



การตอบสนองของเลคตินในกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค
Response of *Penaeus merguensis* Lectin to Pathogen and Non-pathogen

ปิ่นภา ลิ้มพานิช
Pinnapa Limpanich

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตอบสนองของเลคตินในกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค
ผู้เขียน นางสาวปิ่นนภา ลีมพานิช
สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเขาว์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์)

.....กรรมการ
(ดร.จรงค์ อรรถรัฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

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

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตอบสนองของเลคตินในกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค
ผู้เขียน	นางสาวปิ่นนภา ลิมพานิช
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงแตกที่เรีย ไรรัส หรือเซลล์อื่นๆ เกิดการเกาะกลุ่มผ่านการจับอย่างจำเพาะกับลิแกนด์ได้ เลคตินมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง รวมทั้งครัสเตเชียน ในงานวิทยานิพนธ์นี้ ได้ใช้การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเป็นวิธีการวัด แอคติวิตี (hemagglutinating activity) ของเลคตินในกุ้งแชบ๊วย เมื่อวัดแอคติวิตีของเลคตินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย พบแอคติวิตีของเลคตินมีค่าสูงสุดในซีรัม รองลงมาคือสารสกัดจากตับ รังไข่ กระจก และลำไส้ ตามลำดับ ไม่พบแอคติวิตีในกล้ามเนื้อ หัวใจ และสารสกัด เซลล์ฮีโมไซท์

จากการแยกเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose สามารถทำให้เลคตินบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,057 เท่า ของเลคตินในซีรัมเริ่มต้น เมื่อแยกสารละลายเลคตินที่ได้จากคอลัมน์แรกต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ที่ยังไม่เคยใช้งานมาก่อน อีกครั้ง พบว่าทำให้แอคติวิตีของเลคตินบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1,898 เท่า ของเลคตินในซีรัมเริ่มต้น จากการทำโครมาโทกราฟีโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ครั้ง สามารถทำให้เลคตินที่มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิกบริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแชบ๊วยได้ ซึ่งเลคตินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

การเหนี่ยวนำ (challenge) กุ้งแชบ๊วยด้วยแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio harveyi* สามารถกระตุ้นแอคติวิตีของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ให้มีระดับเพิ่มสูงขึ้น จากการฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* พบแอคติวิตีของเลคตินในฮีโมลิมฟ์เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 (ก่อนฉีด) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ณ ชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มขึ้นสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีด จากนั้นมีค่าลดลง ณ ชั่วโมงที่ 18 และ 24 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันแอคติวิตีจำเพาะของเลคตินในฮีโมลิมฟ์มีรูปแบบการเพิ่มเช่นเดียวกับแอคติวิตีของตัวอย่างเดียวกัน และมีค่ามากกว่าในชุด

ควบคุมซึ่งมีรูปแบบการลดลงของปริมาณโปรตีนตามเวลาหลังการฉีด แต่ค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

ในการเหนี่ยวนำกึ่งด้วยเชื้อก่อโรคปริมาณต่าง ๆ กัน โดยแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA (tryptic soy agar) พบว่ากึ่งตอบสนองโดยมีระดับของเลคตินในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีดมากขึ้น นอกจากนี้ การฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง ทำให้แอกทิวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดเป็น 5.43 เท่า ที่ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด ในทำนองเดียวกัน เมื่อเหนี่ยวนำกึ่งด้วย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB (tryptic soy broth) ปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่าแอกทิวิตีของเลคตินมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีด และเพิ่มมากที่สุดเป็น 6.83 เท่า ที่ 12 ชั่วโมงเมื่อฉีดในปริมาณ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB มีสมรรถนะมากกว่า *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA 100 เท่า อาจเป็นเพราะแบคทีเรียเติบโตในอาหารเหลว TSB ที่มีสารอาหารเพียงพอดีกว่าบนอาหารแข็ง TSA นอกจากนี้ แอกทิวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกึ่งแซบวัยที่ฉีดด้วย *V. harveyi* ทุกปริมาณมีค่าสูงกว่าของกึ่งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl อย่างมีนัยสำคัญ ในทางกลับกัน แอกทิวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยกว่าของกึ่งชุดควบคุม เมื่อฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi* แบบ inactive ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) หรือแบคทีเรียไม่ก่อโรคกึ่ง เช่น *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าการเพิ่มขึ้นของแอกทิวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์เป็นการตอบสนองอย่างจำเพาะต่อการติดเชื้อก่อโรคซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองในกึ่งแซบวัย

Thesis Title Response of *Penaeus merguensis* Lectin to Pathogen and
Non-pathogen
Author Miss Pinnapa Limpanich
Major Program Biochemistry
Academic Year 2007

ABSTRACT

Lectins are carbohydrate-binding proteins that agglutinate erythrocytes, bacteria, viruses and other cells through interaction with appropriate complementary ligands. In invertebrates including crustaceans, lectins are known to play an important role in innate immunity.

In this study, hemagglutination test of rabbit red blood cells was used to determine the activity of banana shrimp lectin. Determination of lectin activity was performed in various tissues of banana shrimps. The highest activity was detected in the shrimp serum and lower activities were found in the extract fractions from hepatopancreas, ovary, stomach and intestine, respectively, whereas none was shown in the muscle, heart and hemocyte lysate.

A lectin from the hemolymph of banana shrimps was isolated by affinity chromatography on a Fetuin-agarose column with an increasing in HA to 1,057-fold of the initial serum. Further purification of the putative lectin by re-chromatography on a new Fetuin-agarose column, resulted in increasing in HA up to 1,898-fold of the initial serum. By using Fetuin-agarose columns twice, sialic acid-specific lectin was successfully purified from the serum of banana shrimps. The purified lectin showed a single band on polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing condition.

Challenging of banana shrimps by the pathogenic bacterium, *Vibrio harveyi*, could increase lectin levels in the hemolymph. After injecting the shrimps with *V. harveyi*, the HA levels in the hemolymph were significantly increased from hour 0 to hour 6 and reached the highest at hour 12 of post-injection and then subsequently declined at hour 18 and 24, respectively. In similar, the specific HA of lectin in of the

hemolymph showed parallel patterns as the HA levels of the same samples, and the values were higher than that of the control. It was found that the total protein in shrimp hemolymph decreased as time after the challenge injection in the control, but the specific activity did not change significantly ($p < 0.05$).

By means of various doses of pathogenic challenging with bacteria pre-cultured on tryptic soy agar (TSA), shrimps showed response in significantly increasing of lectin levels in the hemolymph as injected doses increase. Injection of shrimps with *V. harveyi* at 5×10^9 cells/shrimp produced the highest increment of HA levels of hemolymph lectin up to 5.43-fold at 12 hours post-injection. In a similar manner, the increase due to injection with bacteria pre-cultured in tryptic soy broth (TSB) was dose-dependent, the highest HA increment of 6.83-fold was found at 12 hours after challenge with 5×10^7 cells/shrimp. These results suggest that *V. harveyi* cultured in TSB were 100 times more active than those cultured on TSA since they grew better with sufficient nutrients in TBS than on TSA. Moreover, HA levels in the hemolymph of shrimps with *V. harveyi* injection at all doses were significantly higher than that of controls which were injected with 0.85% NaCl. In contrast, HA in the hemolymph of shrimps injected by inactive *V. harveyi*, white spot syndrome virus or their non-pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, increased slightly than that of controls. These results indicate that the increment of HA levels of lectin in hemolymph may respond specifically to the pathogenic infection as a defense mechanism in banana shrimps.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความเสียสละเวลา กรุณาให้คำแนะนำแนวทางแก้ปัญหา การถ่ายทอดความรู้และการติดตามช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการเขียนและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทาร์พันธุ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พรทิพย์ ประพันธ์พจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. นันทา เขิงเขาว์ ประธานกรรมการสอบ และดร.จงรักษ์ อรรถรัฐ ผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้อง สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์จากโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาชีวเคมี ประจำปี 2548

ขอขอบคุณคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำที่อนุเคราะห์เชื้อและสถานที่เลี้ยงกุ้งแชบ๊วย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการจัดหาและดูแลสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการ วท. 414 เพื่อนในภาควิชาชีวเคมีทุกคนที่เป็นกำลังใจ ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่อบรมสั่งสอน สนับสนุนทุนการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ผลสำเร็จและสิ่งที่เป็นประโยชน์ของงานวิจัยนี้ ขออุทิศแด่สัตว์ทดลองทุกชีวิตและผู้มีพระคุณที่กล่าวมาทุกท่าน

ปิ่นนภา ลิมพานิช

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการรูป	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	33
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	34
วัสดุ	34
อุปกรณ์	35
วิธีการ	36
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	45
4. สรุป	94
เอกสารอ้างอิง	96
ภาคผนวก	111
ประวัติผู้เขียน	114

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของเลคตินในสัตว์แบ่งตามโครงสร้างปฐมภูมิ	5
2	สมบัติของเลคตินของกุ้งสกุล <i>Penaeus</i> บางชนิด	13
3	การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแช่บ๊วย	47
4	แอกทิวีทีของเลคตินในสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งแช่บ๊วย	52
5	แอกทิวีทีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่างๆ หลังการฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i> ปริมาณ 3×10^7 เซลล์/ตัวกุ้ง	56
6	แอกทิวีทีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i> ปริมาณ $2-5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกุ้ง	60
7	แอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i> ปริมาณ $2-5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกุ้ง	62
8	แอกทิวีทีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i> ปริมาณ $5 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกุ้ง	66
9	แอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i> ปริมาณ $5 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกุ้ง	68
10	แอกทิวีทีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดแบคทีเรียหรือ WSSV	73
11	แอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดแบคทีเรียหรือ WSSV	75
12	แอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินในซีรัมและสารสกัดตับของกุ้งหลังฉีดด้วยแบคทีเรียหรือ WSSV นาน 12 ชั่วโมง	78
13	แอกทิวีทีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่างๆ หลังการฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^6 เซลล์/ตัวกุ้ง	83
14	แอกทิวีทีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาณ $5 \times 10^4 - 5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกุ้ง	87
15	แอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วย <i>V. harveyi</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาณ $5 \times 10^4 - 5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกุ้ง	89
16	เปรียบเทียบระดับของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i> ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งกับที่เลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาณ 5×10^7 เซลล์/ตัวกุ้ง	91

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	โดเมนและโครงสร้างของ MBL และ Ficolin	8
2	บริเวณการจดจำคาร์โบไฮเดรต (CRD) ของ MBL กับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง	9
3	การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นการเกิด opsonization และ phagocytosis	20
4	การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolysis)	21
5	กุ้งแช่บ๊วย (banana shrimp, <i>Penaeus merguensis</i>)	22
6	โครงสร้างของเปปทิโดไกลแคน	28
7	ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ	29
8	การแยกเลคตินจากซีรัมด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1	46
9	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของสารละลายเลคตินซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ครั้ง ซึ่งย้อมเจลแบบซิลเวอร์	48
10	การแยกสารละลายเลคตินพีค FF1 ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1 ด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 2	50
11	แอกทิวิตีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่างๆ หลังการฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	55
12	แอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i> ปริมาณ $2-5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกุ้ง	58
13	แอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i> ปริมาณ $5 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกุ้ง	64
14	แอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดแบคทีเรียหรือ WSSV	71
15	การเติบโตของแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	81
16	แอกทิวิตีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^6 เซลล์/ตัวกุ้ง	82
17	แอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ <i>V. harveyi</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ $5 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกุ้ง	85

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°	=	องศาเซลเซียส
A	=	absorbance
BSA	=	bovine serum albumin
CM-cellulose	=	carboxymethyl-cellulose
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
mmole	=	millimole
NAcMur หรือ NAM	=	N-acetyl muramic
NAcGal	=	N-acetyl galactosamine
NAGlc	=	N-acetyl-D-glucosamine
NAcMan	=	N-acetyl mannosamine
NAcNeu หรือ NAG	=	N-acetyl neuraminic acid
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCA	=	plate count agar
pH	=	-log hydrogen ion concentration
TBS	=	50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.15 M NaCl
TBS-Ca	=	50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.1 M NaCl-50 mM CaCl ₂
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TSA	=	tryptic soy agar
TSB	=	tryptic soy broth
Tris	=	tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tris-NaCa	=	50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.3 M NaCl-0.1 M CaCl ₂
%	=	percent
β	=	beta

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบัน อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย, 2548) กุ้งเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะกุ้งทะเลเป็นสินค้าอาหารทะเลที่ตลาดโลกมีความต้องการบริโภคสูง และเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง กุ้งทะเลที่ได้จากธรรมชาตินั้นวันจะลดปริมาณลงตามลำดับ ดังนั้นปริมาณของกุ้งทะเลที่จะตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคในอนาคตคือ กุ้งทะเลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ประเทศไทยได้เริ่มเพาะเลี้ยงกุ้งแบบธรรมชาติมานานแล้ว การปรับเปลี่ยนระบบการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาทำให้มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสูงมากขึ้น และเนื่องจากมีปัจจัยการผลิตที่เอื้ออำนวยหลายประการ เช่น สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสม และมีแหล่งพ่อแม่พันธุ์ที่ดี เป็นต้น ทำให้ประเทศไทยมีกำลังผลิตกุ้งทะเลมากขึ้นจนสามารถส่งออกผลผลิตกุ้งทะเลจากการเพาะเลี้ยงได้เป็นอันดับหนึ่งของโลกติดต่อกันมา จากปี 2534 จนถึงปี 2543 โดยมีผลผลิตสูงสุด ถึงประมาณ 300,000 ตัน และส่งออกนำรายได้เข้าประเทศเกือบ 100,000 ล้านบาท (ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์, 2545) ซึ่งกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญได้แก่ กุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) และกุ้งขาวหรือกุ้งแปซิฟิก (Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*) แต่ตั้งแต่ปี 2545 เป็นต้นมาการเลี้ยงกุ้งของไทยต้องเจอกับปัญหาการใช้ยาและสารเคมีทั้งในโรงพักและฟาร์มเลี้ยงกุ้ง (ลีลา เรือนแป้น, 2545) จนทำให้เกิดปัญหาสุขภาพและสิ่งแวดล้อมในเนื้อกุ้งส่งออก ทำให้สหภาพยุโรประงับการนำเข้ากุ้งทะเลจากประเทศไทย (สุปราณี ชินบุตร, 2545) ยิ่งไปกว่านั้นกุ้งกุลาดำได้ประสบปัญหาการขยายพื้นที่เลี้ยงได้น้อยลง และพื้นที่เลี้ยงเดิมมีสภาพเสื่อมโทรมและมีปัญหาสำคัญจากการเกิดโรคระบาดที่ไม่สามารถควบคุมได้ เป็นเหตุให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำได้ไม่ต่อเนื่องและส่งผลกระทบต่อผลผลิตกุ้งกุลาดำของประเทศไทยลดน้อยลงมาก รวมทั้งต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำค่อนข้างสูงเพราะการผลิตกุ้งกุลาดำต้องอาศัยแม่พันธุ์จากธรรมชาติที่มีราคาสูงทำให้ลูกกุ้งมีราคาสูงตามไปด้วย ด้วยเหตุนี้กรมประมงได้ริเริ่มชักชวนสมาคมผู้เลี้ยง กลุ่มเกษตรกร ธุรกิจที่เกี่ยวข้อง และนักวิจัยร่วมกันจัดระบบอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้มาตรฐาน รวมถึงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ชนิดอื่นทดแทน

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อสามัญว่า banana shrimp มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguensis* และมีชื่อที่ใช้เรียกทั่วไปว่า กุ้งขาว กุ้งหางแดงหรือกุ้งหางดอก วงศ์เดียวกับกุ้งกุลาดำ เปลือกบาง เนื้อนุ่ม มีรสชาติดี จึงนิยมบริโภคมากกว่ากุ้งกุลาดำ ดูแลอนุบาลง่ายและโตเร็วกว่าลูกกุ้งกุลาดำในช่วงต้นของการเลี้ยง (ศรีรัตน์ สอดสุข และ พนม กระจ่างพจน์, 2541)

กุ้งแชบ๊วยจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนในการผลิตลูกกุ้ง สามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินในการผลิตลูกกุ้งได้ แต่ลูกกุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงนานกว่า 2 เดือน จะมีอัตราการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากมีนิสัยที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงเมื่อสภาวะของน้ำเปลี่ยน ตื่นตกใจง่าย และมีอัตราการรอดตายต่ำกว่ากุ้งกุลาดำจึงเป็นจุดอ่อนของกุ้งแชบ๊วยทำให้พัฒนาได้ช้ากว่ากุ้งกุลาดำ (ธวัช ศรีวีระชัย และฐานันดร ทัดตานนท์, 2538) หากสามารถเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ได้ขนาดที่ต้องการแล้วจะพบว่ากุ้งแชบ๊วยมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธี วัฒนสิงห์, 2543; สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) ในปัจจุบันมีความพยายามเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในรูปแบบพัฒนา โดยอาศัยพ่อแม่พันธุ์จากทะเล แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ปัจจุบันแนวโน้มการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลจากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการเพาะพักลูกกุ้งได้ทวีความรุนแรงมากขึ้นเนื่องจากสภาพแวดล้อมทางทะเลเปลี่ยนไปเป็นปัจจัยทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ในสัตว์น้ำมากขึ้น (Wootton *et al.*, 2003) และการเลี้ยงลูกกุ้งในบ่อเพื่อให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ทดแทนจากการจับจากแหล่งธรรมชาติไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมที่เลี้ยงยากและอ่อนแอต่อโรค (ธนิษฐ ศรีทองสุข, 2531)

จากเหตุผลดังกล่าวทำให้มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรค (immune system) ในกุ้งมากขึ้น ซึ่งเป็นพื้นฐานในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้ง (Bulgakov *et al.*, 2004) สัตว์น้ำในกลุ่มอาร์โทรพอด (arthropod) ซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่มีภูมิคุ้มกันโรคแบบจำเพาะเจาะจงซึ่งทำงานโดยแอนติบอดี (antibody) แต่มีกลไกการป้องกันตนเอง (defense mechanism) เพื่อป้องกันการบุกรุกของจุลชีพ (microorganism) หรือพาราไซต์ (parasite) ผ่านโปรตีนในพลาสมา (plasma protein) ในครัสเตเชียน (crustacean) มีโปรตีนที่สำคัญ 2 กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง กลุ่มแรก ได้แก่ระบบโปรเฟโนออกซิเดส (prophenoloxidase (proPO) system) หรือระบบ proPO ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase, PO) นำไปสู่การสังเคราะห์เมลานิน (melanin) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคผ่านฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ได้ โปรตีนอีกกลุ่มคือแอกกลูตินิน (agglutinin) หรือเลคติน (lectin) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) บนผนังเซลล์ของจุลชีพทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม (agglutinate) เพื่อกำจัดการบุกรุกของจุลชีพได้ (Banerjee *et al.*, 2004) และจากการศึกษาของนิษา ไพจิตร (2545) มีการพบเลคตินที่มีความจำเพาะกับน้ำตาลกรดไซอะลิก (sialic acid) ในฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) ของกุ้งแชบ๊วยที่เพิ่มสูงขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* (Rittidach, 2006) และพบเลคตินโมนอดิน (monodin) จากซีรัม (serum) ของกุ้งกุลาดำที่ทำให้แบคทีเรีย (bacteria) *Vibrio vulnificus* ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; 1992) นอกจากนี้ Utarabhand และคณะ (2007) พบว่าเลคตินจากซีรัม

ของกุ้งแชบ๊วยสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรค *V. vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่ทำให้เชื้อไม่ก่อโรคในกุ้งเกาะกลุ่ม

โรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส (virus) ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก เลคตินซึ่งเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อ จุลชีพต่างๆ ในกุ้งและสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนอื่นๆ โดยกลไกการป้องกันตนเอง เช่น ทำให้ เซลล์แบคทีเรียหรือเซลล์อื่นๆ รวมถึงไวรัสบางชนิดเกิดการเกาะกลุ่ม การกระตุ้นให้เกิดฟาโกไซโทซิส และการเกิดออปโซไนซ์ (opsonization) หรือเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) บางชนิดกระตุ้น (activate) ให้เกิดกลไกการป้องกันตนเองแบบอื่นๆ เช่น เลคติน จากหนอนไบบาสุบ (*Manduca sexta*) กระตุ้นให้ระบบโปรตีนออกซิเดสทำงาน เป็นต้น (Yu *et al.*, 2002) และเนื่องจากเลคตินในกุ้งหลายชนิดตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพอย่างชัดเจนเช่น เลคตินในกุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำที่มีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อถูกบุกรุก (infect) โดยเชื้อก่อโรค ดังที่ กล่าวมาข้างต้น งานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจศึกษาการตอบสนองของเลคตินในกุ้งแชบ๊วยเมื่อมี การบุกรุกจากเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค นอกจากนี้การทำให้เลคตินบริสุทธิ์มักใช้วิธีการแยกโดย คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) เช่น Pereyra และคณะ (2004) ได้สกัดและทำให้เลคตินจากกุ้งนาง (crayfish) บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fetuin-Sepharose และจาก การศึกษาโดย Rittidach (2006) ทำให้เลคตินจากกุ้งแชบ๊วยบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ตามด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเตรียม (preparative polyacrylamide gel electrophoresis) ซึ่งพบว่าใช้เวลาในการทำค่อนข้างนานและยุ่งยาก ฉะนั้นงานวิทยานิพนธ์ นี้ส่วนหนึ่งจึงได้ศึกษาการทำให้เลคตินจากกุ้งแชบ๊วยบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ครั้ง เพื่อเป็นอีกแนวทางสำหรับการทำให้เลคตินจากกุ้งแชบ๊วยบริสุทธิ์

การตรวจเอกสาร

1. ความหมายของเลคติน

เลคตินเป็นโปรตีนที่สามารถจดจำและจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตได้ คำนิยาม นี้ถูกเสนอต่อคณะกรรมการตั้งชื่อของ Internation Union of Biochemistry โดย Goldstein และ คณะ (1980) โดยเลคตินสามารถจดจำคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดต่างๆ รวมถึงน้ำตาลที่เป็น ส่วนประกอบของสารชีวโมเลกุลอื่นๆ (glycoconjugate) เช่น ไกลโคลิพิด (glycolipid) และ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เป็นต้น เลคตินมีแหล่งจับจำเพาะกับน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง (Kocourek and Horejsi, 1981) โดยทั่วไปเซลล์เมมเบรน (cell membrane) หรือบริเวณ ผิวเซลล์ (cell surface) มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนและลิพิด (lipid) หลายชนิด ส่วนใหญ่ จับกับน้ำตาลต่างๆ โดยการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) และน้ำตาลเหล่านี้จะเป็นตำแหน่ง ที่เลคตินสามารถจับกับเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมได้ (Bies *et al.*, 2004) และทำให้เซลล์เกิดการ

