืนยันว่าเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส น่าจะเป็นเอนไซม์หนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วย (วิไลพร ธรรมรัตน์, 2551)



รูปที่ 5 การเกิดปฏิกิริยา Hydroxylation และ Oxidation ของไดฟีโนลโดยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Marshall *et al.*, 2000)

#### 4. ฮีโมไซยานิน (Hemocyanin, HC)

ฮีโมไซยานินพบในฮีโมลิมฟ์ของสัตว์กลุ่มมอลลัสค์และกลุ่มอาร์โทรพอด ประมาณ 90-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์เป็นโปรตีนฮีโมไซยานิน (Adachi *et al.*, 2005; Van Holde and Miller, 1995; Sellos *et al.*, 1997; Markl and Decker, 1992) เนื่องจากฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่มีคอปเปอร์ (Cu, copper) เป็นองค์ประกอบ เมื่ออยู่ในรูปที่ไร้ออกซิเจน (deoxy form) จึงทำให้ฮีโมลิมฟ์ของสัตว์เหล่านี้ไม่มีสี แต่เมื่ออยู่ในรูปที่มีออกซิเจน (oxy form) ทำให้ฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียนกลายเป็นสีน้ำเงินอ่อน มีรายงานว่าฮีโมไซยานินถูกสังเคราะห์จากตับ (hepatopancreas) (Spindler *et al.*, 1992) ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการทำ hybridization ในกุ้งนาง (crayfish, *Astacus leptodactylus*) (Gellissen *et al.*, 1991) ในปูสีน้ำเงิน (blue crab, *Callinectes sapidus*) (Rainer and Brouwer, 1993) และในกุ้ง *P. semisulcatus* (Khayat *et al.*, 1995)

##### 4.1 แหล่งที่พบฮีโมไซยานิน

พบฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของสัตว์กลุ่มมอลลัสค์ เช่น ปลาหมึก *Octopus vulgaris* (Salvato *et al.*, 1998) และ *Octopus bimaculatus* (Herskovits and Villanueva, 1986) ในหอยทะเล เช่น *Cryptochiton stelleri* (Herskovits and Hamilton, 1987a), *Stenoplax conspicua* (Herskovits and Hamilton, 1987b) และ *Acanthopleura granulate* (Herskovits *et al.*, 1986) และกลุ่มอาร์โทรพอดเช่น แมงมุม (tarantula, *Eurypelma californicum*) (Decker *et al.*, 1989) ในแมงดาทะเล เช่น *Limulus polyphemus* (Decker *et al.*, 2001) และ *Tachypleus tridentatus* (Nagai *et al.*, 2001; Kurtz, 1999) ในกุ้งนาง crayfish เช่น *A. leptodactylus* (Schneider *et al.*, 1986) และ *P. leniusculus* (Dolashka-Angelova *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004) ในปู เช่น *Cancer magister* (Terwilliger and Brown, 1993) ในกุ้ง เช่น กุ้งกุลาดำ (Stoeva *et al.*, 2001) กุ้ง kuruma (*Penaeus japonicus*) (Adachi *et al.*, 2001) และกุ้งขาว (Figuroa-Soto *et al.*, 1997)

##### 4.2 สมบัติของฮีโมไซยานิน

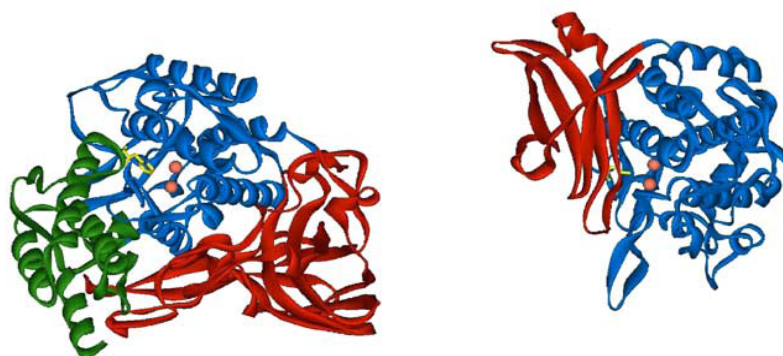
#### 4.2.1 โครงสร้างของฮีโมไซยานิน

ฮีโมไซยานินที่พบในสัตว์กลุ่มมอลลัสค์และอาร์โทรพอดมีโครงสร้างโมเลกุลต่างกัน (Van Holde and Miller, 1995; Salvato and Beltramini, 1990) ในอาร์โทรพอดฮีโมไซยานินเกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อย (subunit) ซึ่งมีมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยอยู่ในช่วง 72,500-79,500 ดัลตัน (Dalton) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 600-660 หน่วย (Markl, 1986) จากผลงานวิจัยของ Linzen และคณะ (1985) พบว่าโครงสร้างสามมิติ (three-dimensional) ของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินในกิ้งมังก (Panulirus interruptus) มีโครงสร้างแบบตติยภูมิ (tertiary structure) โดยแสดงตัวอย่างของฮีโมไซยานินจาก *Limulus polyphemus* (รูปที่ 6A) ที่ประกอบด้วย 3 โดเมน (domain) โดยโดเมนที่ 1 เป็นด้านปลาย N ของสายโพลีเปปไทด์ (N-terminus of polypeptide) ที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวแอลฟา ( $\alpha$ -helix) 7-8 เกลียว โดเมนที่ 2 เป็นตำแหน่งที่มีคอปเปอร์สองอะตอม คือ CuA และ CuB แต่ละอะตอมจับกับ 3 ฮิสทีดีน (histidine) ในสายโพลีเปปไทด์ของฮีโมไซยานิน และเป็นตำแหน่งที่มีการจับกับออกซิเจน (รูปที่ 7) ส่วนโดเมนที่ 3 เป็นด้านปลาย C (C-terminus) ของสายโพลีเปปไทด์ที่เป็นโครงสร้างแบบแผ่น  $\beta$  ( $\beta$ -barrel) 7 ส่วน (stranded)

โครงสร้างพื้นฐานของฮีโมไซยานินในอาร์โทรพอดเป็นแบบเฮกซะเมอร์ (hexamer) มีมวลโมเลกุลประมาณ 450,000 ดัลตัน (García-Carreño *et al.*, 2008; Adachi *et al.*, 2005; Decker and Jaenicke, 2004; Jaenicke and Decker, 2003; Burmester, 1999; Terwilliger *et al.*, 1999; Zlateva *et al.*, 1996; Linzen *et al.*, 1985) โดยได้จากการศึกษาโครงสร้างผลึก (crystallography) ใน *Panulirus interruptus* (Volbeda and Hol, 1989) และในแมงดาทะเล *Limulus polyphemus* (Hazes *et al.*, 1993) และได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (cryoelectron) ในแมงมุม (*E. californicum*) (De Haas and Van Bruggen, 1994) และในกิ้งมังก (*Palinurus elephas*) (Meissner *et al.*, 2003) ฮีโมไซยานินจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ซึ่งประกอบด้วย hexamer หลายหน่วยอยู่รวมกัน (aggregate) ขึ้นอยู่กับกลุ่มของสิ่งมีชีวิต เช่นเป็น 6-mer (1x6,  $M_r \sim 450$  kDa), 12-mer (2x6,  $M_r \sim 900$  kDa), 24-mer (4x6,  $M_r \sim 1,800$  kDa) และ 48-mer (8x6,  $M_r \sim 3,600$  kDa) (Van Holde and Miller, 1995; Salvato and Beltramini, 1990) แต่ละหน่วยของ hexamer จะไม่จับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) แต่ก็มีรายงานวิจัยของ Markl (1980) เกี่ยวกับพันธะระหว่างหน่วยของ hexamer ของแมงมุม (*Cupiennius salei*) ว่า hexamer 2 หน่วยอาจจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) รวมกันเป็น 12-mer ในสัตว์กลุ่มมอลลัสค์ฮีโมไซยานินมีมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 50,000 ดัลตัน (Lieb *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 1998) จากผลงานวิจัยของ Cuff และคณะ (1998) ศึกษาโครงสร้างของฮีโมไซยานินในปลาหมึก *Octopus dofleini*

ด้วยรังสีเอกซ์ (X-ray) พบว่ามีโครงสร้างแบบตติยภูมิที่ประกอบด้วย 2 โดเมน (รูปที่ 6B) ทั้งสองโดเมนนี้เหมือนกับโดเมนที่ 2 และ 3 ของฮีโมไซยานินในอาร์โทรพอด โดยตำแหน่งของคอปเปอร์ที่จับกับออกซิเจนอยู่ที่โดเมนที่ 1 ซึ่งเป็นด้านปลาย N ของสายโพลีเปปไทด์ ส่วนโดเมนที่ 2 เป็นด้านปลาย C ของสายโพลีเปปไทด์ที่เป็นแผ่น  $\beta$  (Van Holde *et al.*, 2001) และมีโครงสร้างพื้นฐานของฮีโมไซยานินเป็นแบบ dodecamer (12-mer) (Miller *et al.*, 1998)

**A** *Limulus hemocyanin*      **B** *Octopus hemocyanin*



**รูปที่ 6** โครงสร้างแบบตติยภูมิของฮีโมไซยานิน

A ฮีโมไซยานินของ *Limulus polyphemus*

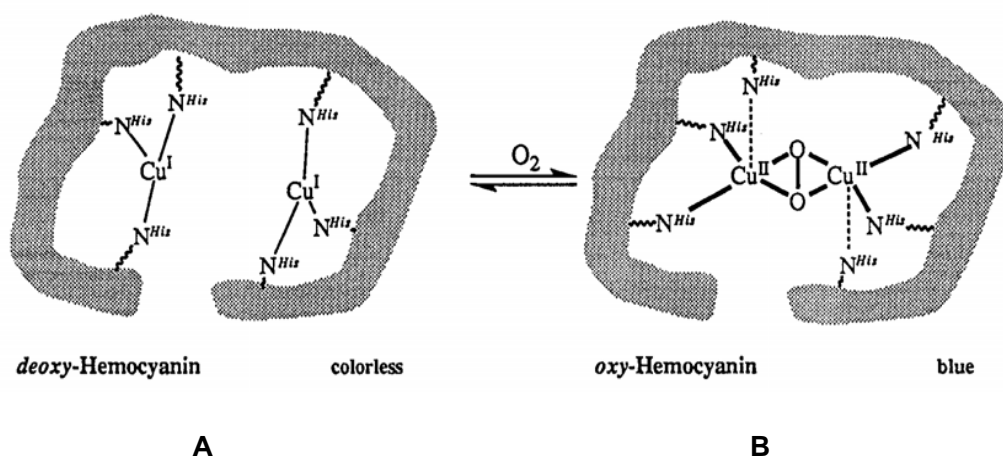
B ฮีโมไซยานินของ *Octopus dofleini*

สีส้มคือคอปเปอร์, สีเขียวคือโดเมน 1

สีน้ำเงินคือโดเมน 2, สีแดงคือโดเมน 3



(Decker and Jaenicke, 2004)



รูปที่ 7 การเกิดปฏิกิริยา Oxygenation ของฮีโมไซยานิน

A ฮีโมไซยานินที่ไม่มีออกซิเจนจับอยู่ ไม่มีสี

## B ฮีโมไซยานินที่จับกับออกซิเจน มีสีน้ำเงิน (Fox *et al.*, 1993)

### 4.2.2 มวลโมเลกุลของฮีโมไซยานิน

มวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในรูปแบบไม่แปลงสภาพ (native form) จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ แหล่ง มีมวลโมเลกุลต่างๆ กัน เช่น กุ้งขาว (*P. vannamei*) มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) กุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) และของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (Ellerton and Anderson, 1981) มีมวลโมเลกุลเท่ากันคือ 471 kDa สำหรับฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของปู *Scylla olivacea* มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Chen *et al.*, 2007)

จำนวนและมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ แหล่ง มีจำนวนและมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยต่างๆ กัน เช่น มีหน่วยย่อย 2 หน่วย อาทิเช่น ในกุ้ง kuruma (*P. japonicus*) มีมวลโมเลกุล 77,000 และ 67,000 ดัลตัน (Adachi *et al.*, 2001) กุ้งขาว (*P. vannamei*) มีมวลโมเลกุล 82,000 และ 75,000 ดัลตัน (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) กุ้ง *P. setiferus* มีมวลโมเลกุล 82,000 และ 77,000 ดัลตัน (Brouwer *et al.*, 1978) ในกุ้งนาง (*P. leniusculus*) มีมวลโมเลกุล 75,000 และ 66,000 ดัลตัน (Lee *et al.*, 2004; Dolashka-Angelova *et al.*, 2005) และใน giant isopod (*Bathynomus giganteus*) มีมวลโมเลกุล 72,000 และ 70,000 ดัลตัน (Pless *et al.*, 2003) สำหรับฮีโมไซยานินที่รายงานว่า มีหน่วยย่อย 3 หน่วย เช่น ของกุ้งกุลาดำมีมวลโมเลกุล 85,000, 77,000 และ 70,000 ดัลตัน (Ellerton and Anderson, 1981) และของปู *C. japonica* มีมวลโมเลกุล 80,000, 75,000 และ 70,000 ดัลตัน (Fan *et al.*, 2009)

### 4.3 การทำบริสุทธิ์ฮีโมไซยานิน

โดยทั่วไปการทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ทำได้ด้วยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ (ultracentrifugation) และโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน (gel filtration chromatography) (Sanders *et al.*, 1992; Markl and Kempter, 1981; Senkbeil and Wriston, 1981) เนื่องจากฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่พบมากในฮีโมลิมฟ์ ประมาณ 90-95% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ สามารถทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้ง kuruma (*P. japonicus*) โดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ และคอลัมน์ Sepharose CL-6B และตรวจหาฮีโมไซยานินได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Adachi *et al.*, 2001) ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนกับการทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งขาว (*P. vannamei*) (García-Carreño *et al.*, 2008) สำหรับในกุ้งนาง (*P. leniusculus*) ได้มีการทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์แล้วผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 (Lee *et al.*, 2004)

## 5. บทบาททางชีวภาพของฮีโมไซยานิน

ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หลากหลาย (multifunctional) โดยทั่วไปเป็นที่ทราบกันว่าฮีโมไซยานินทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนของสัตว์ในกลุ่มมอลลัสค์และอาร์โพรอด (Van Holde and Miller, 1995) เมื่อคอปเปอร์จับกับออกซิเจนทำให้ฮีโมลิมฟ์กลายเป็น สีน้ำเงิน ฮีโมไซยานินยังเป็นตัวปรับแรงดันในฮีโมลิมฟ์ (Paul and Pirow, 1998) รวมทั้งสามารถขนส่งฮอร์โมนลอกคราบ ecdysone จากผลงานวิจัยของ Jaenicke และคณะ (1999) ที่ศึกษาฮีโมไซยานินในแมงมุม (*E. californicum*) และจากการศึกษาโครงสร้างของฮีโมไซยานินด้วยรังสีเอกซ์ พบว่าโดเมนที่ 1 ของหน่วยย่อยฮีโมไซยานินเป็นตำแหน่งที่จับกับ ecdysone มีรายงานในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่าในช่วงก่อนการลอกคราบมีปริมาณฮีโมไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในฮีโมลิมฟ์ (Rao *et al.*, 2007)

จากการที่มีรายงานวิจัยว่าสายโพลีเปปไทด์ด้านปลาย N ของฮีโมไซยานินมีแอกทิวีทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นให้มีแอกทิวีทีหรือเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารหลายอย่าง อาทิเช่น โดย SDS (sodium dodecyl sulfate) ดังนั้น SDS ถูกใช้เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่ใช้ในการหาค่าแอกทิวีทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในพืช เช่น เห็ด (*Agaricus bisporus*) (Espin and Wichers, 1999) ในสัตว์ เช่น กุ้ง *Penaeus californiensis* (Gollas-Galvan *et al.*, 1999) แมงดาทะเล

(*Tachypleus tridentatus*) (Kurtz, 1999) กุ้งนาง (*P. leniusculus*) (Lee *et al.*, 2004) จากผลงานวิจัยของ Adachi และคณะ (2001) พบว่าฮีโมไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์จากฮีโมลิมพ์ของกุ้ง kuruma (*P. japonicus*) ถูกกระตุ้นด้วย SDS ทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีค่าแอสซิติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเหมือนกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่พบในฮีโมไซท์

มีรายงานว่าสายโพลีเปปไทด์ด้านปลาย C ของฮีโมไซยานินมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยพบในฮีโมลิมพ์ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน ดังเช่น *P. vanamei* (PvHct) และกุ้ง *Penaeus stylirostris* (PsHct1, PsHct2) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ โดยสายโพลีเปปไทด์ของ PvHct (มวลโมเลกุล 2.7 kDa) PsHct1 (มวลโมเลกุล 7.9 kDa) และ PsHct2 (มวลโมเลกุล 8.3 kDa) มีตำแหน่งอยู่ด้านปลาย C ของสายโพลีเปปไทด์ของฮีโมไซยานิน โดยมีความเหมือนกัน (identity) อยู่ในช่วง 95-100% เมื่อเทียบกับฮีโมไซยานินของกุ้งที่มีรายงานในฐานข้อมูล (Gen Bank) (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001)

## 6. การศึกษายีนฮีโมไซยานิน

จากการศึกษาฮีโมไซยานินของ spiny lobster, *Panulirus interruptus* พบว่าเป็น hexamer ที่มีหน่วยย่อย 4 แบบ คือ a, b, b' และ c และได้มีการโคลนยีนฮีโมไซยานินหน่วยย่อย c ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 661 หน่วย มีมวลโมเลกุล 80,000 ดัลตัน มีตำแหน่งของคอปเปอร์สองอะตอม และมีตำแหน่งที่เติมคาร์โบไฮเดรต (glycosylation site) ที่ตำแหน่งที่ 476 (Asn<sub>476</sub>-Asn-Thr) ในโดเมนที่ 3 ของหน่วยย่อย c ซึ่งบ่งบอกว่าฮีโมไซยานินชนิดนี้เป็นไกลโคโปรตีน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนหน่วยย่อย c ไปเปรียบเทียบกับยีนฮีโมไซยานินหน่วยย่อย a ในกุ้งชนิดเดียวกัน พบว่ามีค่าความเหมือนเป็น 59% จากการศึกษาลำดับของยีนโดยโปรแกรมพบว่ามีตำแหน่งตัด (cleavage site) ของสายโพลีเปปไทด์หน่วยย่อย c ที่ Pro<sub>148</sub>-His<sub>149</sub> โดยเอนไซม์ protease (Neuteboom *et al.*, 1992)

มีรายงานการศึกษายีนฮีโมไซยานินของปู *Cancer magister* พบว่าฮีโมไซยานินมีการรวมตัวเป็นแบบ hexamer ที่มีหน่วยย่อย 6 หน่วย ได้มีการโคลนยีนฮีโมไซยานินหน่วยย่อยที่ 6 (Cmag6) โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมจากตับ (hepatopancreas) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ สามารถโคลนยีน Cmag6 ยาว 1,939 คู่เบส แปลเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนยาว 650 หน่วย มีมวลโมเลกุล 74,903 ดัลตัน และมีตำแหน่งที่เติมคาร์โบไฮเดรตที่กรดอะมิโน

ตำแหน่ง 600 บ่งชี้ว่าฮีโมไซยีนชนิดนี้เป็นไกลโคโปรตีน (Durstewitz and Terwilliger, 1997) ในปีเดียวกัน Sellos และคณะ (1997) ได้ศึกษายีนฮีโมไซยานินของกุ้งขาว *P.vannamei* จาก cDNA library ที่เตรียมจากตับ พบว่าโคลนได้ยีนฮีโมไซยานินยาว 2,095 คู่เบส แปลเป็นสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนยาว 648 หน่วย มีมวลโมเลกุล 73,570 ดัลตัน ซึ่งมีความเหมือนกันมากเมื่อเทียบกับของ *Panulirus interruptus* แต่ในงานวิจัยนี้ไม่พบตำแหน่งการเติมคาร์โบไฮเดรตของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งขาว

Lee และคณะ (2004) ได้ศึกษายีนฮีโมไซยานินของกุ้งนาง *P. leniusculus* โดยโคลนยีนฮีโมไซยานิน 2 ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 687 หน่วย มีมวลโมเลกุล 78,372 ดัลตัน มีความเหมือนเป็น 59% เมื่อเทียบกับยีนฮีโมไซยานิน 1 (Gen Bank AF522504) และมีความเหมือนเป็น 29% เมื่อเทียบกับยีนของเอนไซม์โปรตีนอลออกซิเดสของกุ้งนางชนิดเดียวกัน (Gen Bank X83494) รวมทั้งมีความเหมือนสูงถึง 68% เมื่อเทียบกับยีนฮีโมไซยานิน 4 ของกุ้งมังกร (lobster) *Palinurus elephas* (Gen Bank CAD56697)

ในขณะที่มีรายงานว่าฮีโมไซยานินของ amphipod *Gammarus roeseli* มีโครงสร้างเป็น hexamer และโคลนยีนฮีโมไซยานินได้ขนาด 2,150 คู่เบส แปลเป็นสายเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนยาว 672 หน่วย และมีมวลโมเลกุล 76,300 ดัลตัน (Hagner-Holler et al., 2005) ส่วนการศึกษาในกุ้ง *P. japonicus* พบว่าสามารถโคลนยีนของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินได้ 2 ยีน คือ PjHcL และ PjHcY ซึ่งมีแปลเป็นกรดอะมิโน 678 และ 664 หน่วย มีมวลโมเลกุล 75,000 และ 73,000 ดัลตัน ตามลำดับ (Lei et al., 2007)

## 7. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมไซยานินกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

ฮีโมไซยานินมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในด้านความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน สมบัติทางเคมีกายภาพและมีหน้าที่คล้ายกัน (Lee et al., 2004; Pless et al., 2003) ฮีโมไซยานินและเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นโปรตีนที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกัน พบได้ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เช่นในกุ้ง kuruma (*Penaeus japonicus*) (Adachi et al., 2001) แต่เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสยังพบในพืช อาทิเช่น ในแครอท (*Daucus carota*) (Carlberg and Söderhäll, 1985) รากและใบของข้าวโพด (*Zea mays*) (Adamia et al., 2006) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียน โดยเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์เมลานินเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บูกรุกได้ (Söderhäll and Cerenius, 1998) ในฮีโมลิมพ์ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมีปริมาณฮีโมไซยานินมากเป็น 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมพ์ ในขณะที่พบปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสน้อยมาก (Van Holde and Miller, 1995; Adachi et al., 2001) มีรายงานวิจัยว่าสายโพลีเปปไทด์ด้านปลาย N ของฮีโมไซยานินมีแอกทิวีทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เช่น ในแมง

มูม *E. californicum* (Decker and Rimke, 1998) แมงดาทะเล (*T. tridentatus*) (Nagai *et al.*, 2001) และ deep-sea crustacean *Bathynomus giganteus* (Pless *et al.*, 2003) ฮีโมไซยานิน ถูกกระตุ้นให้มีแอกทิวิตีหรือเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ทริปซิน perchlorate และ SDS และสารภายในสัตว์เอง (endogenous) เช่น clotting factor และ anti-bacterial peptide ดังแสดงในตารางที่ 1 และมีผลงานวิจัยในปี 1995 ที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุล (molecular cloning) ของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสของกุ้งนาง (*P. leniusculus*) (Aspan *et al.*, 1995) แมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* (Fujimoto *et al.*, 1995) และ *Manduca sexta* (Hall *et al.*, 1995) พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของฮีโมไซยานินมาก และจากผลงานวิจัยของ Lee และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของฮีโมไซยานินของกุ้งนาง (*P. leniusculus*) กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสของกุ้งนางชนิดเดียวกัน (Gen Bank X83494) พบว่าของฮีโมไซยานิน 1 (Gen Bank AF522504) มีความเหมือน 31% และ ของฮีโมไซยานิน 2 มีความเหมือน 29%

#### ตารางที่ 1 แอกทิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของฮีโมไซยานิน

Species	Activators	References
<i>Eurypelma californicum</i>	trypsin	Decker and Rimke, 1998
<i>Eurypelma californicum</i>	sodium dodecyl sulfat	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Limulus polyphemus</i>	sodium dodecyl sulfat	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Tachypleus tridentatus</i>	clotting enzyme, factor b, sodium dodecyl sulfat	Nagai and Kawabata, 2000
<i>Tachypleus tridentatus</i>	tachyplestin, tachystatin (A,B,C), big defensin, sodium dodecyl sulfat	Nagai <i>et al.</i> , 2001
<i>Astacus leptodactylus</i>	sodium dodecyl sulfat ,	Jaenicke and Decker, 2004

	trypsin	
<i>Bathynomus giganteus</i>	sodium dodecyl sulfate	Pless <i>et al.</i> , 2003
<i>Calappa granulata</i>	sodium dodecyl sulfate	Jaenicke and Decker, 2004
<i>Cancer magister</i>	sodium dodecyl sulfate	Decker <i>et al.</i> , 2001
<i>Cancer pagurus</i>	sodium dodecyl sulfate,	Jaenicke and Decker, 2004
	trypsin	
<i>Carcinus maenas</i>	perchlorate	Zlateva <i>et al.</i> , 1996
<i>Carcinus maenas</i>	sodium dodecyl sulfate,	Jaenicke and Decker, 2004
	trypsin	
<i>Homarus americanus</i>	perchlorate	Zlateva <i>et al.</i> , 1996
<i>Homarus americanus</i>	sodium dodecyl sulfate,	Jaenicke and Decker, 2004
	trypsin	
<i>Palinurus elephas</i>	sodium dodecyl sulfate,	Jaenicke and Decker, 2004
	trypsin	
<i>Panulirus interruptus</i>	sodium dodecyl sulfate,	Jaenicke and Decker, 2004
	trypsin	
<i>Penaeus japonicus</i>	sodium dodecyl sulfate	Adachi <i>et al.</i> , 2001