เกาะกลุ่มหรือสามารถตกตะกอน (precipitate) โดยเลคตินจะจับกับน้ำตาลอย่างหลวมๆ ด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (non-covalent bond) และสามารถผันกลับได้เช่นเดียวกับการจับระหว่างเอนไซม์ (enzyme) กับสับสเตรท (substrate) และการจับของแอนติเจน (antigen) กับแอนติบอดี (Sharon, 1977) เลคตินเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตไม่ได้สร้างขึ้นจากการกระตุ้นจากสิ่งเร้าหรือสิ่งแปลกปลอมภายนอกในร่างกายเหมือนแอนติบอดี ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีเลคตินได้หลายชนิดหรือเลคตินชนิดเดียวกันอาจมีโครงสร้างแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน

2. เลคตินในสัตว์

เลคตินพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งใน พืช สัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น รา สาหร่าย (algae) ยีสต์ (yeast) แบคทีเรีย หรือไวรัส เลคตินอาจอยู่ในรูปสารละลายหรือเป็นส่วนประกอบของเมมเบรน (membrane) (Barondes, 1986) เลคตินจากแหล่งต่างกัมน้ำหนักโมเลกุลและสมบัติแตกต่างกัน เนื่องจากวิธานิพนธ์นี้ศึกษาเลคตินในกิ้งก่าบ๊วย จึงเน้นกล่าวเฉพาะเลคตินในสัตว์

ปี ค. ศ. 1988 เลคตินส่วนใหญ่ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Drickamer, 1988) คือ เลคตินชนิด C (C-type lectin) และ เลคตินชนิด S (S-type lectin) ในปัจจุบันยังคงนิยมแยกเลคตินออกเป็น 2 กลุ่มเช่นเดิม แต่แท้จริงแล้ว พบว่าแอกทิวิตี (activity) และหน้าที่ของเลคตินแตกต่างกัน เป็นเพราะมีโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ที่ต่างกัน จากรายงานพบว่า เลคตินมี 12 โครงสร้างใหญ่ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 (Kilpatrick, 2002) โดยเรียกชื่อต่างๆ กัน เช่น เลคตินชนิด C ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในการเกิดปฏิกิริยา ส่วนเลคตินชนิด S ต้องการหมู่ไธออล (thiol group) เป็นองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาในบริเวณที่สามารถจับกับน้ำตาลได้ ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดในลำดับต่อไป นอกจากนั้นยังมีเลคตินอื่นๆ เช่น pentraxin อาจรวมอยู่ในเลคตินชนิด C เนื่องจากเป็นเลคตินที่ต้องการแคลเซียมไอออนเป็นองค์ประกอบ แต่เกิดจากหน่วยย่อยของสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) 5 หน่วยมาเชื่อมต่อกันเป็นวงแหวน โดยแต่ละหน่วยขดเป็นก้อนกลมๆ เท่าๆ กันเมื่อมาเรียงเข้าด้วยกันจะมีลักษณะคล้ายรูปดาวตรงกลางว่า พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ส่วนใหญ่แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ชนิดแบบที่เชื่อมโดยสายโพลีเปปไทด์สั้นๆ พบว่าเป็นส่วนประกอบของ serum amyloid P (SAP) และ C-reactive protein (CRP) อีกชนิดคือเชื่อมโดยสายโพลีเปปไทด์ยาว ๆ เป็นส่วนประกอบของ PTX3 (cytokine modulated molecule) และ pentraxin ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท ซึ่งเลคตินทั้งสองชนิดนี้มีหน้าที่กระตุ้นให้ระบบต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทำงานสมบูรณ์ขึ้น (Kilpatrick, 2002; <http://en.wikipedia.org/wiki/Pentraxin>, retrived April 4, 2008)

เลคตินชนิด P (P-type, phosphomannosyl receptor) เป็นเลคตินที่เป็นโปรตีนในเมมเบรน (transmembrane protein) พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยจับจำเพาะกับตัวรับ

แมนโนส-6-ฟอสเฟต (mannose-6-phosphate receptor) แบ่งเป็นสองชนิดคือ ชนิดแรก พบว่าตำแหน่งที่จับกับน้ำตาลต้องการไอวาเลนท์แคทไอออน (divalent cation) ช่วยในการจับกับตัวรับแมนโนส-6-ฟอสเฟต เรียกว่า CD-MPR (cation-dependent mannose-6-phosphate receptor) อีกชนิดไม่ต้องการไอวาเลนท์แคทไอออน เรียกว่า CI-MPR (cation-independent mannose 6-phosphate receptor) (<http://www.imperial.ac.uk/research/animallelectins/default.html>, accessed 3/10/ 2006)

เลคตินบางชนิดนอกจากมีตำแหน่งที่จับกับน้ำตาลแล้วยังมีตำแหน่งพิเศษอื่น ๆ อีก เช่น เลคตินชนิด I-type หรือ immunoglobulin (Ig) - type เป็นเลคตินที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งนอกจากมีตำแหน่งจับกับน้ำตาลแล้วยังมีโดเมน (domain) ที่คล้ายกับอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin-like domain) เลคตินชนิด I พบว่ามีส่วนในการกระตุ้นสารอื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย (Kilpatrick, 2002) เลคตินชนิดฟิโคลิน (ficolin), Tachylectin 5A, 5B และ *Limas flavus* agglutinin มีบริเวณพิเศษที่คล้ายกันคือมีโดเมนที่คล้ายไฟบริโนเจน (fibrinogen-like domain) ส่วนเลคตินชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 มีสมบัติต่างๆ กัน ซึ่งมีหลายโครงสร้างที่สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลได้ และบางชนิดสามารถจดจำต่อสารชีวเคมีอื่นๆ นอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรตและไกลโคคอนจูเกต ซึ่งในจำนวนเลคตินเหล่านี้มีหลายชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ โดยสามารถจดจำเชื้อโรคต่างๆ ที่บุกรุกได้ (Kilpatrick, 2002) จากการศึกษาเลคตินในสัตว์หลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง และในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น เลคตินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เลคตินเหล่านี้มักประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) หลายหน่วย แต่ละหน่วยย่อยมีตำแหน่งจับกับคาร์โบไฮเดรตได้ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เป็นโดเมนที่จดจำคาร์โบไฮเดรตเรียก CRD (carbohydrate recognition domain)

ตาราง 1 ชนิดของเลคตินในสัตว์แบ่งตามโครงสร้างปฐมภูมิ

Structural families of animal lectins	
C-type	ERGIC-53 and VIP-36
S-type (galectin)	Discoindins
I-type (siglecs and other)	Eel agglutinins (fuclectins)
P-type (phosphomannosyl receptor)	Annexin lectins
Pentraxin	Ficolins
(Trout) egg lectins	Tachylectins 5A 5B
Calreticulin and calnexin	<i>Limas flavus</i> agglutinin

(Kilpatrick, 2002)

ส่วนใหญ่เลคตินในสัตว์ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันได้มีการจำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะของส่วน CRD ดังนี้

2.1 เลคตินชนิด C

จากการศึกษาเลคตินชนิด C พบว่า มีจำนวนกรดอะมิโนประมาณ 130 หน่วยในบริเวณที่เป็น CRD (Wang *et al.*, 2007) และเป็นบริเวณที่ต้องการแคลเซียมไอออน ในการเกิดปฏิกิริยา (Sharon and Lis, 1995) ซึ่งพบว่ามีสมบัติคือต้องการตัวรับจำเพาะ (specific receptor) และสามารถจดจำโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) โปรตีนในซีรัม สารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular matrix) และโปรตีนหรือลิพิดบริเวณผิวเซลล์ได้ด้วยการบวนการต่างๆ โดยเป็นตัวกลางในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การเกาะกลุ่มของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของสารไกลโคโปรตีนในซีรัม และการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคโดยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการป้องกันตนเองในระบบภูมิคุ้มกัน (Drickamer, 1988) เลคตินชนิด C สามารถแบ่งย่อยได้ 7 ชนิด ที่เป็นที่รู้จักได้แก่ ชนิด คอลเลคติน (collectin) และฟีโคลิน ซึ่งพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เลคตินชนิด C เกิดแอกทิวที่ใต้ที่ pH สูงหรือภาวะที่เป็นเบส (base) มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ในโครงสร้างโมเลกุล มีความจำเพาะกับน้ำตาลได้หลายชนิด และพบในส่วนของของเหลวนอกเซลล์ (extracellular fluid) มักพบเลคตินกลุ่มนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในปัจจุบัน เลคตินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนส่วนใหญ่พบว่าเป็นเลคตินชนิด C กุ้งสกุลพีเนียส (genus *Penaeus*) ที่ศึกษาพบว่าเป็นเลคตินชนิด C เช่น เลคตินของกุ้งกุลาดำ, *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis* *Parapenaeus longirostris* เป็นต้น (Rittidach *et al.*, 2007) ส่วนเลคตินจากกุ้ง *Jasus verreauxi*, กุ้งลายเสือ (kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*), *Penaeus paulensis* เป็นชนิดที่ไม่ต้องการแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (Cominetti *et al.*, 2002)

2.2 เลคตินชนิด S

เลคตินชนิด S เป็นเลคตินอีกกลุ่มหนึ่งในสัตว์ มีจำนวนกรดอะมิโนบริเวณ CRD ประมาณ 130 หน่วยซึ่งคล้ายกับเลคตินชนิด C ที่แตกต่างกันคือเลคตินชนิดนี้ไม่ต้องการแคลเซียมไอออนในการเกิดปฏิกิริยาของ CRD แต่จับกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้เมื่ออยู่ในภาวะที่มีหมู่ไรโอสซึ่งมักจับจำเพาะกับน้ำตาลแลคโตส (lactose) โอลิโกแซคคาไรด์และไกลโคคอนจูเกตอื่น ๆ ที่มีหน่วยเบตา-กาแลคโตส (β -galactose) เป็นองค์ประกอบ (Drickamer, 1988; Elola and Fink, 1996) โดยจับที่ตำแหน่ง เบตา-กาแลคโตไซด์ (β -galactoside) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Galectin>, retrived April 11, 2008) ทำให้บางครั้งเลคตินชนิด S เป็นที่รู้จักในชื่อ กาเลคติน (galectin) กาเลคตินมีหมู่ไรโอสอิสระในโมเลกุล ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่ละลาย (soluble protein) อยู่ในของเหลวในเซลล์ (intracellular fluid) และของเหลวนอกเซลล์ มักพบเลคตินชนิด S ในสัตว์มีกระดูกสันหลังและอาจพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น เลคตินจากฟองน้ำทะเล (*Geodia cydonium*) เลคตินจากหนอนตัวกลม (*Caenorhabditis elegans*) และเลคตินจากเพรียงหัวหอม (tunicate, *Clavelina picta*)

การศึกษากาแลคตินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนมีความแตกต่างกัน จึงแยกกาแลคตินได้มากกว่า 10 ชนิด โดยแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้สามกลุ่มคือ prototype galectin, chimera galectin, และ tendendem-repeat galectin (Cooper, 2002) กาแลคตินส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น กาแลคตินชนิด 1 ซึ่งเป็นกาแลคตินที่พบในทุกเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีส่วนช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ การเกาะติดกันของเซลล์ กาแลคตินชนิด 3 สามารถจับจำเพาะกับแมคโครฟาจ (macrophage) บางชนิดได้

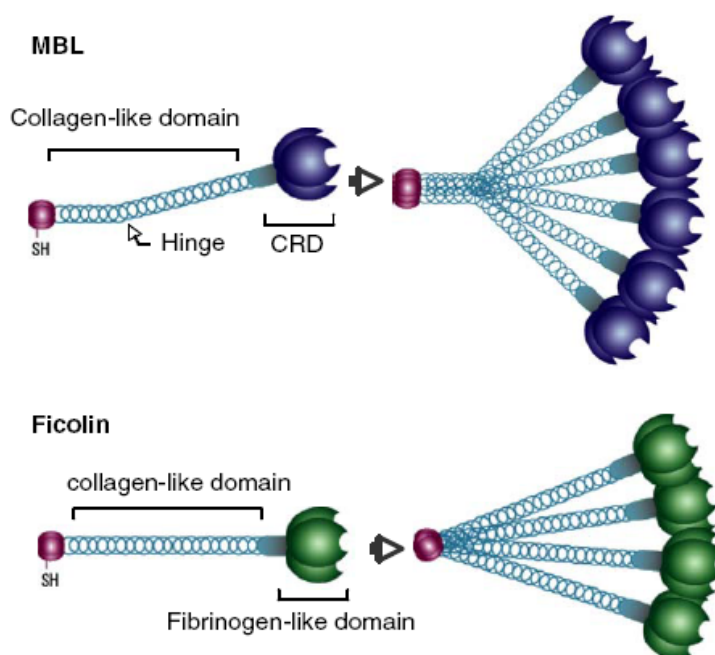
2.3 เลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เลคตินที่พบในสัตว์ชนิดนี้ส่วนใหญ่พบทั้งชนิดที่ต้องการและไม่ต้องการไควาเลนท์แคทไอออนในการจับกับคาร์โบไฮเดรต พบเลคตินทั้งในรูปสารละลายและที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน มีความแตกต่างกันทั้งขนาดโมเลกุลและความจำเพาะต่อน้ำตาล และพบในสัตว์ต่างชนิดกัน นอกจากนี้ยังพบได้ในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันของสัตว์ต่างชนิด

คอลเลคตินเป็นเลคตินชนิด C ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีลักษณะเด่นคือมีส่วนที่มีโครงสร้างคล้ายคอลลาเจน (collagen) อยู่ในโมเลกุล จึงเรียกอีกอย่างว่า collagen-like lectin น้ำตาลต่างๆ สามารถจับจำเพาะกับคอลเลคตินแต่ละชนิดได้ด้วยบริเวณที่เป็น CRD ทางปลายคาร์บอกซิลิก (COOH-terminal end) และกรดอะมิโนบริเวณปลายอะมิโน (NH₂-terminal end) มีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) ประมาณ 2-3 ตัวหรือมากกว่านั้นแล้วแต่ชนิดของคอลเลคติน กรดอะมิโนซิสเตอีนมีส่วนในการยึดจับของแต่ละหน่วยย่อยหรือเกิดพันธะภายในสายโพลีเปปไทด์ของแต่ละหน่วยย่อยด้วยพันธะไดซัลไฟด์ การจำแนกคอลเลคตินในปัจจุบันพบว่า มี 7 ชนิด คือ mannose-binding lectin (MBL) หรือ mannan-binding protein (MBP), collectin-43 (CL-43), collectin-46 (CL-46), collectin-L1 (CL-L1), คอนกลูตินิน (conglutinin), ฟิโคลิน และคอลเลคตินที่ถูกสังเคราะห์ในปอดเรียก surfactant protein (SP) อีก 2 ชนิดคือ SP-A และ SP-D (Jensen *et al.*, 2007)

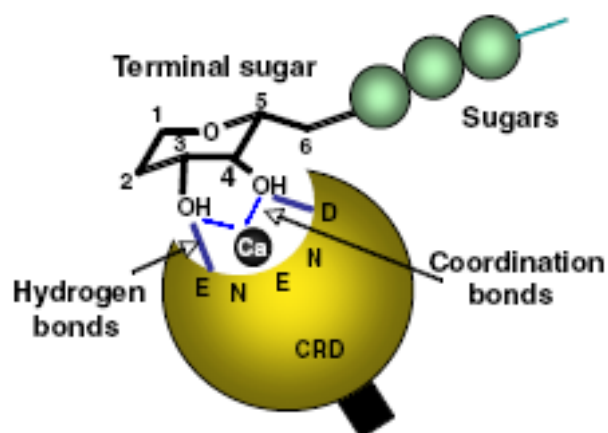
MBL เป็นคอลเลคตินที่ถูกนำมาศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นโปรตีนที่สามารถจดจำต่อรูปแบบจำเพาะได้ ทำให้มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันโดยจดจำน้ำตาลบางชนิดบนผิวเซลล์ของเชื้อก่อโรคได้ MBL ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย (oligomer) แต่ละหน่วยย่อยเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32,000 ดัลตัน (Dalton) จำนวน 3 สายพันเป็นเกลียว แต่ละสายถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ทางปลายอะมิโนประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนเป็นส่วนใหญ่ ส่วนกลางเป็นส่วนที่คล้ายกับคอลลาเจนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) ตามด้วยกรดอะมิโนอื่นๆ อีกสองชนิด (X-Y) เรียงต่อกันซ้ำๆ หลายโมเลกุล และส่วนปลายคาร์บอกซิลิก เป็นตำแหน่งของ CRD ที่ขดม้วนเป็นทรงกลม (globular) (Jensen *et al.*, 2007; Endo *et al.*, 2006) ดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วนที่คล้ายคอลลาเจนสามารถจับกับ

เอนไซม์ serine protease (MBL-associated serine proteases, MASPs) ได้ซึ่งนำไปสู่การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกลไกอื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกันต่อไป ส่วนที่มีซิสเตอีนเป็นองค์ประกอบทางปลายอะมิโนจะทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างโพลีเปปไทด์แต่ละสายรวมถึงการยึดติดกันระหว่างแต่ละหน่วยย่อย โดยส่วนใหญ่เลคตินชนิดนี้มี 3-6 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300,000-650,000 ดัลตัน (Endo *et al.*, 2006) จากรูปที่ 1 MBL มีทั้งหมด 6 หน่วยย่อย ในมนุษย์มีตั้งแต่ 3-5 หน่วยย่อยที่ค้นพบในปัจจุบัน น้ำตาลบางชนิดสามารถจับกับเลคตินตรงส่วนที่เป็น CRD ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ตำแหน่ง 3 และ 4 ของน้ำตาลไพราโนส (pyranose) โดยต้องการ Ca^{+2} ในการทำปฏิกิริยา (รูปที่ 2) เลคตินชนิดนี้มีความจำเพาะต่อน้ำตาล แมนโนส, NAcGlc, เอ็น-อะซิติลแมนโนซามีน (N-acetyl mannosamine, NAcMan), กลูโคส (glucose), ฟรุคโตส (fructose) แต่มีความจำเพาะน้อยต่อน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) และกรดไซอะลิก และพบว่าไกลโคโปรตีนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่ไม่สามารถตรวจวัดได้ว่ามีความจำเพาะต่อเลคตินชนิดนี้ (Turner, 2003)



รูปที่ 1 โดเมนและโครงสร้างของ MBL และ Ficolin

(Endo *et al.*, 2006)



รูปที่ 2 บริเวณการจดจำคาร์โบไฮเดรต (CRD) ของ MBL กับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง

ตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved residue) ตรงบริเวณ CRD คือ E, N, E, N และ D (Glu185, Asn187, Glu193, Asn205, และ Asp206 ตามลำดับ) สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลบางชนิดด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 4 ของน้ำตาลไพราโนส โดยต้องการ Ca^{+2} (Endo *et al.*, 2006)

ส่วนฟีโคลินเป็นคอลเลคตินอีกชนิดที่มีลักษณะคล้าย MBL นอกจากมีโครงสร้างส่วนที่คล้ายคอลลาเจนแล้วยังมีส่วนที่คล้ายไฟบริโนเจน เรียกบริเวณนั้นว่า fibrinogen-like domain โดยทางปลายอะมิโนมีจำนวนกรดอะมิโนสั้นมาก ประกอบด้วยซิสเตอีนเป็นส่วนใหญ่ ส่วนกลางเป็นส่วนที่คล้ายกับคอลลาเจนที่ประกอบด้วยอะมิโนไกลซีน ตามด้วยกรดอะมิโนอื่นๆ อีกสองชนิด (X-Y) เรียงต่อกันซ้ำๆ กันเช่นเดียวกับ MBL และปลายคาร์บอกซิลิกเป็น fibrinogen-like domain ที่ขดม้วนเป็นทรงกลม ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ CRD ใน MBL (รูปที่ 1) เลคตินฟีโคลินพบในหลายเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Endo *et al.*, 2006, 2007) ในซีรัมมนุษย์เลคตินนี้จับจำเพาะกับ NAcGlc และถูกแบ่งเป็นสองชนิดคือ L-ficolin และ H-ficolin ซึ่งทั้งสองชนิดสามารถจับกับตัวรับจำเพาะของเอนไซม์ MASPs เพื่อนำไปสู่การย่อยทำลายสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกได้ (Matsushita *et al.*, 2001; 2002) นอกจากนั้นยังพบชนิด M-ficolin ซึ่งไม่ใช่ชนิดที่พบในซีรัม (non-serum lectin) แต่พบในเม็ดเลือด leukocyte โดยจับจำเพาะกับเอนไซม์ MASPs เพื่อนำไปสู่ฟีโคเลคตินต่อไป (Endo *et al.*, 2006) มีการศึกษาพบว่า M-ficolin สามารถจับจำเพาะกับแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (Liu *et al.*, 2005)

ส่วนเลคติน SP-A และ SP-D ซึ่งถูกสร้างที่ปอดส่วนใหญ่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันโดยทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการกำจัดเชื้อโรค เลคติน SP-A พบว่าสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตสและแลคโตสได้ ส่วนเลคตินชนิด SP-D มีความจำเพาะต่อน้ำตาลมอลโตส (maltose) (Ding *et al.*, 2004)

2.4 เลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

เลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมักพบในฮีโมลิมฟ์ เมือก (mucus) น้ำในโพรงลำตัว (coelomic fluid) และเมมเบรนของเซลล์ซึ่งทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยพบมากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มอาร์โทรพอดและหอย (mollusca) เนื่องจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นการศึกษาเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกิ้งก่าซึ่งเป็นสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังและมีเปลือกแข็งหุ้มภายนอก จึงนำเสนอข้อมูลของเลคตินในสัตว์ทะเลกลุ่มครัสเตเชียนต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู และหอยเป็นต้น