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย
2. เพื่อศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์
3. เพื่อพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้หาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์
4. เพื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วย

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

#### วัสดุ

##### 1. กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษาคือ กุ้งแชบ๊วยที่มีน้ำหนักประมาณ 30 - 40 กรัม และไม่อยู่ในระยะลอกคราบ จับจากทะเลอันดามัน นำมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 500 ลิตร โดยให้อาหารเม็ดทุก 8 ชั่วโมง ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

##### 2. กระจ่าย

กระจ่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระจ่ายขาว ตาแดง เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน เลี้ยงที่หน่วยสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

##### 3. แบคทีเรีย

- *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5 $\alpha$  มีลักษณะ Genotype: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80dlacZ  $\Delta$ M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169,  $\lambda$ <sup>-</sup>

- *Vibrio harveyi* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

##### 4. อนุชีวโมเลกุล

###### 4.1 ดีเอ็นเอพาหะ (Plasmid vector)

pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega)

###### 4.2 ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA) ที่ใช้ในการศึกษา

ดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้คือ cDNA library ซึ่งเตรียมจากตับของกุ้งแชบ๊วยได้จากการศึกษาของ Rattanaporn (2008)



## สารเคมี

### 1. สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Fluka Chemika-Biochemika
Agar	BD-Biosciences
Agarose	Sigma Chemical Co.
Amido black B	Sigma Chemical Co.
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Univar
Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated	Sigma Chemical Co.
Bisacrylamide (N, N'-methylene diacrylamide)	Fluka Chemika-Biochemika
Blue dextran	Amersham Biosciences
Bovine serum albumin	Sigma Chemical Co.
Broad range protein molecular weight marker	Promega Corporation
Bromophenol blue	Carlo erba
Calcium chloride	Unilab
Carboxymethyl-cellulose	Sigma Chemical Co.
Coomassie brilliant blue G-250	Bio-Rad
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma Chemical Co.
Diethylaminoethyl-Sepharcel	Sigma Chemical Co.
3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine	Sigma Chemical Co.
Disodium hydrogen phosphate	Univar
Ethanol	BDH AnalaR
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka Chemika-Biochemika
Freund's complete adjuvant	Sigma Chemical Co.
Freund's incomplete adjuvant	Sigma Chemical Co.
Gel filtration high molecular weight calibration kit	Amersham Biosciences
Gel filtration low molecular weight calibration kit	Amersham Biosciences
Glycerol	Sigma Chemical Co.
Glycine	Fluka Chemika-Biochemika

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	Sigma Chemical Co.
Hydrochloric acid	Merck
Hydrogen peroxide	Carlo erba
Magnesium chloride	Univar
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka Chemika-Biochemika
Methanol	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Fluka Chemika-Biochemika
<i>o</i> -Phenylenediamine dihydrochloride (tablet)	Sigma Chemical Co.
Phenylmethanesulfonyl fluoride	Sigma Chemical Co.
Phosphoric acid	J.T. Baker
Ponceau S	Sigma Chemical Co.
Potassium chloride	Bio-Rad
Potassium dichromate	Analyticals
Potassium dihydrogen phosphate	Merck
Potassium hydrogen phosphate	Merck
Superose 12 HR	Carlo Erba
Silver stain kit	Pharmacia
Sodium dihydrogen phosphate	Merck
Sodium carbonate	Carlo Erba
Sodium chloride	Fluka Chemika-Biochemika
Sodium citrate	Carlo Erba
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de Haen
Sulfuric acid	Merck
Superdex 200 HR	Pharmacia
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate kit	Vector Laboratories
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma Chemical Co.
Tween 20	Labchem

## 2. สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma Chemical Co.
100 Base pair DNA ladder	Biolabs
1000 Base pair DNA ladder	Biolabs
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside	Amresco
Deoxynucleotide triphosphate	Invitrogen
<i>EcoR</i> I	Biolabs
Ethidium bromide	Promega
Luria Bertani broth	USB Corporation
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen
<i>Taq</i> DNA polymerase	Promega
T4 DNA ligase	Biolabs

## อุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-5	Mettler
Autoclave	-	Hirayama
Automated DNA Sequencer	ABI PRISM 377	Applied Biosystems
Automated Protein Sequencer	ABI473A	Applied Biosystems
Centrifuge	Avanti J-30I	Beckman Coulter
Centrifuge	5415C	Eppendorf
Centrifuge	5804R	Eppendorf
ELISA plate reader	Elx808	Bio-Tek Instrument Inc.
Fast protein liquid chromatography	-	Pharmacia Biotech
Gradient marker	SG 15	Hoefer
Heating box	AccuBlock	Labnet
Hot plate	-	EGD
Incubator	1510E	Shel Lab
Micropipette	-	Eppendorf
Microtube pump MP-3	MP-3N	Eyela
Mighty small <sup>TM</sup> Transphor	TE22	Pharmacia Biotech
Orbital shaker	OS 20	Boeco
pH meter	Accumet 15	Fisher Scientific
Power supply	1000/500	Bio-Rad
PCR	Master Cyclor	Eppendorf
Shaking Incubator	SI-23MC	BIOER
Slab gel electrophoresis	AE-6400	Atto
Submarine electrophoresis system	Mupid-Ex	Advance
UV transilluminator	M-20	UVP
UV-VIS spectrophotometer	160A	Shimadzu
Vortex	G-560E	Scientific Industries
Water bath	WB-170M	Optima

## วิธีการ

### 1. การเตรียมพลาสมาและซีรัมจากฮีโมลิมพ์ของกึ่งแซบวัย

ดูดฮีโมลิมพ์จากกึ่งแซบวัยหลังจับขึ้นมาด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิเมตร ที่มี 1 มิลลิเมตรของสารกันเลือดแข็งตัว [450 mM NaCl - 10 mM KCl - 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) - 10 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) - 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), pH 7.3] และเข้มนขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณ pericardium หรือขาเดินคู่ที่ 3 จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาที นำส่วนใสหรือพลาสมา (plasma) เก็บไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ในการแยกฮีโมไซยานิน

สำหรับการหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์ เตรียมซีรัม (serum) โดยดูดฮีโมลิมพ์จากกึ่งแซบวัยแล้วปล่อยให้แข็งตัว 1 คืน จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ ส่วนใสหรือซีรัมเก็บไว้หาปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA

### 2. การทำโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะครีลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 × 12 เซนติเมตรหนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจลสองส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separation gel) มีความสูงประมาณ 7 เซนติเมตร

#### 2.1 โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

##### (Non-denaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล 4-10% ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel 3% (5 ml)	Separating gel	
		4% (3 ml)	10% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.40 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
10% Ammonium persulphate	25 µl	10 µl	10 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.84 ml	1.09 ml	0.49 ml

### 2.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับ บัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ให้ได้ สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นโปรตีนพอเหมาะ และเตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน

### 2.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ใส่ในแต่ละช่องเจล ส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris - 0.192 M glycine, pH 8.3 เปิด กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่าง ของเจล ปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลไปย้อมสี

### 2.2 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (6-15%) ซึ่งมี ส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	6% (3 ml)	15% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.60 ml	1.50 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 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
10% SDS	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
10% Ammonium persulphate	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l
Distilled water	3.10 ml	1.56 ml	0.66 ml

### 2.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับ บัฟเฟอร์ 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS, 0.4% โบรโมฟีนอลบลู และ 1% เบตา-เมอร์แคปโตเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol)

ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ จากนั้นต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ก่อนทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 2.2.2 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจล ส่วนบน ใช้ 0.025 M Tris - 0.192 M glycine - 0.1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เปิดกระแสไฟฟงที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมเฟีนอลบลู เคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

## 2.3 การย้อมสีโปรตีน

### 2.3.1 ย้อมสีค้อมาซีบลู (Coomassie blue)

นำเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ไปแช่ในสารละลาย 0.02% ค้อมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250) - 50% เมทานอล (methanol) - 7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 50% เมทานอล - 7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วย 5% เมทานอล - 7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีน สีน้ำเงินชัดเจน

### 2.3.2 ย้อมแบบซิลเวอร์ (Silver staining)

หลังการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส นำเจลไปตรึงโปรตีนด้วย 40% เมทานอล - 10% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลาย 10% เอทานอล - 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 จากนั้นแช่เจลในสารละลายซิลเวอร์ (silver reagent) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดไอออน นาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีเวลอปเปอร์ (developer) เขย่าและเปลี่ยนสารละลายเมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ และเมื่อปรากฏแถบของโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% กรดน้ำส้ม

## 3. การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างด้วยชุดหาโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 - 4.7% ethanol - 8.5% phosphoric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยทำควบคู่ไปกับ bovine serum albumin (BSA) จากบริษัท Pierce ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเจือจาง BSA ให้มีปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 4. การหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสใน Non-denaturing PAGE แบบย้อม แอควิวิตี

นำฮีโมลิมป์ของกุ้งแชบ๊วยไปทำ Non-denaturing PAGE ตามวิธีการข้อ 2.1 จากนั้นตัดแผ่นเจลออกเป็น 2 ส่วน นำเจลส่วนแรกไปแช่ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 ที่มี 10% SDS บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วเติม 6 mM 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) บ่มปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง จนปรากฏแถบแอควิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นสีเทาดำ หยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปเทียบกับเจลส่วนที่สองซึ่งย้อมด้วยสีคูมาซีบลู จากผลดังกล่าวทำให้ทราบตำแหน่งของแถบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมป์ของกุ้งแชบ๊วยใน Non-denaturing PAGE

#### 5. การทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมา

##### 5.1 โดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ (Ultracentrifugation)

นำพลาสมาที่เตรียมได้จากฮีโมลิมป์ของกุ้งแชบ๊วย ตามวิธีการข้อ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่ 2 หลอด ไปเซนตริฟิวจ์ตามวิธีของ Adachi และคณะ (2001) โดยใช้โรเตอร์ 70 Ti ของ Beckman เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 200,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายจากส่วนบนเก็บเป็นส่วนๆ (fraction) หลอดละ 800 ไมโครลิตร ส่วนตะกอนละลายด้วยบัฟเฟอร์ Tris-MgCa (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 - 5 mM MgCl<sub>2</sub> - 5 mM CaCl<sub>2</sub>) นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A<sub>340</sub>) จากนั้นหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

##### 5.2 โดย Preparative PAGE

นำสารละลายโปรตีนหลอดที่ 13 จากข้อ 5.1 ที่แยกได้จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ ไปแยกต่อโดยโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (preparative PAGE) ซึ่งเป็น non-denaturing PAGE แต่มีการเตรียมเจลให้มีขนาด 10 x 12 เซนติเมตรหนา 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ในเจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 4-10% เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่าง 12 ช่อง จากนั้นผสมสารละลายโปรตีน 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน นำสารผสมที่ได้เติมลงในช่องใส่สารตัวอย่าง แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ จากนั้นตัดเจลตรงกลาง ขอบซ้าย และขอบขวาเป็นแถบกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาวตลอดแผ่นเจล นำเจลทั้ง 3 ชิ้นไปย้อมด้วยสารละลาย Bradford นาน 5-10 นาที เมื่อปรากฏแถบโปรตีน นำไปเทียบกับเจลซึ่งไม่ได้ย้อม แล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบโปรตีนที่ต้องการ แล้วทำการชะโปรตีนออกจากชิ้นเจล โดยนำชิ้นเจลที่ตัดได้ใส่ในถุงไดอะลิซิส (dialysis bag) แล้วนำไปวางตามขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอน ซึ่งมีบัฟเฟอร์



0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ (submarine) เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA อุณหภูมิ 4 °C นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซิส (dialyse) ต่อในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วทำให้เข้มข้นด้วย carboxymethyl (CM) - cellulose หาปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford และทดสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมไซยานินโดยวิธี Non-denaturing PAGE

## 6. การศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

### 6.1 การหามวลโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน (Gel filtration)

หามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC ซึ่งปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเติมฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เข้มข้น โปแตสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate,  $M_r$  294) บลูเด็กซ์แทรน (blue dextran,  $M_r$  2,000,000) และโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ ferritin ( $M_r$  440,000) catalase ( $M_r$  232,000) aldolase ( $M_r$  158,000) BSA ( $M_r$  67,000) และ ovalbumin ( $M_r$  43,000) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.8 มิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจล (void volume,  $V_o$ ) จากค่าปริมาตรชะของบลูเด็กซ์แทรนที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และปริมาตรทั้งหมด (total volume,  $V_t$ ) ของคอลัมน์จากค่าปริมาตรชะของโปแตสเซียมไดโครเมต ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (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 และคำนวณหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

### 6.2 การหามวลโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อย

หามวลโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีการข้อ 2.2 โดยทำควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ myosin ( $M_r$  203,646) galactosidase ( $M_r$  116,134) BSA ( $M_r$  92,266) ovalbumin ( $M_r$  50,400) carbonic anhydrase ( $M_r$  37,043) soybean trypsin inhibitor ( $M_r$  28,920) lysozyme ( $M_r$  20,081) และ aprotinin ( $M_r$  6,936) หลังการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมสีโปรตีนแล้ว วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐาน และแถบสโบริโมเฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการ

เคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility,  $R_f$ ) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างจากความสัมพัทธ์ ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของโบรมอฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า  $\log$  ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า  $R_f$  ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่า  $R_f$  ไปคำนวณหามวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินได้

## 7. การเตรียมแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกิ้งชังบิว

### 7.1 การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในกระต่าย

ทำการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในกระต่ายขาว ตาแดง น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 6 เดือน โดยฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จาก preparative PAGE บริเวณผิวหนัง 3 - 4 จุด และใต้ผิวหนัง 2 - 3 จุด โดยใช้ปริมาณฮีโมไซยานิน และระยะเวลาการกระตุ้น ดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 และ 2 ฉีดฮีโมไซยานินสัปดาห์ละ 20 ไมโครกรัม ซึ่งผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 สัปดาห์ต่อมา ฉีดฮีโมไซยานิน 20 ไมโครกรัม ที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 0.8 มิลลิลิตร

เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหู 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งก่อนฉีดฮีโมไซยานินแต่ละครั้ง และหลังจากการฉีดฮีโมไซยานินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ทดสอบแอนติบอดี

### 7.2 การทดสอบการมีแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานิน

ทดสอบการมีแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานิน ด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1956) ดังนี้ เท 0.3% อะกาโรส (agarose) ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ (slide) ทิ้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C จนอะกาโรสแห้งติดแผ่นสไลด์ จากนั้นเท 1.5% อะกาโรส ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์เดิม ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเจาะอะกาโรสให้เป็นหลุม ทดสอบการมีแอนติบอดี โดยการเติมซีรัมของกระต่ายก่อนและหลังฉีดฮีโมไซยานินในหลุมข้างรอบหลุมกลาง เก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในหลุมกลาง เก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 ชั่วโมง ถ้ามีแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายจะเห็นแถบการตกตะกอนระหว่างหลุมของแอนติบอดีและแอนติเจน เพื่อให้เห็นแถบการตกตะกอนนี้ชัดเจน แซสไลด์ใน 0.9% NaCl นาน 48 ชั่วโมง

จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่ตกตะกอนออกโดยการเปลี่ยนน้ำกลั่นบ่อยๆ จากนั้นวางสไลด์ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อะกาโรสแห้งติดแผ่นสไลด์ แล้วย้อมสไลด์ด้วยสีอะมิโดแบล็กบี (amido black B) (0.02% อะมิโดแบล็กบี - 50% เอทานอล - 5% กรดน้ำส้ม) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น

### 7.3 การแยกแอนติบอดี

หลังจากฉีดอีโมไซยานินครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่าย 30-35 มิลลิลิตร ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1,250 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที เก็บซีรัม แล้วแยกแอนติบอดีจากซีรัมตามวิธีของ Warden และ Giese (1984) โดยนำซีรัมไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ที่ความอิ่มตัว 50% ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 22,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที ละลายตะกอนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วนำไปไดแอไลซีในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม นาน 10 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 22,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 50 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ผ่านลงคอลัมน์ DEAE-Sephacel (ขนาด 2.6 x 10 เซนติเมตร) ที่ปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร แอนติบอดี (IgG, immunoglobulin G) จะหลุดออกมาในพีคแรก (Wallace, 1965) รวมสารละลายของพีคแรกเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose แล้วทดสอบการมีแอนติบอดีโดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion

### 8. การทำ Western blot

นำอีโมลิมีฟี่และอีโมไซยานินบริสุทธิ์ ไปแยกใน 6-15% gel ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979) โดยทำในบัฟเฟอร์ Towbin (0.025 M Tris - 0.192 M glycine - 20% methanol, pH 8.3) และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 500 mA 250 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ติดตามการขนถ่ายโปรตีนโดยย้อมด้วย 0.5% Ponceau S - 1% กรดน้ำส้ม ล้างสี Ponceau S ออกด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างต่อด้วย TBS (25 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 0.5 M NaCl) จนสีออกหมด นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มด้วย 10% skim milk ใน TBS ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 12 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TTBS (25 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 0.5 M NaCl - 0.05% Tween 20) นาน 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีต่ออีโมไซยานิน (1°Ab) ที่เจือจาง 1:1,500 ด้วย TTBS - 5% skim milk ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1.5 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TTBS นาน 10 นาที 4 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่าย ซึ่งยึดติดกับแอนติบอดีออกซิเดส (2°Ab, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase

conjugated) ที่เจือจาง 1:20,000 ด้วย TTBS - 5% skim milk ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TTBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง และล้างต่อด้วย TBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นทำให้เกิดสีด้วยสารละลาย TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) substrate kit โดยปมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น

## 9. การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิพท์

### 9.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดปริมาณฮีโมไซยานิน

#### 9.1.1 การเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสม

การวัดปริมาณฮีโมไซยานินโดย ELISA มีการใช้แอนติบอดี 2 ชนิด คือ แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ่มแซบวัย ( $1^{\circ}$ Ab) และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับแอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ( $2^{\circ}$ Ab) ทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีของ Rittidach (2006) โดยใช้ปริมาณฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เคลือบผิวเพลทหรือไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ขนาด 96 หลุม (Maxisorp F96, Nunc) ด้วยปริมาณคงที่ที่ 800 นาโนกรัมต่อหลุม และเจือจาง  $1^{\circ}$ Ab ด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ (assay buffer, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.05% Tween 20) ด้วยอัตราส่วน 1:1,000, 1:2,000, 1:2,500, 1:3,000 และ 1:4,000 ส่วน  $2^{\circ}$ Ab เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ด้วยอัตราส่วน 1:10,000, 1:12,500, 1:25,000, 1:50,000 และ 1:75,000 แล้วนำไปทำตามขั้นตอนของ ELISA ดังนี้

ทำการทดลองแต่ละหลุม โดยนำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์เคลือบ (coating buffer, 50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.6) เติมลงในเพลทปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทำการปมที่อุณหภูมิ 4 °C อย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการล้างซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ขัดขวาง (blocking buffer, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 5% skim milk - 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้างปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง แล้วเติม  $1^{\circ}$ Ab ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปมที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้างปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติมสารละลาย  $2^{\circ}$ Ab ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปมที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ล้างปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทซึ่งมี o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 0.4 mg/ml ใน 50 mM sodium citrate, pH 5.0 และมี 0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ใช้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงหยุด

ปฏิกิริยาด้วย 2 M  $H_2SO_4$  ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A492) ด้วยเครื่อง ELISA Reader

### 9.1.2 การหา pH ที่เหมาะสมของการเคลือบฮีโมไซยานินกับเพลท

เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ 50 mM  $Na_2CO_3$ , pH 9.6 มีการเคลือบติดผิวเพลทน้อยกว่าโปรตีนอื่น เช่น เลคติน (Rittidach, 2006) ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ทดลองหา pH ของบัฟเฟอร์เคลือบที่เหมาะสมที่ทำให้ฮีโมไซยานินเคลือบติดเพลทได้มากขึ้น ทำการทดลองโดยใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ ปริมาณ 800 นาโนกรัม เตรียมในบัฟเฟอร์ 50 mM  $Na_2CO_3$ , pH ต่าง ๆ ในช่วง 9 - 11.5 แล้วทำการทดลองต่อตามข้อ 9.1.1 และใช้  $1^\circ Ab$  และ  $2^\circ Ab$  ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 9.1.1) ในการทำ ELISA

### 9.1.3 การเจือจางฮีโมลิมฟ์ที่เหมาะสม

เจือจางฮีโมลิมฟ์ด้วยอัตราส่วน 1:100, 1:200, 1:320, 1:1,000 และ 1:3,200 ด้วยบัฟเฟอร์เคลือบที่มี pH ที่เหมาะสมคือ 50 mM  $Na_2CO_3$ , pH 10.5 นำไปเคลือบผิวเพลทแต่ละหลุม หลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นทำการทดลองต่อตามวิธีข้อ 9.1.1 โดยใช้  $1^\circ Ab$  และ  $2^\circ Ab$  ที่เจือจางเป็นความเข้มข้น 1:2,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ ในการทำ ELISA

## 9.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานฮีโมไซยานิน

เตรียมกราฟมาตรฐานฮีโมไซยานิน โดยใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เจือจางในบัฟเฟอร์เคลือบที่มี pH ที่เหมาะสมคือ 50 mM  $Na_2CO_3$ , pH 10.5 ให้มีปริมาณในช่วง 5 – 69 ไมโครกรัม นำไปเคลือบผิวเพลทแต่ละหลุม หรือคิดเป็นความเข้มข้นในช่วง 33.33 – 460 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นทำการทดลองต่อตามวิธีข้อ 9.1.1 โดยใช้  $1^\circ Ab$  และ  $2^\circ Ab$  ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากข้อ 9.1.1) คือ  $1^\circ Ab$  1:2,000 และ  $2^\circ Ab$  1:25,000 จากนั้นพล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างค่า A492 และปริมาณฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่ใช้

## 10. การวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบวัย

ทำการวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบวัยโดยวิธี ELISA ดังนี้ เจือจางฮีโมลิมฟ์ด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม (จากข้อ 9.1.3) คือ 1:200 ด้วยบัฟเฟอร์เคลือบที่มี pH ที่เหมาะสมคือ 50 mM  $Na_2CO_3$ , pH 10.5 นำไปเคลือบผิวเพลทแต่ละหลุม หลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นทำการทดลองต่อตามวิธีข้อ 9.1.1 โดยใช้  $1^\circ Ab$  และ  $2^\circ Ab$  ที่เจือจางเป็นความเข้มข้น 1:2,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ ในการทำ ELISA

## 11. การทำ Agarose gel electrophoresis

การเตรียม 1.5% agarose gel ทำได้โดยการละลายผงอะกาโรส (agarose) ในบัฟเฟอร์ TAE (40 mM Tris-acetate, pH 8 - 1 mM EDTA) ต้มจนเดือดเพื่อให้อะกาโรส หลอมละลาย เทอะกาโรสเหลวลงในพิมพ์ที่มีหัวเสียบเพื่อให้เจลที่แข็งตัวมีช่องสำหรับหยอดสาร โดยเทให้เจลมีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร เมื่ออะกาโรสแข็งตัวดีแล้ว ดึงหัวเสียบออกอย่างระมัดระวัง นำถาดเจลไปวางในอ่าง electrophoresis ให้ด้านที่มีช่องใส่สารอยู่ใกล้ขั้วลบ เทบัฟเฟอร์ TAE ลงในอ่างจนท่วมเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ส่วนกับ 6x loading dye 1 ส่วน (0.03% bromophenol blue - 0.03% xylene cyanol FF - 0.4% orange G - 15% Ficoll 400 - 10 mM Tris-HCl, pH7.5 - 50 mM EDTA, pH 8) ใช้กระแสไฟฟ้า 50-100 โวลท์ เมื่อเห็นแถบสีเคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายเจล หยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลไปแช่ในสารละลาย ethidium bromine (1 µg/ml) นาน 15 นาที จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่นประมาณ 15 นาที ก่อนนำไปส่องดูแถบ ดีเอ็นเอด้วย ultraviolet (UV) lamp

## 12. การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน

### 12.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนชิ้นยีนฮีโมไซยานิน

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนชิ้นยีนฮีโมไซยานิน โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮีโมไซยานินจากสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียที่มีการศึกษามาแล้วจากธนาคารยีน (GenBank) ผ่านฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, สืบค้นเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2551) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX และ GeneDoc เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) และนำมาใช้เป็น forward และ reverse primer ในการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' → 3'
H280 F1	CACTGGTTCTC(C/G/T)CT(C/T)TTCAA(C/T)AC
H1180 R1	TCACG(A/G)TGGC(A/G)GTYTCGAAGT
H660 F2	AC(C/T)TGGCAT(A/T)TGGAATTCCCCTTCT
H1780 R2	TT(A/G)CCCTTGGGGAG(A/G)AGGAA(C/T)C

## 12.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานิน

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ cDNA library จากตับของกิ้งก่าขบ๊วยที่ได้จากการศึกษาของ Rattanaporn (2008) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มจำนวน และใช้ไพรเมอร์ของยีนฮีโมไซยานิน (ตารางที่ 2) ผสมกับสารละลายที่ใช้ในการทำ PCR (ตารางที่ 3) ให้เข้ากัน ทำ PCR ภายใต้ภาวะดังแสดงในตารางที่ 4 และวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR (PCR product) ที่ได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

### ตารางที่ 3 สารละลายที่ใช้ในการทำ PCR

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5x PCR buffer	10
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5
10 mM dNTP	1
10 μM Forward primer	2.5
10 μM Reverse primer	2.5
Template DNA (1:500)	10
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 unit/μl)	0.25
น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase	18.75
ปริมาตรรวม	50

ตารางที่ 4 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
Denaturation	94	3	1
Denaturation	94	0.50	}
Annealing	60	0.50	
Extension	72	1	
Denaturation	94	0.50	}
Annealing	62	0.50	
Extension	72	1	
Final extension	72	5	1

### 12.3 การสกัดชิ้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel

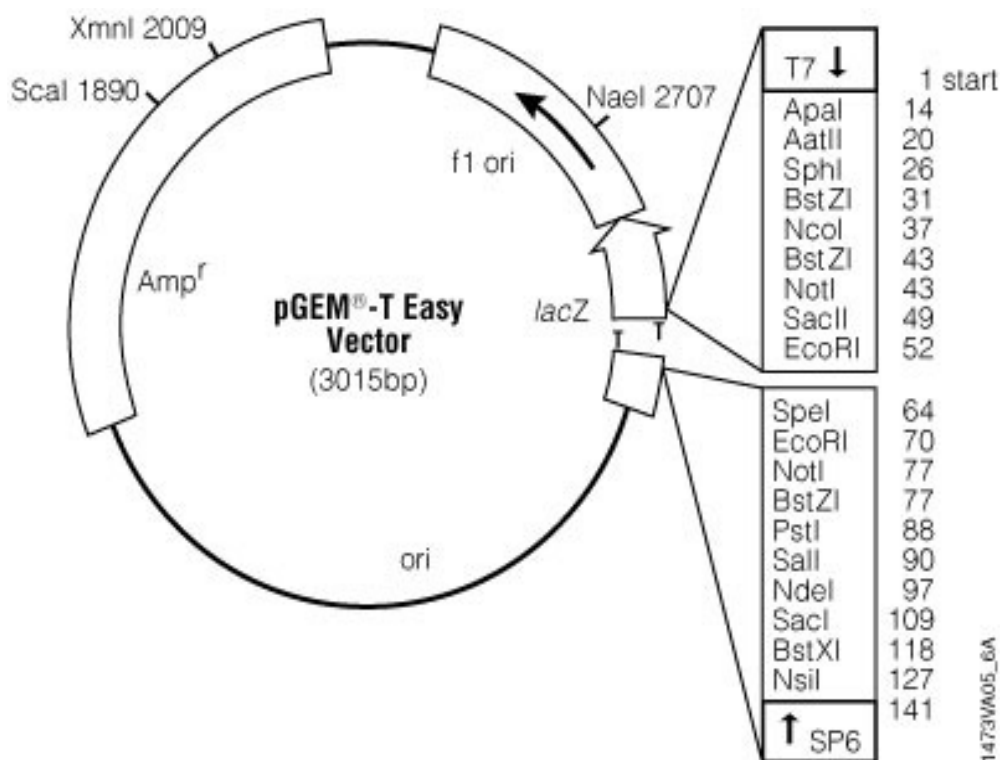
#### Extraction Kit (Qiagen)

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis จากนั้นตัดเจลบริเวณที่เป็นแถบดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน นำชิ้นเจลไปซังน้ำหนัก เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG (guanidine thiocyanate, pH  $\leq$  7.5) ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50<sup>o</sup> ซ เป็นเวลา 10 นาที จนชิ้นเจลละลาย นำสารละลายเติมลงในคอลัมน์ QIAquick spin บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอะกาโรสที่เหลือในคอลัมน์ โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ PE ที่มีเอทานอลเป็นส่วนประกอบ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง นำไปเซนตริฟิวจ์ซ้ำอีก 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ QIAquick spin ไปวางในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ โดยเติมน้ำบัฟเฟอร์ EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สกัดแยกออกจากเจลได้ที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup> ซ จนกว่าจะทำการทดลองต่อ



#### 12.4 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ

นำชิ้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินที่สกัดแยกออกจากเจลไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะคือ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) ดังรูปที่ 8 ทำการเชื่อมโดยนำดีเอ็นเอของฮีโมไซยานิน ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, pGEM<sup>®</sup>-T Easy (50 ng) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2x Rapid ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase (3 unit/μl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 14 - 16 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ที่ได้จากการเชื่อมดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินกับดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวน



รูปที่ 8 แผนที่ลักษณะดีเอ็นเอพาหะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega)

## 12.5 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน (DH 5 $\alpha$ )

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 $\alpha$  บนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB agar) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ โดยบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางหัวเชื้อเป็น 1:100 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง หรือมีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5 - 1.0 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แขนวลอยตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ที่เย็นจัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร วางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แขนวลอยตะกอนเซลล์ด้วย 0.1 M CaCl<sub>2</sub> - 7% DMSO (dimethyl sulfoxide) ที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งเก็บหลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

## 12.6 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Transformation)

นำดีเอ็นเอลูกผสมจากข้อ 12.4 มาบ่มกับ *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 $\alpha$  ที่เตรียมได้จากข้อ 12.5 บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที และวางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml และเคลือบผิวอาหารด้วย 15 ไมโครลิตร ของ 40 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งมีดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชั้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินอยู่ มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม

## 12.7 การสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

นำโคโลนีสีขาวที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin จากข้อ 12.6 วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 250 ไมโครลิตร ของบัฟเฟอร์ P1 ที่มี RNase A เป็นส่วนประกอบ นำไปเขย่าด้วย vortex จากนั้นเติมน้ำบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยเขย่าเบาๆ 3 - 4 ครั้ง แล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยเขย่าเบาๆ 3 - 4 ครั้ง นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูเฉพาะส่วนใส

ใส่คอลัมน์ QIAprep spin บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง นำไปเซนตริฟิวจ์ซ้ำอีก 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ QIAprep spin ไปวางในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะพลาสมิตออกจากคอลัมน์ QIAprep spin โดยเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 17,900 x g เป็นเวลา 1 นาที เก็บพลาสมิตที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ทดลองต่อ

### 12.8 การตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I

นำพลาสมิตที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I (BioLabs) เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม โดยนำพลาสมิตที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10x Reaction buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาตร 15.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

### 12.9 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำพลาสมิตลูกผสมที่มีชิ้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI Prism 377 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้ SP6 และ T7 เป็นไพรเมอร์ของพลาสมิต

### 12.10 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮีโมไซยานินชิ้นที่ 1 และ 2 มาต่อเข้าด้วยกัน (overlapping) ด้วยโปรแกรม CAP 3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>, สืบค้นเมื่อวันที่ 12 พฤษภาคม 2551) ทำการแปล (translate) ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Translate (<http://br.expasy.org/tools/dna.html>, สืบค้นเมื่อวันที่ 12 พฤษภาคม 2551) และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับยีนฮีโมไซยานินของกลุ่มครัสเตเชียนที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) ผ่านฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BlastP และ Vector NTI (version 9.0, Invitrogen)

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมาของกุ้งแชบ๊วย

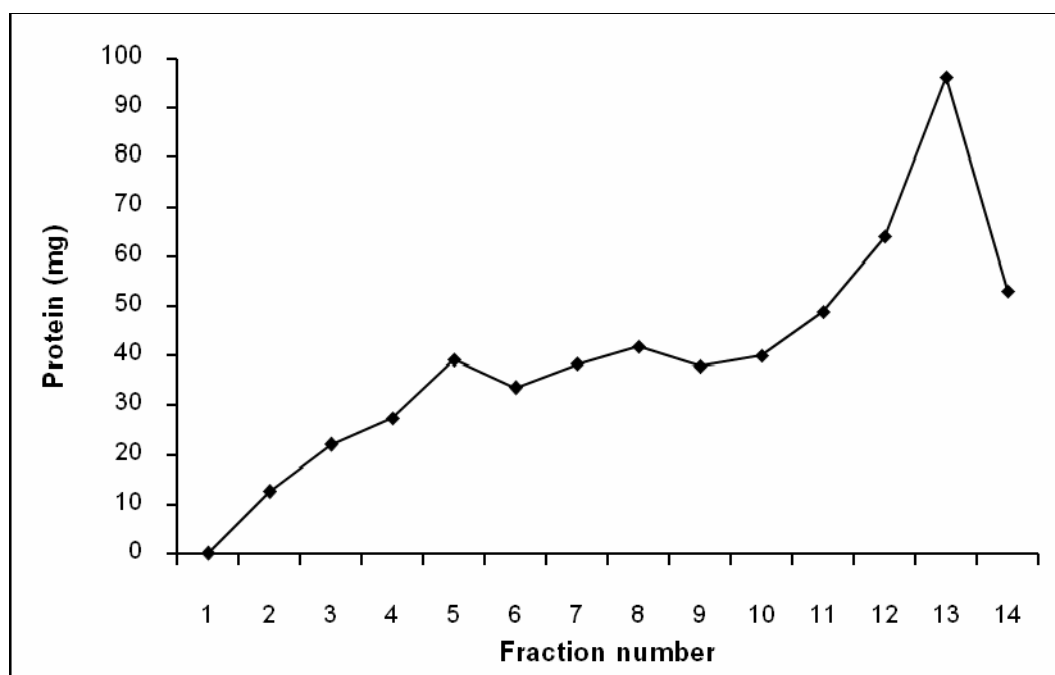
##### 1.1 โดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ (Ultracentrifugation)

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่จับอยู่กับคอปเปอร์และมีสีน้ำเงินจากการที่คอปเปอร์จับกับออกซิเดส (Rainer and Brouwer, 1993) รวมทั้ง 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียนเป็นฮีโมไซยานิน อาทิเช่น ที่รายงานในกุ้งขาว *P. vannamei* (Cariolou and Flytzanis, 1993) กุ้ง *P. japonicus* (Chen and Cheng, 1993) และในกุ้ง *Palaemon elegans* (Taylor et al., 1985) นอกจากนี้ฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งหลายชนิดปรากฏแถบเข้มสุดเมื่อแยกโดย non-denaturing PAGE (Brouwer et al., 1978; Ellerton and Anderson, 1981; Figueroa-Soto et al., 1997)

เมื่อนำพลาสมาที่เตรียมได้จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 550 มิลลิกรัม ไปแยกด้วยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ เก็บสารละลายเป็นส่วน ๆ ตามลำดับจากบนสุด (หลอดที่ 1) ไปจนถึงตะกอนก้นหลอด (หลอดที่ 14) และเมื่อนำสารละลายแต่ละหลอดไปหาปริมาณโปรตีน พบว่ามีปริมาณโปรตีนมากที่สุดในหลอดที่ 13 (96 มิลลิกรัม) ดังแสดงผลในรูปที่ 9 และมีการค่าดูดกลืนแสงของคอปเปอร์ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร สูงตั้งแต่หลอดที่ 5-14 (ไม่ได้แสดงผลไว้) เมื่อนำสารละลายแต่ละหลอดที่ได้จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ไปตรวจหาแถบโปรตีนฮีโมไซยานินด้วยการทำ non-denaturing PAGE และใช้ปริมาณโปรตีนของสารละลายแต่ละหลอดเท่ากัน พบว่าสารละลายหลอดที่ 13 ปรากฏแถบโปรตีนฮีโมไซยานินดีดสีคูมาซีเข้มกว่าสารละลายหลอดอื่นๆ (ไม่แสดงผล) บ่งชี้ว่าสารละลายหลอดที่ 13 มีปริมาณฮีโมไซยานินมากกว่าสารละลายหลอดอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับสีของสารละลายหลอดที่ 13 ที่มีสีน้ำเงินเข้มของคอปเปอร์ และคล้ายกับผลการแยกฮีโมไซยานินจากพลาสมาของกุ้ง kuruma ด้วยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ ที่พบฮีโมไซยานินถูกแยกอยู่ในสารละลายที่อยู่ก้นหลอดและในส่วนของตะกอน (Adachi et al., 2001)

เมื่อนำพลาสมาของกุ้งแชบ๊วยและสารละลายหลอดที่ 13 ที่ได้จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ไปทดสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมไซยานินด้วยวิธี non-denaturing PAGE ปรากฏแบบแผนโปรตีนของสารละลายทั้ง 2 ตัวอย่างคล้ายกัน แสดงว่ายังมีโปรตีนอื่นปนเป็น

อยู่ในสารละลายหลอดที่ 13 ดังแสดงผลในรูปที่ 10 แถวที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้สารละลายหลอดที่ 13 ที่ได้จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ไปทำ preparative PAGE เพื่อทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ต่อไป



### รูปที่ 9 การแยกฮีโมไซยานินจากพลาสมาโดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์

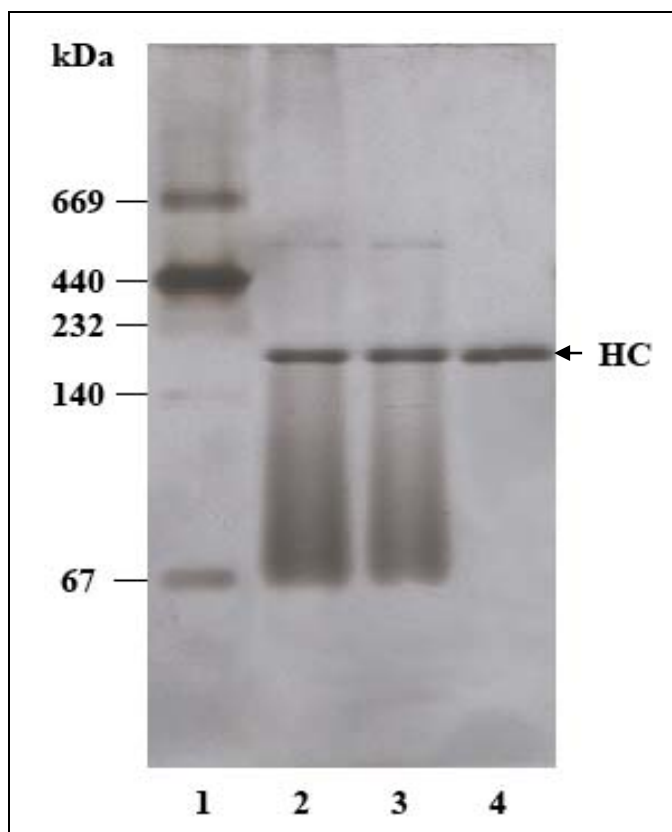
แยกพลาสมาของกิ้งชงแว้ว (ปริมาณโปรตีน 550 มิลลิกรัม) ด้วยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว  $200,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}C$  นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายจากส่วนบนเก็บเป็นส่วนๆ หลอดละ 800 ไมโครลิตร ส่วนตะกอนละลายด้วยบัฟเฟอร์ Tris-MgCa นำสารละลายแต่ละหลอดไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford

## 1.2 โดยวิธี Preparative PAGE

จากการนำสารละลายหลอดที่ 13 (96 มิลลิกรัม) ที่ได้จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ ไปแยกต่อโดยวิธี preparative PAGE โดยตัดเฉพาะแถบโปรตีนของฮีโมไซยานินเพียงแถบเดียว (โปรตีนแถบที่ชี้ด้วยลูกศร ในรูปที่ 10) แล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลด้วยเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวอน นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้นและไดเอไลซ์ หาปริมาณโปรตีน พบว่าสารละลายที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีน 13.9 มิลลิกรัม และคิดเป็น 2.5 % ของพลาสมาโปรตีนเริ่มต้น ดังแสดงผลในตารางที่ 5 เมื่อนำสารละลายโปรตีนไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี non-denaturing PAGE ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อย้อมโปรตีนแบบซิลเวอร์ ดังแสดงผลในรูปที่ 10 แถวที่ 4 บ่งชี้ว่าการทำ preparative PAGE สามารถแยกฮีโมไซยานินได้บริสุทธิ์

### ตารางที่ 5 การทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมา

Sample	Protein	
	mg	%
Plasma	550	100
Ultracentrifugation (fraction number 13)	96	17.4
Euate from preparative PAGE (purified HC)	13.9	2.5



รูปที่ 10 แบบแผนโปรตีนใน Non-denaturing PAGE ของฮีโมไซยานิน  
 ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ และย้อมแบบซิลเวอร์  
 แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน  
 แถวที่ 2 พลาสมาของกิ้งชั่งวัย  
 แถวที่ 3 สารละลายหลอดที่ 13 จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์  
 แถวที่ 4 สารละลายโปรตีนจากการทำ preparative PAGE  
 (แถบฮีโมไซยานิน = HC)

## 2. การศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

### 2.1 แบบแผนโปรตีนของฮีโมไซยานินใน Non-denaturing PAGE

ในการศึกษาแบบแผนโปรตีนของฮีโมไซยานินในพลาสมา โดยการทำให้ non-denaturing PAGE พบว่าพลาสมาเริ่มต้นที่นำมาศึกษาปรากฏแถบโปรตีนที่ย้อมแบบซิลเวอร์เข้มติดสีเข้มมากเพียง 1 แถบ (รูปที่ 10 แถวที่ 2) ซึ่งเมื่อเทียบแบบแผนโปรตีนกับของกุ้งขาว *P. vannamei* (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) กุ้งกุลาดำ (Ellerton and Anderson, 1981) และ กุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) บ่งชี้ว่าแถบนี้เป็นแถบของฮีโมไซยานิน และพลาสมาของกุ้งแชบ๊วยยังปรากฏแถบโปรตีนอื่นจาง ๆ อีกจำนวนหนึ่งวิ่งกระจายอยู่ด้านล่างของเจล (รูปที่ 10 แถวที่ 2) เนื่องจากฮีโมไซยานินที่มีรายงานในครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ พบว่ามีปริมาณมากถึง 80-95% ของโปรตีนในพลาสมา ดังนั้นโปรตีนแถบเข้มที่สุดจึงเป็นแถบของฮีโมไซยานินในทำนองเดียวกับที่พบในกุ้งขาว (*P. vannamei*) (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) และจากปู (*S. olivacea*) (Chen *et al.*, 2007)

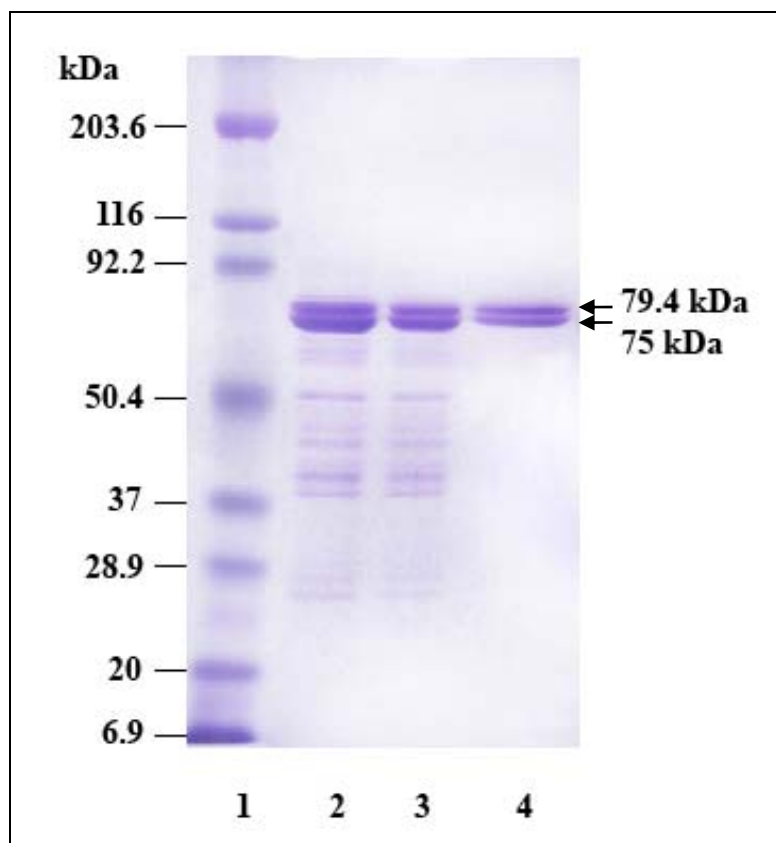
เมื่อทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมาของกุ้งแชบ๊วย โดยการใช้อัลตราเซนตริฟิวจ์ พบว่าสารละลายหลอดที่ 13 มีค่าดูดกลืนแสงและมีสีน้ำเงินเข้มของคอปเปอร์มาก บ่งชี้ว่ามีปริมาณฮีโมไซยานินอยู่ในหลอดนี้มาก (Adachi *et al.*, 2001) เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมไซยานินในสารละลายหลอดที่ 13 ที่เตรียมได้ ปรากฏแบบแผนโปรตีนคล้ายกับพลาสมาของกุ้งแชบ๊วย แต่ความเข้มของแถบโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่แถบโปรตีนฮีโมไซยานินติดสีอ่อนจางลง (รูปที่ 10 แถวที่ 3) แสดงให้เห็นว่าการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์กำจัดโปรตีนปนเปื้อนออกได้บางส่วน เมื่อนำสารละลายหลอดที่ 13 ไปแยกต่อโดยวิธี preparative PAGE พบว่าสารละลายที่เตรียมได้ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อย้อมโปรตีนแบบซิลเวอร์ ณ ตำแหน่งของฮีโมไซยานิน (รูปที่ 10 แถวที่ 4) บ่งชี้ว่าการทำ preparative PAGE สามารถแยกฮีโมไซยานินได้บริสุทธิ์

แบบแผนโปรตีนของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพลาสมาของกุ้งแชบ๊วยนี้ คล้ายกับแบบแผนโปรตีนของฮีโมไซยานินที่แยกได้จากครัสเตเชียนชนิดอื่น ซึ่งปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวใน non-denaturing PAGE อาทิเช่น ฮีโมไซยานินจากกุ้งขาว (*P. vannamei*) (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) และจากปู (*S. olivacea*) (Chen *et al.*, 2007)



## 2.2 แบบแผนหน่วยย่อยโปรตีนของอีโมไซยานินใน SDS-PAGE

จากการนำอีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยวิธี preparative PAGE ไปวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ที่อยู่ใกล้กันเป็นคู่ (รูปที่ 11 แถวที่ 4) ซึ่งเป็นแบบแผนคล้ายกับหน่วยย่อยของอีโมไซยานินของครัสเตเชียนชนิดอื่น ๆ ที่พบว่าหน่วยย่อยของจะถูกแยกใกล้กันมากเป็น 2 แถบ ใน SDS-PAGE อาทิเช่นของ กุ้ง kuruma (*P. japonicus*) (Adachi *et al.*, 2001) กุ้งขาว (*P. vannamei*) (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) กุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) ของกุ้งนาง (*P. leniusculus*) (Lee *et al.*, 2004; Dolashka-Angelova *et al.*, 2005) และของ giant isopod (*Bathynomus giganteus*) (Pless *et al.*, 2003) แต่อีโมไซยานินของกุ้งกุลาดำปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ (Ellerton and Anderson, 1981) หรือของปู (*Charybdis japonica*) ก็ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ (Fan *et al.*, 2009) เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าอีโมไซยานินของครัสเตเชียน เช่น กุ้ง หรือปู เป็นต้น จะมีหน่วยย่อยที่ปรากฏเป็นแถบโปรตีน 2-3 แถบ ใน SDS-PAGE คล้าย ๆ กัน



รูปที่ 11 แบบแผนโปรตีนใน SDS-PAGE ของฮีโมไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์  
ในขั้นตอนต่างๆ ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 พลาสมาของกึ่งแซบวัย

แถวที่ 3 สารละลายหลอดที่ 13 จากการทำอัลตราเซนตริฟิวส์

แถวที่ 4 สารละลายโปรตีนจากการทำ preparative PAGE

(ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์)

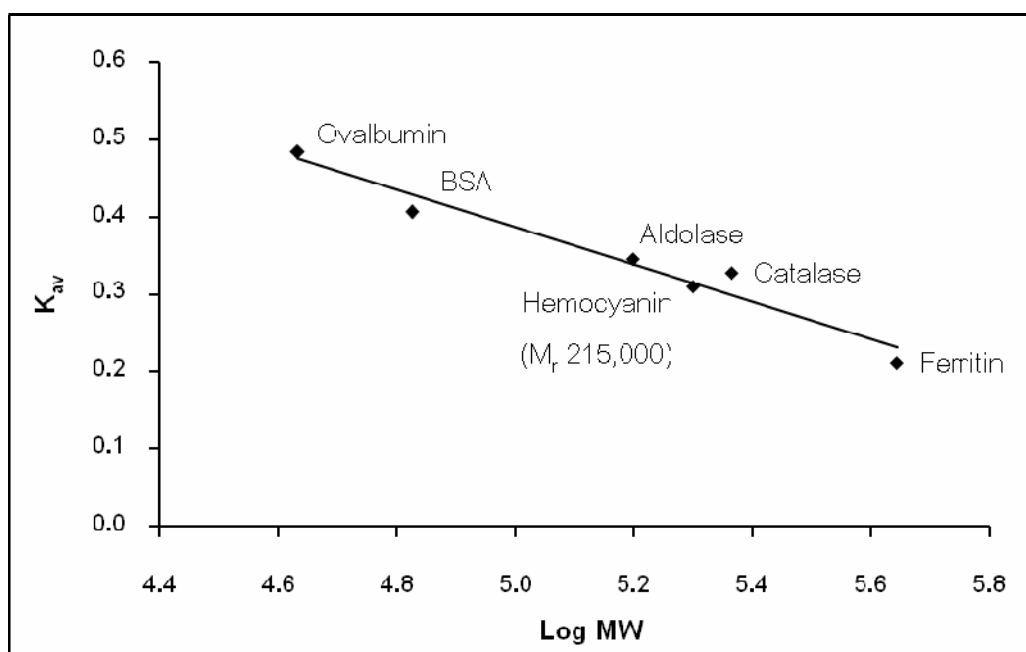
### 2.3 การหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

จากการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำ preparative PAGE โดยใช้คอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า  $K_{av}$  ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ได้ 215,000 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 12

มีรายงานเกี่ยวกับมวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในรูปไม่แปลงสภาพ (native form) น้อยมาก โดยส่วนใหญ่มักรายงานเป็นมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินใน SDS-PAGE ถึงแม้การหามวลโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี Non-denaturing PAGE จะไม่แม่นยำเพราะการวิเคราะห์ด้วยวิธี Non-denaturing PAGE เป็นการแยกโปรตีนด้วย 3 ปัจจัยควบคู่กันคือประจุสุทธิ ขนาด และรูปร่างของโปรตีนนั้น ๆ แต่ก็มีรายงานการวิเคราะห์ด้วยวิธี Non-denaturing PAGE ว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งขาว (*P. vannamei*) มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) ส่วนฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) และของกุ้งกุลาดำ (Ellerton and Anderson, 1981) มีมวลโมเลกุลเท่ากันคือ 471 kDa สำหรับฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของปู *S. olivacea* มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Chen *et al.*, 2007) และมีการวิเคราะห์จากรายงานเหล่านี้ว่า native form ของฮีโมไซยานินที่ศึกษาใน Non-denaturing PAGE มีการจัดตัวแบบ hexamer (1 x 6 หน่วย)

เป็นที่น่าแปลกใจที่พบว่าแถบฮีโมไซยานินทั้งในพลาสมาและฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งแช่บ๊วยมีการเคลื่อนที่ใน Non-denaturing PAGE อยู่ในตำแหน่งระหว่างโปรตีนมาตรฐาน lactate dehydrogenase ( $M_r$  140 kDa) และ catalase ( $M_r$  232 kDa) ซึ่งเมื่อคำนวณเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าฮีโมไซยานินเคลื่อนที่อยู่ ณ ตำแหน่งแถบที่มีมวลโมเลกุล 230 kDa (รูปที่ 10) โดยแบบแผนการเคลื่อนที่ใน Non-denaturing PAGE ของฮีโมไซยานินของกุ้งแช่บ๊วยต่างจากฮีโมไซยานินที่เป็น hexamer ของกุ้งขาว (*P. vannamei*) (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) กุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) กุ้งกุลาดำ (Ellerton and Anderson, 1981) และของปู *S. olivacea* (Chen *et al.*, 2007) ซึ่งเคลื่อนที่ ณ แถบที่มีมวลโมเลกุล 400-471 kDa อาจเป็นไปได้ที่ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งแช่บ๊วยมีประจุสุทธิเป็นลบมากกว่าของปูและกุ้งอื่นๆ จึงเคลื่อนที่ใน Non-denaturing PAGE ไปหาขั้วบวกได้มากกว่า ซึ่งคำนวณมวลโมเลกุลได้ 230 kDa แทนที่จะเป็น hexamer ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 460 kDa [ได้จากการคำนวณ  $3 \times (79.4 + 75 \text{ kDa})$  ซึ่งหาได้จาก SDS-PAGE จากข้อ 2.4] ดังเช่นของปูและกุ้งอื่น ๆ ที่มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 400-471 kDa อย่างไรก็ตามเมื่อหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Superose 12 พบว่ามีค่า 215 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับที่คำนวณได้จากการวิเคราะห์ด้วย Non-denaturing PAGE งานวิทยานิพนธ์นี้ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่า

ทำไมฮีโมไซยานินปริสซูทรีของกุ้งแชบ๊วยจึงมีมวลโมเลกุลน้อยกว่าของกุ้งขาว (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) กุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) กุ้งกุลาดำ (Ellerton and Anderson, 1981) และของปู *S. olivacea* (Chen *et al.*, 2007) ประมาณ 2 เท่า



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินปริสซูทรีด้วยคอลัมน์ Superose 12 HR 10/30

หามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินปริสซูทรี โดยใช้คอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC ซึ่งปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย TB (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) แล้วเติมฮีโมไซยานินปริสซูทรี potassium dichromate ( $M_r$  294), blue dextran ( $M_r$  2,000,000) และโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ ferritin ( $M_r$  440,000) catalase ( $M_r$  232,000) aldolase ( $M_r$  158,000) BSA ( $M_r$  67,000) และ Ovalbumin ( $M_r$  43,000) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ TB ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.8 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าดูดกลืนแสง

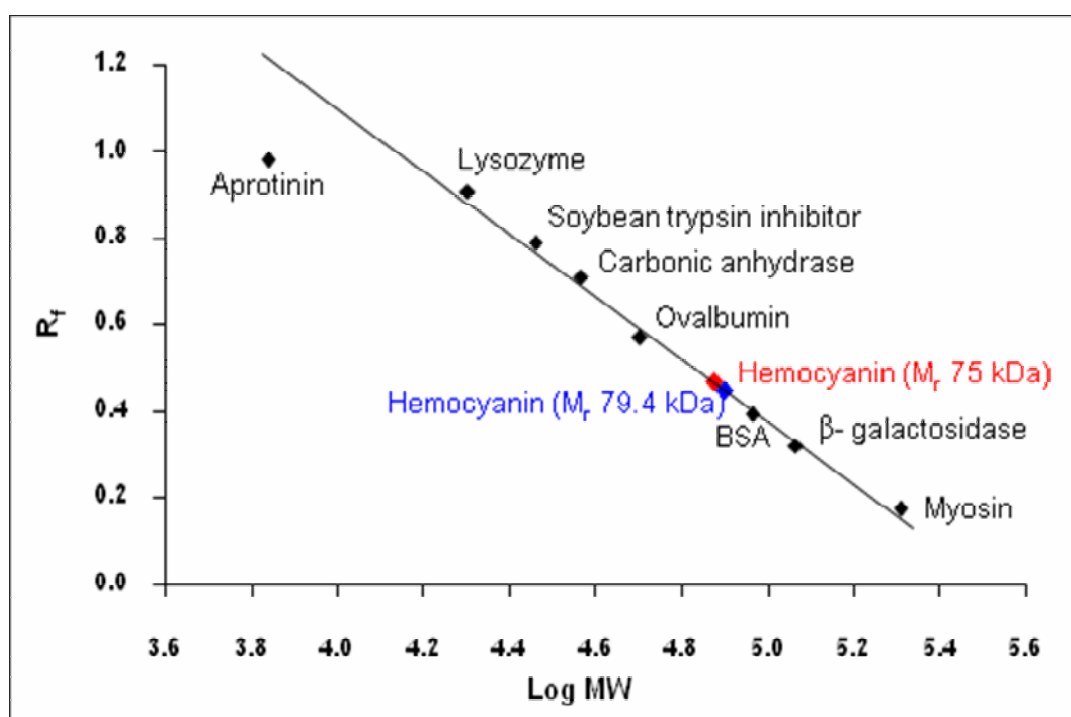
## 2.4 การหาจำนวนและมวลโมเลกุลของหน่วยย่อย

เมื่อนำฮีโมไซยานินบริสซูร์ของกุ้งแชบ๊วยไปวิเคราะห์ด้วยการทำ SDS-PAGE เพื่อหามวลโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินบริสซูร์ ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินบริสซูร์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาด ดังแสดงผลในรูปที่ 11 แถวที่ 4 และจากการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสซูร์โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 8 ชนิด พบว่าสามารถคำนวณหามวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินบริสซูร์ได้ 79,400 และ 75,000 ดัลตัน จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ( $R_f$ ) ของโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงผลในรูปที่ 13 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับของหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินในกุ้งชนิดอื่นๆ ซึ่งฮีโมไซยานินประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาด เช่นกัน อาทิ เช่น ฮีโมไซยานินของกุ้ง *P. japonicus* มีมวลโมเลกุล 77,000 และ 67,000 ดัลตัน (Adachi *et al.*, 2001) ของกุ้งขาว *P. vannamei* มีมวลโมเลกุล 82,000 และ 75,000 ดัลตัน (Figueroa-Soto *et al.*, 1997) ของกุ้ง *P. setiferus* มีมวลโมเลกุล 82,000 และ 77,000 ดัลตัน (Brouwer *et al.*, 1978) ในขณะที่ของกุ้งนาง (*P. leniusculus*) มีมวลโมเลกุล 75,000 และ 66,000 ดัลตัน (Lee *et al.*, 2004; Dolashka-Angelova *et al.*, 2005) หรือของ giant isopod (*Bathynomus giganteus*) มีมวลโมเลกุล 72,000 และ 70,000 ดัลตัน (Pless *et al.*, 2003)

สำหรับฮีโมไซยานินที่ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ ใน SDS-PAGE หรือประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 ขนาด ก็มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับของกุ้งแชบ๊วย เช่น ฮีโมไซยานินของกุ้งกุลาดำมีมวลโมเลกุล 85,000, 77,000 และ 70,000 ดัลตัน (Ellerton and Anderson, 1981) และของปู *C. japonica* มีมวลโมเลกุล 80,000, 75,000 และ 70,000 ดัลตัน (Fan *et al.*, 2009)

ฮีโมไซยานินในรูป native form ของคริสต์เตเซียนมีการเกาะกลุ่ม (aggregate) ของหน่วยย่อยเป็น 12-mer (2 x 6 หน่วย) ถึง 48-mer (8 x 6 หน่วย) ทำให้มีมวลโมเลกุลจาก 450 kDa ถึง 3,900 kDa (Herskovits, 1988) การจัดตัวของฮีโมไซยานินของ decapod ที่พบทั่วไปคือเป็น hexamer (1 x 6 หน่วย) หรือ dodecamer (2 x 6 หน่วย) (Chan and Weeks, 1992) มีรายงานว่าฮีโมไซยานินบริสซูร์ของกุ้งขาว *P. vannamei* มีขนาด 400 kDa (Figueroa-Soto *et al.*, 1997) ส่วนฮีโมไซยานินบริสซูร์ของกุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) และของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (Ellerton and Anderson, 1981) มีมวลโมเลกุลเท่ากันคือ 471 kDa สำหรับฮีโมไซยานินบริสซูร์ของปู *S. olivacea* มีมวลโมเลกุล 400 kDa (Chen *et al.*, 2007) และมีการวิเคราะห์จากรายงานเหล่านี้ว่า native form ของฮีโมไซยานินที่ศึกษาใน Non-denaturing PAGE มีการจัดตัวแบบ hexamer (1 x 6 หน่วย) เมื่อเปรียบเทียบมวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสซูร์ของกุ้งแชบ๊วยที่หาโดยคอลัมน์ Superose 12 (215 kDa, รูปที่ 12) หรือที่คำนวณจาก Non-denaturing PAGE (230 kDa, รูปที่ 10) กับมวลโมเลกุลของหน่วยย่อย

ของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ ซึ่งมีค่าเป็น 79,400 และ 75,000 ดัลตัน (รูปที่ 13) แสดงให้เห็นว่าฮีโมไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์จากพลาสมาของกุ้งแชบ๊วยที่อยู่ในรูป native form น่าจะรวมตัวกันด้วยจำนวนหน่วยย่อยที่น้อยกว่าของกุ้งอื่น ๆ ซึ่งไม่เคยมีรายงานเช่นนี้สำหรับฮีโมไซยานินของกุ้งชนิดอื่น ๆ มาก่อน ทั้งนี้เพราะฮีโมไซยานินของกุ้งขาว *P. vannamei* (Figuroa-Soto *et al.*, 1997) และของกุ้ง *P. setiferus* (Brouwer *et al.*, 1978) ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาดรวมกันเป็น 6 หน่วย (hexamer) หรือฮีโมไซยานินของกุ้งกุลาดำประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 ขนาด รวมกันเป็น 6 หน่วย (hexamer) (Ellerton and Anderson, 1981) งานวิทยานิพนธ์นี้พบว่าฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยแตกต่างจากฮีโมไซยานินของคริสต์เตเซียนอื่น ๆ ซึ่งต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าของฮีโมไซยานินของกุ้งพีเนียดประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกัน แต่มีจำนวนแตกต่างกันบ้าง



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของการหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE

หามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ โดยวิธี SDS-PAGE โดยทำควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ myosin ( $M_r$  203,646),  $\beta$ -galactosidase ( $M_r$  116,134), BSA ( $M_r$  92,266), ovalbumin ( $M_r$  50,400), carbonic anhydrase ( $M_r$  37,043), soybean trypsin inhibitor ( $M_r$  28,920), lysozyme ( $M_r$  20,081) และ aprotinin ( $M_r$  6,936)

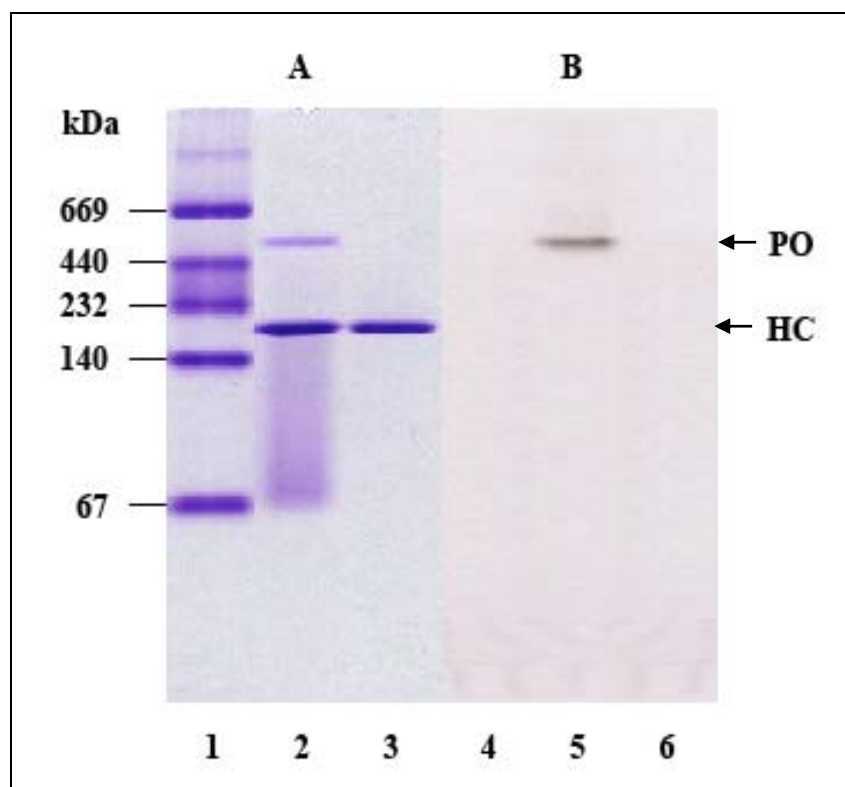
### 3. การหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสใน Non-denaturing PAGE

#### แบบย้อมแอดทิวทิ

เพื่อหาตำแหน่งแถบโปรตีนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase, PO) ในพลาสมาของกุ้งแชบ๊วยและทดสอบว่าฮีโมไซยานินบริสุทธ์มีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสหรือไม่ ทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี non-denaturing PAGE จากนั้นย้อมเจลแบบแอดทิวทิที่ใช้สับสเตรท L-DOPA และกระตุ้นด้วย SDS พบว่าปรากฏแถบแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพียงแถบเดียวในพลาสมาของกุ้งแชบ๊วย (แถบ PO) ดังแสดงผลในรูปที่ 14 แถวที่ 5 แต่ไม่พบแถบแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ตำแหน่งของแถบฮีโมไซยานิน (แถบ HC) (รูปที่ 14 แถวที่ 6) เมื่อคำนวณมวลโมเลกุลของแถบแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หรือแถบ PO (รูปที่ 14 แถวที่ 2 และ 5) เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าแถบโปรตีนที่มีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีมวลโมเลกุลประมาณ 480 kDa อาจเป็นได้ทั้งแถบ PO อาจเป็นฮีโมไซยานินที่รวมตัวกันเป็น hexamer และมีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเมื่อถูกกระตุ้นด้วย SDS ดังเช่นที่พบทั่วไปในกุ้งชนิดอื่น ต่างกันตรงที่ฮีโมไซยานินของกุ้งชนิดอื่นที่พบมากในฮีโมลิมฟ์เป็นแบบ hexamer และมีมวลประมาณ 400 kDa แต่ฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยที่พบมากในฮีโมลิมฟ์อยู่ในรูปเล็กกว่า hexamer ซึ่งมีมวลโมเลกุล 215-230 kDa และไม่มีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ส่วนรูปแบบ hexamer ที่มีมวลประมาณ 480 kDa และมีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสพบในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยในปริมาณที่น้อยกว่ามาก (รูปที่ 14 แถวที่ 2 และ 5)

ในทำนองเดียวกัน เมื่อวัดแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมไซยานินบริสุทธ์ของกุ้งแชบ๊วย โดยการกระตุ้นด้วย SDS หรือเอนไซม์ทริปซิน ไม่พบว่าฮีโมไซยานินบริสุทธ์มีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Adachi และคณะ (2001) ที่สามารถวัดแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ในฮีโมไซยานินบริสุทธ์ที่กระตุ้นด้วย SDS และใช้ L-DOPA เป็นสับสเตรทในกุ้ง kuruma (*P. japonicus*) หรือเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kurtz (1999) ที่ศึกษาในแมงดาทะเล (*T. tridentatus*) และผลงานวิจัยของ Lee และคณะ (2004) ที่ศึกษาในกุ้งนาง (*P. leniusculus*) ที่พบว่าฮีโมไซยานินบริสุทธ์มีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเมื่อผ่านการกระตุ้นในทำนองเดียวกัน สาเหตุที่ไม่พบแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมไซยานินบริสุทธ์ของกุ้งแชบ๊วยอาจเป็นผลมาจากฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยต่างจากกุ้งชนิดอื่นเพราะมีการจัดตัวรวมกันเป็นรูปแบบที่เล็กกว่า hexamer จึงไม่มีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในขณะที่ฮีโมไซยานินบริสุทธ์ของครัสเตเชียนอื่นๆ รวมตัวกันเป็น hexamer จึงมีแอดทิวทิของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส





รูปที่ 14 แถบโปรตีนของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสใน Non-denaturing PAGE ที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู (A) และย้อมแบบแอกทีวี่ที (B)  
 แถวที่ 1 และ 4 โปรตีนมาตรฐาน  
 แถวที่ 2 และ 5 ซีรัมของกิ้งแกบวัย  
 แถวที่ 3 และ 6 ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์  
 PO = เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

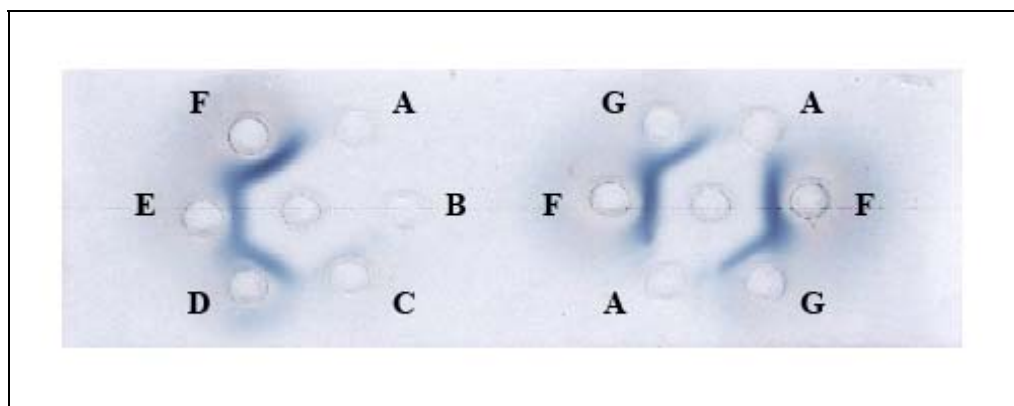
#### 4. แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์ของกุ่มแซบวัย

##### 4.1 การสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

จากการเตรียมแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์ของกุ่มแซบวัย โดยการฉีดกระตุ้นกระต่ายบริเวณผิวหนังกับไตผิวหนังหลายๆ จุด โดยใช้ปริมาณฮีโมไซยานินครั้งละ 20 ไมโครกรัม เมื่อทดสอบการมีแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่ากระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์ได้ หลังจากการฉีดสัปดาห์ที่ 4 (รูปที่ 15 หลุม C) และมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นหลังจากการฉีดสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ตามลำดับ (รูปที่ 15 หลุม D และ E) ทั้งนี้ไม่พบแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์ในซีรัมกระต่ายก่อนการฉีดแอนติบอดี ดังแสดงผลรูปที่ 15 หลุม A จะเห็นได้ว่ากระต่ายมีการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนและใช้แอนติเจนครั้งละปริมาณไม่มาก (ครั้งละ 20 ไมโครกรัม) ในการกระตุ้น

##### 4.2 การแยกแอนติบอดีจากซีรัม

เมื่อแยกแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์จากซีรัมกระต่าย 4.5 มิลลิลิตร โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50% แล้วแยกแอนติบอดีด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาในพีคแรก (Wallance, 1965) และมีปริมาณโปรตีน 9.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แอนติบอดีที่ผ่านการแยกทั้งสองขั้นตอนนี้เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนกับฮีโมไซยานินบริสุทธ์ได้ดีเช่นเดียวกับซีรัมกระต่ายก่อนผ่านคอลัมน์ ดังแสดงผลในรูปที่ 15

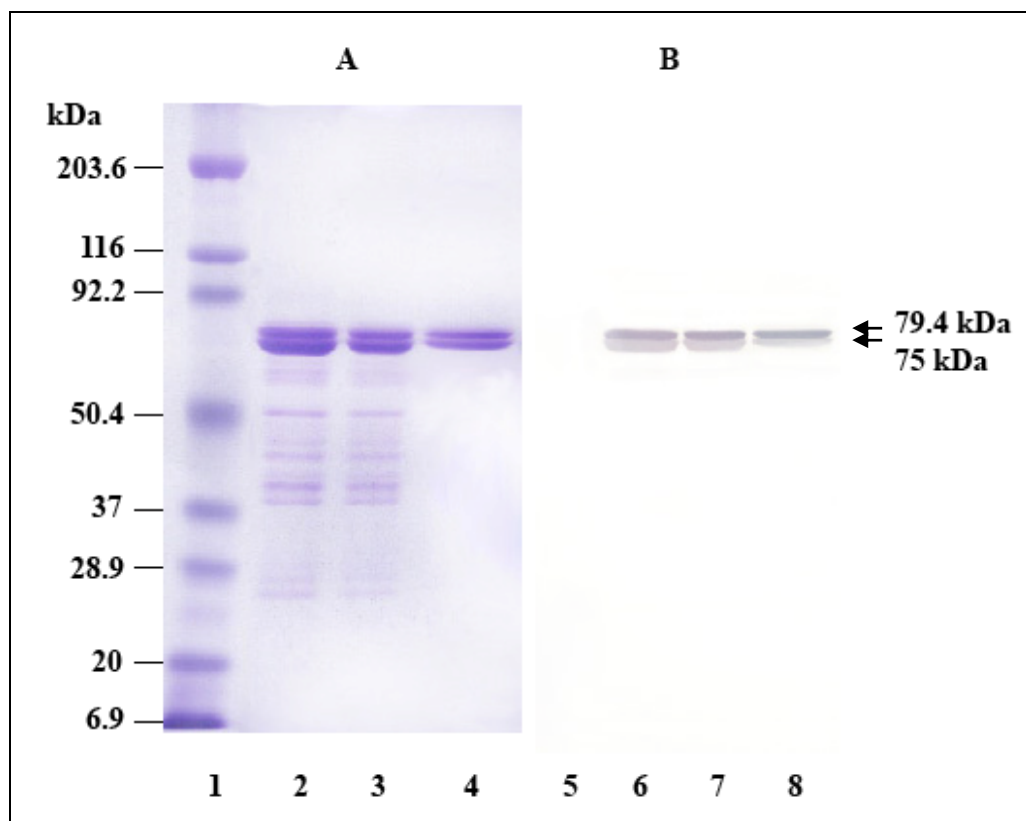


รูปที่ 15 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของแอนติบอดีต่อ  
ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่าย

- กลุ่ม A ซีรัมก่อนการฉีดแอนติบอดี
- กลุ่ม B ซีรัมหลังฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์สัปดาห์ที่ 2
- กลุ่ม C ซีรัมหลังฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์สัปดาห์ที่ 4
- กลุ่ม D ซีรัมหลังฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์สัปดาห์ที่ 5
- กลุ่ม E ซีรัมหลังฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์สัปดาห์ที่ 6
- กลุ่ม F ซีรัมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต
- กลุ่ม G แอนติบอดีหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel

## 5. การทำ Western blot

เพื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์ จากการนำพลาสมาของกึ่งแซบวัย สารละลายหลอดที่ 13 ที่ได้จากการทำอัลตราเซนทริฟิวจ์ และฮีโมไซยานินบริสุทธ์ไปทำ SDS-PAGE และทดสอบต่อด้วยการทำ Western blot โดยขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ย้อมสีโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสี Ponceau S ปรากฏแบบแถบโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสคล้ายกับโปรตีนในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยสีคумаซีบลู (รูปที่ 16A แถวที่ 2-4) แสดงว่าโปรตีนในแผ่นเจลส่วนใหญ่ถูกขนถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (ไม่ได้แสดงผล) เมื่อนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มกับแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์ ปรากฏเฉพาะแถบโปรตีน 2 แถบ ที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีในทั้ง 3 ตัวอย่าง คือ พลาสมาของกึ่งแซบวัย (รูปที่ 16B แถวที่ 6) สารละลายหลอดที่ 13 (รูปที่ 16B แถวที่ 7) และฮีโมไซยานินบริสุทธ์ (รูปที่ 16B แถวที่ 8) และเมื่อนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่บ่มกับแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์ไปเปรียบเทียบกับแผ่นเจลที่ย้อมด้วยสีคумаซีบลู (รูปที่ 16A แถวที่ 2-4) พบว่าตำแหน่งของแถบโปรตีน 2 แถบ ที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีเป็นตำแหน่งของฮีโมไซยานินซึ่งมีมวลโมเลกุล 79,400 และ 75,000 ดัลตัน บ่งชี้ว่าแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธ์มีความจำเพาะสูงเพราะเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับฮีโมไซยานินเท่านั้น แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนอื่น ๆ ในพลาสมาหรือในสารละลายหลอดที่ 13 รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงผลในรูปที่ 16B แถวที่ 5