2.4.1 เลคตินในกุ้ง

เลคตินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนรวมถึงกุ้งสกุลพีเนียส ส่วนใหญ่จดจำและจับจำเพาะกับหมู่เอ็น-อะซิติก (N-acetyl group) ของ aminosugar โดยเฉพาะกรดไซอะลิก ซึ่งมีหมู่เอ็น-อะซิติก และโอ-อะซิติก (O-acetyl) เป็นส่วนประกอบหรือน้ำตาลเอ็น-อะซิติกนิวรามินิก (N-acetyl neuraminic acid, NAcNeu) ซึ่งเป็นกรดไซอะลิกที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ กรดไซอะลิกพบบนผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ มักไม่พบในสัตว์ชั้นสูงรวมถึงสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนด้วย โดยเลคตินในสัตว์กลุ่มนี้สามารถจับจำเพาะกับกรดไซอะลิกได้ ซึ่งเกี่ยวข้องต่อการจดจำเพื่อป้องกันตนเองจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มาจากกรุก เช่น ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ที่มี 2-keto-3-deoxy-octonate ซึ่งมีกรดไซอะลิกประกอบอยู่ (Cominetti *et al.*, 2002) เลคตินจากกุ้งพีเนียสที่จำเพาะต่อน้ำตาลไซอะลิกและสามารถจดจำผนังเซลล์แบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้มีหลายชนิด เช่น เลคตินจากซีรัมของกุ้งกุลาดำจำเพาะกับกรดไซอะลิก ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมูเลือด O เกาะกลุ่มเป็นเลคตินที่ต้องการ Ca^{2+} และทำให้แบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; 1992) Luo และคณะ (2006) ศึกษาพบเลคตินที่จับกับลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide-binding lectin) ในกุ้งกุลาดำ โดยลิโปโพลีแซคคาไรด์ที่มี O-antigen เป็นองค์ประกอบ จากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ O127:B8 สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดี และพบว่าเลคตินที่จับกับลิโปโพลีแซคคาไรด์นี้สามารถทำให้เกิดการออปโซไนซ์ คือเมื่อเลคตินเพิ่มปริมาณสูงขึ้นจะกระตุ้นให้เม็ดเลือดเกิดฟาโกไซโทซิสต่อสิ่งแปลกปลอมมากขึ้น นอกจากนี้ Luo และคณะ (2006) ยังพบว่าเลคตินของกุ้งกุลาดำสามารถทำให้แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดเกาะกลุ่มได้เป็นอย่างดี เช่น *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* และ *Vibro alginolyticus* ซึ่งเป็น

แบคทีเรียแกรมลบ และ *Micrococcus lysodeikticus* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำ ซึ่งได้แก่ *M. lysodeikticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus* ส่วนแบคทีเรียก่อโรค *V. parahemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้เพียงเล็กน้อย บ่งชี้ว่าเลคตินในกุ้งกุลาดำตอบสนองต่อการติดเชื้องูโรคและเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง Yang และคณะ (2007) ศึกษาเลคตินในกุ้งลายเสือพบว่า เป็นเลคตินชนิด C มีความจำเพาะกับ NAcMan, NAcNeu และลิโพโพลีแซคคาไรด์ และสามารถทำให้เชื้องูโรคในกุ้งลายเสือ เช่น *V. parahemolyticus*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus* และ *M. lysodeikticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ แสดงถึงการเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งชนิดนี้ สำหรับกุ้งทะเลในสกุลพีเนียสอื่น ๆ ได้มีการศึกษาบางชนิด (species) ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่วนเลคตินในกุ้งแชบ๊วย พบว่าเป็นชนิด C และทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยคอลัมน์ Feuin-agarose ตามด้วยเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) ด้วยคอลัมน์ Superose 12 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 316,200 ดัลตัน (Dalton) มีหน่วยย่อย 2 ขนาด คือ 32,200 และ 30,900 ดัลตัน ที่ไม่ได้จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายและหนูเกิดการเกาะกลุ่มได้ดีเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดแดงหมูต่างๆ ของคน ในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้เม็ดเลือดแดงกระต่ายในการทดลองหาแอกทิวิตีของเลคตินเพราะดูดเลือดได้ง่ายและมีปริมาณมากกว่าหนู เลคตินของกุ้งแชบ๊วยมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 4.4% มีความจำเพาะกับกรดไซอะลิก หรือน้ำตาลที่มีหมู่เอ็น-อะซีทิลเป็นองค์ประกอบ เช่น NAcMan, NAcGlc, เอ็น-อะซีทิลกาแลคโตซามีน (N-acetyl galactosamine, NAcGal) และที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ดีที่สุดคือน้ำตาล NAcNeu ส่วนมิวซินจากกระเพาะหมู (porcine stomach mucin) และฟีทูอิน (fetuin) เป็นไกลโคโปรตีนที่ยับยั้งแอกทิวิตีของเลคตินของกุ้งแชบ๊วยได้ดีเช่นกัน (Utarabhand *et al.*, 2007; Rittidach *et al.*, 2007) นอกจากนี้พบว่าเลคตินบริสุทธิ์จากกุ้งแชบ๊วยยังสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคเกาะกลุ่มได้เป็นอย่างดีคือ *V. harveyi* และ *V. parahemolyticus* ส่วน *V. vulnificus* สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้รองลงมา แต่ไม่สามารถทำให้เชื้องูโรคในกุ้งแชบ๊วยได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* และ *E. coli* เกาะกลุ่มได้ แสดงให้เห็นว่าเลคตินนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วย (Rittidach *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบเลคตินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ซึ่งเป็นกุ้งน้ำจืดมีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิกเช่นกัน เมื่อทำให้เลคตินบริสุทธิ์พบว่าประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 7% มีน้ำหนักโมเลกุล 19,000 ดัลตัน ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ขนาด 9,600 ดัลตัน ที่จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Vazquez *et al.*, 1993) Vazquez และคณะ (1994) รายงานเลคตินชนิด MrL ในกุ้งก้ามกรามว่าเป็นเลคตินที่สามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลที่มีหมู่อะซีทิลเป็นองค์ประกอบ และสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียบางชนิดเกาะกลุ่มได้เช่น *Pasteurella haemolytica* (serotype A12), *Bacillus cereus* และ *Aeromonas* spp. ส่วน *E. coli* และ *Salmonella izona* เกาะกลุ่มได้น้อย ต่อมามีการศึกษาพบ

เลคตินกึ่งก้ำมกราม 2 ชนิดคือ MrL-I เป็นเลคตินที่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 62,100, 67,100 และ 81,400 ดัลตัน อีกชนิดคือ MrL-II เป็นเลคตินชนิดที่สามารถเกิดทำให้เม็ดเลือดแดงต่าง ๆ เกาะกลุ่มได้ และพบว่ามีหน่วยย่อยเดี่ยวคือ 9,600 ดัลตัน แต่พบว่าเลคตินทั้งสองชนิดจับจำเพาะกับน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติดเป็นองค์ประกอบ ซึ่งได้แก่ NAcGlc, NAcGal, NAcNeu (Pereyra *et al.*, 2004) เลคตินของกิ้ง *Litopenaeus schmitti* เป็นเลคตินชนิด C มีความจำเพาะกับน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติดเป็นองค์ประกอบ คือ น้ำตาล NAcNeu O-sialoglycoconjugate มีวชินจากวัว (bovine submaxillary mucin) และพบว่าสามารถจดจำลิโปโพลีแซคคาไรด์หลายชนิด เมื่อทำให้เลคตินชนิดนี้บริสุทธิ์พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 ดัลตัน มีหน่วยย่อยขนาด 31,000 และ 34,000 ดัลตัน (Cominetti *et al.*, 2002)

ตารางที่ 2 สมบัติของเลคตินของกุ้งสกุล *Penaeus* บางชนิด

Species	M.W. (dalton)	Subunit (dalton)	Divalent cation	Carbohydrate specificity	Biological activity	References
<i>P. californiensis</i>	175,000	41,000	Dependent	NAcGlc; NAcGal, NAcNeu; Fetuin; Bovine mucin; LPS	Bacteria agglutination (<i>V. parahemolyticus</i> , <i>V. fischeri</i> , <i>V. vulnificus</i>) Opsonin activity	Vargas-Albores <i>et al.</i> , 1993; Vargase- Albores <i>et al.</i> , 1993
<i>P. indicus</i>	181,000	84,000; 97,000	Independent	NAcGlc; NAcGal; NAcMan; NAcNeu; Bovine mucin; Fetuin; LPS	Not determined	Maheswari <i>et al.</i> , 1997; Jayasree, 2001
<i>P. japonicus</i>	330,000	330,000	Dependent	NAcGlc; NAcGal; NAcNeu; Ribose; Bovine mucin; Porcine mucin; Fetuin; LPS	Opsonin activity (serum) Bacterial agglutination (<i>V. parahemolyticus</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>M. lysodeikticus</i>)	Kondo <i>et al.</i> , 1992; 1998; Yang <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Species	M.W. (dalton)	Subunit (dalton)	Divalent cation	Carbohydrate specificity	Biological activity	References
<i>P. monodon</i>	420,000	27,000	Dependent	NAcGlc; NAcGal; NAcNeu; Bovine mucin; Fetuin; LPS	Bacterial agglutination (<i>V. vulnificus</i> , O-antigen from <i>E. coli</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>M. lysodeikticus</i>)	Ratanapo and Chulavatnalol, 1990; 1992; Luo <i>et al.</i> , 2006
<i>P. paulensis</i>	153,000	31,000	Independent	NAcGlc; NAcGal; NAcNeu; Fetuin; LPS	Opsonin activity (serum)	Marques and Barracco, 2000
<i>P. schmitti</i>	153,000	31,000; 34,000	Partial Dependent	NAcGlc; NAcGal; NAcNeu; Fetuin; LPS	Not determined	Marques and Barracco, 2001
<i>P. merguensis</i>	316,200	32,200; 30,900	Dependent	NAcGlc; NAcGal; NAcNeu; NAcMan; Porcine mucin; Fetuin	Bacterial agglutination (<i>V. parahemolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. vulnificus</i>)	Utarabhand <i>et al.</i> , 2007; Rittidach <i>et</i> <i>al.</i> , 2007

2.4.2 เลคตินในหอย

ในหอยสองฝา *Mytilus edulis* พบเลคติน 3 ชนิด คือ M3, M6 และ M7 ที่จำเพาะกับอะไซอะโลฟีทูอิน (asialofetuin) ในภาวะที่มี Ca^{+2} โดยพบว่า M6 และ M7 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 180 หน่วย และมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกัน 76% ส่วน M3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 149 หน่วยและมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับของ M6 และ M7 26% นอกจากนี้พบว่ากรดอะมิโน 50% ของปลายคาร์บอกซิลิกของเลคตินทั้ง 3 ชนิดเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนใน CRD ของเลคตินชนิด C ที่พบในสัตว์ชนิดอื่นๆ (Takagi *et al.*, 1994) เลคตินจากอีโมลิมีฟของหอยนางรม *Crassostrea gigas* และหอย horse-mussel (*Modiolus modiolus*) ทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์หลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียหลายชนิดเกาะกลุ่มได้ จัดเป็นเลคตินชนิด C-reactive protein คือจับจำเพาะกับน้ำตาลหลายชนิดและถูกสังเคราะห์เมื่อร่างกายอยู่ในภาวะที่อ่อนแอจากโรคหรือบาดแผล (Olafsen, 1994) Tunkijjanukij และคณะ (1999) ได้ทำให้เลคตินในหอยนางรมบริสุทธิ์ โดยวิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 มิติ (two-dimensional electrophoresis) พบเลคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุล ที่ isoelectric point (pI) ดังนี้คือ 14,000 (pI ~5.1 และ ~5.5), 17,500 (pI ~5.5) และ 20,000 (pI ~4.9) ตัลดัน และพบว่าเลคตินนี้สามารถทำให้แบคทีเรีย *Vibrio salmonicida*, *Vibrio viscosus* และ *Vibrio wodanis* เกิดการเกาะกลุ่มได้ ส่วนแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* และ *Shewanella putrefaciens* เกาะกลุ่มได้เล็กน้อย ส่วนแบคทีเรีย *Alteromonas* spp. ไม่เกิดการเกาะกลุ่ม แบคทีเรียที่ถูกทำให้เกาะกลุ่มส่วนใหญ่เป็นชนิดก่อโรคต่อหอยชนิดนี้แสดงให้เห็นว่าเลคตินมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการติดโรคของหอยนางรม เลคตินจากอีโมลิมีฟของหอยมุก (pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*) มีขนาดโมเลกุล 440,000 ตัลดัน ประกอบด้วย 22 หน่วยย่อยขนาด 20,000 ตัลดัน มีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสและ NAcGal (Suzuki and Mori, 1989) เลคตินในหอยก้ามมะนิลา (Manila clam, *Ruditapes philippinarum*) เป็นเลคตินที่สามารถจับจำเพาะกับ hypnosporin ของเชื้อโปรโตซัว *Perkinsus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในหอยชนิดนี้ได้ และเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากหอยชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 138,000 ตัลดัน มี 3 หน่วยย่อยคือ 74,000, 34,000 และ 30,000 ตัลดัน และเป็นเลคตินชนิด C มีความจำเพาะกับน้ำตาล NAcGal มีวชิโน และเลือดคนหมู่ม A (Bulgakov *et al.*, 2004)

2.4.3 เลคตินในปูและแมงดาทะเล

เลคตินในฮีโมลิมพ์ของปูม้า (blue crab, *Scylla serrata*) เป็นเลคตินที่จำเพาะกับ NAcNeu และสามารถเร่งการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ (Mercy and Ravindranath, 1994) เลคตินที่สกัดจากไข่ระยะเอ็มบริโอ (embryonated egg) ของปู *Emerita asiatica* เป็นไกลโคโปรตีนที่จำเพาะต่อมิวซิน (mucin-type glycoprotein) ที่จับอยู่กับแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นเลคตินกลุ่มใหม่ที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องในการนำไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) เข้าสู่เซลล์ไข่ (Devaraj *et al.*, 1995)

Gokudan และคณะ (1999) ศึกษาเลคตินในฮีโมลิมพ์ของแมงดาทะเล (horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*) โดยให้ชื่อว่า tachylectins 5A และ 5B (TLs-5) เลคตินชนิด TLs-5 สามารถทำให้เม็ดเลือดคนเกาะกลุ่มได้ทุกหมู่ รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดได้ ทำให้เลคตินชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดจุลชีพต่างๆ ได้ดี และพบว่ามีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่มีหมู่อะซิติกเป็นองค์ประกอบ แมงดาทะเลชนิดนี้สามารถหลั่งไฟบริโนเจนออกมาในฮีโมลิมพ์ ซึ่งทำหน้าที่เสมือนเลคตินที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่เซลล์เจ้าบ้านได้ (nonself-recognizing lectin) โดยพบว่าปลายอะมิโนมีกรดอะมิโนซิสเตอีน ประกอบอยู่ และปลายคาร์บอกซิลิกมีไฟบริโนเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับของเลคตินชนิดฟีโคลินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 51% แต่ไม่มีส่วนที่เป็นคอลลาเจน นอกจากนี้ Dorai และคณะ (2004) พบเลคตินที่จับจำเพาะกับกรดไซอะลิก (sialic acid-binding lectin) ในแมงดาทะเลชนิดนี้ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 42,000 ดัลตัน มี 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 และ 28,000 ดัลตัน

3. บทบาททางชีวภาพของเลคตินในสัตว์

เลคตินในสัตว์แต่ละชนิดมีความหลากหลายของโครงสร้าง โดยพบว่าอาจมีทั้งเลคตินที่เป็นส่วนของเมมเบรนหรือเมมเบรนเลคติน (integral membrane lectin) และเลคตินที่อยู่ในรูปสารละลาย (soluble lectin)

3.1 บทบาทของเลคตินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เลคตินในสัตว์แต่ละชนิดมีบทบาททางชีวภาพที่ต่างกันไป เช่น ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เลคตินมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจับหรือการขนย้ายสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ไกลโคโปรตีน และแคลเซียม (Goldstein *et al.*, 1980) และเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ (Gabijs, 1988; Kamiya *et al.*, 1990) แต่ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องับระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) และกลไกการป้องกันตนเอง

เลคตินที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มนี้มีหลากหลายชนิดที่เป็นที่รู้จักได้แก่ คอลเลคตินชนิดต่างๆ ที่สามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นตัวรับจำเพาะบน

ผิวเซลล์แปลกปลอมที่ไม่ใช่เซลล์เจ้าบ้านได้ เช่น เซลล์จุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ พาราไซต์ รวมถึงไวรัสบางชนิด การจับจำเพาะดังกล่าวนำไปสู่การยับยั้งและการทำลายโดยกระบวนการต่างๆ อาจเกี่ยวข้องกับแอนติบอดี เอนไซม์หรือสารชีวเคมีอื่นๆ ที่มีหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมได้ เช่น คอลเลคตินชนิด SP-A และ SP-D ที่ถูกสร้างจากปอดของสัตว์เลี้ยงลูกนม จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคต่างๆ ได้ เช่น กระตุ้นให้เกิดฟาโกไซโทซิส และออปโซไนซ์ เป็นต้น (Ding et al., 2004) จากการศึกษา SD-A จากซีรัมคนพบว่าสามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่างๆ ได้หลายชนิดเช่น *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* และ *Haemophilus influenzae* โดยเลคตินอาจไปกระตุ้นการเกิดออปโซไนซ์ หรือกระตุ้นแมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์ฟาโกไซท์ (phagocyte cell) ชนิดหนึ่งให้เกิดฟาโกไซโทซิสได้โดยตรงหรืออาจเกิดขึ้นทั้งสองวิธี โดย CRD ของเลคตินนี้สามารถจดจำไกลโคคอนจูเกตบางชนิดบนผิวเซลล์เชื้อโรคได้ เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ กรดลิโปทิไซอิก (Lipoteichoic acid, LTA) แอปทิดโกลแคน (peptidoglycan, PGN) ลิพิด ไกลโคลิพิด (glycolipid) ด้วยเหตุนี้ทำให้สามารถจับกับแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ไวรัส เชื้อรา หรืออนุภาคอื่นที่มีไกลโคคอนจูเกตเป็นองค์ประกอบได้ (Ding et al., 2004) Nadesalingam และคณะ (2005) ศึกษาคอลเลคตินชนิด SP-D พบว่าทำหน้าที่เป็นตัวกลางระหว่างระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune system) และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immune system) ซึ่งเลคตินเป็นโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยคอลเลคติน SP-D จดจำคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ด้วยตำแหน่ง CRD และกระตุ้นให้เกิดฟาโกไซโทซิส และกระบวนการต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เช่น SP-D จับอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) เช่น IgG, IgM, IgE และ IgA ที่ถูกหลั่งออกมา โดยแอนติบอดีเหล่านี้มีตัวรับกับเลคตินเรียกว่า C1q หรือ Fc จับกับเลคตินส่วนที่คล้ายกับคอลลาเจนแล้วนำไปสู่กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในขบวนการอื่นๆ ส่วน MBL นอกจากจำเพาะต่อน้ำตาลแมนโนส ยังจำเพาะต่อน้ำตาลอื่นๆ อีกเช่น NAcMan, NAcGlc ดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งเป็นน้ำตาลที่พบมากบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้ MBL สามารถทำให้เซลล์ต่างๆ เกาะกลุ่มได้ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ ฟังไจ โปรโตซัว รวมถึงไวรัสบางชนิด (Turner, 2003) MBL มีหน้าที่คล้ายกับเลคตินชนิดฟิโคลินที่จับจำเพาะกับน้ำตาลที่บริเวณผิวเซลล์ด้วยตำแหน่ง CRD ส่วนตำแหน่งที่เป็นคอลลาเจนจับกับ MASPs เพื่อนำไปสู่การกำจัดสิ่งบุกรุกด้วยการเกิดออปโซไนซ์ การทำให้เกิดการอักเสบ (modulation of inflammation) หรือชักนำให้เกิดกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของแอนติบอดีและวิถีเลคตินอื่นๆ ได้

3.2 บทบาทของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

บทบาททางชีวภาพของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมักเป็นเลคตินที่อยู่ในรูปของเหลวภายในเซลล์ ส่วนใหญ่ศึกษาในสัตว์ทะเล โดยแยกบทบาททางชีวภาพของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังออกได้เป็น 2 ด้าน คือ บทบาทที่ไม่เกี่ยวข้องและเกี่ยวข้องกับกลไกการ

ป้องกันตนเอง

บทบาทที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองเช่น ในแมลง (Kubo *et al.*, 1990, 1993; Natori, 1990) การยึดติด เคลื่อนย้าย และการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (Vasta *et al.*, 1999) เลือดดินจากแมงดาทะเล (*Limulus polyphemus*) มีบทบาทช่วยชักนำการเข้าผสมกันของไข่และตัวอสุจิ (Barnumand and Brawn, 1983)

บทบาทของเลือดดินที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของสัตว์แบ่งออกเป็น 2 ระบบคือระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะพบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะพบทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เพราะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นการป้องกันตนเองจากเชื้อโรค มาจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Loker *et al.*, 2004) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนซึ่งรวมทั้งกุ้งแชบ๊วย กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวและกุ้งอื่น ๆ เป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ (Yu *et al.*, 2002)

3.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (Cellular immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มักใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ (hemocyte) เป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยทั่วไปเซลล์เม็ดเลือดของครัสเตเชียนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เซลล์ไฮยาลิน (hyaline cell) และเซลล์ฮีโมไซท์ที่มีกรานูล (granular hemocyte) การแยกชนิดของเซลล์ขึ้นอยู่กับลักษณะการมีหรือไม่มีกรานูลของเซลล์เป็นหลัก (Bauchau, 1981) โดยทั่วไปเซลล์ไฮยาลินมีขนาดเล็ก มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ตรงกลางเซลล์ พบไซโทพลาสไมคกรานูล (cytoplasmic granule) เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย ในขณะที่เซลล์เซมิกรานูล (semigranular cell) มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรืออยู่ที่ขอบ มีไซโทพลาสไมคกรานูลมากขึ้น เซลล์ลาร์จกรานูล (large granular cell) มีนิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ และพบไซโทพลาสไมคกรานูลจำนวนมาก (Sternshein and Burton, 1980; Bauchau, 1981) หน้าทีการทำงานของเม็ดเลือดแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น หน้าทีหลักของเซลล์ไฮยาลินในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้แก่ความสามารถในการกลืนเซลล์โดยวิธีฟาโกไซโทซิส ขณะที่เซลล์เซมิกรานูลทำหน้าที่โดยตรงในการสร้างนูดูล (nodule formation) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) (Söderhäll and Cerenius, 1992) โดยเซลล์ไฮยาลินเข้าจับกับโพลีแซคคาไรด์ของจุลชีพ เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ และเบตา-1,3-กลูแคน (β -1,3-glucan) แล้วปล่อยให้สารที่มีอยู่ในกรานูล ออกมาทำลายและทำให้เกิดการกักล้อม รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของระบบโปรเฟินอลออกซิเดส (prophenoloxidase activating system) ส่วนเซลล์ลาร์จกรานูลจะทำหน้าที่หลักในระบบโปรเฟินอลออกซิเดส (Söderhäll and Cerenius, 1992) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นระบบโปรเฟินอลออกซิเดสของครัสเตเชียนโดยลิโปโพลีแซคคาไรด์ เปปติโดไกลแคน และ เบตา-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะไปออกซิไดซ์ (oxidize) สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นควิโนน (quinone) แล้ว