รูปที่ 16 แบบแผนโปรตีนของฮีโมลิฟและฮีไซยานินบริสุทธ์ ใน SDS-PAGE และ  
 ย้อมด้วยสีค้อมาซิปลู (A) และใน Western blot ซึ่งบ่มด้วยแอนติบอดีต่อ  
 ฮีโมไซยานินบริสุทธ์ (B)

แถวที่ 1 และ 5 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 และ 6 พลาสมาของกึ่งแซบวัย

แถวที่ 3 และ 7 สารละลายหลอดที่ 13 จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์

แถวที่ 4 และ 8 ฮีโมไซยานินบริสุทธ์

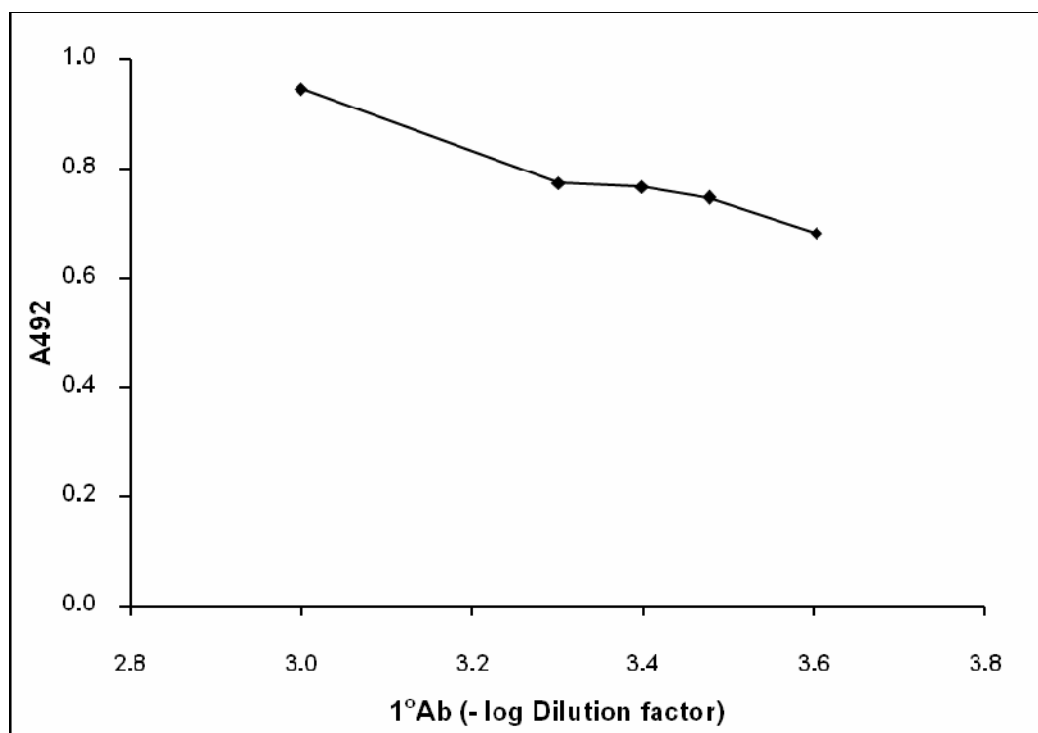
## 6. การพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์

### 6.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA ต้องอาศัยหลายปัจจัยในการทำ ได้แก่การใช้ปริมาณฮีโมไซยานิน ปริมาณแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ ( $1^{\circ}\text{Ab}$ ) และปริมาณแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ( $2^{\circ}\text{Ab}$ ) ที่เหมาะสม นอกจากนี้ในการติดตามปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกิด ก็ต้องใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท OPD และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  รวมทั้งระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสม ซึ่งในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้พัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์ จึงได้หาภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ยกเว้นความเข้มข้นของ OPD ซึ่งเลือกใช้ที่ 0.4 mg/ml ความเข้มข้นของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  เลือกใช้ที่ 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนาน 30 นาที ในการทำ ELISA โดยได้จากผลงานวิทยานิพนธ์ของ Rittidach (2006) ที่เคยศึกษาว่าเป็นความเข้มข้นของสับสเตรท OPD และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  รวมทั้งระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสม

#### 6.1.1 การหาปริมาณแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ ( $1^{\circ}\text{Ab}$ ) ที่เหมาะสมในการทำ ELISA

ในการหาปริมาณแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ่มแซบ้วย ( $1^{\circ}\text{Ab}$ ) ที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ทำโดยการใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เคลือบผิวเพลทด้วยปริมาณคงที่ 800 นาโนกรัมต่อหลุม บ่มกับ  $1^{\circ}\text{Ab}$  ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ด้วยอัตราส่วน 1:1,000, 1:2,000, 1:2,500, 1:3,000 และ 1:4,000 และใช้  $2^{\circ}\text{Ab}$  ที่ความเข้มข้นคงที่ที่ 1:25,000 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A492) ดังแสดงผลในรูปที่ 17 พบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ  $1^{\circ}\text{Ab}$  ซึ่งค่าการเจือจาง  $1^{\circ}\text{Ab}$  ที่เหมาะสมคือ 1:2,000 เนื่องจากให้ค่า A492 ไม่สูงหรือต่ำเกินไป ดังแสดงผลในรูปที่ 17 ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงใช้  $1^{\circ}\text{Ab}$  ที่เจือจาง 1:2,000 เท่า ในการศึกษาข้อต่อไป



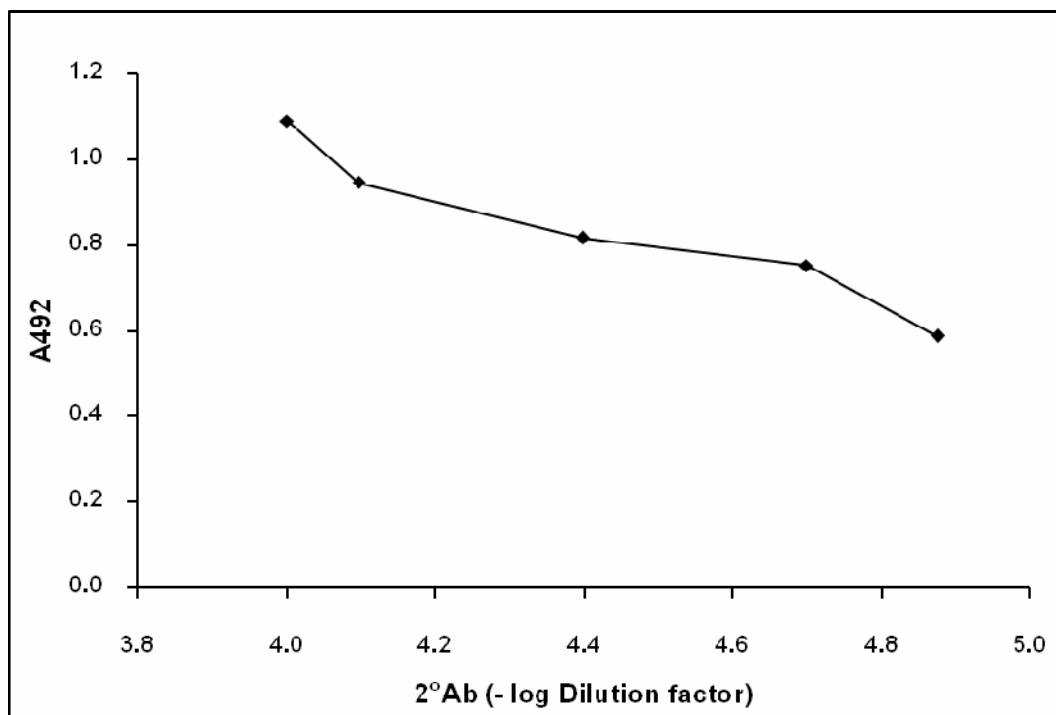
### รูปที่ 17 การเจือจางที่เหมาะสมของ 1°Ab ในการทำ ELISA

ในการหาค่าการเจือจางของแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสทูรี (1°Ab) ที่เหมาะสม โดยการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ที่ 1:1,000, 1:2,000, 1:2,500, 1:3,000 และ 1:4,000 และใช้ฮีโมไซยานินบริสทูรี 800 นาโนกรัมต่อหลุม, 2°Ab เจือจางที่ 1:25,000, ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml, ความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนาน 30 นาที ในการทำ ELISA

### 6.1.12 การหาปริมาณแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ( $2^{\circ}\text{Ab}$ ) ที่เหมาะสมในการทำ ELISA

ในทำนองเดียวกัน เพื่อหาปริมาณแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับ  
เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ( $2^{\circ}\text{Ab}$ ) ที่เหมาะสมในการทำ ELISA ทำโดยเคลือบผิวเพลทด้วยฮีโม  
ไซยานินบริสทูร์ปริมาณคงที่ 800 นาโนกรัมต่อหลุม และบ่มกับ  $1^{\circ}\text{Ab}$  ที่เจือจาง 1:2,000 เท่า  
แล้วหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของ  $2^{\circ}\text{Ab}$  โดยเจือจาง  $2^{\circ}\text{Ab}$  ด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะห์ที่  
1:10,000, 1:12,500, 1:25,000, 1:50,000 และ 1:75,000 พบว่าได้ผลในทำนองเดียวกันกับ  
 $1^{\circ}\text{Ab}$  โดยพบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ  $2^{\circ}\text{Ab}$  ที่ใช้ และแปรผันเป็นเส้นตรงกับ  
ค่าการเจือจาง  $2^{\circ}\text{Ab}$  ระหว่าง 1:12,500 ถึง 1:50,000 เท่า โดยมีค่าการเจือจาง  $2^{\circ}\text{Ab}$  ที่  
เหมาะสมคือ 1:25,000 เท่า ดังแสดงผลในรูปที่ 18 ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงใช้  $2^{\circ}\text{Ab}$  ที่  
เจือจาง 1:25,000 เท่า ในการศึกษาครั้งต่อไป





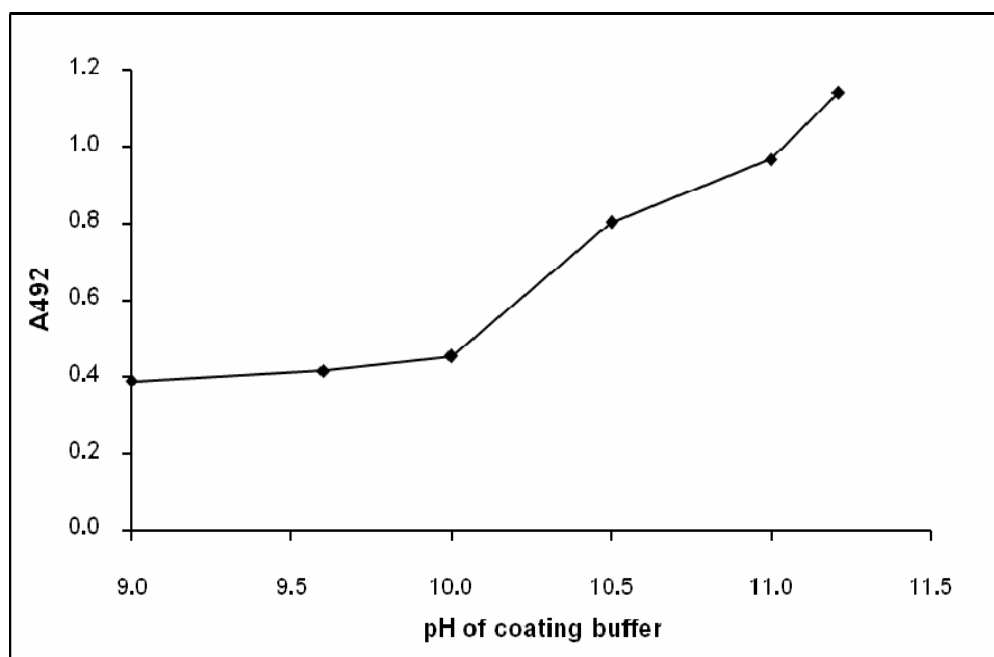
### รูปที่ 18 การเจือจางที่เหมาะสมของ 2°Ab ในการทำ ELISA

ในการหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของ 2°Ab ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์วิเคราะหที่ 1:10,000, 1:12,500, 1:25,000, 1:50,000 และ 1:75,000 โดยใช้ฮีโมไซยานิน ปริสุทธิ์ 800 นาโนกรัมต่อหลอด, 1°Ab เจือจางที่ 1:2,000, ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml, ความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนาน 30 นาที ในการทำ ELISA

### 6.1.3 การหา pH ที่เหมาะสมของการเคลือบฮีโมไซยานินกับเพลทในการ ทำ ELISA

นอกเหนือจากการใช้แอนติบอดีที่เหมาะสมแล้ว ได้ทำการหา pH ของบัฟเฟอร์เคลือบที่เหมาะสมที่ทำให้ฮีโมไซยานินเคลือบติดเพลทได้มากขึ้น เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าเมื่อเตรียมฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในบัฟเฟอร์เคลือบที่ใช้กันทั่วไปคือ 50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.6 พบว่ามีฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เคลือบติดที่ผิวเพลทน้อย ค่า A492 จึงมีค่าต่ำมาก ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้เตรียมฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปริมาณคงที่ 800 นาโนกรัมต่อหลุม ในบัฟเฟอร์เคลือบ 50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 9-11.5 เคลือบผิวเพลทจากการทดลองพบว่าค่า A492 เพิ่มขึ้นตามค่า pH ของบัฟเฟอร์เคลือบ และเพิ่มมากที่สุดที่ pH 11.5 ดังแสดงผลในรูปที่ 19 แต่เนื่องจากไม่ต้องการวิเคราะห์โปรตีนในภาวะที่เป็นเบสมากเกินไป จึงได้เลือกใช้ pH ของบัฟเฟอร์เคลือบที่เหมาะสมคือ 10.5

ดังนั้นในการหาปริมาณฮีโมไซยานินโดยวิธี ELISA จึงเลือกใช้ภาวะที่เหมาะสม ดังนี้คือ เตรียมตัวอย่างในบัฟเฟอร์เคลือบที่ pH 10.5 ใช้  $1^\circ\text{Ab}$  และ  $2^\circ\text{Ab}$  ที่เจือจาง 1:2,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml ความเข้มข้นของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 30 นาที

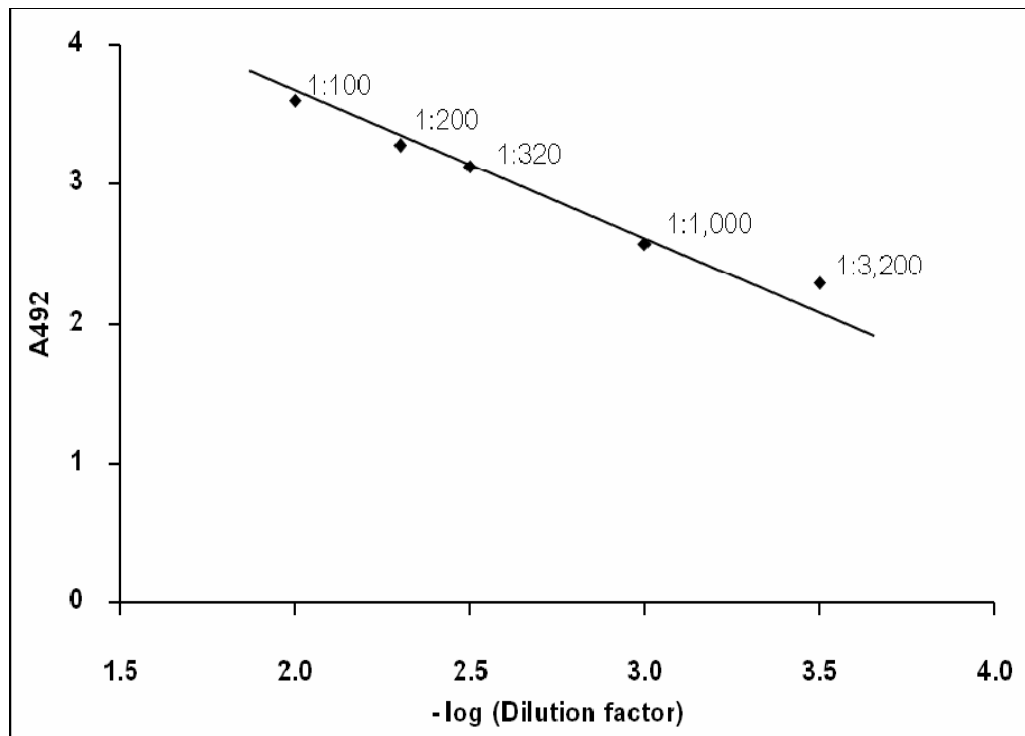


### รูปที่ 19 การหา pH ที่เหมาะสมของการเคลือบอีโมไซยานินกับเพลทในการทำ ELISA

ในการหา pH ของบัฟเฟอร์เคลือบที่เหมาะสมที่ทำให้อีโมไซยานินเคลือบติดเพลทได้ดี ใช้อีโมไซยานินบริสุทธิ์ 800 นาโนกรัมต่อหลุม เตรียมในบัฟเฟอร์เคลือบที่ pH ต่าง ๆ ในช่วง 9-11.5, 1°Ab เจือจางที่ 1:2,000, 2°Ab เจือจางที่ 1:25,000, ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml, ความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนาน 30 นาที ในการทำ ELISA

## 6.2 การเจือจางอีโมลิมีฟที่เหมาะสมในการทำ ELISA

เพื่อหาปริมาณอีโมไซยานินในอีโมลิมีฟที่เหมาะสมในการทำ ELISA ได้ทำการเจือจางอีโมลิมีฟด้วยอัตราส่วน 1:100, 1:200, 1:320, 1:1,000 และ 1:3,200 ด้วยบัฟเฟอร์เคลือบที่มี pH ที่เหมาะสมคือ 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.5 นำไปเคลือบผิวเพลทแต่ละหลุม จากนั้นทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 9.1.1 โดยใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจางเป็นความเข้มข้น 1:2,000 และ 1:25,000 ตามลำดับ ในการทำ ELISA ผลพบว่าอีโมลิมีฟที่เจือจางในช่วงดังกล่าวมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเมื่อพล็อตกราฟระหว่างค่า A492 และ log อัตราส่วนการเจือจาง ดังแสดงผลในรูปที่ 20 แต่การเจือจางด้วยอัตราส่วนมากกว่า 1:1,000 ทำให้ผลที่เริ่มเบี่ยงเบนออกจากเส้นตรง ดังนั้นจึงเลือกเจือจางอีโมลิมีฟด้วยอัตราส่วน 1:200 ซึ่งเป็นช่วงกลาง ๆ ในการหาปริมาณอีโมไซยานินในอีโมลิมีฟด้วยการทำ ELISA ต่อไป

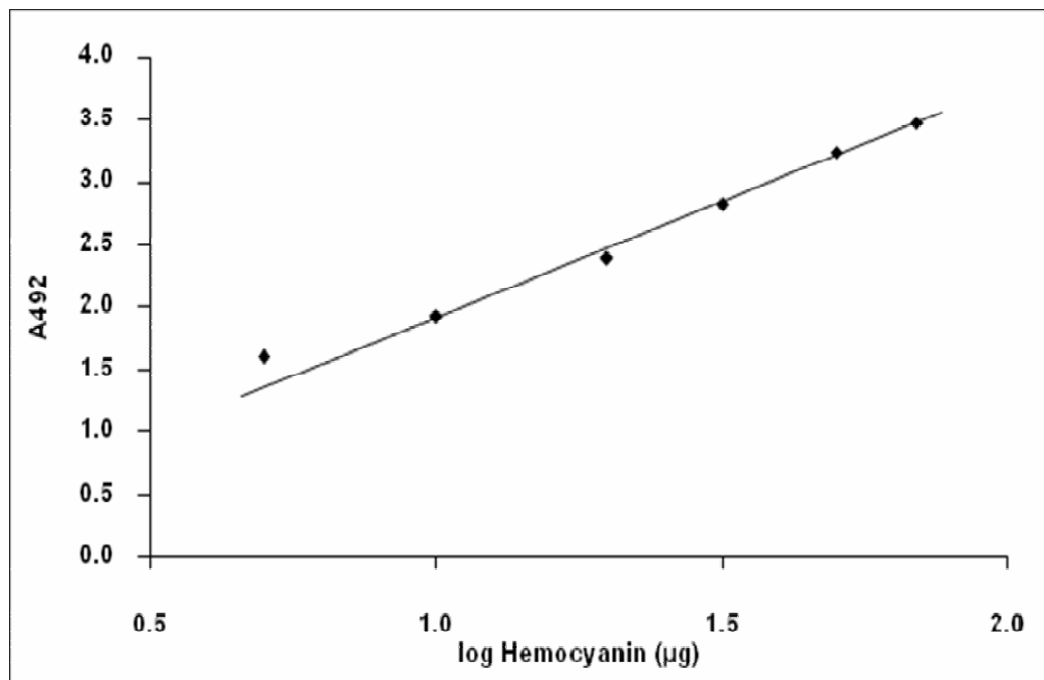


### รูปที่ 20 การเจือจางฮีโมลิฟท์ที่เหมาะสมในการทำ ELISA

ในการหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของฮีโมลิฟท์ ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ วิเคราะห์ที่ 1:100, 1:200, 1:320, 1:1,000 และ 1:3,200, ใช้ 1°Ab เจือจางที่ 1:2,000, 2°Ab เจือจางที่ 1:2,000, ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml, ความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนาน 30 นาที ในการทำ ELISA

### 6.3 การทำกราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

เนื่องจากฮีโมไซยานินมีปริมาณมากในฮีโมลิมฟ์ดังที่เคยมีรายงานกันมาก่อน ดังนั้นการทำกราฟมาตรฐานจึงได้เลือกทำในช่วงที่มีค่า A492 ครอบคลุมการวัดหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ ซึ่งในการทำกราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินเพื่อใช้ในการวัดปริมาณของฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบ้วย ได้จากการนำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปริมาณต่าง ๆ ในช่วง 5-69 ไมโครกรัมต่อหลอด เคลือบเพลท จากนั้นทำ ELISA ติดตามภาวะที่เหมาะสมในข้อ 6.1 แล้วพล็อตกราฟระหว่างค่า A492 กับ log ของปริมาณฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่ใช้ ผลการทดลองแสดงค่า A492 เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามปริมาณของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 10-69 ไมโครกรัม การใช้ฮีโมไซยานินปริมาณ 5 ไมโครกรัม จะให้ค่า A492 ที่เบี่ยงเบนออกจากเส้นตรง (รูปที่ 21) ดังนั้นจึงใช้ปริมาณฮีโมไซยานินในช่วง 10-69 ไมโครกรัม ต่อหลอด หรือความเข้มข้นในช่วง 66.67 – 460 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบ้วยโดยวิธี ELISA ต่อไป



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในการวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยวิธี ELISA

ในการทดสอบใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เคลือบเพลทในช่วง 5-69 ไมโครกรัมต่อหลุม, ใช้ 1<sup>o</sup>Ab เจือจางที่ 1:2,000, 2<sup>o</sup>Ab เจือจางที่ 1:25,000, ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml, ความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็น 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 30 นาที

#### 6.4 การหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยวิธี ELISA

เมื่อทำการวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย 6 ตัวอย่าง โดยเจือจางฮีโมลิมพ์ด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 1:200 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี ELISA ตามวิธีการข้อ 9.1.1 โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พบว่ามีปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์เฉลี่ยจาก 6 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าผิดพลาดมาตรฐาน เป็น  $111.07 \pm 3.58$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของฮีโมลิมพ์ ขณะที่โปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมพ์มีค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าผิดพลาดมาตรฐาน เป็น  $129.65 \pm 4.63$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของฮีโมลิมพ์ ดังนั้นปริมาณฮีโมไซยานินที่หาด้วยวิธี ELISA ของกุ้งแชบ๊วยจึงคิดเป็น 85.67% ของโปรตีนในฮีโมลิมพ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของครัสเตเชียนเป็นฮีโมไซยานิน อาทิเช่น ในกุ้งขาว *P. vannamei* (Cariolou and Flytzanis, 1993) กุ้ง *P. japonicus* (Chen and Cheng, 1993) และในกุ้ง *P. elegans* (Taylor et al., 1985)