เปลี่ยนไปเป็นเมลานิน (melanin) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย

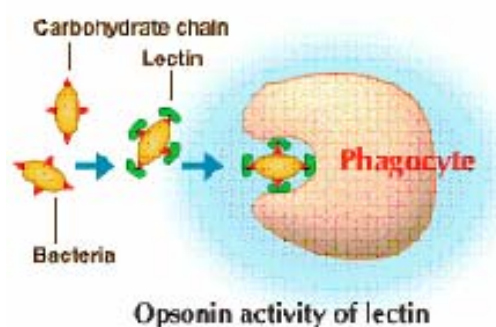
ถ้าสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยจะถูกจำกัดโดยฟาโกไซโทซิส นับเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีพาราไซท์หรือสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้าสู่ร่างกาย วิธีในการกลืนเซลล์สิ่งแปลกปลอมจะมีการยื่นไซโทพลาซึม (cytoplasm) ไปล้อมสิ่งแปลกปลอม แล้วไลโซโซม (lysosome) จะหลั่งสารช่วยย่อยซึ่งมีทั้งสารต่อต้านแบคทีเรีย และ เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) หลังจากการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกนอกเซลล์ สำหรับการเกิดหนูดูลจะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมจะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่ กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543) พบว่าหลังการฉีดยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เข้าตัวกึ่งกุลาดำ เซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ฟาโกไซท์ที่อยู่กับที่ (fixed phagocyte) ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอม โดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้าล้อมจับแล้วมีเซลล์เม็ดเลือดเข้ารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นหนูดูลและการห่อหุ้ม และสุดท้ายมีการสร้างเมลานินขึ้นและถูกกำจัดออกจากร่างกาย

3.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (Humoral immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ได้แก่ เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สลายผนังเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการทำให้เซลล์แตก (hydrolysis) โดยย่อยพันธะเบตา 1,4 ของน้ำตาลเอ็น-อะซิติลมิวราินิก (N-acetylmuramic, NAcMur) และ NAcGlc ในโมเลกุลของเปปทิโดไกลแคน (<http://en.wikipedia.org/wiki/Lysozyme>, retrieved April 11, 2008) ส่วนเลคตินซึ่งแพร่อยู่ทั่วไปในฮีโมลิมฟ์ พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นส่วนใหญ่ (Renwranz, 1986; Cooper *et al.*, 1992)

เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะถูกออกแบบเพื่อจดจำรายละเอียดเล็กๆ น้อยๆ ที่บอกถึงความแตกต่างของเชื้อจุลชีพแต่ละชนิดได้ โดยโครงสร้างของเชื้อต่างๆ มีรูปแบบที่เฉพาะตัวเรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) โมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบโครงสร้างเหล่านี้มีหลายชนิด เช่น ลิโปโพลีแซคคาไรด์ เปปทิโดไกลแคนจากผนังเซลล์แบคทีเรีย เบตา-1,3-กลูแคนจากยีสต์และรา (fungal cell) ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (bacterial DNA), อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) จากไวรัสและโมเลกุลที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ (Wang *et al.*, 2007; Janeway and Medzhitov, 2002) โปรตีนที่สามารถจดจำโมเลกุลเหล่านี้เรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs) โดยจดจำและจับกับโมเลกุลเหล่านี้ ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีทั้งหมด 6 กลุ่มคือ โปรตีนที่จดจำเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan recognition protein, PGRP) โปรตีนที่จับแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative binding protein, GGBP) ตัวรับที่เป็น multidomain (multidomain scavenger receptor) S-locus Cys-rich (SCR) เลคตินชนิด C เลคตินชนิด S และโปรตีนที่มีหมู่ไทออลเป็นองค์ประกอบ (thioester-containing protein, TEP) (Christophides *et al.*, 2002)

เลคตินซึ่งเป็น PRPs ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมากในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังพบว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองซึ่งเหมือนกับอิมมูโนโกลบูลินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือ มีหน้าที่กำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการทิ้งในระหว่างการเปลี่ยนรูปร่าง (metamorphosis) และมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาการป้องกันการติดเชื้อ เลคตินมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านการเกิดโรคโดยแบคทีเรียหรือศัตรูที่มาจากธรรมชาติ เช่น เลคตินจาก Japanese horseshoe crab และเลคตินจากแมลงสาป (cockroach, *Blaberus discoidalis*) สามารถจับจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนจากยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดได้ จากนั้นจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่อต้านและทำลายโดยระบบโปรตีนออกซิเดส (Kilpatrick, 2002) ในสัตว์บางชนิดอาศัยความเป็นพิษของเลคตินเอง เช่น เลคตินที่เป็นพิษ (venom) ในหนาม (spine) ของหอยเม่นทะเล (*Toxopheustes pileolus*) (Seike *et al.*, 1992) มีรายงานว่าเมื่อเลคตินจับกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นให้มีการจับของเซลล์ฟาโกไซท์ในการเกิดออปโซไนซ์ เพื่อทำลายเซลล์แปลกปลอม (รูปที่ 3)

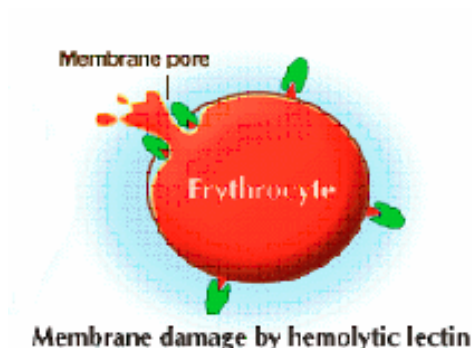


รูปที่ 3 การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นการเกิด

opsonization และ phagocytosis

(Hatakeyama *et al.*, 1995)

เลคตินที่มีความจำเพาะกับกรดไซอะลิกจากแมงดาทะเลและเลคตินที่จำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโตสจากปลิงทะเล (*Acropora echinata*) สามารถทำลายเมมเบรนและทำให้เม็ดเลือดแดงของคนและกระต่ายแตกได้ โดยเลคตินจับกับคาร์โบไฮเดรตดังกล่าวบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เมมเบรนเกิดรูพรุน (pore) และทำให้เซลล์แตก (รูปที่ 4) กล่าวได้ว่าการทำลายเซลล์แปลกปลอมขึ้นกับชนิดของเซลล์แปลกปลอมและปริมาณของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของสัตว์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นตัวชักนำให้เกิดการกำจัดเซลล์แปลกปลอมได้ดีและเร็วขึ้น (Hatakeyama *et al.*, 1995)



รูปที่ 4 การจับของเลคตินกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolysis) (Hatakeyama *et al.*, 1995)

จากสมบัติของเลคตินที่มีความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตและโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของผนังเซลล์จุลชีพชนิดต่างๆ ได้ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เลคตินจึงเป็นตัวละครสำคัญในระบบการรับรู้ถึงการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอม (Ratcliffe *et al.*, 1985) ในสัตว์จำพวกกุ้งเนื่องจากเลคตินสามารถทำให้เซลล์จุลชีพเกิดการเกาะกลุ่ม จึงไม่สามารถแพร่กระจายไปยังที่ต่างๆ นอกจากนี้เลคตินยังจับระหว่างจุลชีพและเซลล์เม็ดเลือดก่อให้เกิดฟาโกไซโทซิสของจุลชีพที่บุกรุกได้ (Sritunyalucksana *et al.*, 2001) มีการศึกษาเลคตินที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งเพื่อใช้ในการควบคุมและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งอย่างหลากหลายเช่น การพบเลคตินที่มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิกในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยที่เพิ่มสูงขึ้นตอบสนอง

ต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* (นิษา ไพจิตร, 2545; Rittidach, 2006) Vazquez และคณะ (1995) พบว่าเลคตินในกุ้งก้ามกรามสามารถทำให้แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกเกิดการเกาะกลุ่ม โดยอธิบายว่าเป็นเพราะเลคตินสามารถจับจำเพาะต่อ O-keto และ O-methyl ของน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติลของโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์เหล่านั้นได้

4. กุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguensis* มีชื่อสามัญว่า banana shrimp มีลำดับอนุกรมวิธานรายงานไว้ดังนี้ (Grey *et al.*, 1983) และแสดงไว้ในรูปที่ 5

Phylum Arthropoda

Superclass Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus Penaeus



รูปที่ 5 กุ้งแชบ๊วย (banana shrimp, *Penaeus merguensis*)

4.1 ชีวิตวิทยาและลักษณะทั่วไป

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดปานกลาง ตัวโตเต็มวัยมีขนาดลำตัวยาว 10-25 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 50-400 กรัม ลำตัวมีสีขาวยาวครีมนเปลืองมีจุดสีน้ำตาล เขียว แก่และเขียวอ่อนกระจายอยู่ เปลือกหุ้มลำตัวเรียบเป็นมัน ลักษณะเปลือกบาง เนื้อมาก มีเปลือกหัวหรือกรีส่วนบนเป็นรูปสามเหลี่ยม มีฟันทั้งด้านบนและด้านล่าง โดยฟันกรีด้านบนมีประมาณ 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 5-6 ซี่ เปลือกคลุมหัวมีร่องตามยาวและร่องตามขวาง มีแพนหาง ด้านข้างของหางไม่มีหนาม ลักษณะทั่วไปที่ต่างจากกุ้งกุลาดำหรือกุ้งกุลาลาย (green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus*) คือไม่มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดขวางลำตัวและเปลือกหัว หนวดคู่ที่หนึ่งมีแถบสีน้ำตาล หนวดคู่ที่สองสีน้ำตาลไม่มีแถบขวาง ขาเดินและขาว่ายน้ำมีสีเหลืองบางครั้งมีสีน้ำตาล หรือสีชมพู (Grey et al., 1983)

4.2 การแพร่กระจายและพฤติกรรมการกินอาหาร

พบกุ้งแชบ๊วยมากบริเวณน้ำตื้น ปากอ่าวหรือปากแม่น้ำที่น้ำค่อนข้างขุ่น บางครั้งจะพบอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก พบลูกกุ้งระยะหลังตัวอ่อน (post larva) และ juvenile ได้ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลตรงที่มีพื้นดินเลนหรือพื้นดินโคลนปนทราย โดยอาศัยอยู่ตั้งแต่ชายฝั่งจนถึงทะเลลึก พบทั้งในทะเลและเขตน้ำกร่อยที่มีความเค็มระหว่าง 10-36 ppt ส่วน pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.8-8.5 อุณหภูมิ 25-32 °C ตัวเต็มวัยจะวางไข่ในทะเลที่มีความลึกประมาณ 10 เมตรขึ้นไป การกระจายของกุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตอินโดแปซิฟิกฝั่งตะวันตก (West-Indopacific coast) ตั้งแต่อ่าวเปอร์เซีย ชายฝั่งทะเลปากีสถาน อินเดีย มาเลเซีย ไทย ตอนใต้ของจีน อินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย (วิวัฒน์ชัย พรหมสาขา ณ สกลนคร และ สมพร โล่สวัสดิ์กุล, 2532)

กุ้งแชบ๊วยมีนิสัยการกินอาหารแบบกัดแทะโดยจับชิ้นอาหารแล้วว่ายน้ำ กัดกินไปเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่ต่างจากกุ้งกุลาดำที่จับอาหารแล้วหยุดกัดกินอาหารหนึ่งอยู่กับที่ กุ้งแชบ๊วยปราดเปรียวและว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลาแม้แต่เวลาที่กินอาหาร อาหารธรรมชาติของกุ้งแชบ๊วยได้แก่ ตัวอ่อนสัตว์น้ำ แมลงน้ำ ซากพืช ซากสัตว์ สาหร่ายชนิดต่าง ๆ หอย ปลา ลูกกุ้ง ฟิชน้ำ (เมธี วิฒนสิงห์, 2543)

4.3 ประวัติและการพัฒนาการเพาะเลี้ยง

เป็นกุ้งชนิดแรกๆที่พบว่ามีกรเลี้ยงมาเป็นเวลานาน โดยเลี้ยงแบบธรรมชาติหรือที่เรียกว่า “วังกุ้ง” โดยเกษตรกรจะนำน้ำทะเลเข้าบ่อและปิดบ่อเลี้ยงไว้ อาศัยลูกกุ้งที่มากับน้ำทะเล กุ้งจะเจริญเติบโตจากการอาศัยอาหารธรรมชาติและการให้อาหารเสริมในบางโอกาส เมื่อกุ้งมีขนาดที่มีราคาก็จะจับขาย ต่อมาพบว่าลูกกุ้งที่ได้จากธรรมชาติลดน้อยลงทำให้ผลผลิตไม่คุ้มค่าจึงมีการเลี้ยงน้อยลงมาก แต่สำหรับประเทศไทย กรมประมงได้พยายามนำแม่พันธุ์กุ้งแชบ๊วยจากธรรมชาติมากระตุ้นให้วางไข่และผลิตลูกกุ้งปล่อยเสริมในธรรมชาติเพื่อเพิ่มปริมาณ

กุ้งแชบ๊วยในธรรมชาติ ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลแบบหนาแน่น (intensive farm) ได้มีความพยายามเลี้ยงกุ้งชนิดนี้เช่นกัน แต่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากกุ้งมีความอ่อนแอต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำและสภาพแวดล้อม มักจะทยอยตายและหายไปจากบ่อก่อนจะมีขนาดที่ขายได้ การเลี้ยงกุ้งชนิดนี้จึงเจียบหายไป ประกอบกับได้มีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลชนิดอื่น ๆ ด้วย พบว่ากุ้งกุลาดำสามารถเลี้ยงได้ง่ายกว่า ขนาดตัวโตกว่า และมีปัญหาในการเลี้ยงน้อยกว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างต่อเนื่อง และขยายตลาดได้ทั่วโลกจนประเทศไทยกลายเป็นประเทศที่ผลิตและส่งออกกุ้งกุลาดำได้สูงที่สุดในโลกยาวนานติดต่อกันหลายปี สำหรับประวัติการทดลองเพาะฟักกุ้งแชบ๊วยในประเทศไทยมีมากกว่า 25 ปี และปัจจุบันเมื่อพบว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวสูงสุด แต่ประสบปัญหาหลายประการโดยเฉพาะปัญหาโรคระบาด จึงเป็นจุดที่เริ่มมีการหันมาให้ความสนใจการเพาะฟักและการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นกุ้งพื้นเมืองกันอีกครั้ง (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543)

5. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย Vibrios (Vibriosis)

จากที่กล่าวมาข้างต้น ปัจจุบันลักษณะการเพาะเลี้ยงกุ้งได้ขยายตัวเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัดเจน กลายเป็นลักษณะของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเน้นการเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดจนบางครั้งเกิดสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีความหนาแน่นของจำนวนตัวกุ้งต่อพื้นที่เพาะเลี้ยงมากเกินไป ซึ่งสภาพการเลี้ยงเช่นนี้มักก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของกุ้งและสิ่งแวดล้อมได้ง่าย เนื่องจากการก่อให้เกิดสภาพเครียด สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงไม่ถูกสุขลักษณะ และเกิดการผลิตและสะสมของเสียจำพวกสารอินทรีย์และอนินทรีย์ต่าง ๆ ขึ้นอย่างมากมาย เป็นที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อต่าง ๆ เช่น เชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว และปรสิตต่าง ๆ เป็นต้น ทางภาครัฐไม่ว่าจะเป็นกรมประมงหรือกรมปศุสัตว์ รวมถึงนักวิจัยในหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงได้พยายามคิดค้นหาแนวทางในการป้องกันการเกิดโรค ตั้งแต่การตรวจสุขภาพลูกกุ้งก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยง ตลอดจนการตรวจสุขภาพในช่วงการเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีที่ปฏิบัติกันโดยทั่วไป (เพ็ญศรี บุญตามช่วย และ อรอนงค์ คงทวี, 2548) แต่ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งยังเกิดปัญหากุ้งติดเชื้ออยู่เสมอ พบว่าการระบาดของโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียกลุ่ม vibrios (*Vibrio*) ซึ่งพบบ่อยและเกิดได้ตลอดปี (Ruangpan and Kitao, 1991) เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของกุ้งในระดับตั้งแต่ค่อนข้างมาก (Lightner, 1988) ซึ่งการติดเชื้อ vibrios ต่าง ๆ อาจเรียก รวมกันว่าโรค vibrios (Vibriosis) โดยเฉพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *Vibrio splendidus*, *V. vulnificus*, *Vibrio damsala* และ *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo, 1990) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก

5.1 การแพร่ระบาดของโรค

การระบาดของโรคแบคทีเรียในกุ้งเลี้ยงมีรายงานมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1981 (พ.ศ. 2524) โดยพบว่ากุ้งลายเสือที่เลี้ยงในประเทศไทยญี่ปุ่น เกิดการติดเชื้อไวรัสโอเป็นจำนวนมาก (Takahashi *et al.*, 1984 อ้างอิงโดย Lightner, 1993) ต่อมาในปี ค.ศ. 1989 ได้มีรายงานพบการติดเชื้อไวรัสโอเป็นครั้งแรกในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) จากโรงเพาะฟักที่ประเทศเอกวาดอร์ หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1989 พบการระบาดของติดเชื้อไวรัสโอที่รุนแรงในเขตพื้นที่การเลี้ยงของประเทศเอกวาดอร์ ซึ่งเหตุการณ์ครั้งนี้ถูกบันทึกไว้เรียกว่า “sindroma gaviota” (sea gull syndrome, SGS หรือโรคคนนางนวล) เนื่องจากเหตุการณ์นี้ถูกบันทึกไว้เรียกว่า “sindroma gaviota” (sea gull syndrome, SGS หรือโรคคนนางนวล) เนื่องจากเหตุการณ์ที่ผู้เลี้ยงกุ้งสังเกตเห็นว่ามีฝูงนกทะเลจำนวนมากมาเกาะขอบบ่อ และลงไปกินกุ้งที่ตายในบ่อเลี้ยง (Mohney *et al.*, 1991) และมีการพบว่า *V. harveyi* และ *V. splendidus* เป็นสาเหตุการตายของลูกกุ้งในโรงฟักที่ประเทศฟิลิปปินส์ (Lavilla *et al.*, 1990)

เชื้อแบคทีเรียไวรัสโอมีการแพร่ระบาดทั่วไป ทั้งลูกกุ้งภายในโรงเพาะฟัก และกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการระบาดของโรค ได้แก่ ความเค็มของน้ำ การระบาดของโรคจะเกิดขึ้นมากในช่วงที่มีความเค็มสูง เนื่องจากเชื้อไวรัสโอสามารถเจริญได้ดีในระดับความเค็ม 20-30 ppt (Mohney *et al.*, 1991) นอกจากนี้ปริมาณสารอินทรีย์ที่สะสมอยู่มากในน้ำมีผลทำให้เชื้อไวรัสโอเจริญได้มากขึ้น (Lightner, 1993) ประกอบกับในสภาวะที่กุ้งเกิดความเครียด ทั้งที่มีสาเหตุมาจากคุณภาพน้ำ อาหาร การจัดการสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีการสะสมของสารอินทรีย์ปริมาณสูงในบ่อเลี้ยง มีผลทำให้กุ้งอ่อนแอและมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันลดต่ำลง ทำให้เชื้อแบคทีเรียที่มีจำนวนมากในบ่อเลี้ยงสามารถเข้าสู่ร่างกายกุ้งได้ง่าย (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2542)

5.2 โรคติดเชื้อไวรัสโอในตัวกุ้ง

เชื้อไวรัสโอหลายชนิด รวมทั้งเชื้อ *V. haveyi* ก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณอวัยวะภายใน เช่น ตับอ่อน ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ antennal gland และกล้ามเนื้อลาย (Brock and Main, 1994) หรือติดเชื้อทั่วร่างกาย (systemic infection) ซึ่งทำให้เนื้อเยื่ออวัยวะภายในถูกทำลาย เชื้อไวรัสโอจากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เข้าสู่ตัวกุ้งโดยเข้าไปอยู่ในทางเดินอาหารของกุ้ง ด้วยการกินอาหารหรือทางปาก และเนื่องจากตับ (hepatopancreas) และตับอ่อน (pancreas) ของกุ้งเป็นอวัยวะที่ติดต่อกับทางเดินอาหารส่วนหน้า ซึ่งอาหารจะถูกส่งมาย่อยต่อจากกระเพาะอาหารส่วนหลัง (pyloric chamber) โดยตับและตับอ่อนมีลักษณะเป็นท่อที่ขดอยู่ (Meglitsch and schram, 1991; Harrison and Corliss, 1992) แบคทีเรียจึงสามารถเข้าสู่ท่อตับและตับอ่อนได้ง่าย

อาการของกุ้งที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียไวรัสโอที่สามารถสังเกตเห็นได้ เช่น มีลักษณะพฤติกรรมผิดปกติ เชื่องซึม หลบซ่อนตัวบริเวณขอบบ่อเลี้ยง ไม่กินอาหาร กล้ามเนื้อลำตัวส่วนท้อง (abdomen) มีสีขาวขุ่น มีการกระจายของเม็ดสีลำตัวเข้มมากขึ้น ปริมาณเม็ด

เลือดลดต่ำลงมาก ตับอ่อนมีลักษณะสีฝอภายในมีของเหลวใส ในลูกกุ้งที่ติดเชื้อพบว่าตับอ่อนมีลักษณะขาวขุ่น (cloudiness) และอาจสังเกตเห็นก้อนสีดำ (melanized hemocytic nodule) บริเวณภายในตับอ่อน (Lightner, 1993; Brock and Main, 1994) ซึ่งแตกต่างจากตับอ่อนและตับอ่อนของกุ้งปกติที่มีสีน้ำตาลเข้มหรือสีเขียวและมีของเหลวภายในตับและตับอ่อน ในกรณีที่มีการติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย อาจพบว่ากุ้งที่ตายเกิดเรื่องแสงเมื่อสังเกตในห้องมืด ปัจจุบันนิยมตรวจสุขภาพกุ้งกรณีกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียโดยการใส่ลูป (loop) เพาะเชื้อไวรัสในตับและตับอ่อนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulphate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและมีโอกาสปนเปื้อนน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ (กิจการ, 2542) เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคในกุ้ง และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS เป็นอาหารที่จำเพาะต่อเชื้อกลุ่มนี้ซึ่งจะเติบโตได้ดี แต่ผลการวินิจฉัยบางกรณีพบว่า แม้กุ้งปกติที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อไวรัสจำนวนหนึ่งได้เช่นกัน (เพ็ญศรี บุญตามช่วย และ อรอนงค์ คงทวี, 2548) อีกวิธีคือศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาในกุ้งที่ติดเชื้อ พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อกลุ่มไวรัส อวัยวะภายในหลายส่วนทั้งตับอ่อนและต่อมน้ำเหลืองเกิดการตาย (necrosis) เม็ดเลือดมีการรวมตัวกันเป็นก้อนล้อมรอบกลุ่มเชื้อ เกิดการสร้างเมลาไนนรอบก้อนของเม็ดเลือด ในส่วนตับอ่อนพบว่าท่อของตับอ่อนถูกทำลาย เกิดการอักเสบ (inflammation) (กิจการ สุภมาตย์และคณะ, 2542)

6. แบคทีเรีย

6.1 *Vibrio harveyi*

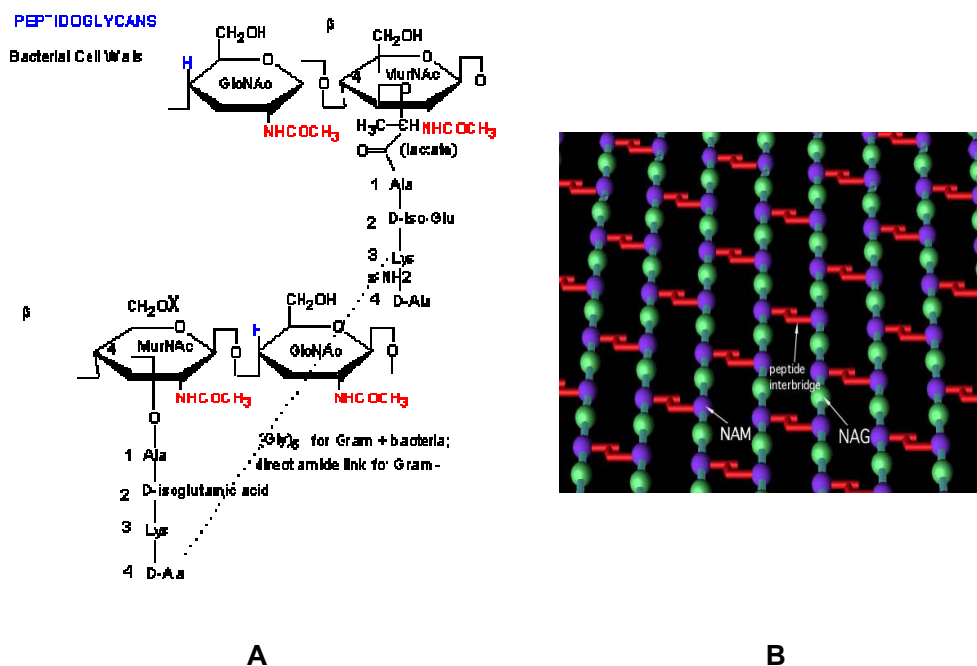
แบคทีเรีย *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (มณฑลเชียร สงเสริม และคณะ, 2533) และในลูกกุ้งแซบวัย (ดาร์ณี แซ่อยู่ และคณะ, 2530) เชื้อชนิดนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักในประเทศฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) และได้หวัน (Chen *et al.*, 1992) โดยเชื้อ *V. harveyi* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อลูกกุ้งพีเนียด (penaeid) ในโรงเพาะฟักในระยะตัวอ่อน (larvae) หลังตัวอ่อน (Lightner, 1988) และในกุ้งขนาดใหญ่ที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเลี้ยง (Nash *et al.*, 1992; Jiravanichpaisal and Miyazaki, 1994) จากการทดลองของ Le Groumellec และคณะ (1995) ซึ่งทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากลูกกุ้งพีเนียด ในโรงเพาะฟักที่เลี้ยงในประเทศไทยและประเทศเอกวาดอร์ พบว่าเป็น *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายจำนวนมากของลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก โดยพบว่า *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากกว่าที่พบในประเทศเอกวาดอร์ และยังตรวจพบเชื้อ *V. harveyi* ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างหนาแน่น (Ruangpan *et al.*, 1995)

จากการศึกษาของ ดาร์ณี แซ่อยู่ และคณะ (2530) ถึงสาเหตุการตายของลูกกุ้งแซบวัยในโรงเพาะฟัก พบว่าการตายของลูกกุ้งมักจะเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นการเรืองแสงช่วงกลางคืนในน้ำทะเลและพบอยู่ตามซากลูกกุ้งและลูกกุ้งที่มีชีวิต หลังจากทำการแยกเชื้อจาก

ลูกกุ้งแชบ๊วยที่ตายพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. harveyi* โดย มณฑิเยร ส่งเสริม และคณะ (2533) พบว่าอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* คือในระยะแรก ๆ ลูกกุ้งจะมีการเคลื่อนไหวช้าลงลำตัวสีขาวขุ่น ต่อมากุ้งจะเบืออาหารและตาย

เชื้อ *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* โดยอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เต็บโตได้ทั้งในสภาพที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน บางพวกต้องการเกลือหรือเกลือมีส่วนช่วยกระตุ้นการเติบโต ผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยทั่วไปเป็นโครงสร้างส่วนที่อยู่ใต้แคปซูล (capsule) หรือชั้นเมือก และอยู่นอกเยื่อหุ้มเซลล์ (cell plasma membrane) ผนังเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบ 20 % ของเซลล์ ประกอบด้วยเปปไทด์ (peptide) โพลีแซคคาไรด์และลิพิด ซึ่งมีองค์ประกอบย่อยแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ผนังเซลล์เป็นส่วนที่มีความแข็งแรงเนื่องจากมีโครงสร้างเป็นเปปทิโดไกลแคน

เปปทิโดไกลแคนเป็นโพลีเมอร์ขนาดใหญ่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นแกนกลาง (back bone) หรือสายไกลแคน (glycan strand) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์สองชนิดคือ NAcGlc หรือ NAG และ NAcMur หรือ NAM ต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) สลับกันตลอดสาย ส่วนที่สองเป็นเทตระเปปไทด์ (tetrapeptide) ซึ่งต่ออยู่กับ NAM โดยจับกับกรดอะมิโนต่าง ๆ เช่น แอล-อะลานีน (L-alanine) ดี-อะลานีน (D-alanine) ดี-กลูตามีน (D-glutamine) แอล-ไลซีน (L-lysine) และส่วนที่สามเป็นเปปไทด์อีกชุดหนึ่ง ซึ่งจะเชื่อมสายของโพลีแซคคาไรด์ที่ทอดขนานกัน (รูปที่ 6) โดยส่วนที่เป็นแกนกลางจะเหมือนกันหมดในแบคทีเรียทุกชนิด ส่วนที่เป็นเทตระเปปไทด์และเปปไทด์ที่เชื่อมระหว่างโพลีแซคคาไรด์จะแตกต่างกันในแต่ละชนิด เนื่องจากเปปทิโดไกลแคนทุกสายจะถูกเชื่อมกันทางขวาง ทำให้เปปทิโดไกลแคนชั้นต่าง ๆ ของแบคทีเรียเชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่โมเลกุลเดียว



รูปที่ 6 โครงสร้างของเปปทิโดไกลแคน

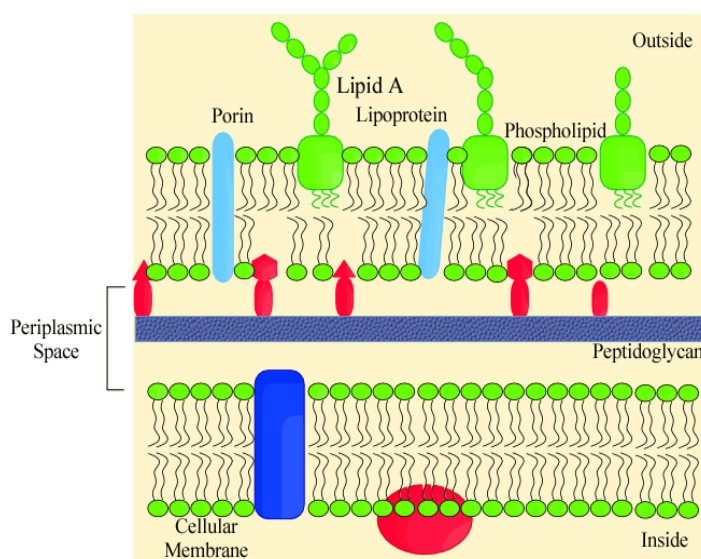
N-Acetyl muramic acid = NAM; NAcGlc = NAG

A หน่วยซ้ำๆ ของ NAM, NAG และเทอระเปปไทด์

B การเชื่อมต่อทางขวางระหว่างเปปทิโดไกลแคนสายที่อยู่ใกล้เคียงกัน

(<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/P/Peptidoglycan.html>, retrieved March 25, 2008; <http://en.wikipedia.org/wiki/Peptidoglycan>, retrieved April 13, 2008)

สำหรับผนังเซลล์ของเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างประกอบด้วยเยื่อชั้นนอกซึ่งมีโครงสร้างเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และโปรตีนน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ามีลิโปโพลีแซคคาไรด์ด้วย ส่วนที่ถัดเข้ามาจากเยื่อชั้นนอก คือชั้นเปปทิโดไกลแคนซึ่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเยื่อชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่าเพอริพลาสมิกสเปซ (periplasmic space) ส่วนสุดท้ายที่ถัดเข้ามาจากชั้นเพอริพลาสมิกสเปซ คือเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งประกอบด้วยลิปิดและโปรตีน (รูปที่ 7) การติดเชื้อมาก่อนโรด *V. harveyi* ของกุ้งที่เพาะเลี้ยง ก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ การศึกษาผลของเชื้อ *V. harveyi* ต่อเลคตินจึงมีความสำคัญในการเข้าใจถึงการตอบสนองของกุ้งแซบวัยต่อเชื้อก่อโรดกุ้งได้ต่อไป



รูปที่ 7 ผังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

(<http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook>,

retrieved March 25, 2008)

6.2 *Vibrio vulnificus*

เชื้อ *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แท่งสั้น มี polar flagellum เป็นแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ชนิดหนึ่งซึ่งมักถูกเรียกว่า halophilic คือต้องการเกลือในการดำรงชีวิต (http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/vibriov_gi.html, retrieved March 25, 2008) โดยความเค็ม 10-20 ppt และที่อุณหภูมิ 30-35 °C เป็นภาวะที่เชื้อเติบโตได้ดี การเลี้ยงกึ่งที่หนาแน่นมากๆ จนความเค็มลดลงติดต่อกันเป็นเวลานาน จะทำให้กึ่งติดเชื้อชนิดนี้ ซึ่งก่อให้เกิดโรคเสี้ยนดำ คือเกิดอาการอักเสบและเนื้อเยื่อต่างๆ มีลักษณะเป็นรูปร่างคล้ายเสี้ยนหรือก้อนเล็กๆ สีเหลืองน้ำตาล บริเวณกล้ามเนื้อและเปลือกกุ้งโดยรอยต่อระหว่างเปลือกแต่ละปล้องหรือบริเวณใต้แพนหาง เมื่อแกะเปลือกออกจะพบแผ่นแบนๆ อาจมีรูสีดำหรือน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอนใต้เปลือกด้านใน บางตัวจะพบลักษณะเป็นเสี้ยนดำฝังลึกลงไปใต้อาหารเนื้อ เมื่อนำกุ้งไปต้มให้สุกจะเห็นเสี้ยนดำในกล้ามเนื้อได้ชัดเจน เนื่องจากบริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกแต่ละปล้องจะเป็นส่วนที่บอบบางของชั้นเปลือกที่แบคทีเรียสามารถที่จะเข้าไปได้ง่ายกว่าบริเวณอื่นๆ (ชาญณรงค์ รอดคำ, 2550) ที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งเองคือเมื่อกุ้งติดเชื้อ *V. vulnificus* จะทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดผลิต กราโนลูล กระตุ้นให้เกิดเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากขึ้นและเกาะติดแน่นมากเพื่อดักจับเชื้อโรค

ในขณะที่เดียวกันจะมีการสร้างเมลานินขึ้น ทำให้ตำแหน่งเนื้อเยื่อนั้นมีสีดำ สีดำจะฝังอยู่ในเนื้อ แม้กุ้งจะลอกคราบไปแล้วจะไม่เห็นจุดบนเปลือก แต่เส้นยังคงฝังอยู่ภายใน ซึ่งถ้าแบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่จะทำการอักเสบเพิ่มขึ้น ทำให้กุ้งกินอาหารได้น้อยลง ส่วนใหญ่แบคทีเรียชนิดนี้ไม่ทำให้กุ้งตาย แต่ทำให้กุ้งเสียคุณภาพ (ชะลอ ลัมสุวรรณ, 2531) การหลีกเลี่ยงการติดเชื้อ *V. vulnificus* ทำได้โดยเลี้ยงกุ้งไม่ให้หนาแน่นเกินไป และระวังเรื่องความเค็มของน้ำต่ำ

เมื่อบริโภคกุ้งหรืออาหารทะเลอื่นๆ ที่ติดเชื้อ *V. vulnificus* จะทำให้เกิดโลหิตเป็นพิษ (septicemia) เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่กระแสโลหิตโดยผ่านทางเยื่อทางเดินอาหารที่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบหรือผ่านทางบาดแผล (wound infection) จะทำให้มีอาการไข้ หนาวสั่น อ่อนเพลีย ความดันต่ำ อาจมีอาการอุจจาระร่วง อาเจียน อาการโลหิตเป็นพิษนี้พบอัตราการป่วยตายสูงถึง 75% ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* จากการรับประทานอาหารทะเลดิบที่สำคัญคือหอยนางรม และทางบาดแผลที่สัมผัสกับเชื้อในแหล่งน้ำ ปริมาณเชื้อ 10^3 เซลล์ ในอาหาร 1 กรัม สามารถก่อให้เกิดโรคได้ ในการติดเชื้อที่บาดแผล เชื้อสามารถลุกลามอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดเนื้อเยื่ออักเสบ ผิวหนังมีอาการบวม ร้อนแดง เจ็บปวด อาจกลายเป็นตุ่ม จนเกิดอาการเนื้อเน่าตายของเนื้อเยื่ออ่อนใต้ผิวหนัง นอกจากนี้การรับประทานอาหารทะเลดิบทำให้อุจจาระร่วง อาเจียน ภาวะพิษอาหารและลำไส้อักเสบ (ศรีวรรณ หทัยานานนท์ และคณะ, 2549)

6.3 แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*

แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในวงศ์เดียวกับแบคทีเรีย *V. cholerae* เป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (Luo, 2006) เจริญได้ดีในอาหารและน้ำเค็ม ที่มีเกลือ 2-8% มีมากตามชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งฝั่งทะเลไทย พบสัตว์ทะเลมีเชื้อนี้ปะปนอยู่มาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะห้องปฏิบัติการอ้างอิงได้ดำเนินการเฝ้าระวังโรคติดต่อทางอาหารและน้ำที่เกิดจากเชื้อกลุ่มวิบริโอในประเทศไทย พบผู้ป่วยภาวะพิษอาหารและลำไส้อักเสบจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงเป็นอันดับหนึ่ง ประมาณปีละ 1,000-2,000 ราย สาเหตุจากการรับประทานอาหารทะเลสุกๆ ดิบ ๆ จากอาหารทะเล (ศรีวรรณ หทัยานานนท์, 2549) ผู้ป่วยมักมีอาการหลังรับประทานอาหารที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* อยู่ 10 - 20 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อนี้มีปริมาณมากพอ โดยเชื้อจะเติบโตเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุก 12 - 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C และสร้างสารพิษขึ้นในลำไส้ เชื้อ *V. parahaemolyticus* จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60 °C ในเวลา 15 นาที

6.4 แบคทีเรีย *Vibrio cholerae*

V. cholerae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น ปลายโค้งเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์ (spore) เติบโตได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 16-42 °C แต่เติบโตได้ดีที่สุดที่ 37 °C และที่

pH 6.4-9.6 (Wolin, 1973) พบ *V. cholerae* แพร่กระจายทั่วไปในแหล่งน้ำทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย บริเวณปากแม่น้ำหรือแถบชายฝั่งทะเล (Colwell *et al.*, 1977) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบในอาหารทะเลหรือสัตว์ทะเลที่มีเปลือกหุ้ม (Dalsgaard *et al.*, 1995) จากการศึกษาคopepod ซึ่งเป็นแพลงก์ตอนสัตว์พบว่า เป็นแหล่งที่พบเชื้อ *V. cholerae* ได้มากที่สุดโดยจะสะสมอยู่ที่บริเวณปากและรังไข่ (Huq *et al.*, 1983) นอกจากนี้อาจพบได้ในส่วนของทางเดินอาหาร เชื้อสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในไคติน (chitin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสัตว์ทะเล ไคตินยังช่วยป้องกันเชื้อในภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด เช่นในระบบทางเดินอาหารของคน *V. cholerae* สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) เพื่อช่วยย่อยสลายไคตินและเพื่อเกาะติดกับระบบทางเดินอาหารของคน (Nalin *et al.*, 1979)

V. cholerae เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรคในคน การติดเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ้าร่างกายสูญเสียน้ำและเกลือแร่มากผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ (Kamruzzaman and Nishibuchi, 2008)

6.5 แบคทีเรีย *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในลำไส้ใหญ่หรืออุจจาระของคนและสัตว์หลายชนิด *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เต็มโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ปกติเป็น normal flora อยู่ในลำไส้ หากเชื้ออยู่ในลำไส้จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อเข้าไปอยู่ในอวัยวะส่วนอื่นที่ไม่ใช่ลำไส้เชื้อจะก่อให้เกิดโรคได้ เช่น ในปอด ในช่องท้อง ในเยื่อหุ้มสมอง โดยเชื้อจะก่อให้เกิดการอักเสบกับอวัยวะดังกล่าว *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคท้องร่วงได้ เนื่องจาก *E. coli* อยู่ในลำไส้และออกมากับอุจจาระ

7. ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV)

WSSV เป็นโรคติดเชื้อในกุ้งที่มีความรุนแรงมากและสามารถแพร่กระจายได้ในบริเวณกว้าง ลักษณะอาการภายนอกของกุ้งที่ติดโรคคือสีตัวซีดในช่วงแรกๆ แล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดงเรื่อ ๆ พบจุดขาวบริเวณด้านล่างของเปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว กุ้งจะกินอาหารลดลงและทยอยตายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อาจตายมากถึง 100% ภายใน 3-10 วัน รายงานโรคชนิดนี้ครั้งแรกพบในกุ้งลายเสือที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น โดยพบว่าเกิดขึ้นในฟาร์มที่นำลูกกุ้งมาจากประเทศจีน (Nakano *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994) หลังจากนั้นมียางานการระบาดของโรสดังกล่าวอีกหลายภูมิภาคโดยมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป ในประเทศไทยพบการระบาดในกุ้งกุลาดำเมื่อปลายปี พ.ศ.2537 (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) นอกจากนี้กุ้งที่กล่าวมายังพบการระบาดในกุ้ง greasyback (*Metapeneus ensis*) และในครัสเตเชียนหลายชนิด ทั้งในธรรมชาติ บ่อเลี้ยงและห้องปฏิบัติการ แต่ระดับความรุนแรงอาจไม่สูงมาก (Momoyama *et al.*, 1995) นอกจากนี้ประเทศในแถบเอเชียแล้วการระบาดของโรสดังกล่าวยังพบ

ได้ในบางประเทศของทวีปอเมริกาใต้ เช่น ปานามา เอกวาดอร์ ชิลี และในทวีปอเมริกาเหนือ (Pantoja and Lightner, 2003)

จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลและเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า WSSV เป็นไวรัสชนิด ดีเอ็นเอ (DNA) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Baculovirus มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ กรดนิวคลีอิกและ โปรตีน อวัยวะเป้าหมายของเชื้อนี้คือเนื้อเยื่อไตเปลือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อบุผิวเหงือก กระเพาะอาหาร ต่อมน้ำเหลือง แอ่งเลือด และหัวใจ (Takahashi *et al.*, 1994)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เลคตินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะด้วยคอลัมน์ Feuin-agarose 2 ครั้ง
2. เพื่อศึกษาการกระจายของเลคตินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย
3. เพื่อศึกษาการตอบสนองของเลคตินตามเวลาหลังการฉีดกุ้งด้วย
Vibrio harveyi
4. เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ที่เหมาะสมที่ทำให้แอกทีวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้น
5. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงแอกทีวิตีของเลคตินที่เป็นผลมาจากการฉีดเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรคในกุ้งแชบ๊วย

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษาคือ กุ้งแชบ๊วยที่มีขนาดลำตัวยาว 10 - 14 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 30 - 40 กรัม และอยู่ในระยะคราบแข็ง (ไม่อยู่ในระยะลอกคราบ) จับจากทะเลอันดามัน (จังหวัดนครศรีธรรมราช) แล้วนำมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 500 ลิตร ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กระต่ายที่ใช้ศึกษาเม็ดเลือดแดงเป็นกระต่ายขาวตาแดงสายพันธุ์ New Zealand น้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม อายุ 1 ปี ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

2. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade สั่งซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Fluka
Agar	BD-Biosciences
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Fluka
Bisacrylamid (N,N'-methylendiacylamide)	Fluka
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol blue	Merck
Carboxymethyl-cellulose	Sigma
Coomassie plus protein assay reagent kit	Pierce
Ethanol	BDH
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka
Fetuin-agarose	Sigma

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Sigma
Glycine	Fluka
Heparin	Difco Laboratories
Hydrochloric acid	Merck
Potassium chloride	Carlo Erba
laminarin	Sigma
Low molecular weight standard	Amersham Pharmacia
β -Mercaptoethanol	Fluka
Methanol	Merck
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	Sigma
Phenylmethylsulphonyl fluoride	Fluka
Plate count agar	Difco Laboratories
Potassium phosphate	Baker analyzed
Silver staining kit	Bio-Rad
Sodium chloride	Fluka
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de Haen
Sodium hydroxide	Fluka
Thiosulphate citrate bile salt sucrose agar	HiMedia
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma
Tryptic soy broth	BD-Biosciences

3. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-5	Mettler
Autoclave	-	Hirayama
Centrifuge	5415C, 5804R	Eppendorf
Centrifuge	Avanti J-30I	Beckman Coulter
Hot plate	-	EGD

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
Incubator	1510E	Shel lab
Micropipette	-	Eppendorf, Gilson
Microtiter plate	-	Nunc
Microtube pump MP-3	MP-3N	Eyela
Orbital shaker	OS 20	Boeco
pH meter	Accumet 15	Fisher Scientific
Power supply	1000/500	Bio-Rad
Slab gel electrophoresis apparatus	AE-6400	Atto
UV-VIS spectrophotometer	160A	Shimadzu
Vortex	G-560E	Scientific- Industries
Water bath	WB-170M	Optima

วิธีการ

1. การเตรียมซีรัมจากฮีโมลิมพ์ของกึ่งแซบวัย

ดูดฮีโมลิมพ์จากกึ่งแซบวัยทันทีหลังจับขึ้นมาด้วยกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณ pericardium หรือขาเดินคู่ที่ 3 เก็บฮีโมลิมพ์ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ฮีโมลิมพ์แข็งตัว นำใส่หลอด homogenizer ทำการโฮโมจีไนส์ (homogenize) หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที เก็บส่วนใสหรือซีรัมไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดจากเนื้อเยื่อของกึ่ง

ในการทดลองหาแอกทิวีทีของเลคตินทำการสกัดเนื้อเยื่อโดยตัดเนื้อเยื่อจากกึ่งไปชั่งน้ำหนักแล้วนำใส่หลอด homogenizer เติม TBS-Ca (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 0.1 M NaCl และ 50 mM CaCl₂) โดยใช้อัตราส่วนเนื้อเยื่อ 1 กรัม : TBS-Ca 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการโฮโมจีไนส์ ดูดใส่หลอด eppendorf ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกตะกอนและไขมันทิ้งไป นำส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดเนื้อเยื่อแบ่งใส่หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร และนำไปหาแอกทิวีทีทันที

3. การเตรียมสารสกัดฮีโมไซท์ (hemocyte lysate, HLS)

ดูดฮีโมลิมป์จากบริเวณ pericardium หรือขาเดินคู่ ที่ 3 ของกุ้งแช่บ๊วย แล้วผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว [salt anticoagulant, 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), pH 7.3, 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)] ปริมาตร 1 : 2 เท่า จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 5 นาที แล้วดูดแยกส่วนใสและเม็ดเลือดออกจากกัน ล้างเม็ดเลือดด้วยการแขวนลอยในสารกันเลือดแข็งตัว เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง ดูดส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้ในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำไปเก็บที่ -80 °ซ เพื่อรอใช้ศึกษาต่อไป หรือทำเป็น HLS โดยทำให้เม็ดเลือดแตกด้วยวิธี freeze-thaw จากนั้นเตรียมต่อโดยแขวนลอยใน TBS-Ca ในสัดส่วนฮีโมลิมป์ก่อนผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว 1 ส่วน ต่อ TBS-Ca 2 ส่วน ผสมให้เข้ากันเพื่อทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง กระจายต่อไป

4. การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างด้วยชุดหาโปรตีน (Coomassie plus protein assay reagent kit) จากบริษัท Pierce ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่างปริมาณที่เหมาะสม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายชุดหาโปรตีน 1 มิลลิลิตร โดยทำควบคู่ไปกับ BSA (bovine serum albumin) จากบริษัท Pierce ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเจือจาง BSA ให้มีปริมาณโปรตีน 2-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

5. การทดสอบสมบัติในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระจายของเลคติน

ดูดเลือดจากกระต่าย นำไปผสมกับเฮพาริน (heparin) เพื่อกันเลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ นาน 5 นาที แล้วล้างเม็ดเลือดแดงด้วย TBS-Ca โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม 3 ครั้ง แขวนลอยเม็ดเลือดแดงใน TBS-Ca ให้มีความเข้มข้น 2% แล้วนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงตามวิธีของ Kilpatrick และ Yeoman (1978) โดยผสมสารละลายเลคตินที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ (1:2 serial dilution) 25 ไมโครลิตร กับ 2% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 25 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS-Ca แทนสารละลายเลคติน

แอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating activity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์ (titer) ที่เป็นค่าการเจือจางสูงสุดของสารละลายเลือด ซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้สมบูรณ์ ดังตัวอย่างเช่น ถ้าไตเตอร์มีค่า 1:8 แอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์มีค่า 8 หน่วยต่อปริมาตรสารละลายเลือดที่ใช้ 25 ไมโครลิตร โดยใช้เม็ดเลือดแดงกระต่ายความเข้มข้น 2 % ปริมาตรอีก 25 ไมโครลิตร รวมเป็น 50 ไมโครลิตร หรือถ้าใน 100 ไมโครลิตร จะมีสารละลายเลือดอยู่ 50 ไมโครลิตร แสดงว่าถ้าสารละลายเลือดรวมกับสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 1 มิลลิเมตร สามารถคำนวณหาแอกทิวิตีของเลือดได้คือ

$$\begin{aligned} \text{แอกทิวิตีของเลือด} &= \frac{\text{titer} \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (1 ml)}}{\text{ปริมาตรสารละลายเลือด}} \\ &= \frac{8 \text{ หน่วย} \times 1,000 \text{ ไมโครลิตร}}{50 \text{ ไมโครลิตร}} \end{aligned}$$

$$\text{แอกทิวิตีของเลือดในสารตัวอย่างนี้} = 160 \text{ หน่วย/มิลลิเมตร (U/ml)}$$

ส่วนแอกทิวิตีที่จำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (specific hemagglutinating activity, U/mg) มีค่าเป็นแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

6. การศึกษาผลการยับยั้งของลามินารินต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลือด

เจือจางสารละลายเลือดให้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกาะกลุ่ม 32 หน่วย ใช้เลือดที่เจือจาง 25 ไมโครลิตร ผสมกับลามินาริน (laminarin) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในช่วง 0-100 mg/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารแขวนลอยเม็ดเลือดแดงกระต่าย 4% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากการทดลองนี้คำนวณหาความเข้มข้นของลามินารินที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายโดยเลือดได้ 100%

7. การศึกษาการกระจายของเลือดในเนื้อเยื่อต่าง ๆ

เพื่อศึกษาการกระจายของเลือดในเนื้อเยื่อต่าง ๆ นอกเหนือไปจากในฮีโมลิมพ์ ทำการวัดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลือดในตัวอย่างจากฮีโมลิมพ์ ซึ่งได้แก่ ซีรัมและในสารสกัดฮีโมไซท์ รวมทั้งในสารสกัดเนื้อเยื่อต่าง ๆ คือ ตับ, หัวใจ, กล้ามเนื้อ, ลำไส้, กระเพาะ และรังไข่

8. การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

(Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 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	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.82 ml	1.07 ml	0.47 ml

8.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

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

8.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris - 0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของโบรโมเฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่าง ปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลไปย้อมสี

8.3 การย้อมสีโปรตีนแบบซิลเวอร์ (Silver staining)

หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำเจลไปตรึงโปรตีนด้วย 40% เมทานอล (methanol) -10% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลาย 10% เอทานอล (ethanol) -5% กรดน้ำส้ม นาน 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นใช้ชุดย้อมซิลเวอร์ (silver staining kit) ของบริษัท Bio-Rad โดยเติมสารละลายออกซิไดเซอร์ (oxidizer solution) เขย่านาน 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน (deionized water) ครั้งละ 5 นาที จนกระทั่งสี

เหลืองในเจลหมดไป จากนั้นแช่เจลในน้ำยาซิลเวอร์ (silver reagent) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำ
 ปลอดภัยออน นาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีวีโอเปอร์ (developer) เขย่าและเปลี่ยน
 สารละลายเมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ และเมื่อปรากฏแถบของโปรตีน หยุด
 ปฏิกริยาด้วย 5% กรดน้ำส้ม

9. การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกึ่งแซบวัย

เมื่อทำการแยกเลคตินจากซีรัมของกึ่งแซบวัยโดยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ
 ด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ตามวิธีของ Rittidach และคณะ (2007) พบว่ายังไม่สามารถแยก
 ได้เลคตินบริสุทธิ์ งานวิทยานิพนธ์จึงได้ลองทำให้เลคตินบริสุทธิ์ต่อโดยการผ่านคอลัมน์ Fetuin-
 agarose ที่ไม่เคยใช้งานอีกครั้ง รวมเป็น 2 ครั้ง

9.1 การแยกเลคตินจากซีรัมโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1

เตรียมคอลัมน์ Fetuin-agarose ที่มีขนาด 1.2 x 18 เซนติเมตร มีปริมาตรเจล
 22 มิลลิลิตร ซึ่งปรับให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 0.3 M NaCl และ 0.1 M
 CaCl₂ (Tris-NaCa) ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์

นำซีรัม 6.5 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ผ่านลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose
 แล้วล้างคอลัมน์ด้วย Tris-NaCa ให้มีอัตราไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ
 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) จนค่า A280 เข้าใกล้
 ศูนย์ แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M NAcGlc ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ด้วย
 อัตราเร็วและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 ไดอะไลซ์
 (dialyse) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 - 0.15 M NaCl (TBS) แล้วทดสอบความสามารถในการเกาะ
 กลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่าย รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ด
 เลือดแดงสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดย CM-cellulose ไดอะไลซ์ใน TBS แล้วนำไปทดสอบ
 ความบริสุทธิ์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (ตามวิธีการข้อ 8)

9.2 การแยกสารละลายเลคตินต่อโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 2

นำสารละลายเลคตินที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1 ปริมาณ
 โปรตีน 0.46 มิลลิกรัม ซึ่งมีแอกทิวิตีของเลคตินสูง ผ่านลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ที่
 ไม่เคยใช้งานอีกครั้ง ซึ่งมีปริมาตรเจล 10 มิลลิลิตร และได้ปรับคอลัมน์ให้สมดุล รวมทั้งทำการ
 แยกเหมือนกับข้อ 9.1 จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M NAcGlc ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 25
 มิลลิลิตร ด้วยอัตราเร็วและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า
 A280 ไดอะไลซ์ใน TBS แล้วทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่าย
 รวมสารละลายหลอดที่มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงเข้าด้วยกัน ทำให้

เข้มข้นโดย CM-cellulose แล้วนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีโพสอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

10. การเตรียมจุลชีพ

เพื่อศึกษาผลของการฉีดด้วยแบคทีเรียและไวรัสที่มีต่อระดับแอนติบอดีของเลคติน จุลชีพที่ใช้ได้แก่แบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* แบบ active และ inactive แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค *E. coli* และ *V. cholerae* และไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (WSSV) โดยทำการฉีดจุลชีพเหล่านี้ในกุ้งที่คัดขนาดเท่าๆ กัน ด้วยปริมาณเซลล์จุลชีพเท่ากัน โดยศึกษาปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่เหมาะสมที่มีผลทำให้ระดับของเลคตินในฮีโมลิมฟ์เปลี่ยนแปลง เพื่อเป็นตัวกำหนดปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่จะใช้

10.1 การเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA)

10.1.1 การเตรียม *V. harveyi*

แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดลองคือ *V. harveyi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง TSA ที่มี 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารชนิดเดิม โดยนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ 1 โคลน (single colony) เกลี่ยด้วยไม้พินสำลีลงบนอาหารจนทั่วเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ชะเชื้อออกจากเพลทโดยเขี่ยด้วยไม้พินสำลีล้างเซลล์แบคทีเรียในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างตะกอนสามครั้ง และเตรียมแบคทีเรียในน้ำเกลือให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.6-2.0 หน่วย นับจำนวนโคลน ให้อยู่ในช่วงปริมาณเชื้อที่ต้องการ โดยเจือจางเชื้อในน้ำเกลือด้วยอัตราส่วน 1:10 ตามลำดับ ดูดสารแขวนลอยที่ได้อย่างละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ย (spread) บนจานอาหารที่มี plate count agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อ จากจานอาหารที่มีจำนวนโคลน 30-300 โคลน หลังจากทราบจำนวนโคลนที่แน่นอนแล้ว สามารถคำนวณหาปริมาณเชื้อที่ต้องการฉีดเข้าตัวกุ้งได้

ทำให้ *V. harveyi* inactive โดยนำสารแขวนลอย *V. harveyi* แบบ active ที่มีปริมาณเชื้อ 5×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วแขวนลอยตะกอนแบคทีเรียใน TBS ที่มี 0.1% thimerosal บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ค้างคืน และทำการล้างตะกอนแบคทีเรียในน้ำเกลือ แล้วละลายกลับให้มีปริมาตรเท่ากับเริ่มต้น หลังเตรียมเชื้อสามารถเก็บเชื้อไว้ใช้ได้ภายในเวลา 3 วัน แต่ในการทดลองครั้งนี้เชื้อที่เตรียมได้ฉีดเข้าตัวกุ้งทันที

10.1.2 การเตรียม *V. cholerae*

แบคทีเรีย *V. cholerae* ที่ใช้ในการทดลอง ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง TSA ที่มี 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 ชั่วโมง แล้วทำต่อเช่นเดียวกับ *V. harveyi* ที่ active

10.1.3 การเตรียม *E. coli*

แบคทีเรีย *E. coli* ที่ใช้ในการทดลอง ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง TSA ที่มี 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 ชั่วโมง แล้วทำต่อเช่นเดียวกับ *V. harveyi* ที่ active

10.2 การเลี้ยง *V. harveyi* ในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB)

แบคทีเรีย *V. harveyi* ที่ใช้ทดลอง ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดย streak แบคทีเรียด้วยลูปสำหรับเชื้อบนอาหาร TSA ที่มี 1.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ 1 โคลนนี้ เลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ที่มี 1.5% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (stock) แล้วเพิ่มปริมาณเชื้อโดยดูดสารแขวนลอยของหัวเชื้อใส่ในอาหารเหลวชนิดเดิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียที่ได้ และนับจำนวนเซลล์เพื่อเตรียมความเข้มข้นที่ต้องการ

10.3 การเตรียมไวรัส WSSV

WSSV ที่นำมาทดลอง ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งมีวิธีการเตรียมหัวเชื้อ WSSV โดยดัดแปลงจาก กิจการศุภมาตย์ และคณะ (2542) คือ ตัดเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก หัวใจ ผิวใต้เปลือกและต่อมน้ำเหลืองของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มาบดให้ละเอียดใน TBS ในอัตราส่วน 1: 2 (น้ำหนักเนื้อเยื่อ: ปริมาตร TBS) แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรอง (0.45 ไมครอน) เพื่อกำจัดแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนออกไป แล้วเก็บ WSSV ไว้ที่ -70 °C จนกว่าจะนำมาใช้

WSSV ที่ใช้ฉีดกุ้งเตรียมโดยเจือจางเชื้อ WSSV จากที่กล่าวข้างต้นให้มีความเข้มข้น 1×10^{-5} เท่าของหัวเชื้อใน TBS เพื่อใช้ฉีดกุ้งต่อไป

11. การหาปริมาณ *V. harveyi* และเวลาที่ส่งผลทำให้ระดับแอกทีวิตีของเลคตินในซีรัมเปลี่ยนแปลง

11.1 การศึกษาระดับเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่าง ๆ หลังการฉีด *V. harveyi*

เลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในถังพลาสติกกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไว้เรียบร้อยแล้ว มีน้ำทะเลประมาณครึ่งถัง ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์

โดยนำกุ้งที่ตัดขนาดใกล้เคียงกันซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 30-40 กรัม ลงเลี้ยงในถัง ถังละ 4-5 ตัว ให้อาหารทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถังประมาณ 3 วัน โดยสังเกตว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ความเข้มข้น 3×10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดเข้ากุ้งแซบวีย ที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหางเพื่อกระตุ้นให้ติดโรค โดยดัดแปลงวิธีการของ Martin และคณะ (1993) สำหรับกุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน แล้วเจาะฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแต่ละตัวที่เวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, 18, และ 24 ชั่วโมง หลังการฉีด นำฮีโมลิมฟ์ไปหาแอกทีวิตีของเลคตินโดยวิธีทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเพื่อศึกษาระยะเวลาที่ระดับเลคตินเปลี่ยนแปลงหลังการฉีด

11.2 การศึกษาระดับเลคตินในซีรัมเมื่อฉีดด้วย *V. harveyi* ปริมาณต่างๆ

ในการหาปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่เหมาะสมที่ทำให้ระดับแอกทีวิตีของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแซบวียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขั้นต้นได้ทดลองใช้เชื้อจากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ดังนี้ เตรียมกุ้งสำหรับฉีดเชื้อในทำนองเดียวกันกับวิธีข้อ 11.1 โดยเลี้ยงไว้ในถังพลาสติกกลม จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ความเข้มข้นต่างๆ คือ 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , และ 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ฉีดเข้ากุ้งแซบวียที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน แล้วเจาะฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแต่ละตัวที่เวลาต่างๆ คือ เก็บฮีโมลิมฟ์ของกุ้งก่อนการฉีด (เวลา 0 ชั่วโมง) ที่ 6, 12, และ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด นำฮีโมลิมฟ์ไปหาแอกทีวิตีของเลคตินโดยวิธีทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย พบว่าการฉีด *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^7 เซลล์ต่อตัวกุ้ง มีผลทำให้แอกทีวิตีของเลคตินเพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นทำการฉีดกุ้งอีกชุดด้วยเชื้อ *V. Harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารชนิดเดิม ความเข้มข้นดังนี่คือ 5×10^7 , 5×10^8 , 5×10^9 และ 5×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และฉีดกุ้งด้วยน้ำเกลือเป็นชุดควบคุม จากนั้นเจาะฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแต่ละตัวที่เวลา 0, 6, 12 ชั่วโมง หลังการฉีด เปรียบเทียบระดับแอกทีวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งแซบวียทั้งสองชุดการทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมที่ทำให้กุ้งติดเชื้อได้ดี ไม่ทำให้กุ้งตายภายใน 12 ชั่วโมง และมีการเปลี่ยนแปลงระดับเลคตินในซีรัมที่เห็นชัดเจน

ส่วนการทดลองโดยใช้เชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ทำการทดลองวิธีเดียวกับวิธีข้างต้น โดยนำเชื้อมาเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 และ 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร นำไปฉีดเข้าตัวกุ้ง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และฉีดกุ้งด้วยน้ำเกลือเป็นชุดควบคุม หลังจากนั้นเจาะฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแต่ละตัวที่เวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, และ 18 ชั่วโมง และนำมาทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ระดับแอกทีวิตีของเลคตินเปลี่ยนแปลง

12. การศึกษาผลของการฉีดจุลชีพชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อระดับแอนติบอดีของเลคตินในซีรัม

เพื่อทดสอบความจำเพาะของเลคตินที่ตอบสนองต่อจุลชีพต่างชนิด จุลชีพที่ใช้ในการฉีดกึ่ง ใต้แก่แบคทีเรียก่อโรคนก V. *harveyi* แบบ active และ inactive แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคนกคือ V. *cholerae* และ E. *coli* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA รวมทั้งไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว WSSV โดยทำการทดลองทำนองเดียวกับ V. *harveyi* แบบ active คือฉีดแบคทีเรียปริมาณ 5×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ระดับเลคตินเปลี่ยนแปลงมาก ส่วนไวรัส WSSV ใช้ความเข้มข้น 1×10^{-5} เท่าของหัวเชื้อ ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ฉีดที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง จากนั้นนำกึ่งไปเลี้ยงต่อตามปกติ เก็บฮีโมลิมพ์ของกึ่งก่อนการฉีด (เวลา 0 ชั่วโมง) และหลังการฉีดที่ 6 และ 12 ชั่วโมง และตรวจวัดแอนติบอดีของเลคตินในซีรัม เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีของเลคตินของกึ่งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อจุลชีพแต่ละชนิดกับของชุดควบคุม

นอกจากนี้ได้วัดแอนติบอดีของเลคตินในสารสกัดเนื้อเยื่อตับควบคู่กับซีรัม เพื่อศึกษาแอนติบอดีของเลคตินในเนื้อเยื่อตับที่เปลี่ยนไปในกึ่งที่ฉีดจุลชีพชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับของกึ่งชุดควบคุมที่ไม่ฉีดจุลชีพ

13. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในข้อ 11-12 ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าผิดพลาดมาตรฐาน (mean \pm S.E.) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ T-test จากโปรแกรม simple interactive statistical analysis (SISA) (Steel and Torrie, 1980)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

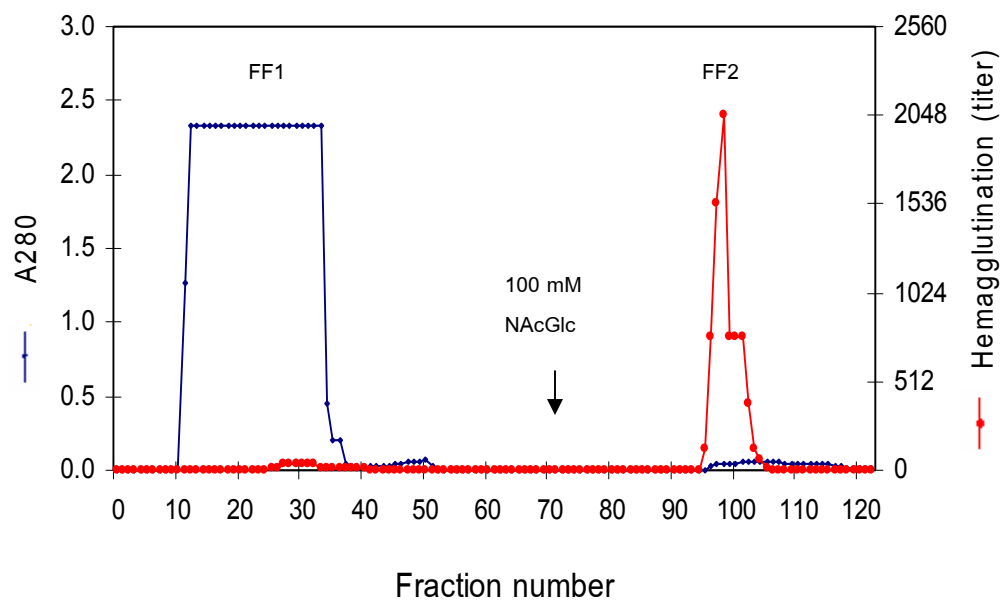
1. การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกึ่งแซบวัย