### 7. การโคลนซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน

#### 7.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน

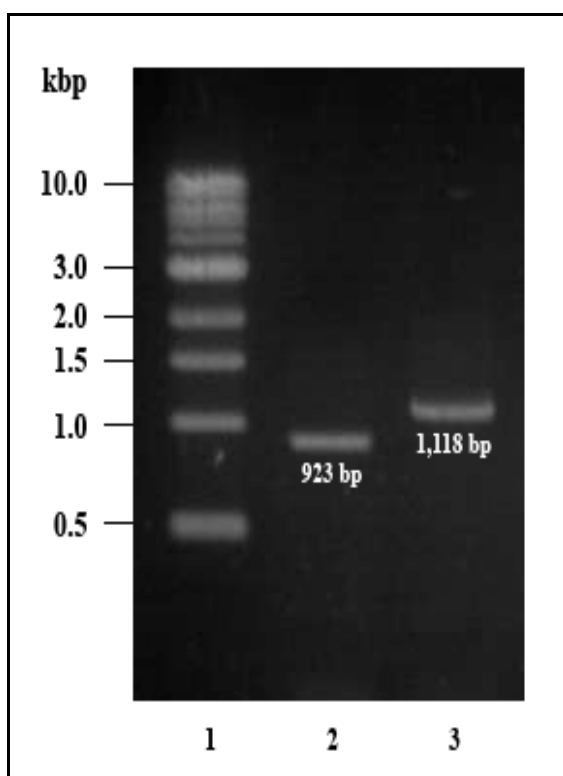
ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนส่วนของยีนฮีโมไซยานิน โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮีโมไซยานินจากสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนที่มีการศึกษามาแล้วจากธนาคารยีน โดยผ่านฐานข้อมูล NCBI ในงานวิทยานิพนธ์นี้ เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. japonicus* Y (EF375712), *M. japonicas* L (EF375711), *P. vannamei* (X82502), *C. magister* 5 (AY861680.1) และ *C. sapidus* (AF249297) ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX และ GeneDoc พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของฮีโมไซยานินมีบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) หลายตำแหน่ง เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์นำมาใช้เป็น forward และ reverse primer ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยใช้ H280 F1 และ H1180 R1 สำหรับเป็น forward และ reverse primer ในการโคลนซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานินซันยีนที่ 1 (HC1) และใช้ H660 F2 และ H1780 R2 เป็น forward และ reverse primer ในการโคลนซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานินซันยีนที่ 2 (HC2)

#### 7.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน

ในการโคลนซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน HC1 และ HC2 โดยใช้ไพรเมอร์ตามข้อ 7.1 จากนั้นเพิ่มปริมาณซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานินด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA library จากตับของกุ้งแชบ๊วยที่ได้มาจากงานวิทยานิพนธ์ของ Rattanaporn (2008) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มจำนวน และใช้ไพรเมอร์จากตารางที่ 2 ในการโคลนซันดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน HC1 และ HC2 เมื่อนำ PCR product ของ HC1 และ HC2 ที่ได้มาตรวจสอบผลด้วย



การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 1.5% agarose gel พบแถบ PCR product เพียงแถบเดียวขนาดประมาณ 923 คู่เบส (base pair, bp) ของ HC1 และ 1,118 คู่เบส ของ HC2 ดังแสดงผลในรูปที่ 22 แถวที่ 2 และ 3



รูปที่ 22 แบบแผนดีเอ็นเอใน 1.5% Agarose gel electrophoresis ของ ยีนฮีโมไซยานินที่ได้จากการทำ PCR

แถวที่ 1 1,000 Base pair DNA ladder

แถวที่ 2 PCR product ของยีนฮีโมไซยานินชั้นที่ 1 (HC1)

แถวที่ 3 PCR product ของยีนฮีโมไซยานินชั้นที่ 2 (HC2)

### 7.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานิน

เพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินทั้ง 2 ชั้น ได้สกัดชั้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit นำชั้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินที่สกัดแยกออกจากเจลไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสมในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 $\alpha$  จากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit นำพลาสมิดลูกผสมที่มีชั้นดีเอ็นเอของฮีโมไซยานินไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI Prism 377 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) พบว่า HC1 มีความยาว 923 คู่เบส และ HC2 มีความยาว 1,118 คู่เบส และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงผลในรูปที่ 23 และ 24 ตามลำดับ

1 CACTGGTTCTCGCTTTTCAACACAAGGCATCGTAATGAGGCACCTCTGCTTTTTGACGTC  
 61 CTCATCCATAGCAGTGACTGGGCAACCTTTGTGCGCAATGCAGCCTTCTTCCGTCAGAAA  
 121 ATTAATGAAGGAGAGTTTGTCTATGCCCTTGATGTTGCCGTGATCCACTCGCCATTGACT  
 181 GAAGACGTAGTGCTGCCTCCACTCTATGAAATCACACCGCACCTCTTACCAACAGTGAA  
 241 GTTATTGAAGCAGCTTATCGTGCCAAACAGAAGCAGACGCCAGGCAAATTCGAGTCCACC  
 301 TTTACAGGAACCAAGAAGAACCCTGAACAGAGAGTAGCTTATTTCCGGTGAAGATATTGGC  
 361 TTGAATACTCATCACGTTACCTGGCATATGGAATTCCCCTTCTGGTGGGATGATGCATAC  
 421 GGCCATCATCTGGATCGCAAGGGAGAAAACCTTCTTCTGGGTTTCATCATCAACTTACCGTC  
 481 CGATTTGACGCTGAACGTCTGTCCAATTATTTGGATCCAGTAGGTGAACGCATTGGTAC  
 541 AAGCCCATCGTAGACGGCTTTGCTCCCATAACCACTTACAAGTATGGAGGTCAGTTCCT  
 601 GCTCGTCCTGACAACGTTAAATTCGAAGATGTGGACGATGTTGCCCGAATTCGAGACATG  
 661 GTCATCGTCGAGAGCCGAATTCGCGATGCCATTGCCCATGGCTACATAATTGATAGCCAC  
 721 GGCAAACAGATTGACATCAGTAATGAGAAAGGCATTGACATTCTCGGGGATGTTATCGAG  
 781 TCATCACTGTACAGTCCCAATGTGCAGTACTATGGAGCTTTACATAACACTGCCCATATT  
 841 GTACTTGGTCGCCAAGGTGATCCTCATGGAAAATTCGATTTACCCCTGGTGTGCTGGAA  
 901 CACTTCGAAACTGCCACCCGTGA

**รูปที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน ชั้นที่ 1 (HC1)**

ใช้ H280 F1 และ H1180 R1 สำหรับเป็น forward และ reverse primer ในการโคลนส่วนของยีนฮีโมไซยานินชั้นที่ 1 (HC1) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย HC1 มีความยาว 923 คู่เบส

1 ACTTGGCATTTGGAATTCCTTCTGGTGGGATGATGAATACGGCCATCATCTGGATCGC  
 61 AAGGGAGAAAACCTTCTTCTGGGTTCATCATCAACTTACCGTCCGATTTGATGCTGAACGT  
 121 CTGTCCAATTATTTGGATCCAGTAGGTGAACTGCATTGGTACAAGCCCATCGTAGACGGC  
 181 TTTGCTCCCCATACCACTTACAAGTATGGAGGTCAGTTCCTGCTCGTCCTGACAACGTT  
 241 AAATTCGAAGATGTGGACGATGTTGCCCGAATTCGAGACATGGTCATCGTCGAGAGCCGA  
 301 ATTCGCGATGCCATTGCCCATGGCTACATAAATTGATAGCCACGGCAAACAGATTGACATC  
 361 AGTAATGAGAAAGGCATTGACATTCTCGGGGATGTTATCGAGTCATCACTGTACAGTCCC  
 421 AATGTGCAGTACTATGGAGCTTTACATAAACTGCCCATATTGTACTTGGTCGCCAAGGT  
 481 GATCCTCATGGAAAATTCGATTTACCCCTGGTGTGCTGGAACATTCGAAACTGCCACC  
 541 CGTGATCCCAGCTTCTTCCGGCTTCACAAATATATGGATAACATTTTCAAAGAACAACAAG  
 601 GACAGCCTACCTCCATACACCAAAGCCGATTTGGAATTCTCTGGCGTGTCTATCTCTGAG  
 661 GTAAACGTTGTAGGTGAACTGGAGACCTATTTTGAAGATTTGAATACAACCTTATCAAC  
 721 GCAGTTGATGACGCTGAAGGAATCCCAGATGTGGACATCAGCACATATGTGCCACGTCTT  
 781 AACCACAAGGAGTTCACCTTTTAAGATTGACATAGAGAATGGAGGCTCTCCCAGATTGGCT  
 841 ACAGTTCGTATCTTTGCCTGGCCTCATAAGGACAACAACCGGAATCGAATTTACATTTGAC  
 901 GAAGGTCGCTGGAATGCCATCGAGTTGGATAAGTTCTGGGTATCATTTGGCGGGTGGAAAA  
 961 AATTCGATTGAGCGCAAGTCCACGGAATCTTCGGTAACTGTCCCGGATGTACCAAGCATA  
 1021 GATACACTGTTTGCAAAGACCGCGGCAGGCGGTGATGGCCTTTCGGAATTCGCGAGTGCA  
 1081 ACAGGCCTGCCAAACAGGTTCTTCTCCCAAGGGCAA

**รูปที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินชั้นยีนที่ 2 (HC2)**

ใช้ H660 F2 และ H1780 R2 สำหรับเป็น forward และ reverse primer ในการโคลนส่วนของยีนฮีโมไซยานินชั้นที่ 2 (HC2) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย HC2 มีความยาว 1,118 คู่เบส

#### 7.4 การสร้างยีนฮีโมไซยานินชิ้นรวม (pHC)

เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินเป็นชิ้นที่ยาวขึ้น ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินทั้ง 2 ชิ้น (HC1 และ HC2) มาเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน (overlapping) ด้วยโปรแกรม CAP 3 ทำให้ได้ชิ้นยีนฮีโมไซยานินที่มีความยาว 1,496 คู่เบส จากโปรแกรมแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HC1 และ HC2 มีส่วนที่คาบเกี่ยว (overlap) กัน จากนั้นทำการแปล (translate) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินที่ศึกษา (pHC) ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Translate พบว่ามีกรดอะมิโน 498 หน่วย ดังแสดงผลในรูปที่ 25 เนื่องจากข้อมูลยีนฮีโมไซยานินที่ได้ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ยังไม่สมบูรณ์เต็มสาย (full-length) จึงขอเรียกเป็น partial hemocyanin gene หรือ pHC

มีรายงานเกี่ยวกับยีนฮีโมไซยานินเต็มสาย (full-length) ของกุ้ง *P. vannamei* โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมจากตับเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่าได้ยีนฮีโมไซยานินยาว 2,095 คู่เบส ซึ่งมีความเหมือน (% identity) สูงเมื่อเทียบกับของ *P. interruptus* (Sellos *et al.*, 1997) และผลงานวิจัยของ Lei และคณะ (2007) ทำการศึกษายีนฮีโมไซยานินจากกุ้ง *P. japonicus* พบว่าสามารถโคลนหน่วยย่อยของยีนฮีโมไซยานินได้ 2 ยีน คือ PjHcL และ PjHcY ซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโน 678 และ 664 หน่วย มีมวลโมเลกุล 75,000 และ 73,000 ดัลตัน ตามลำดับ มีการศึกษายีนฮีโมไซยานินของปู *Cancer magister* โดยสามารถโคลนยีนฮีโมไซยานินหน่วยย่อย 6 (Cmag6) ยาว 1,939 คู่เบส แปลเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนยาว 650 หน่วย และมีมวลโมเลกุล 74,903 ดัลตัน โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมจากตับเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (Durstewitz and Terwilliger, 1997)

H W F S L F N T R H R N E A L L L F D V  
 1 CACTGGTTCTCGCTTTTCAACACAAGGCATCGTAATGAGGCACTCCTGCTTTTTGACGTC

---

L I H S S D W A T F V G N A A F F R Q K  
 61 CTCATCCATAGCAGTGACTGGGCAACCTTTGTCGGCAATGCAGCCTTCTTCCGTCAGAAA

---

I N E G E F V Y A L Y V A V I H S P L T  
 121 ATTAATGAAGGAGAGTTTGTCTATGCCTTGATGTTGCCGTGATCCACTCGCCATTGACT

---

E D V V L P P L Y E I T P H L F T N S E  
 181 GAAGACGTAGTGCTGCCCTCCACTCTATGAAATCACACCGCACCTCTTCACCAACAGTGAA

---

V I E A A Y R A K Q K Q T P G K F E S T  
 241 GTTATTGAAGCAGCTTATCGTGCCAAACAGAAGCAGACGCCAGGCAAATTCGAGTCCACC

---

F T G T K K N P E Q R V A Y F G E D I G  
 301 TTTACAGGAACCAAGAAGAACCCCTGAACAGAGAGTAGCTTATTTCCGGTGAAGATATTGGC

---

L N T H H V T W H M E F P F W W D D E Y  
 361 TTGAATACTCATCACGTTACCTGGCATATGGAATTCCTTCTGGTGGGATGATGAATAC

---

G H H L D R K G E N F F W V H H Q L T V  
 421 GGCCATCATCTGGATCGCAAGGGAGAAAACCTTCTTCTGGGTTCATCATCAACTTACCCTC

---

R F D A E R L S N Y L D P V G E L H W Y  
 481 CGATTTGACGCTGAACGCTGTCCAATTATTTGGATCCAGTAGGTGAAGTGCATTGGTAC

---

K P I V D G F A P H T T Y K Y G G Q F P  
 541 AAGCCCATCGTAGACGGCTTTGCTCCCATACCCTTACAAGTATGGAGGTGAGTTCCTCCT

---

A R P D N V K F E D V D D V A R I R D M  
 601 GCTCGTCCTGACAACGTTAAATTCGAAGATGTGGACGATGTTGCCCGAATTCGAGACATG

---

V I V E S R I R D A I A H G Y I I D S H  
 661 GTCATCGTCGAGAGCCGAATTCGCGATGCCATTGCCCATGGCTACATAATTGATAGCCAC

---

G K Q I D I S N E K G I D I L G D V I E  
 721 GGCAAACAGATTGACATCAGTAATGAGAAAGGCATTGACATTCCTCGGGGATGTTATCGAG

---

S S L Y S P N V Q Y Y G A L H N T A H I  
 781 TCATCACTGTACAGTCCCAATGTGCAGTACTATGGAGCTTTACATAACACTGCCCATATT

---

V L G R Q G D P H G K F D L P P G V L E  
 841 GTACTTGGTCGCCAAGGTGATCCTCATGAAAATTCGATTTACCCCTGGTGTGCTGGAA

---

H F E T A T R D P S F F R L H K Y M D N  
 901 CACTTCGAAAACCGCCACCCGTGATCCAGCTTCTTCCGGCTTCACAAATATATGGATAAC

```

          I F K E H K D S L P P Y T K A D L E F S
961  ATTTTCAAAGAACAACAAGGACAGCCTACCTCCATACACCAAAGCCGATTTGGAATTCTCT
-----
          G V S I S E V N V V G E L E T Y F E D F
1021 GGCGTGTCTATCTCTGAGGTAACGTTGTAGGTGAACTGGAGACCTATTTTGAAGATTTT
-----
          E Y N L I N A V D D A E G I P D V D I S
1081 GAATACAACCTTATCAACGCAGTTGATGACGCTGAAGGAATCCAGATGTGGACATCAGC
-----
          T Y V P R L N H K E F T F K I D I E N G
1141 ACATATGTGCCACGTCTTAACCACAAGGAGTTCACTTTTAAGATTGACATAGAGAATGGA
-----
          G S P R L A T V R I F A W P H K D N N G
1201 GGCTCTCCAGATTGGCTACAGTTCGTATCTTTGCCTGGCCTCATAAGGACAACAACGGA
-----
          I E F T F D E G R W N A I E L D K F W V
1261 ATCGAATTTACATTTGACGAAGGTCGCTGGAATGCCATCGAGTTGGATAAGTTCTGGGTA
-----
          S L A G G K N S I E R K S T E S S V T V
1321 TCATTGGCGGGTGGAAAAAATTCGATTGAGCGCAAGTCCACGGAATCTTCGGTAACTGTC
-----
          P D V P S I D T L F A K T A A G G D G L
1381 CCGGATGTACCAAGCATAGATACACTGTTTTGCAAAGACCGCGGCAGGCGGTGATGGCCTT
-----
          S E F A S A T G L P N R F L L P K G
1441 TCCGAATTCGCGAGTGCAACAGGCCTGCCAAACAGGTTCTTTCTCCCAAGGGCAA

```

**รูปที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHc**

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานินชั้นที่ 1 (HC1) และชั้นที่ 2 (HC2) มาต่อกันด้วยโปรแกรม CAP 3 ได้ยีนฮีโมไซยานิน pHc ที่มีความยาว 1,496 คู่เบส และมีกรดอะมิโน 498 หน่วย

## 7.5 การเปรียบเทียบยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับยีนฮีโมไซยานินของ กุ้งชนิดอื่น

ได้ทำการเปรียบเทียบยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับยีนฮีโมไซยานินของกุ้งชนิดอื่นที่มีรายงานในธนาคารยีน ผ่านฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่ายีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยมีความเหมือนใกล้เคียงกับยีนฮีโมไซยานินของกุ้งขาว *L. vanamai* (CAA 57880.1) มากที่สุด โดยมีค่าความเหมือน (identity) 91% รองลงมาเป็นยีนของกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* (88%, 81%) และกุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* (80%) ดังแสดงผลในตารางที่ 6

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการทำ BlastP โดยเลือกยีนฮีโมไซยานินของกุ้งที่มีค่าความเหมือนไม่ต่ำกว่า 80% รวม 4 ชนิด มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกัน (alignment) โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (version 9.0, Invitrogen) พบว่าปรากฏบริเวณอนุรักษ์ (แถบสีเหลือง) หลายบริเวณ ดังแสดงผลรูปที่ 26 ยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยมีบริเวณอนุรักษ์ที่มีความเหมือนเช่นเดียวกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนฮีโมไซยานินของกุ้ง *M. japonicus* กุ้งขาว *L. vannamei* และกุ้ง *F. chinensis* (รูปที่ 26)

ตารางที่ 6 ค่าความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับของกุ้งฟิเนียดชนิดอื่น

	F.M. HC	L.V. HC	F.C. HC	M.J. HC L	M.J. HC Y
F.M. HC	100	91	80	81	88
L.V. HC		100	78	80	86
F.C. HC			100	85	78
M.J. HC L				100	79
M.J. HC Y					100

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับยีนฮีโมไซยานินของ กุ้งอีก 4 ชนิด โดยใช้โปรแกรม BlastP

HC = Hemocyanin; F.M. = *Fenneropenaeus merguensis*; L.V. = *Litopenaeus vannamei* (CAA 57880.1); M.J. = *Marsupenaeus japonicus* (ABR14693.1; ABR14694.1); F.C. = *Fenneropenaeus chinensis* (ACM61982.1).



		1	60
F.M.hemocyanin	(1)	-----	-----
L.V.hemocyanin	(1)	MRVLVVLGLVAAAAFQ-----VASADVQCQKDVLLLNKIYGDIQGLLLTANSE	
M.J.hemocyanin L	(1)	MKVLVLFGLVAAAAAWPSFGFQSDAGVSAOKQHDLNLLHKIYGDIRDALAKAKDSF	
M.J.hemocyanin Y	(1)	MKVLVVLGLVAAAAFQ-----VVGADLVQKQKDLVYVHKIYGDIQADLKAANSE	
F.C.hemocyanin	(1)	MKVLVVLAFVATAAARPNLGFQADAQDVSAAOKQHDLNLLHKIYGEIRPNLKKAKDSF	
Consensus	(1)	MKVLVVLALVAAAA	A D QKQ DI FLLHKIYGDI D LKA A SF
		61	120
F.M.hemocyanin	(1)	-----	-----
L.V.hemocyanin	(52)	DPVGNLGSYSDGGA AVVQKLVQDLNDGKLI EQKHWFSLFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWA	
M.J.hemocyanin L	(61)	DPEADLSHYSDDCEAVHTLIRDLKIDRLIQKHWFSLFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWD	
M.J.hemocyanin Y	(53)	DPVADLGIYSDGGA AQRLVKDLNDGKLIQKHWFSLFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWA	
F.C.hemocyanin	(61)	DPEADLSHYSDSCEAVHKLIRDLKIDHRLIQKHWFSLSPQRHRNEALMLFDVLIHCKDWD	
Consensus	(61)	DP ADL YSD G AV KLIRDL D KLL QKHWFSLFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWA	
		121	180
F.M.hemocyanin	(29)	TFVGNAAF FRQKNEGEFVYALYVAVIHSPLTE DVVLPPLYEITPHLFTNSEVIEAAYRA	
L.V.hemocyanin	(112)	SFVGNAAF FRQKMNEGEFVYALYVAVIHSLAEQVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIEAYRA	
M.J.hemocyanin L	(121)	TFVSNAAF FRQRMNEGEFVYALYVAVIHSLAEVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIEAAYRA	
M.J.hemocyanin Y	(113)	GFVGNAAF FRQKMNEGEFVYAVYVAVIHSLAEVVLPPLYEITPHPFTNSEVIEAYRA	
F.C.hemocyanin	(121)	TFVSNAAF FRQRMNEGEFVYALYVAVIHSLAEVVLPPLYEVAAPHLFTNSEVIEAAYRA	
Consensus	(121)	TFVGNAAF FRQKMNEGEFVYALYVAVIHSLAEHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIEAAYRA	
		181	240
F.M.hemocyanin	(89)	KQKQTPGKFE SFTGTGKKNPEQRVAYFGEDIGLNTHHVTVHMEFPFWWDDEYGHHLDRKG	
L.V.hemocyanin	(172)	KQKQTPGKFK SFTGTGKKNPEQRVAYFGEDIGLNTHHVTVHMEFPFWWDDAYGHHLDRKG	
M.J.hemocyanin L	(181)	KQTQKPGKFK SFTGTGKKNPEQRVAYFGEDIGLNTHHVTVHMEFPFWWDKYSHHLDRKG	
M.J.hemocyanin Y	(173)	KQTQTPGKFK SFTGTGKKNPEQRVAYFGEDIGLNTHHVTVHMEFPFWWDKYGHHLDRKG	
F.C.hemocyanin	(181)	KQTQTPGKFK SFTGTGKKNPEQRVAYFGEDIGLNTHHVTVHMEFPFWWDDEYSHHLDRKG	
Consensus	(181)	KQTQTPGKFK SFTGTGKKNPEQRVAYFGEDIGLNTHHVTVHMEFPFWWQD YGHHLDRKG	
		241	300
F.M.hemocyanin	(149)	ENFFWVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVGEIHWYKPIVDGFAPHTTYKYGGQFPPRPDNDVKE	
L.V.hemocyanin	(232)	ENFFWVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVGEIQWKKPIVDGFAPHTTYKYGGQFPPRPDNDVKE	
M.J.hemocyanin L	(241)	ENFFWVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVDEIHWKPIVDGFAPHTTYKYGGQFPPRPDNDVKE	
M.J.hemocyanin Y	(233)	ENFFWVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVGEIHWKPIVDGFAPHTTYKYGGQFPPRPDNDVNE	
F.C.hemocyanin	(241)	ESFFWVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVDEIHWKPIVDGFAPHTTYKYGGQFPPRPDNDVNE	
Consensus	(241)	ENFFWVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVGEIHW KPIVDGFAPHTTYKYGGQFPPRPDNDVKE	
		301	360
F.M.hemocyanin	(209)	EDVDVARIRDMVIVESRIRDAIAHGYSIDSHGKQIDISNEKGIDILGDIYESSLYSPNV	
L.V.hemocyanin	(292)	EDVDVARIRDMVIVESRIRDAIAHGYSIDSEGKHIDISNEKGIDILGDIYESSLYSPNV	
M.J.hemocyanin L	(301)	EDVDGVARIRDLIVESRIRDAIAHGYSIDREGKHIDIMNERGIDILGDIYESSLYSPNV	
M.J.hemocyanin Y	(293)	EDVDGVARIRDMTIVESRIRDAIAHGYSIDSHGKHIDINNERGIDILGDIYESSLYSPNV	
F.C.hemocyanin	(301)	EDVDGVARIRDLIVESRIRDAIAHGYSIDKQGNRIDIMNERGIDILGDIYESSLYSPNV	
Consensus	(301)	EDVDGVARIRDMLIVESRIRDAIAHGYSIDVDS GKHIDI NERGIDILGDIYESSLYSPNV	
		361	420
F.M.hemocyanin	(269)	QYYGALHNTAHIVLGRQSDPHGKFDLPPGVLEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKEHKDS	
L.V.hemocyanin	(352)	QYYGALHNTAHIVLGRQSDPHGKFDLPPGVLEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKEHKDN	
M.J.hemocyanin L	(361)	QYYGALHNTAHIVLGRQSDPHGKYDLPPGVLEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKEHKDT	
M.J.hemocyanin Y	(353)	QYYGALHNTAHIVLGRQSDPHGKYDLPPGVLEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKEHKDT	
F.C.hemocyanin	(361)	QYYGALHNTAHIVLGRQADPHGKYALPPGVLEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKEHKDS	
Consensus	(361)	QYYGALHNTAHIVLGRQADPHGKYDLPPGVLEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKEHKDS	
		421	480
F.M.hemocyanin	(329)	LPPYTKADLEFSGVSISEINNVGEELETYFEDFEYNLINAVDDAEGIPDVEISTYVPRLNH	
L.V.hemocyanin	(412)	LPPYTKADLEFSGVSVTELVAVGEELETYFEDFEYSLINAVDDAEGIPDVEISTYVPRLNH	
M.J.hemocyanin L	(421)	LPPYTAEELETFAGVSVDSIATEGALETYFEDFEYNLINAVDDTEQIPDVEISTYVPRLNH	
M.J.hemocyanin Y	(413)	LTPYTKADLEFAGVSLDNVAVEGEELETYFEDFEYSLINAVDDAEGIQDVAISTYVPRLNH	
F.C.hemocyanin	(421)	LPPYSKEELETFAGVNVENLSDVGELETYFEDFEYSLINAVDDTEETADVEISTYVPRLNH	
Consensus	(421)	LPPYTKADLEFAGVSVSD LAVEGEELETYFEDFEYSLINAVDDAEGIPDVEISTYVPRLNH	
		481	540
F.M.hemocyanin	(389)	KEFTFKIDVENG-SSPRLATVRIFAWPHKDNNGIEYTFDEGRWNAIELDKFWVSLGCKN	
L.V.hemocyanin	(472)	KEFTFRIDVENG-CAERLATVRIFAWPHKDNNGIEYTFDEGRWNAIELDKFWVSLKCKN	
M.J.hemocyanin L	(481)	KDFAFKIGVSNKCEETLATVRIFAWPHLKNNGIEYTFDEGRWNAIELDKFWVSLKGTGVT	
M.J.hemocyanin Y	(473)	KEFTIKLDVKS--DARLATVRIFAWPHKDNNGIEYTFDEGRWNAIELDKFWVSLSSGN	
F.C.hemocyanin	(481)	KDFAVNIETVNNKCEETLATVRIFAWPHKDNNGIEYTFDEGRWNAIELDKFWVSLSPGN	
Consensus	(481)	KEFTFKIDV N GAERLATVRIFAWPHKDNNGIEYTFDEGRWNAIELDKFWVSLS G N	