จากงานวิทยานิพนธ์ของ Rittidach (2006) พบว่าเลคตินในกึ่งแซบวัยมีความจำเพาะต่อไกลโคโปรตีนฟีทูอิน งานวิทยานิพนธ์นี้จึงใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose ในการแยกเลคตินจากซีรัมของกึ่งแซบวัย

1.1 การแยกโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1

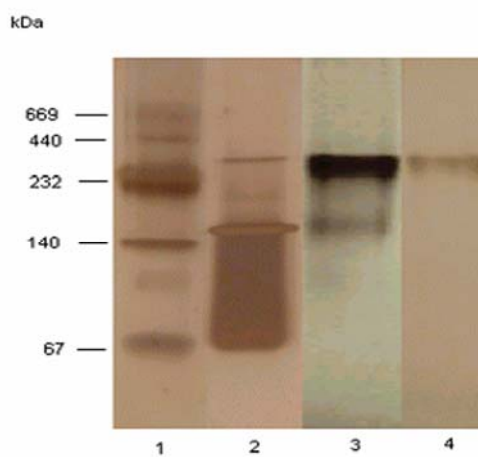
จากการนำซีรัมปริมาตร 6.5 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 796.77 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose ที่ผ่านการใช้มาแล้ว แล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-NaCa พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค (peak) คือพีค FF1 ที่มีแอกทิวีทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายน้อยมาก ดังแสดงผลในรูปที่ 8 เมื่อล้างคอลัมน์ต่อด้วย 100 mM NAcGlc ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาอีก 1 พีค คือ พีค FF2 เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 96-102 ที่มีแอกทิวีทีของการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงเข้าด้วยกัน ไดแอสโตรและทำให้เข้มข้น พบว่าสารละลายโปรตีนพีค FF2 มีปริมาณโปรตีน 0.46 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.0577% ของซีรัมโปรตีนเริ่มต้น และมีแอกทิวีทีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 40,600 หน่วย และ 88,260 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 61% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,057 เท่า ของซีรัมเลคตินเริ่มต้น ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และรูปที่ 8 เมื่อนำสารละลายเลคตินพีค FF2 ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ปรากฏโปรตีนเลคติน 1 แถบ และโปรตีนอื่นอีก 1 แถบ (รูปที่ 9 แถวที่ 3) บ่งชี้ว่าเลคตินที่แยกได้โดยคอลัมน์นี้ยังไม่บริสุทธิ์ และผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับงานของ Rittidach และคณะ (2007) โดยคอลัมน์นี้สามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ในซีรัมไปได้มากกว่า 99%

นอกจากนี้ยังพบว่าในการแยกเลคตินจากซีรัมของกึ่งแซบวัยด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ไม่ว่าจะเป็คอลัมน์ใหม่หรือคอลัมน์ที่เคยใช้งานมาแล้ว ไม่สามารถแยกเลคตินได้บริสุทธิ์ โดยมีแถบโปรตีนอื่นอีก 1 แถบ ปนเปื้อนมาด้วย เมื่อวิเคราะห์โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ อาจเป็นเพราะมีปริมาณโปรตีนอื่น ๆ ในซีรัมจำนวนมากซึ่งรบกวนการจับจำเพาะระหว่างคอลัมน์ Fetuin-agarose กับเลคตินที่มีปริมาณโปรตีนน้อยมากในซีรัม นอกจากนี้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลงตามจำนวนครั้งที่ใช้งาน อาจเป็นเพราะฟีทูอินบางส่วนของคอลัมน์ที่ใช้จับกับเลคตินเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการชะล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีเกลือและน้ำตาล NAcGlc ความเข้มข้นสูงหลายครั้ง เมื่อ นิษา ไพจิตร (2545) ทำให้เลคตินบริสุทธิ์ต่อโดยวิธีเจลฟิลเทรชันด้วยคอลัมน์ Superdex 200 FPLC พบว่า



รูปที่ 8 การแยกเลือดคตินจากซีรัมด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1

นำซีรัมปริมาตร 6.5 มิลลิลิตร (โปรตีน 796.77 มิลลิกรัม) ผ่านลงในคอลัมน์ Fetuin-agarose (1.2 x 18.7 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-NaCa อัตราไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะด้วย 100 mM NAcGlc ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม และเก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 9 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของสารละลายเลคตินซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ครั้ง ซึ่งย้อมเจลแบบซิลเวอร์

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 ซีรัม

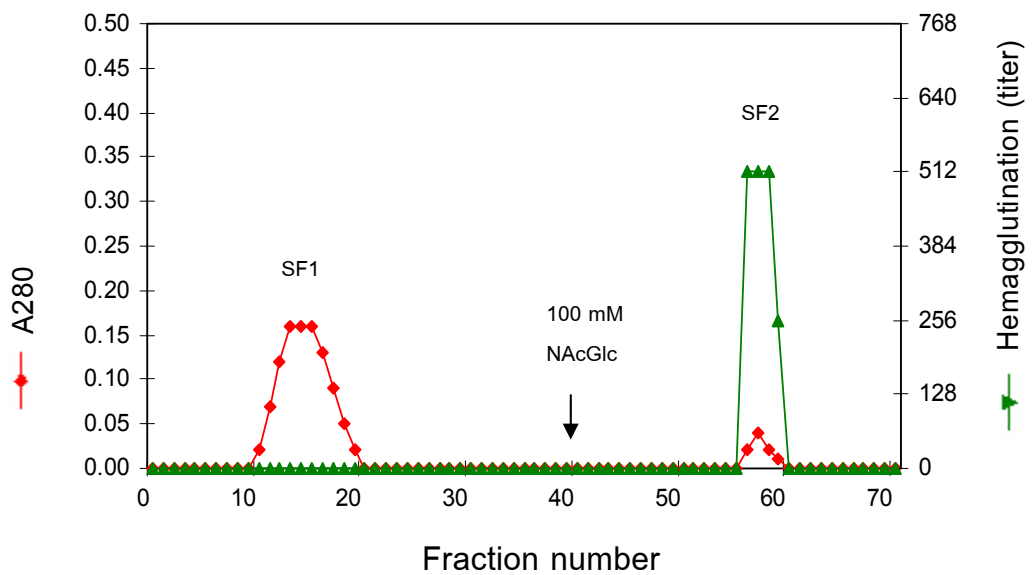
แถวที่ 3 สารละลายเลคตินพีค FF2 จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1

แถวที่ 4 สารละลายเลคตินพีค SF2 จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 2

คอลัมน์ชนิดนี้ทำให้มีการสูญเสียแอกทิวิตีของเลคตินไปมาก อาจเป็นเพราะ dextran ของคอลัมน์สามารถจับได้ดีกับเลคตินส่วนที่เป็นไกลโคโปรตีน เนื่องจากพบว่าเลคตินของกุ้งแชบ๊วยมีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (Rittidach, 2006) ในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้เลือกใช้คอลัมน์ Fetuin-agarose ที่ผ่านการใช้มาแล้วเป็นขั้นตอนแรกในการแยกเลคตินจากซีรัมของกุ้งแชบ๊วย

1.2 การแยกโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 2

เนื่องจากสารละลายเลคตินที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1 ซึ่งผ่านการใช้งานมาแล้ว ยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนมาด้วย (ผลข้อ 1.1) ดังนั้น งานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ทำให้เลคตินบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ซึ่งยังไม่เคยใช้งานมาก่อน เป็นขั้นตอนที่สองของการทำให้เลคตินบริสุทธิ์ โดยนำสารละลายเลคตินพีค FF2 ปริมาณ 0.46 มิลลิกรัม ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ แล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-NaCa พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค คือพีค SF1 ที่ไม่มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ดังแสดงผลในรูปที่ 10 เมื่อล้างคอลัมน์ต่อด้วย 100 mM NAcGlc ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมามากอีก 1 พีค (พีค SF2) เมื่อรวมสารละลายหลอดที่มีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงเข้าด้วยกัน ไดแอสโอสและทำให้เข้มข้น พบว่าสารละลายเลคตินพีค SF2 มีปริมาณโปรตีน 0.104 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.0001% ของซีรัมโปรตีนเริ่มต้น และมีแอกทิวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย 16,640 หน่วย และ 15,865 หน่วย/มก.โปรตีน คิดปริมาณเลคตินที่แยกได้ 25% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,898 เท่า ของซีรัมเลคตินเริ่มต้น ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 3 การแยกสารละลายเลคตินพีค SF2 ต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ครั้งที่ 2 นี้มีประสิทธิภาพของการแยกไม่ต่างจากการแยกสารละลายเลคตินพีค FF2 ต่อด้วยคอลัมน์ Superose 12 FPLC ที่แยกเลคตินได้โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,890 เท่าของซีรัมเลคตินเริ่มต้น (Rittidach *et al.*, 2007) แต่มีข้อดีกว่า 2 ประการคือ ประการแรก การแยกเลคตินด้วยการผ่านคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ครั้งสามารถแยกเลคตินบริสุทธิ์ได้ yield (25%) มากกว่าการแยกสารละลายเลคตินพีค FF2 ต่อด้วยคอลัมน์ Superose 12 FPLC ซึ่งแยกเลคตินบริสุทธิ์ได้ 15.9% ของซีรัมเลคตินเริ่มต้น (Rittidach *et al.*, 2007) และประการที่สอง วิธีการในงานวิทยานิพนธ์นี้ดีกว่าการใช้คอลัมน์ Superose 12 FPLC ซึ่งมีขนาดใหญ่และปรับปริมาณไม่ได้ ดังนั้นในการใช้คอลัมน์ Superose 12 FPLC แต่ครั้งต้องใช้อุณหภูมิของสารละลายเลคตินพีค FF2 ปริมาณมาก ซึ่งได้จากการรวมสารละลายเลคตินพีค FF2 ที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1 หลาย ๆ คอลัมน์เข้าด้วยกัน ในขณะที่การแยกสารละลายเลคตินพีค FF2 ต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ครั้งที่ 2 สามารถปรับปริมาณเจลหรือขนาดคอลัมน์ที่ใช้ตามปริมาณสารละลายเลคตินพีค FF2 ที่มี



รูปที่ 10 การแยกสารละลายเลคตินพีค FF2 ที่ได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 1 ด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ครั้งที่ 2

นำสารละลายเลคตินเข้มข้นพีค FF2 จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ปริมาณโปรตีน 0.46 มิลลิกรัม ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ (1x12.7 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ Tris-NaCa ด้วยอัตราไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.8 มิลลิลิตร จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะด้วย 100 mM NAcGlc ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม และเก็บสารละลายหลอดละ 0.8 มิลลิลิตร

เมื่อนำสารละลายเลคตินพีค SF2 ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ปรากฏแถบเลคตินเพียงแถบเดียวจากการย้อมโปรตีนแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 9 แถวที่ 4) บ่งชี้ว่าสารละลายเลคตินที่แยกได้จากคอลัมน์ Fetuin-agarose ใหม่ครั้งที่ 2 บริสุทธิ์ และแสดงให้เห็นว่าการใช้โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะมีประสิทธิภาพในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์ได้ดีกว่าโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน ซึ่งคล้ายกับการใช้คอลัมน์ erythrocyte stroma ที่ตรงกับ Sephadex G-25 ในการแยกเลคตินจากฮีโมลิมพ์ของกุ้งก้ามกรามซึ่งเป็นการแยกเพียงขั้นตอนเดียวก็ได้เลคตินบริสุทธิ์ (Vazquez *et al.*, 1993) ส่วนการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากแหล่งอื่น อาจผ่านหลายขั้นตอน เช่นการแยกเลคตินจากฮีโมลิมพ์ของกุ้งกุลาดำอาศัยคอลัมน์ Fetuin-agarose, Superose 12 และ Mono-Q ตามลำดับ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) หรือการแยกเลคตินจากฮีโมลิมพ์ของเพรียงหัวหอม (ascidian) ต้องใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephacryl S-200, Sephacryl S-300 และ Sepharose 4B ตามลำดับ จึงจะแยกได้เลคตินบริสุทธิ์ (Schluter and Ey, 1989) ดังนั้นการใช้โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ครั้ง จึงเป็นแนวทางใหม่ในการทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแชบ๊วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. การกระจายของเลคตินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย

จากการศึกษาการกระจายของเลคตินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยทำการสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งที่จับจากธรรมชาติตัวอย่างชุดเดียวกัน ได้แก่ ตับ กระจกใส หัวใจ รังไข่ และกล้ามเนื้อ สำหรับฮีโมลิมพ์ได้เตรียมแยก 2 แบบ คือเตรียมเป็นซีรัม (ตามวิธีการข้อ 1) ฮีโมลิมพ์อีกส่วนผสมกับสารกันเลือดแข็งตัว แล้วเซนตริฟิวจ์แยกเซลล์ฮีโมไซท์ออกไปเตรียมเป็นสารสกัดฮีโมไซท์ (ตามวิธีการข้อ 3) และส่วนเสคือพลาสมาได้นำไปไดอะไลซ์เอาสารกันเลือดแข็งตัวออก แล้วนำซีรัม พลาสมา และสารสกัดเนื้อเยื่อต่าง ๆ เหล่านี้ไปหาแอกทิวิตีของเลคตินและปริมาณโปรตีน ได้ผลพบว่าซีรัมมีแอกทิวิตีรวมของเลคตินมากที่สุด (15,600 หน่วย) รองลงมาคือสารสกัดตับ รังไข่ กระจกใส ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 4 ไม่พบแอกทิวิตีของเลคตินในสารสกัดฮีโมไซท์และกล้ามเนื้อ เมื่อคิดเป็นค่าแอกทิวิตีจำเพาะก็มีผลทำนองเดียวกัน ยกเว้นสารสกัดรังไข่ (38.18 ± 4.28 หน่วย/มก.โปรตีน) ที่มีค่ามากกว่าสารสกัดตับ (26.12 ± 3.77 หน่วย/มก.โปรตีน) (ตารางที่ 4) สำหรับพลาสมาพบว่ามีแอกทิวิตีของเลคตินเท่ากับในซีรัม (ไม่ได้แสดงผลไว้) แสดงว่าสารกันเลือดแข็งตัวที่ใช้ในขั้นตอนการแยกเซลล์ฮีโมไซท์ไม่มีผลต่อแอกทิวิตีของเลคตินในพลาสมา การไม่พบแอกทิวิตีของเลคตินในสารสกัดฮีโมไซท์และกล้ามเนื้อบ่งบอกได้ว่าเซลล์ฮีโมไซท์และกล้ามเนื้ออาจไม่ใช่เนื้อเยื่อเป้าหมายของการทำงานของเลคตินในกุ้ง และเลคตินอาจไม่ได้ถูกสังเคราะห์โดยกล้ามเนื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการที่ไม่เคยมีรายงานการสังเคราะห์เลคตินโดยกล้ามเนื้อมาก่อน ในกุ้ง *Fenneropenaeus*

chinensis พบการแสดงออกของ mRNA ของยีนเลคตินชนิด C ในเซลล์ฮีโมไซท์ (Liu *et al.*, 2007) บ่งชี้ว่าเซลล์ฮีโมไซท์เป็นแหล่งสังเคราะห์เลคตินในกุ้งชนิดนี้ แต่การไม่พบแอกทิวีทีของเลคตินในสารสกัดฮีโมไซท์ของกุ้งแชบ๊วย อาจเป็นได้ที่เซลล์ฮีโมไซท์สังเคราะห์เลคตินแล้วหลั่งออกนอกเซลล์ ขณะนี้นางสาวอรุณชา รัตนภรณ์ นักศึกษาปริญญาเอกในที่ปรึกษาของ รศ. ดร. ประภาพร อุทราพันธ์ กำลังศึกษาการโคลนยีนเลคตินและการแสดงออกของยีนเลคตินในกุ้งแชบ๊วย ซึ่งจะช่วยให้ข้อสรุปเหล่านี้ชัดเจนขึ้น ส่วนการพบแอกทิวีทีของเลคตินในสารสกัดตับมากเป็นอันดับ 2 รองจากซีรัม (735.46 หน่วย หรือคิดเป็น 4.71% ของเลคตินในซีรัม) อาจเป็นได้ที่ตับซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนต่าง ๆ อาจเป็นแหล่งสังเคราะห์เลคตินด้วยเช่นกัน แล้วหลังเลคตินออกสู่อิมูโนลิมฟ์ซึ่งทำหน้าที่เสมือนกระแสเลือดเพื่อใช้ในกระบวนการต่าง ๆ เช่นการป้องกันตนเองของกุ้งต่อสิ่งแปลกปลอมที่มาบุกรุก ปัจจุบันยังไม่เคยมีรายงานการศึกษา ยีนเลคตินที่จำเพาะต่อกรดไขมันซาลิไซลิก แต่มีรายงานฉบับแรกของการศึกษา ยีนเลคตินในกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นยีนเลคตินที่จำเพาะต่อลิโปโพลีแซคคาไรด์ แต่ไม่ได้กล่าวถึงแหล่งสังเคราะห์เลคตินไว้ (Luo *et al.*, 2006)

สำหรับรังไข่พบว่ามีแอกทิวีทีของเลคตินในปริมาณที่ค่อนข้างสูงรองลงมาจากในตับ (270.66 หน่วย หรือคิดเป็น 1.73% ของเลคตินในซีรัม) (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการพบแอกทิวีทีของเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่เพิ่มสูงขึ้นตามระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่กุ้งแชบ๊วย ที่ได้เคยรายงานไว้ในงานวิทยานิพนธ์ของ Rittidach (2006) อาจเป็นได้ที่เลคตินในรังไข่ทำหน้าที่ป้องกันไข่ที่เจริญพันธุ์และถูกปล่อยออกเพื่อการผสมพันธุ์ต่อไป ดังเช่นการพบระดับเลคตินในน้ำในโพรงลำตัวของเพรียง (*acorn barnacle, Megabalanus rosa*) สูงขึ้นแปรผันตามระยะพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่และพบมีค่าสูงสุดเมื่อไข่แก่ (Muramoto *et al.*, 1991) นอกจากนี้ แอนติบอดีต่อเลคตินของกุ้งกุลาดำเกิดปฏิกิริยากับสารสกัดรังไข่ได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990) บ่งชี้ว่าเลคตินมีโครงสร้างโปรตีนสัมพันธ์ด้านการเป็นแอนติเจนกับโปรตีนในสารสกัดรังไข่ของกุ้งกุลาดำ

เนื่องจากกระเพาะและลำไส้ของกุ้งมีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถแยกเฉพาะเซลล์เนื้อเยื่อของทั้ง 2 ส่วนออกมาศึกษาได้ ดังนั้นการพบแอกทิวีทีของเลคตินในสารสกัดกระเพาะและลำไส้ อาจเป็นผลมาจากการที่กุ้งซึ่งใช้ในการศึกษาที่จับมาจากทะเลอาจกินอาหารที่มีเลคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ก่อนแล้ว

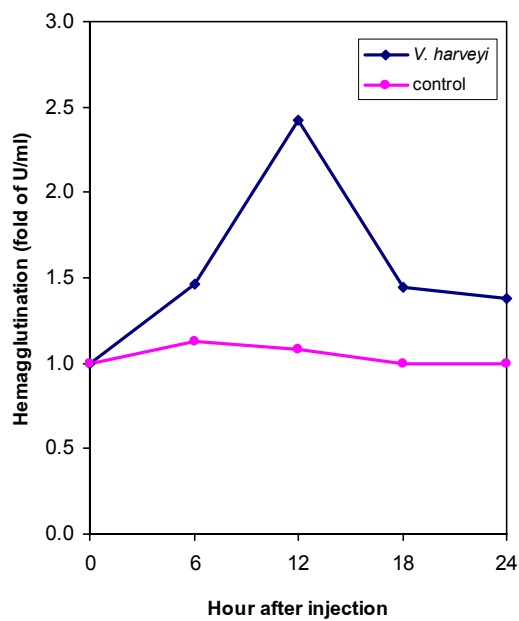
3. ระดับแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมของกึ่งที่ฉีดด้วย *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA

เพื่อศึกษาการตอบสนองของกึ่งแซบวัยต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ได้ทำการศึกษาในสองประเด็นคือ การตอบสนองตามเวลาหลังการฉีดเชื้อ และตามปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ฉีด รวมทั้งเพื่อหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่กระตุ้นให้กึ่งตอบสนองได้ดีที่สุดในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา โดยในข้อนี้ได้ใช้แบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นตัวกระตุ้น

3.1 การเปลี่ยนแปลงระดับแอกทิวิตี้ของเลคตินตามเวลาหลังการฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi*

จากการติดตามแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมของกึ่งแซบวัยที่ฉีดด้วย *V. harveyi* ปริมาณ 3×10^7 เซลล์ต่อตัวกึ่ง แล้วเก็บฮีโมลิมพ์ที่เวลาก่อนฉีดและที่เวลาต่างๆ หลังการฉีดพบว่าแอกทิวิตี้ของการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินเพิ่มขึ้นตามเวลาตอบสนองต่อการติดเชื้อ (รูปที่ 11) โดยมีค่าแอกทิวิตี้เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ($7,880 \pm 72$ หน่วย/มล.) เป็น $11,505 \pm 62$ หน่วย/มล. ณ ชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มสูงสุดเป็น $19,070 \pm 44$ หน่วย/มล. ณ ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นมีค่าลดลงตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 18 ($11,347 \pm 40$ หน่วย/มล.) และ 24 ($10,874 \pm 44$ หน่วย/มล.) ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของแอกทิวิตี้ที่ชั่วโมงอื่นๆ กับชั่วโมงที่ 0 (ก่อนฉีด) พบระดับแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้นเป็น 1.46 เท่า ที่ชั่วโมง 6 และเพิ่มมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 2.42 เท่า ที่ชั่วโมง 12 จากนั้นลดลงที่ชั่วโมง 18 และ 24 เป็น 1.44 และ 1.38 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 5 และรูปที่ 11) ส่วนแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมของกึ่งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือพบว่าไม่มีระดับเปลี่ยนแปลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ชั่วโมงต่าง ๆ ดังกล่าว ดังแสดงผลในรูปที่ 11 และตารางที่ 5

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระดับเลคตินในฮีโมลิมพ์ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นจากแบคทีเรียก่อโรค โดยกึ่งมีการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคที่รุกรานในช่วงหลังฉีดแบคทีเรียด้วยการหลังหรือสังเคราะห์เลคตินเพิ่มขึ้นใน 6-12 ชั่วโมง เพื่อช่วยในการยับยั้งการรุกรานของแบคทีเรีย หลังจากนั้นระดับของเลคตินลดลงอาจเป็นเพราะกึ่งอ่อนแอลงเพราะปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีดมากเกินไปกว่าความสามารถของกึ่งที่จะกำจัดได้หมด รวมทั้งกึ่งอาจใช้สารอาหารที่จำเป็นในการสร้างโปรตีนที่ใช้ในระบบป้องกันตนเอง เช่นเลคติน ไปมากเกินไปกว่าจะสร้างได้เพิ่มอีกต่อไป เพราะพบว่าหลังการฉีดเชื้อ 6 ชั่วโมง เป็นต้นไป กึ่งจะไม่กินอาหาร แสดงอาการอ่อนเพลีย เริ่มว่ายน้ำน้อยลง บางตัวจะนอนนิ่ง ๆ และตายหลัง 24 ชั่วโมง