		541		600
F.M.hemocyanin	(448)	SIERKSTESAVTVPDVPSIDTLFAWTAAGG---- <td></td> <td></td>		
L.V.hemocyanin	(531)	SIERKSTESAVTVPDVPSIDHDLFAEAEAGG---- <td></td> <td></td>		
M.J.hemocyanin L	(541)	EITRKCSESAIVTVPDVPSFATLFEKTKAALGGADSGLTDFESATGLPNRFLLPKGNKGL		
M.J.hemocyanin Y	(531)	AIERKSTESAVTVPDVPSIQTLFDKAAAGG---- <td></td> <td></td>		
F.C.hemocyanin	(541)	HIVRKSSESAIVTVPDVPSFDTLFKAAEALGGGDAGLTEFESATGLPNRFLLPKGNQQGL		
Consensus	(541)	SIERKSTESAVTVPDVPSI TLF KA AGG AGLTEFESATGLPNRFLLPKGNGL		
		601		660
F.M.hemocyanin	(499)	-----		
L.V.hemocyanin	(587)	EFDLVVAVTDGDADSAVPNLHENTENHYGSHGVYDPKRPHGYPLDRKVPDERVFEDLPN		
M.J.hemocyanin L	(601)	EFDLVVAVTDGADAAVDGHLHENTENHYGAYCKYPDNRPHGYPLDRSVPDERVFEDLPN		
M.J.hemocyanin Y	(587)	EFDLVVAVTDGDADAADLHQNTDYNHYGAHGVYDPKRPHGYPDRKVPDERVFEDLSN		
F.C.hemocyanin	(601)	EFDLVVAVTDGEADAADVEGLHDNTDFIHYGSHCKYPDNRPHGYPLDRKVPDRVFVLPN		
Consensus	(601)	EFDLVVAVTDGDADAADV LHENTDFNHYGAHG YPD RPHGYPLDRKVPDERVFEDLPN		
		661		678
F.M.hemocyanin	(499)	-----		
L.V.hemocyanin	(647)	FKHIQVKVFNHGEHIIH--		
M.J.hemocyanin L	(661)	FGHIQVKVFNHGEHIIHD		
M.J.hemocyanin Y	(647)	FKRIQVKVFNHGVHIEHS		
F.C.hemocyanin	(661)	FKHIQVKVFNHGEHIIH		
Consensus	(661)	FKHIQVKVFNHGEHIIH		

## รูปที่ 26 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHc ของกุ้งแชบ๊วยกับ ยีนฮีโมไซยานินของกุ้งที่เหี่ยยชนิดอื่น

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHc ของกุ้งแชบ๊วยกับ ยีนฮีโมไซยานินของกุ้งอีก 4 ชนิด โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (version 9.0, Invitrogen). F.M. = *Fenneropenaeus merguensis*; L.V. = *Litopenaeus vannamei* (CAA 57880.1); M.J. = *Marsupenaeus japonicus* (ABR14693.1; ABR14694.1); F.C. = *Fenneropenaeus chinensis* (ACM61982.1).

## 7.6 เปรียบเทียบยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับยีนโปรตีนลอกอกซีเตสของกุ้งชนิดอื่น

ในงานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานิน pHC มาเปรียบเทียบกับยีนโปรตีนลอกอกซีเตสของกุ้งชนิดอื่นที่มีรายงานในธนาคารยีน พบว่ามีความเหมือนอยู่ในช่วง 32-35% โดยมีค่าความเหมือนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีนของกุ้งนาง *P. leniusculus* (35%) รองลงมาเป็นยีนของกุ้งกุลาดำและกุ้ง *P. semisulcatus* (34%) กุ้งขาว *L. vannamei* (33%) กุ้ง *M. japonicus* และ *Homarus gammarus* (32%) ดังแสดงผลในตารางที่ 7

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการทำ BlastP โดยเลือกของเอนไซม์โปรตีนลอกอกซีเตสของกุ้งชนิดอื่นที่มีค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 32-35% รวม 6 ชนิด มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกัน (alignment) โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (version 9.0, Invitrogen) พบว่าปรากฏบริเวณอนุรักษ์ (แถบสีเหลือง) หลายบริเวณ ดังแสดงผลรูปที่ 27 ยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยมีบริเวณอนุรักษ์ที่มีความเหมือนเช่นเดียวกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนโปรตีนลอกอกซีเตสของ *L. vannamei*, *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *M. japonicus*, *P. leniusculus* และ *H. gammarus* (รูปที่ 27) แสดงให้เห็นว่ายีนฮีโมไซยานินมีความสัมพันธ์กับยีนโปรตีนลอกอกซีเตสในด้านความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน เช่นเดียวกับยีนฮีโมไซยานินและยีนโปรตีนลอกอกซีเตส (Gen Bank X83494) ของกุ้งนาง (*P. leniusculus*) มีความเหมือนกัน 29% มีผลงานวิจัยในปี 1995 ที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุล (molecular cloning) ของเอนไซม์โปรตีนลอกอกซีเตสของกุ้งนาง (*P. leniusculus*) (Aspan *et al.*, 1995) แมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* (Fujimoto *et al.*, 1995) และ *Manduca sexta* (Hall *et al.*, 1995) พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของฮีโมไซยานินมาก และมีรายงานในกุ้งขาว (*L. vannamei*) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีนเอนไซม์โปรตีนลอกอกซีเตสในฮีโมไซม์มีความเหมือนกับของยีนฮีโมไซยานิน 28% (Lai *et al.*, 2005) ในทำนองเดียวกันยีนเอนไซม์โปรตีนลอกอกซีเตสมีความเหมือนกับของยีนฮีโมไซยานิน 59% ในแมงป่อง (*Androctonus australis*) (Buzy *et al.*, 1995) และจากรูปที่ 26 และ 27 แสดงให้เห็นว่ายีนเอนไซม์โปรตีนลอกอกซีเตสมีขนาดยาวกว่ายีนฮีโมไซยานิน

ตารางที่ 7 ค่าความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับยีนโปรเฟินออกซิเดสของ crustacean ชนิดอื่น

	F.M. HC	L.V. proPO	P.M. proPO	P.S. proPO	M.J. proPO	P.L. proPO	H.G. proPO
F.M. HC	100	33	34	34	32	35	32
L.V. proPO		100	88	88	80	60	63
P.M. proPO			100	100	80	60	62
P.S. proPO				100	80	61	62
M.J. proPO					100	58	61
P.L. proPO						100	64
H.G. proPO							100

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับยีนโปรเฟินออกซิเดสของ crustacean ชนิดอื่น โดยใช้โปรแกรม BlastP  
 HC = Hemocyanin; proPO = Prophenoloxidase; F.M. = *Fenneropenaeus merguensis*; L.V. = *Litopenaeus vannamei* (AAW51360.1);  
 P.M. = *Penaeus monodon* (AF099741\_1); P.S. = *Penaeus semisulcatus* (AF521949\_1); M.J. = *Marsupenaeus japonicus* (BAB83773.1);  
 P.L. = *Pacifastacus leniusculus* (CAA58471.1); H.G. = *Homarus gammarus* (CAE46724.1)

		1		60
F.M.hemocyanin	(1)	-----		
H.G. prophenoloxidase	(1)	-----MSAQSLLSLEFKFYSDVTTFRANESMAFELH---ERFVVPVGVGA		
P.L. prophenoloxidase	(1)	MQVTTQLLRDTEMAADAQKQLLYLFERFYTPINAPRADGSFLYAMAGAX---TVATRFVGV		
M.J. prophenoloxidase	(1)	-----MNIHQQLLYLFELPQEPINRPRFGKGSVLFVLENDTTPPLVTTRTAG		
L.V. prophenoloxidase	(1)	-----MANDQQRLLYLFLPQEPICTPRGGGSVQFKLENDTTPPSVATRVGL		
P.M. prophenoloxidase	(1)	-----MANDQQRLLYLFLPQEPDICAPRGGGSVLFKLESDAPPSVATRVGV		
P.S. prophenoloxidase	(1)	-----MANDQQRLLYLFLPQEPICVPRAGGSVQFKF---ETPPSVATRVGL		
Consensus	(1)	MA DQQ LLYLFELPQE IQ PRA GSV F LE D PPSVATRVGV		
		61		120
F.M.hemocyanin	(1)	-----HWFSLENTNRRNEALLFDVLIHSSDWTATVVG		
H.G. prophenoloxidase	(44)	GPTTTLPR--RPDADPSKLGATVVRGSAFSFFVSTHRRRAAKDLCDAFMKTIGVQDLVO		
P.L. prophenoloxidase	(58)	APTSTVTVEARPDADRRLLGRAPVVRGAVFSFFIRSHREAAKDLCDVLMKTQNTDLMQ		
M.J. prophenoloxidase	(48)	SPSKLQVPERNDVALQDLGTATSTPIGSAFSFFIASHRRAAKDLCDVFMKTSGAKDLME		
L.V. prophenoloxidase	(48)	SPSVLPVPERKDVVALQDLGTATSTPMGSAFSFFIASHRRAAKDLCDVFMKTNGAEDLMQ		
P.M. prophenoloxidase	(48)	SPSVNLPVPERKDVTLQDLGTATSVPKGSAFSFFIASHRRAAKDLCDVFMKTSGAEDLMQ		
P.S. prophenoloxidase	(46)	SPSVNLLVPERKDVVALQDLGTATSVPKGSAFSFFIASHRRAAKDLCDVFMKTSGAEDLMQ		
Consensus	(61)	SPSV L VPER DV LQDLGTATSVPKGSAFSFFIASHRRAAKDLCDVFMKTSGA DLMQ		
		121		180
F.M.hemocyanin	(33)	NAAFFRQKINEGEFYVALYVAVHSPLTEDVLLPELYETPHLFTNSEVLEAARYAKCKQ		
H.G. prophenoloxidase	(102)	FAARVKDVENESLEFYSLSEFVILHKKELNFRLLPSLVEVTFQKFFVEVHLLIKSQEAVRR		
P.L. prophenoloxidase	(118)	LAASVRRHVNENLFYALSFTILRKQELRCVRLPELLEVFPHKFFHMEDLITSMQVVENRT		
M.J. prophenoloxidase	(108)	VAARVHGKVNESLEFYALSFEVILRKKELQSVRLPSFVEVPSRFVFPQETLSKAQLRINRM		
L.V. prophenoloxidase	(108)	VAARVHGKVNETLFYALSFEVILRKKELHRSVRLPTMVEVPSRFVFPQETLSRAQLQVNRM		
P.M. prophenoloxidase	(108)	VAARVHGKVNETLFYALSFEVILRKKELRSVRLPTMVEVPSRFVFPQETLSKAQLQVNRM		
P.S. prophenoloxidase	(106)	VAARVHGKVDETLEFYALSFEVILRKKELRSVRLPTMVEVPSRFVFPQETLSKAQLQVNRM		
Consensus	(121)	VAARVHGKVNETLFYALSFEVILRKKELRSVRLPTMVEVPSRFVFPQETLSKAQL INRM		
		181		240
F.M.hemocyanin	(93)	TFG-----KFESTFTGTKKNPEQORVAYHGEDICLNTHHVTWHMEFPFWWDDYEGHLLD		
H.G. prophenoloxidase	(162)	DEEETPLVIEHGPEFSSNTLKPEHRVAYWREYGMNVHHWHHLLIYPIEMNINR-----D		
P.L. prophenoloxidase	(178)	PPTATPLVIEYGPFFANINQKAEHRVSYWREDFGINSHHWHHLLIYPIEMNINR-----D		
M.J. prophenoloxidase	(168)	DPNQREPVIIEHGPEFSGTHLKPEHRISYWREYGLSVHHWHHLLIYPPAMGVDR-----D		
L.V. prophenoloxidase	(168)	DPNQSEAVIIEHGPEFSGSPVKPEHRVSYWREYGINVHHWHHLLIYPPAMGVDR-----D		
P.M. prophenoloxidase	(168)	DPNQTPEVIEHGPEFSGTHLKPEHRISYWREYGINVHHWHHLLIYPPAMGVDR-----D		
P.S. prophenoloxidase	(166)	DPNQTPEVIEHGPEFSGTHLKPEHRISYWREYGINVHHWHHLLIYPPAMGIDR-----D		
Consensus	(181)	DPNQTPEVIEHGPEFSGT LKPEHRVSYWREYGINVHHWHHLLIYPP AMGVDR D		
		241		300
F.M.hemocyanin	(146)	RKGFNFVWHQQLTVRFDAERLSNYLDPVGELEH-WYKPLVDGEALHTTYKYGG-CQPARP		
H.G. prophenoloxidase	(218)	RKGFNFVWHQQLIARYDIERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFPKLTVNNSGRANGTRQ		
P.L. prophenoloxidase	(234)	RKGLFYYMHQQLIARYDIERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFSLKLTVNNSGRPNWTRQ		
M.J. prophenoloxidase	(224)	RKGLFYYMHQQLIARYDIERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFPKLTVNNSGRANGTRQ		
L.V. prophenoloxidase	(224)	RKGLFYYMHQQLIARYDIERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFPKLTVNNSGRANGTRQ		
P.M. prophenoloxidase	(224)	RKGLFYYMHQQLIARYDIERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFPKLTVNNSGRANGTRQ		
P.S. prophenoloxidase	(222)	RKGLFYYMHQQLIARYDIERLSLGLPRVEKLDNWRVPIEDGYFPKLTVNNSGRANGTRQ		
Consensus	(241)	RKGLFYYMHQQLIARYDIERLSLGLPRVEKLDNWRVPI DGYFPKLTVNNSGR WGSRQ		
		301		360
F.M.hemocyanin	(204)	DNVKFEDVD-----DVARIRDMVIVESRIRDAIAGYLIIDSHGKQLDISN-----EKGI		
H.G. prophenoloxidase	(278)	DNTFLKDFRRNDFGLQPLDYTELEWRSRLLDAIHQGYMKNPNGDTPLSDDDVTSGKRGI		
P.L. prophenoloxidase	(294)	DNTFIKDFRENDAGLDFIDSDMEIWRSLMDAIHQGYMNRNNEEVPVLSNVTIGKRGI		
M.J. prophenoloxidase	(284)	DNTLPKDFRRTEIG-EFVDITDLEIWRSLLDAIHQGYMVRDKGNKVPTRDDVTSGQRGI		
L.V. prophenoloxidase	(284)	DNTLPKDFRRTEIG-DPVDITDLEIWRSLLDAIHQGYMVRDKGNKVPTRDDVTSGKRGI		
P.M. prophenoloxidase	(284)	DNTLPKDLRRTEIG-EFVDITDMEIWRSLLDAIHQGYMVRDKGNKVPTRDDVTSGKRGI		
P.S. prophenoloxidase	(282)	DNTLPKDLRRTEIG-EFVDITDLEIWRSLLDAIHQGYMVRDKGNKVPTRDDVTSGKRGI		
Consensus	(301)	DNTLPKDFRR EIG DFVDITDLEIWRSLLDAIHQGYMIDRNGDKVPLRDDVTSGKRGI		
		361		420
F.M.hemocyanin	(253)	DILGDVIES-SLYSPNVQYFALHNTAHIVLGRQGFPHGKFDLPPGVLEHFEFATFDPSF		
H.G. prophenoloxidase	(338)	DILGDTLEADADLSPHYQFYGDLDHMSHVLISSFSHDNDNAHKEEFGVMGDPATSMRDPVF		
P.L. prophenoloxidase	(354)	DILGDAFEADAQLSPNYLFYGDLDHNTGHVILAFCHDNDNSHREEFGLVMGDSATALRDPVF		
M.J. prophenoloxidase	(343)	DILAEALEADELSPNYFYGSLHNFHGHIDILAFSHDPDPAHKEEMGVVGLDGTSLRDPVF		
L.V. prophenoloxidase	(343)	DILADALEADADHSVNFYFYGDLDHNRGHIDILAFSHDPDPAHKEEMGVVGLDGTSLRDPVF		
P.M. prophenoloxidase	(343)	DILSEALEADADLSPNFYFYGDLDHNRGHIDILAFSHDPDPAHKEEMGVVGLDGTSLRDPVF		
P.S. prophenoloxidase	(341)	DILSEALEADAGLSPNFYFYGDLDHNRGHIDILAFSHDPDPAHKEEMGVVGLDGTSLRDPVF		
Consensus	(361)	DILGDALEADADLSPNFYFYGDLDHNR GHIDILAFSHDPDPAHKEEMGVVGLDGTSLRDPVF		

		421		480
F.M.hemocyanin	(312)	FRLHKYMDNIFKFKKDSLFPYTKADLEFSCVSISEVNVVVG-ELETYFEDFEYNLINAVD		
H.G. prophenoloxidase	(398)	YRLHKFVDDVFQAYKLTQRPYTMEDLSMPCGVVNVQVSVTSKREINKITGWSVTRFEASR		
P.L. prophenoloxidase	(414)	YRWKHFVDDIFQEQYKLTQRPYTMEDLSLPGVVLDPVGVVNDQLNTLITGWSVTRFEASR		
M.J. prophenoloxidase	(403)	YRLHKLVDLDFQEQYKLTQRPYSEEEFLSPGCTIEKAGVVRDNEADVLLHTGWRKREFEASR		
L.V. prophenoloxidase	(403)	FRLHKLVDLDFQEQYKLTQRPYKEEELFFPGVRIERAGVVRDNEADVLLTGWNTRFEASR		
P.M. prophenoloxidase	(403)	FRLHKLVDLDFQEQYKLTQRPYTEEELFLPGVRIERAGVVRGNEADVLLTGWNTRFEASR		
P.S. prophenoloxidase	(401)	FLHKLVDLDFQEQYKLTQRPYTEEELFLPGVRIERAGVVRGNEADVLLTGWNTRFEASR		
Consensus	(421)	FRLHKLVDLDFQEQYKLTQRPYTEEEL LPGV IERAGVVR EADVLL TGW TRFEASR		
		481		540
F.M.hemocyanin	(370)	DAEGIPDVIISTYVPRLNHKEFTKIDIEVGGSP---RLATVRIIAWPHKDNNGIIFTFD		
H.G. prophenoloxidase	(458)	GIDFNSPNPVILRLTHLDSVFFNHYIEVTVTEPK--PKVTVVRIFLAPKHHNGSCAEMPFM		
P.L. prophenoloxidase	(474)	GLDFNS---PNPVTAHYPSFPCITLHLPSPDNKQHRKPKSVTVRIYMAPKHNERGLEMGMF		
M.J. prophenoloxidase	(463)	GIEFSG-MPVILRLTHLDHKPFDFYRIQVNNHNRG--TKVTVVRIFLAPKFNQEQEMDFM		
L.V. prophenoloxidase	(463)	GIDFNG-RPVILRLTHLDHKPFDFYHIQINNDLRE--PKEVTVRIYFLAPKFNQEQEMDFM		
P.M. prophenoloxidase	(463)	GLDFSG-KPVILRLTHLDNKPFDYHIQINNDLRE--PKEVTVRIYFLAPKFGDREKEMDFM		
P.S. prophenoloxidase	(461)	GLDFLG-KPVILRLTHLDHKPFDFYHIQINNDLRE--PKEVTVRIYFLAPKFNQEQDVMDFM		
Consensus	(481)	GIDF G PVILRLTHLDHKPFDFYHIQINN R PK VTVRIYFLAPKFNQEQ G EM FM		
		541		600
F.M.hemocyanin	(427)	EGRWNAIEIDKFWYSLAGKKN--SIERKSTESSVIVPVPVSIIDTIFAKTAAAGGDG---L		
H.G. prophenoloxidase	(516)	EQRILWTEMDKFNHTLNPKGN--QIVRSSKSSITNPTDITFRDL-SKPMTSET-DATE		
P.L. prophenoloxidase	(531)	EQRILWAEEMDKFTQDLKPKGN--QIVRSNLSSTINPSGYTFRSLAVNFPANPGPPANAE		
M.J. prophenoloxidase	(520)	EQRILWCEEMDKFTYDLKPKGN--HIVRSSKSSITNLEELTFGDEEGSGPGNS--EQLA		
L.V. prophenoloxidase	(520)	EQRILWCEELYFTYHLKPKGN--HVRSKSSITNLEELTFKDLNNSGPGNS--EQSA		
P.M. prophenoloxidase	(520)	EQRILWAEEMDKFTVLLKPKGNQEVTRSSKSSITNLEELTFKDLNNSGPGNS--EQDA		
P.S. prophenoloxidase	(518)	EQRILWSEEMDKFTVHLKPKGN--HVRSKSSITNLEELTFKDLNNSGPGNS--EQVA		
Consensus	(541)	EQRILW EMDKFTV LKPKGN HIVRSSKSSITNLEELTFKDLN SGPGNS EQ A		
		601		660
F.M.hemocyanin	(482)	EFASGTGLFNRFLLPKGG-----		
H.G. prophenoloxidase	(572)	FDFCGCGWFOHMLLPRGRPEGMAFQLFFMLTDYAKDKVSNPGGVRRRANGVSFCGMQDAK		
P.L. prophenoloxidase	(589)	TNFCGCGWFOHMLLPRGRPEGMTQQLFFMLTDYAKDKVSNPGGVRRRANGVSFCGMQDAK		
M.J. prophenoloxidase	(576)	INFCGCGWFOHMLLPRGRPEGMVQQLFFMLTDYAKDKVSNPGGVRRRANGVSFCGMQDAK		
L.V. prophenoloxidase	(576)	FNFCGCGWFOHMLLPRGRPEGMAFQLFFMLTDYAKDKVSNPGGVRRRANGVSFCGMQDAK		
P.M. prophenoloxidase	(578)	FNFCGCGWFOHMLLPRGRPEGMVQQLFFMLTDYAKDKVSNPGGVRRRANGVSFCGMQDAK		
P.S. prophenoloxidase	(574)	FNFCGCGWFOHMLLPRGRPEGMAFQLFFMLTDYAKDKVSNPGGVRRRANGVSFCGMQDAK		
Consensus	(601)	FNFCGCGWFOHMLLPRGRPEGM FQLFFMLTDY KDKV NPGG VRRRANGVSFCGMQDAK		
		661		718
F.M.hemocyanin	(499)	-----		
H.G. prophenoloxidase	(632)	FPDSPMGFFPDRRFPVLLDAGVLTADYARLDNIMQDVTITFLADKLVK-----		
P.L. prophenoloxidase	(649)	FPIKRPMGFFPDRRFPRLQDAEVTADVYARLNMNTVQDITITFLTTASRSRHDGPI		
M.J. prophenoloxidase	(636)	YPDARPMGFFPDRRFPAPVLS-----EMSDYARLGNLYLHDVTIKFLGKLN-----		
L.V. prophenoloxidase	(636)	YPDARPMGFFPDRRFPAPVLPGLPNTTADYARLGNFMHDTIKFLGKLN-----		
P.M. prophenoloxidase	(638)	YPDARPMGFFPDRRFPAPVLPGLPNTTADYARLGNFMHDTIKFLGKLN-----		
P.S. prophenoloxidase	(634)	YPDARPMGFFPDRVPAVLPGLPNTTADYARLGNFMHDTIKFLGKLN-----		
Consensus	(661)	YPDARPMGFFPDRRFPAPVLPGLPNTTADYARLGN FMHDTIKFLGKLN		

## รูปที่ 27 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับ

### ยีนโปรฟีนอลออกซิเดสของครัสเตเชียบางชนิด

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยกับ ยีนฮีโมไซยานินของกุ้งอีก 4 ชนิด โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (version 9.0, Invitrogen). F.M. = *Fenneropenaeus merguensis*; L.V. = *Litopenaeus vannamei* (AAW51360.1); P.M. = *Penaeus monodon* (AF099741\_1); P.S. = *Penaeus semisulcatus* (AF521949\_1); M.J. = *Marsupenaeus japonicus* (BAB83773.1); P.L. = *Pacifastacus leniusculus* (CAA58471.1); H.G. = *Homarus gammarus* (CAE46724.1)

## บทที่ 4

### สรุป

จากการศึกษาการทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมาของกุ่มแซบวัย และศึกษาสมบัติของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ทั้งด้านโครงสร้างโปรตีนและระดับยีน ในงานวิทยานิพนธ์นี้ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สามารถทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากพลาสมาได้โดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์และโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (preparative PAGE) แยกฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ได้โดยมีปริมาณโปรตีน 13.9 มิลลิกรัม คิดเป็น 2.5% ของโปรตีนในพลาสมาเริ่มต้น
2. ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียว (230 kDa) ใน non-denaturing PAGE และปรากฏโปรตีน 2 แถบ ใน SDS-PAGE บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาด ที่มีมวลโมเลกุล 75 และ 79.4 kDa
3. ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีมวลโมเลกุล 215 kDa เมื่อหาด้วยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชันด้วยคอลัมน์ Superose 12 HR
4. แถบฮีโมไซยานินในพลาสมาและแถบฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ไม่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส แต่แถบโปรตีนขนาด 480 kDa ปรากฏแอคทิวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสใน non-denaturing PAGE ซึ่งแถบโปรตีนขนาด 480 kDa นี้ อาจเป็นฮีโมไซยานินที่เป็นแบบ hexamer ซึ่งพบในพลาสมาและมีปริมาณน้อยมากกว่าฮีโมไซยานินขนาด 230 kDa ที่พบปริมาณมากในฮีโมลิมฟ์
5. สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ได้ด้วยการฉีดกระต่ายด้วยฮีโมไซยานิน 3 ครั้ง ครั้งละ 20 ไมโครกรัม แอนติบอดีมีความจำเพาะต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์และฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนอื่น ๆ ในฮีโมลิมฟ์ รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนมาตรฐาน เมื่อทดสอบโดยการทำ Western blot
6. ภาวะที่เหมาะสมของการวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ่มแซบวัย ด้วยวิธี ELISA คือ เตรียมฮีโมลิมฟ์ที่เจือจาง 1:200 เท่า ในบัฟเฟอร์เคลือบที่ pH 10.5 ใช้  $1^{\circ}\text{Ab}$  และ  $2^{\circ}\text{Ab}$  ที่เจือจาง 1:2,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นของ OPD ที่ 0.4 mg/ml ความเข้มข้นของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่ 0.01% และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนาน 30 นาที

7. กราฟมาตรฐานฮีโมไซยานินในการทำ ELISA ได้จากการใช้ปริมาณฮีโมไซยานินในช่วง 10-69 ไมโครกรัมต่อหลอด หรือความเข้มข้นในช่วง 66.67 – 460 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. ปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย 6 ตัวอย่าง ที่หาด้วยวิธี ELISA พบว่ามีปริมาณคิดเป็น 85.67% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมพ์ ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานว่า 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของครัสเตเชียนเป็นฮีโมไซยานิน

9. สามารถโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีนฮีโมไซยานินบางส่วน (pHC) ของกุ้งแชบ๊วยโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งอื่น ๆ ที่มีในธนาคารยีน ซึ่งโคลนได้ยีนที่มีสายนิวคลีโอไทด์ยาว 1,496 คู่เบส แปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 498 หน่วย และมีความเหมือน (identity) มากกับยีนฮีโมไซยานินของกุ้งขาว *L. vanamai* 91%, ของกุ้ง *M. japonicus* (88%, 81%) และของกุ้ง *F. chinensis* (80%)

10. ยีนฮีโมไซยานิน pHC ของกุ้งแชบ๊วยมีค่าความเหมือนกับยีนโปรตีนออกซิเดสของกุ้งนาง *P. leniusculus* 35%, รองลงมาเป็นยีนของกุ้งกุลาดำและกุ้ง *P. semisulcatus* 34%, ของกุ้งขาว *L. vannamei* 33% และของกุ้ง *M. japonicus* เท่ากับของ *Homarus gammarus* คือ 32% บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินและเอนไซม์โปรตีนออกซิเดสของกุ้งที่เนี่ยดมีความเกี่ยวข้องกันในระดับหนึ่ง



## เอกสารอ้างอิง

- กิจการ สุภมาตย์ และคณะ. 2542. เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสใน กุ้งกุลาดำ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 24-25 เมษายน 2542.
- จรีพร เรืองศรี. 2546. การตอบสนองแบบกึ่งจำเพาะของภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- ชัช ศรีวีระชัย และฐานันดร ทัดตานนท์. 2538. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบพัฒนาในบ่อดิน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 44/2538 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดนราธิวาส กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- บุญศรี จารุธรรมโสภณ. 2537. ชีววิทยากุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) ในบริเวณอ่าว พังงา. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2537 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ปิ่นนภา ลิมพานิช. 2551. การตอบสนองของเลคตินในกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- มัทนา บุญยุบล. 2539. ชีววิทยาและวงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วยในอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี. เอกสารวิชาการฉบับที่ 28/2539, กลุ่มชีวประวัติสัตว์ทะเล. ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน, กรุงเทพฯ. 61 น.
- มาลินี วิชชาวุธ และสมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรม ประมง. วารสารการประมง 58, 2 (มีนาคม-เมษายน), 170.
- เมธี วัฒนสิงห์. 2543. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบพัฒนา ภูมิปัญญาคนไทย ตลาดในและนอกยัง เปิดกว้าง. วารสารสัตว์น้ำ 11(131), 5-16.
- วิไลพร ธรรมรัตน์. 2551. การศึกษาเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

- วิวัฒน์ชัย พรหมสาขา ณ สกลนคร และสมพร โล่สวัสดิ์กุล. 2532. การแพร่กระจายและความชุกชุมของทรพยากรกึ่งทะเลในอ่าวไทย. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2532 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ศรีรัตน์ สอดสุข และพนม กระจ่างพนธ์. 2541. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยจาก 3 แหล่งในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 19/2541 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ.2548. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ: กรมประมง.
- สุพจน์ จึงแยมปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย. 2543. ผลงานชิ้นโบแดงสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตรังเลี้ยงพ่อแม่แชบ๊วยในบ่อดินสำเร็จ. วารสารสัตว์น้ำ 11(132), 37-44.
- อรัญญา คงแก้ว. 2549. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์เอ็นอะซิติกกลูโคซามิเนสในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* ของกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- เอี่ยมมนัส อินทรผาด. 2545. การค้นหายีนที่มีปฏิกริยากับไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- Adachi, K., Endo, H., Watanabe, T., Nishioka, T. and Hirata, T. 2005. Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: Enzymatic properties and immune-localization. *Pigment Cell Res.* 18, 136-143.
- Adachi, K., Hirata, T., Nagai, K. and Sakaguchi, M. 2001. Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. *J. Food Sci.* 66, 1130-1136.
- Adachi, K., Hirata, T., Nishioka, T. and Sakaguchi, M. 2003. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase like enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 134B, 135-141.
- Adamia, G., Ghoghoberidze, M., Graves, D., Khatisashvili, G., Kvesitadze, G., Lomidze, E., Ugrekhelidze, D. and Zaalishvili, G. 2006. Absorption, distribution and transformation of TNT in higher plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 136-145.

- Adema, C. M., van der Knapp, W.P.W. and Aminia, T. 1991. Molluscan hemocyte mediated cytotoxicity: The role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 201-223.
- Asada, N., Fukumitsu, T., Fujimoto, K. and Masuda, K. 1993. Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 515-520.
- Aspan, A., Huang, T., Cerenius, I. and Söderhäll, K. 1995. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 939-943.
- Aspan, A. and Söderhäll, K. 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogeneous serine proteinase. *Insect Biochem.* 21, 363-373.
- Bailey-Brock, J. and Moss, S. 1992. Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*, Fast, A. and Lester, J., Eds. Elsevier, Amsterdam, pp 9-28.
- Barracco, M.A., Duvic, B. and Söderhäll, K. 1991. The  $\beta$ -1-3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a  $\beta$ -1-3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res.* 226, 491-497.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brouwer, M., Bonaventura, C. and Bonaventura, J. 1978. Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp, *Penaeus setiferus*. *Biochemistry* 17, 2148-2154.

- Burmester, T. 1999. Identification, molecular cloning, and phylogenetic analysis of non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. J. Biol. Chem. 274(19), 13217-13222.
- Cariolou, M.A. and Flytzanis, C.N. 1993. Sex-specific gene expression in distinct tissues of the shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 106B, 705-716.
- Carlberg, I. and Söderhäll, K. 1985. Phenoloxidase activity in *Daucus carota* is restricted to embryogenic cultures. FEBS Letter 187, 295-298.
- Chan, H.M. and Weeks, J.M. 1992. The subunit structural composition of amphipod hemocyanin (Crustacea; amphipoda; talitridae). Comp. Biochem. Physiol. 101B, 567-572.
- Chen, H.Y., Ho, S.H., Chen, T.I., Soong, K., Chen, I.M. and Cheng, J.H. 2007. Identification of a female-specific hemocyanin in the mud crab, *Scylla olivacea* (Crustacea: Portunidae). Zoology 46(2), 194-202.
- Chen, J.-C. and Cheng, S.-Y. 1993. Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. Comp. Biochem. Physiol. 106B, 293-296.
- Cuff, M., Miller, K., Van Holde, K. and Hendrickson, W. 1998. Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. J. Mol. Biol. 278, 855-870.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis: II. Method and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- De Haas, F. and Van Bruggen, E.F. 1994. The interhexameric contacts in the four-hexameric hemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum*. A tentative mechanism for cooperative behavior. J. Mol. Biol. 237, 464-478.
- Decker, H. and Jaenicke, E. 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. Dev. Comp. Immunol. 28, 673-687.

- Decker, H. and Rimke, T. 1998. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity, J. Biol. Chem. 273, 25889-25892.
- Decker, H., Ryan, M., Jaenicke, E. and Terwilliger, N. 2001. SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. J. Biol. Chem. 276, 17796-17799.
- Decker, H., Savel-Niemann, A., Korschenhausen, D., Eckerskorn, E. and Markl, J. 1989. Allosteric oxygen-binding properties of reassembled tarantula (*Eurypelma californicum*) hemocyanin with incorporated apo- or met-subunits. Biol. Chem. Hoppe Seyler. 370, 511-523.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A.V., Rodriguez, J., Bachere, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J. Biol. Chem. 272, 28398–28406.
- Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P. and Bachere, E. 2001. Crustacean Immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. J. Biol. Chem. 276, 47070-47077.
- Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Stevanovic, S., Hristova, R., Atanasov, B., Nikolov, P. and Voelter, W. 2005. Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. Spectrochi. Acta 61A, 1207-1217.
- Dorai, D.T., Bachhawat, B.K., Bishayee, S., Kannan, K. and Rao, D.R. 1981. Further characterization of the sialic acid-binding lectin from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*. Arch. Biochem. Biophys. 209(1), 325-33.
- Durstewitz, G. and Terwilliger, N.B. 1997. cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean *Cancer magister* and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family. Mol. Biol. Evol. 14(3), 266-276.

- Duvic, B. and Söderhäll, K. 1990. Purification and characterization of a  $\beta$ -1-3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem. 256, 27-32.
- Ellerton, H.D. and Anderson, D.M. 1981. Subunit structure of the hemocyanin from the prawn *Penaeus monodon*. In: Invertebrate Oxygen-Binding proteins. Structure, Active Site and Function, Lamy, J. and Lamy, J., Eds. Marcel Dekker, New York, pp 159-165.
- Espin, J. and Wichers, H. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. J. Agric. Food Chem. 47, 3518-3525.
- Fan, T., Zhang, Y., Yang, L., Yang, X., Jiang, G., Yu, M. and Cong, R. 2009. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenol-oxidase from the crab *Charybdis japonica*. Comp. Biochem. Physiol. 152B, 144-149.
- Figueroa-Soto, C.G., Calderon, A.M., Vazquez-Moreno, L., Higuera-Ciapara, I. and Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification of hemocyanin from white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone) by immobilized metal affinity chromatography-synthesis by fat body and occurrence in hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 117B, 203-208.
- Figueroa-Soto, C.G., de la Barca, A.M.C., Vazquez-Moreno, L., Higuera-Ciapara, I. and Yepiz-Plascencia, G. 1997. Comp. Biochem. Physiol. 117B, 203-208.
- Fox, S., Nanthakumar, A., Wei, N., Murthy, N.N. and Karlin, K.D. 1993. Investigations of dioxygen reactivity with synthetic models of the metalloproteins hemocyanin and cytochrome C oxidase. Pure Applied Chem. 65, 2335-2342.
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Iwanaga, S. and Ohnishi, E. 1995. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(17), 7769-7773.

- García-Carreño, F.L., Cota, K. and Navarrete Del Toro, M.A. 2008. Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: Conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. J. Agric. Food Chem. 15, 6454-6459.
- Gellissen, G., Hennecke, R. and Spindler, K. D. 1991. The site of synthesis of hemocyanin in the crayfish, *Astacus leptodactylus*. Experientia 47, 194-195.
- Gollas-Galvan, T., Hennandez-Lopez, J. and Vargas-Albores, F. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comp. Biochem. Physiol. 122, 77-82.
- Grey, D., Dall, W. and Baker, A. 1983. A guide to the Australian penaeid prawn. 140 p.
- Hagner-Holler, S., Kusche, K., Hembach, A. and Burmester, T. 2005. Biochemical and molecular characterization of hemocyanin from the amphipod *Gammarus roeseli*: Complex pattern of hemocyanin subunit evolution in Crustacea. J. Comp. Physiol. 175B, 445-452.
- Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhäll, K. and Law, J.H. 1995. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(17), 7764-7768.
- Hatakeyama, T., Ouchi, K., Kuroki, M. and Yamasaki, N. 1995. Amino acid sequence of a C-type lectin CEL-IV from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1314-1317.
- Hazes, B., Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K.H. and Hol, W.G. 1993. Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: Clues for a mechanism for allosteric regulation. Protein Sci. 2, 597-619.
- Herskovits, T. T. 1988. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. Comp. Biochem. Physiol. 91B, 597-611.

- Herskovits, T.T. and Hamilton, M.G. 1987a. Physical investigations of the hemocyanin of the chiton, *Cryptochiton stelleri* (Middendorff). *Comp. Biochem. Physiol.* 86B, 641-649.
- Herskovits, T.T. and Hamilton, M.G. 1987b. Hemocyanin of the chiton, *Stenoplax conspicua* (Dall). *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 127-132.
- Herskovits, T.T., Hamilton, M.G. and Mazzella, L.J. 1986. Hemocyanin of the chiton, *Acanthopleura granulata*. *Biochemistry* 25, 3612-3619.
- Herskovits, T.T. and Villanueva, G.B. 1986. Light scattering investigation of the subunit structure and dissociation of octopoda hemocyanins. *Biochemistry* 25, 931-939.
- Hose, J.E., Martin, G.G., Ngugen, V.A., Lucus, J. and Rosenstein, T. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biol. Bulletin* 173, 178-187.
- Hristova, R., Dolashki, A., Voelter, W., Stevanovic, S. and Dolashka-Angelova, P. 2008. o-Diphenol oxidase activity of molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.* 149B, 439-446.
- Hrmova, M. and Fincher, G.B. 1993. Purification and properties of three (1,3)- $\beta$ -1,3-glucanase isozymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.* 289, 453-461.
- Jaenicke, E. and Decker, H. 2003. Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem. J.* 371(2), 515-523.
- Jaenicke, E. and Decker, H. 2004. Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron and Microscopica Acta* 35, 89-90.
- Jaenicke, E. and Decker, H. 2008. Kinetic properties of catecholoxidase activity of tarantula hemocyanin. *FEBS J.* 7, 1518-1528.
- Jaenicke, E., Föll, R. and Decker, H. 1999. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone. *J. Biol. Chem.* 274, 34267-34271.



- Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the ProPO system. *Parasit. Today* 5, 171-176.
- Khayat, M., Funkestein, B. and Tiez, A. 1995. *In vivo*, *in vitro* and cell-free synthesis of hemocyanin in the shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Comp. Biochem. Physiol.* 112, 31-38.
- Knaap, W.V.D. 1993. Defence in Invertebrate in Biotol (biotechnology by open learning). Butterworth-Heinmann Ltd., Linaese Honse, Jordan Hill, Oxford, p 215.
- Kurtz, D.M., 1999. Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem. *Essays Biochem.* 34, 85-100.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanz, H., Tsutsumi, V. and Arechiga, H. 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 389-397.
- Lee, S.Y., Lee, B.L. and Söderhäll, K. 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*, *J. Biol. Chem.* 278, 7927-7933.
- Lee, S.Y., Lee, B.L. and Söderhäll, K. 2004. Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 490-496.
- Lee, S.Y, Wang, R, and Söderhäll, K. 2000. Lipopolysaccharide- and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* purification, characterization and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 275, 1337-1343.
- Lei, K., Li, F., Zhang, M.C., Yang, H., Luo, T. and Xu, X. 2007. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Dev. Comp. Immunology* 32, 808-813.

- Leonard, C., Söderhäll, K. and Ratcliffe, N.A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.* 15, 803-810.
- Lieb, B., Altenhein, B., Markl, J., Vincent, A., Van Olden, E., Van Holde, K. and Miller, K. 2001. Structures of two molluscan hemocyanin genes: Significance for gene evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 4546-4551.
- Linzen, B., Soeter, N.M., Riggs, A.F., Schneider, H.J., Schartau, W., Moore, M.D., Yokota, E., Behrens, P.Q., Nakashima, H., Takagi, T., Nemoto, T., Vereijken, J. M., Bak, H.J., Beintema, J. J., Volbeda, A., Gaykema, W. P. J. and Hol, W.G.J. 1985. The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229, 519-524.
- Markl, J. 1980. Hemocyanin in spider XI. The quaternary structure of *Cupiennius* hemocyanin. *J. Comp. Physiol.* 140B, 199-207.
- Markl, J. 1986. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.* 171, 90-115.
- Markl, J. and Decker, H. 1992. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology. Blood and tissue oxygen carriers*, Mangum, C.P., Ed. Springer Press, Heidelberg, Germany, Vol. 13, pp 325-376.
- Markl, J. and Kempter, B. 1981. Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immunoelectrophoresis. *J. Comp. Physiol.* 141, 495-502.
- Markl, J., Markl, A., Schartau, W. and Linzen, B. 1979. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. I. Chelicerata. *J. Comp. Physiol.* 130B, 283-292.
- Marshall, M.R., Kim, J. and Wei, C.I. 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://www.fao.org>. (retrived 26/5/2008).
- Martin, G. G., Poole, D., Poole, Ch., Hose, J. E., Arias, M., Reynolds, L. , McKerell, N. and Whang, A. 1993. A. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaid shrimp *Sicyonia ingentis*. *J. Invert. Pathol.* 62, 1-8.

- Meissner, U., Stohr, M., Kusche, K., Burmester, T., Stark, H., Harris, J.R., Orlova, E.V. and Markl, J. 2003. Quaternary structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) 1x6-mer hemocyanin from cryoEM and amino acid sequence data. *J. Mol. Biol.* 325, 99-109.
- Miller, K., Cuff, M., Lang, W., Varga-Weisz, P., Field, K. and Van Holde, K. 1998. Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: Structural and evolutionary implications. *J. Mol. Biol.* 278, 827-842.
- Nagai, T. and Kawabata, S., 2000. A link between blood coagulation and pro-phenoloxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.* 275(38), 29264-29267.
- Nagai, T., Osaki, T. and Kawabata, S. 2001. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 276, 27166-27170.
- Neuteboom, B., Jekel, P.A. and Beintema, J.J. 1992. Primary structure of hemocyanin subunit c from *Panulirus interruptus*. *Eur. J. Biochem.* 206, 243-249.
- Ouchterlony, O. 1956. Antigen-antibody reactions in gel. V. Type of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 32, 231-240.
- Paul, R.J. and Pirow, R. 1998. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology* 100, 319-327.
- Perrazolo, L.M. and Barracco, M.A. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp, *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 385-395.
- Perez-Farfante, I. and Kensley, B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. In: *Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Memoires Du Museum National D'Histoire Naturelle, Paris, France*, 233 p.
- Pless, D.D., Aguilar, M.B., Falcón, A., Lozano-Alvarez, E. and Heimer de la Cotera, E.P. 2003. Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence

- of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. Arch. Biochem. Biophys. 409, 402-410.
- Rainer, J. and Brouwer, M. 1993. Hemocyanin synthesis in Blue Crab *Callinectes sapidus*. Comp. Biochem. Physiol. 104B, 69-73.
- Rao, M.S., Rajitha, B., Pavitra, E. and Anjaneyulu, N. 2007. Changes of copper and protein profiles in hepatopancreas and hemolymph tissues during different molt stages of white shrimp, *Litopenaeus vanamei* (Boone, 1931). Biotechnology 7, 153-156.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1990. Monodin, a new sialic acid specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 97, 515-520.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1992. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 102, 855-859.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P. 1985. Invertebrate Immunity: Basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97, 183-350.
- Rattanaporn, O. 2008. Molecular cloning and characterization of lectin and lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein genes from banana shrimp, *Fenneropenaeus merguensis*. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Rittidach, W. 2006. Characterization of sialic acid-specific lectin in the hemolymph of banana shrimp (*Penaeus merguensis*). Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Salvato, B. and Beltramini, M. 1990. Hemocyanins: Molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper site. Life Chem. Rep. 8, 1-47.

- Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G. and Casella, L. 1998. The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: Odiphenol oxidase activity. *Biochemistry* 37, 14065-14077.
- Sanders, N.K., Morris, S., Childress, J.J. and McMahon, B.R. 1992. Effects of ammonia, trimethylamine, L-lactate and CO<sub>2</sub> on some decapod crustacean haemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A, 511-516.
- Schneider, H. J., Voll, W., Lehmann, L., Grisshammer, R., Goettgens, A. and Linzen, B. 1986. Partial amino acid sequence of crayfish (*Astacus leptodactylus*) hemocyanin. In: *Invertebrate Oxygen Carriers*, Linzen, B., Ed. Springer Press, Heidelberg, Germany, pp 173-176.
- Seike, Y., Shibata, H. and Suyemitsu, T. 1992. Purification of sperm lectin extracted from spermatozoa of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev. Growth Differ.* 34, 285-291.
- Sellos, D., Lemoine, S. and Wormhoudt, A.V. 1997. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Lett.* 407, 153-158.
- Senkbeil, E.G. and Wriston, J.C. 1981. Catabolism of hemocyanin in the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 781-790.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res.* 233, 295-303.
- Söderhäll, K. 1981. Fungal cell wall  $\beta$ -1, 3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 565-573.
- Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization: A recognition mechanism of arthropods? *Dev. Comp. Immunol.* 6, 601-611.

- Söderhäll, K. 1983. Beta-1,3 glucan enhancement of protease activity in crayfish haemocyte lysate. *Comp. Biochem. Physiol.* 74, 221-224.
- Söderhäll, K., Aspan, A. and Duvic, B. 1990. The proPO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.* 141, 896-907.
- Söderhäll, K. and Ajaxon, R. 1982. Effect of quinine and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite of crayfish. *J. Invertbr. Pathol.* 39, 105-109.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23-28.
- Spindler, K.D., Hennecke, R.G. and Gellissen, G. 1992. Protein production and the molting cycle in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). II. Hemocyanin and protein synthesis in the midgut gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85, 248-253.
- Sritunyalucksana, K. 2001. Characterization of some immune genes in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Ph.D. Thesis in Science and Technology, Acta Universitatis Upsaliensis, Sweden.
- Stoeva, S., Idakieva, K., Georgieva, D.N., Voelter, W. and Genov, N. 2001. *Penaeus monodon* (tiger shrimp) hemocyanin: Subunit composition and thermo-stability. *Z. Naturforsch.* 56, 416-422.
- Sugumaran, M. 1996. Roles of the insect cuticle in host defense reactions. In: *Parasites and Pathogens of Insects*, Söderhäll, K., Iwanaga, S., Vasta, G.R. and Federici, B.A. Eds. pp 317-342.
- Sugumaran, M. and Kanost, M. R. 1993. Regulation of insect hemolymph phenoloxidases. In: *New Directions in Invertebrate Immunology*, Beckage, N., Thompson, S.N. and Federici, B.A., Eds. SOS Publication, Fair Haven, pp 355-374.

- Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1996. Microbicidal reaction enhancement in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) via immunostimulants. *J. Biol. Crus.* 16, 279-285.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khungpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirono, I. and Aoki, T. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilli form virus (RU-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (WSSV) DNA in *Penaeus monodon Fabricius*. *J. Fish. Dis.* 19, 399-403.
- Taylor, A.C., Morris, S. and Bridges, C.R. 1985. Modulation of haemocyanin oxygen affinity in the prawn, *Palaemon elegans* (Rathke) under environmental salinity stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94, 167-180.
- Terwilliger, N.B. and Brown, A.C. 1993. Ontogeny of hemocyanin function in the Dungeness crab *Cancer magister*: The interactive effects of developmental stage and divalent cations on hemocyanin oxygenation properties. *J. Exp. Biol.* 183, 1-13.
- Terwilliger, N.B., Dangott, L. and Ryan, M. 1999. Cryptocyanin, a crustacean molting protein: Evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(5), 2013-2018.
- Thornqvist, P.O., Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1994. Opsonic activity of cell adhesion proteins and beta-1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 3-12.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.
- Utarabhand, P., Rittidach, W. and Paijit, N. 2007. Bacterial agglutination by sialic acid specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. *Science Asia* 33, 44-46.

- Van Holde, K.E. and Miller, K.I. 1995. Hemocyanins. In: *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Eisenberg, D.S. and Richards, F.M., Eds. Academic Press Inc., New York, Vol. 47, pp 1-81.
- Van Holde, K., Miller, K. and Decker, H. 2001. Hemocyanins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem.* 276, 15563-6.
- Vazquez, L., Masso, F., Rosas, P., Montano, L.F. and Zenteno, E. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Decapoda) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 617-623.
- Volbeda, A. and Hol, W.G. 1989. Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209, 249-379.
- Wallace, R.A. 1965. Resolution and isolation of avian and amphibian yolk granule protein using DEAE-cellulose. *Anal. Biochem.* 11, 297-311.
- Warden, B.A. and Giese, R.W. 1984. Soluble antibody affinity chromatography techniques investigated with ultratrace <sup>125</sup>I-thyroxin. *J. Chromatogr.* 314, 295-302.
- Zlateva, T., Muro, P.D., Salvato, B. and Beltramini, M. 1996. The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Letts.* 384, 251-254.
- CAP 3. <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php> (accessed 12/5/2008).
- GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 6/3/2008).
- Translate. <http://br.expasy.org/tools/dna.html> (accessed 12/5/2008).