รูปที่ 11 แอคทีวิตีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

กุ่มฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ตัวละ 3×10^7 เซลล์ (N=5)

กุ่มชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ (N=7)

ตารางที่ 5 แอคติวิตีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

Time after injection (hour)	Injection			
	Control (0.85% NaCl), N=7		<i>V. harveyi</i> , N=5	
	Activity (U/ml)	Fold	Activity (U/ml)	Fold
0	7,680 ± 45	1.00	7,880 ± 72	1.00
6	8,678 ± 21	1.13	11,505 ± 62	1.46
12	8,294 ± 17	1.08	19,070 ± 44	**2.42
18	7,680 ± 0	1.00	11,347 ± 40	1.44
24	7,680 ± 0	1.00	10,874 ± 44	1.38

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง

**เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

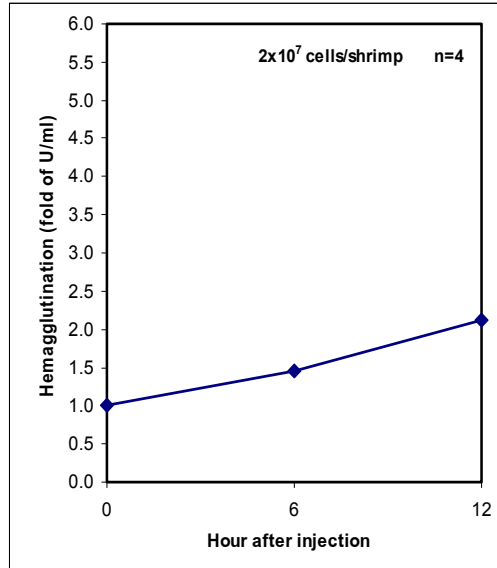
กุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* (ตัวละ 3×10^7 เซลล์) แสดงผลการติดเชื้อในตับ

กุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ไม่แสดงผลการติดเชื้อในตับ

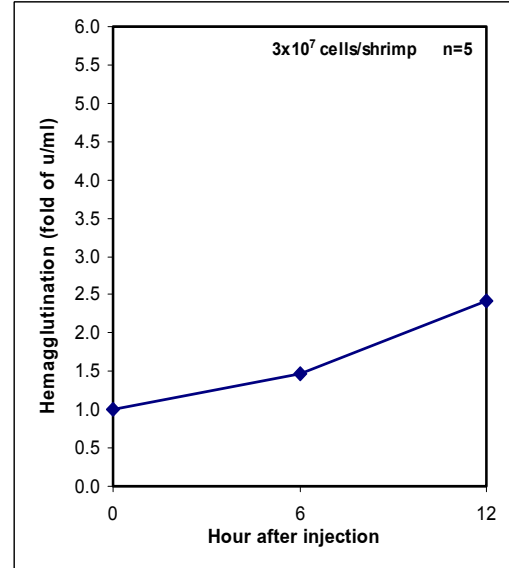
3.2 การเปลี่ยนแปลงระดับแอกทิวิตี้ของเลคตินตามปริมาณเชื้อ *V. Harveyi* ที่ฉีดในช่วง $2-5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกึ่ง

จากการกระตุ้นกึ่งแซบวัยให้ติดเชื้อโดยการฉีดกึ่งด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ active และเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ปริมาณต่างๆ ในช่วง $2-5 \times 10^7$ เซลล์ต่อตัวกึ่ง เพื่อหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้กึ่งตอบสนองได้อย่างชัดเจน แล้วติดตามระดับของเลคตินในซีรัมที่เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการเพิ่มขึ้นของแอกทิวิตี้ของเลคตินอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 11) จากการทดลองนี้พบผลมีแนวโน้มในทำนองเดียวกันคือจำนวนเชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้ฉีดทุกปริมาณ (ในช่วง $2-5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกึ่ง) ทำให้แอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมซึ่งคิดเป็นหน่วยต่อมิลลิลิตรของซีรัม มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 (ก่อนฉีด) ของกึ่งแต่ละชุดทดลอง และเพิ่มสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง (รูปที่ 12 และ ตารางที่ 6) นอกจากนี้จากการสุ่มตรวจพบว่ากึ่งที่ฉีด *V. harveyi* เหล่านี้แสดงอาการติดเชื้อในตับ ส่วนแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมของกึ่งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือมีระดับเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญในช่วงเวลาเดียวกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 6 และรูปที่ 12 และไม่แสดงอาการติดเชื้อในตับ

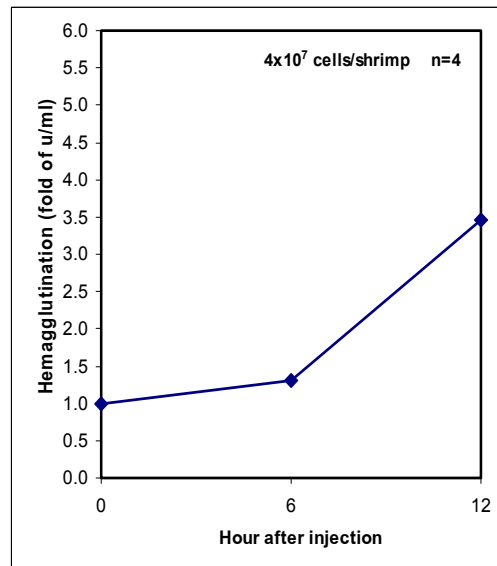
เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเท่าของระดับเลคตินที่เปลี่ยนไปในซีรัมเทียบกับของชั่วโมง 0 ก่อนฉีด ของกึ่งแต่ละชุดที่ฉีดเชื้อปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่าการฉีด *V. harveyi* ด้วยปริมาณ 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 และ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง ทำให้แอกทิวิตี้ของเลคตินเพิ่มขึ้นเป็น 1.45, 1.46, 1.30 และ 2.25 เท่า ตามลำดับ ที่ 6 ชั่วโมงหลังการฉีด และเพิ่มสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 2.12, 2.42, 3.46 และ 4.00 เท่า ตามลำดับ ที่ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด (รูปที่ 12 และตารางที่ 6) จะเห็นได้ว่าการเพิ่มของแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมแปรผันตามปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้ฉีดและเพิ่มสูงสุดเมื่อใช้เชื้อ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง (รูปที่ 12)



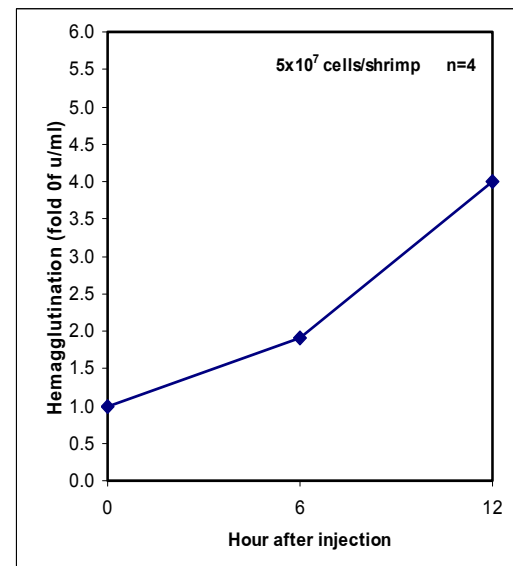
A



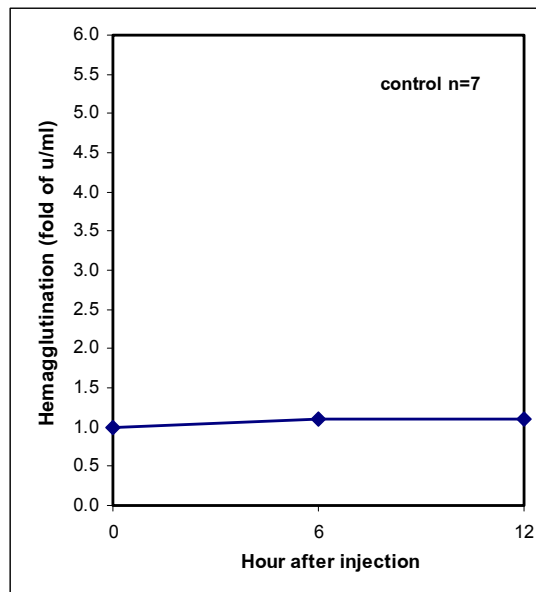
B



C



D



E

รูปที่ 12 แอคติวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ
V. harveyi ปริมาณ $2-5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกุ้ง
กุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ (N=7)

ในการคำนวณหาค่าแอกทิวที่จำเพาะของเลคตินในกึ่งเหล่านี้ข้างต้น โดยเปรียบเทียบค่าในกึ่งแต่ละชุดทดลองกับค่าก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) พบว่าในกึ่งชุดควบคุมมีค่าแอกทิวที่จำเพาะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญเป็น 1.23 และ 1.36 เท่า ที่ 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีดตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่าแอกทิวที่จำเพาะของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 (ตารางที่ 7) ทั้งนี้เพราะพบว่าปริมาณโปรตีนในซีรัมมีค่าค่อย ๆ ลดลงตามเวลา (ไม่ได้แสดงผลไว้) แม้แอกทิวที่ของเลคติน (หน่วย/มล.ซีรัม) ของตัวอย่างเดียวกันไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา (ตารางที่ 6) จึงส่งผลทำให้ค่าแอกทิวที่จำเพาะของเลคตินเพิ่มขึ้น การที่โปรตีนในซีรัมของกึ่งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือมีปริมาณลดลงตามเวลา ไม่สามารถบอกสาเหตุที่แท้จริงได้ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาต่อไป ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะกึ่งกินอาหารน้อยกว่าปกติตลอดช่วงเวลาที่ทดลองจึงไม่ได้สังเคราะห์โปรตีนเพิ่มเติมและอาจเป็นผลจากการเจาะฮีโมลิมฟ์ทุก 6 ชั่วโมง ประกอบด้วยในทำนองเดียวกัน พบว่าโปรตีนในซีรัมของกึ่งชุดทดลองทุกชุดที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณลดลงตามเวลาในอัตราที่ไม่ต่างจากของชุดควบคุม บ่งชี้ว่าการฉีดเชื้อไม่ได้เป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณโปรตีนในซีรัมของกึ่งแซบวัยลดลงตามเวลาที่ศึกษา ในทำนองเดียวกันการลดลงของปริมาณโปรตีนในซีรัมของกึ่งที่ฉีด *V. harveyi* ทุกปริมาณ ส่งผลทำให้ค่าแอกทิวที่จำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน) ของเลคตินในกึ่งเหล่านี้มีค่าเพิ่มสูงกว่าระดับแอกทิวที่ (หน่วย/มล.ซีรัม) ของเลคติน ดังแสดงผลในตารางที่ 7 กล่าวคือ แอกทิวที่จำเพาะของกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อปริมาณ 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 และ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 1.83, 1.98, 1.38 และ 2.54 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 และเพิ่มสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 3.07, 3.34, 4.26 และ 4.71 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 เช่นกัน จะเห็นได้ว่าแอกทิวที่จำเพาะของเลคตินในซีรัมมีค่าเพิ่มขึ้นโดยแปรผันตามปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้ฉีดและเพิ่มสูงสุดเมื่อใช้เชื้อ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง (ตารางที่ 7)

3.3 ผลของขนาดกึ่งต่อการเปลี่ยนแปลงระดับแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมของกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. Harveyi*

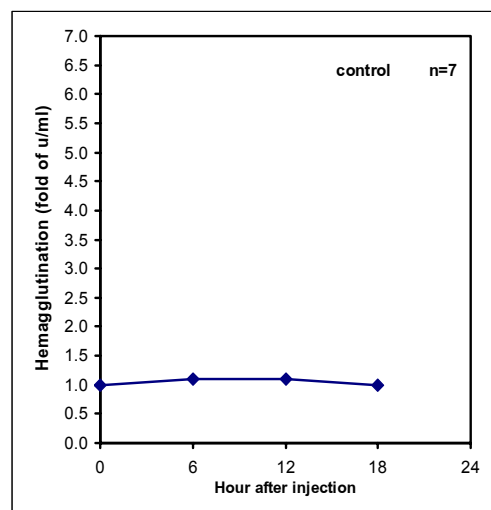
เพื่อศึกษาผลการตอบสนองของการฉีดเชื้อ *V. harveyi* ในกึ่งที่มีขนาดต่างกัน โดยแบ่งกึ่งเป็น 3 ขนาด คือกึ่งขนาดเล็กมีน้ำหนัก 15-25 กรัม กึ่งขนาดกลางมีน้ำหนัก 26-35 กรัม และขนาดใหญ่มีน้ำหนัก 36-50 กรัม จากนั้นฉีดกึ่งทั้ง 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ในปริมาณเท่ากันคือ 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง พบว่าหลังการฉีดเชื้อทั้ง 2 ปริมาณ ณ ชั่วโมงที่ 6 หลังการฉีด กึ่งขนาดใหญ่และขนาดกลางยังเป็นปกติไม่ค่อยแสดงอาการติดเชื้อ ส่วนกึ่งขนาดเล็ก มีอาการอ่อนเพลีย บางตัวนอนนิ่งหรือบางตัวเริ่มว่ายน้ำไร้ทิศทาง ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีด กึ่งขนาดเล็กมีอาการอ่อนแอมากเห็นได้ชัดตามปริมาณเชื้อที่ฉีดและเริ่มทยอยตาย ส่วนกึ่งขนาดใหญ่และขนาดกลางเริ่มมีอาการอ่อนแอ แต่เมื่อนำซีรัมของกึ่งทั้ง 3 ชุด มาทดสอบหาไตเตอร์ของเลคติน พบว่าระดับแอกทิวิตี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเท่าๆ กันที่ 6 และ 12 ชั่วโมง ในกึ่งแต่ละชุด (ไม่ได้แสดงผลไว้) บ่งชี้ว่าการตอบสนองของกึ่งที่มีขนาดต่างกันต่อปริมาณเชื้อเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการทดลองทั้งหมดในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ใช้กึ่งขนาดกลาง (น้ำหนัก 26-35 กรัม) เพราะซื้อหาได้ง่ายกว่ากึ่งขนาดใหญ่และสามารถติดตามการทดลองได้ตลอดช่วงเวลาที่ศึกษา 0-24 ชั่วโมง ดีกว่ากึ่งขนาดเล็ก

3.4 การเปลี่ยนแปลงระดับแอกทิวิตี้ของเลคตินตามปริมาณเชื้อ *V. Harveyi* ที่ฉีดในช่วง $5 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกึ่ง

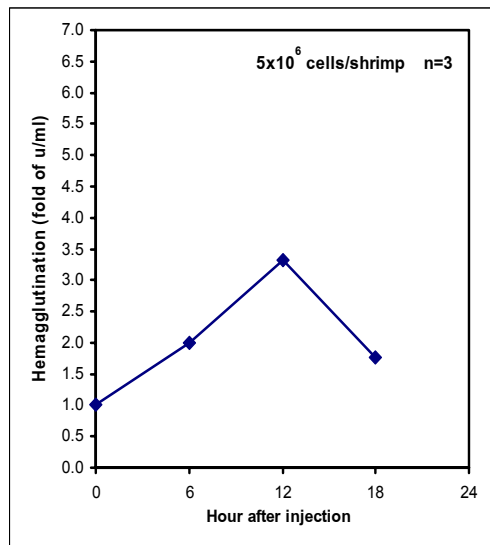
จากการฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi* ที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ในปริมาณ $2-5 \times 10^7$ เซลล์ต่อตัวกึ่ง พบว่าแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมแปรผันตามปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้ฉีดและเพิ่มสูงสุดเมื่อใช้เชื้อ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง (รูปที่ 12) เพื่อหาปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่มากกว่าปริมาณดังกล่าวในการกระตุ้นให้กึ่งตอบสนองได้มากขึ้น จึงได้ลองฉีดกึ่งขนาดกลางด้วย *V. harveyi* ชนิดเดิม แต่ใช้ปริมาณในช่วง 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่าแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมของกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์ต่อตัวกึ่ง มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95-99% เป็น 2.00, 2.25, 2.67 และ 2.72 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 13) และเพิ่มสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 3.33, 4.00, 4.50 และ 5.43 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 13) แต่มีแอกทิวิตี้ลดลง ณ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด โดยมีค่าเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ความเชื่อมั่น 95%) เป็น 1.77, 1.83, 1.77 และ 1.75 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 (ตารางที่ 8 และรูปที่ 13) จะเห็นได้ว่ากึ่งทดลองทั้ง 4 ชุด มีการตอบสนองต่อเชื้อในทำนองเดียวกันคือมีแอกทิวิตี้ของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 6

และเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมง 12 จากนั้นมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 18 หลังการฉีด (รูปที่ 13) และเช่นเดิม การฉีดกึ่งด้วยน้ำเกลือไม่ทำให้ระดับของเลคตินในซีรัมเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาที่ทดลอง

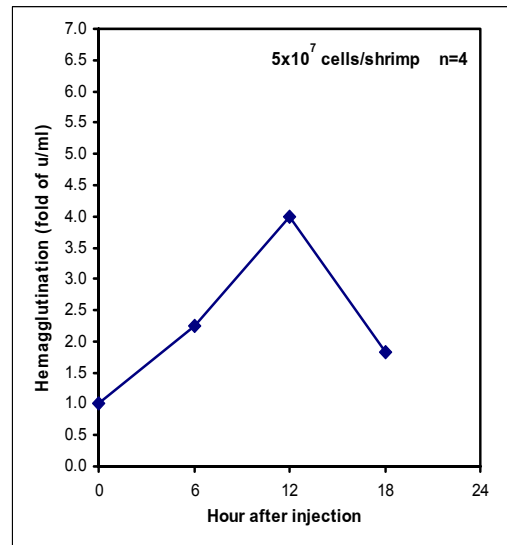
นอกจากนี้กึ่งมีการตอบสนองต่อปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีดอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบ แอคติวิตีของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้นแปรผันตามปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้ฉีดและเพิ่มสูงสุด เมื่อใช้เชื้อ 5×10^9 เซลล์ต่อตัวกึ่ง (รูปที่ 13E และตารางที่ 8) ดังจะเห็นได้ว่าค่าแอกติวิตีของ เลคตินในซีรัมของกึ่งชุดนี้มีการเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดอื่น ณ ที่ 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด และ ลดลงอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันที่ชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นการฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi* ที่เลี้ยงบน อาหารแข็ง TSA ปริมาณ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้กึ่งติดเชื้อและ ตอบสนองได้ดี รวมทั้งไม่ทำให้กึ่งตายภายใน 18 ชั่วโมง ที่ทำการศึกษา



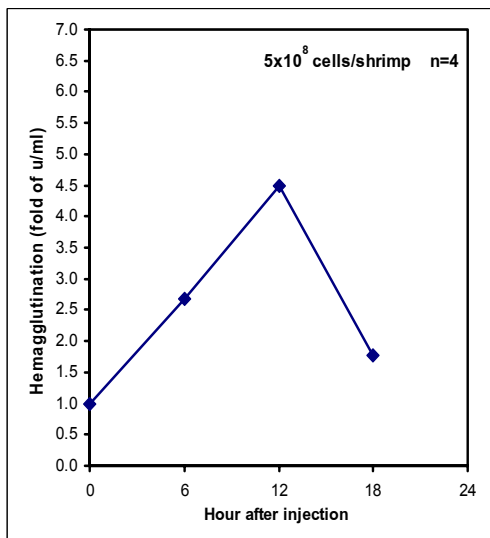
A



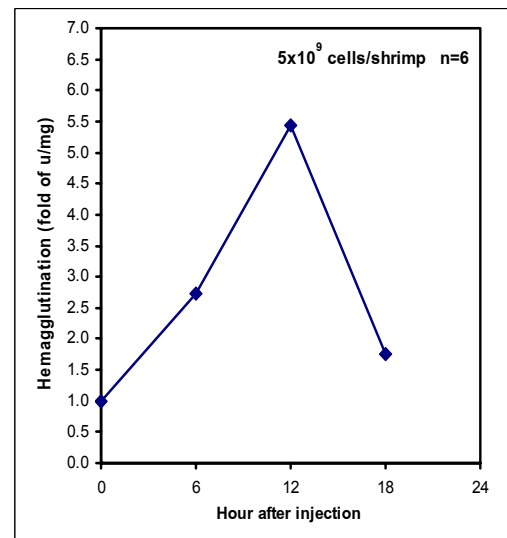
B



C



D



E

รูปที่ 13 แอคทีวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ $5 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกุ้ง กุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ

เมื่อพิจารณาเป็นค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินในซีรัมของกุ้งทั้งหมดที่กล่าวข้างต้น พบว่าการฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์ต่อตัวกุ้ง มีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่าแอกทิวิตีของเลคติน (หน่วย/มล.ซีรัม) กล่าวคือในแต่ละชุดของกุ้งที่ฉีดเชื้อแต่ละปริมาณ ค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินมีรูปแบบแผนผังที่เหมือนกัน คือมีค่าเพิ่มมากขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และเพิ่มมากที่สุดที่ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีการลดลงในช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงหลังการฉีด (ตารางที่ 9) เช่นการฉีดกุ้งปริมาณ 5×10^9 เซลล์ต่อตัวกุ้ง จะมีแอกทิวิตีที่จำเพาะ ณ ชั่วโมงที่ 0, 6, 12 และ 18 เป็น 55.71 ± 10.19 , 181.51 ± 10.51 , 466.03 ± 15.60 และ 125.06 ± 10.51 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ หรือคิดเป็นปริมาณแอกทิวิตีที่จำเพาะที่เพิ่มขึ้นเป็น 1, 3.25, 8.36 และ 2.24 เท่า ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่าง ณ เวลาต่าง ๆ นี้ เป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95-99% (ตารางที่ 9)

นอกจากนี้ ค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินเมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกันหลังการฉีด จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีด ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 9 ดังเช่น ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีด กุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อปริมาณ 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์/ตัวกุ้ง มีแอกทิวิตีที่จำเพาะเป็น 227.55 ± 4.40 , 282.70 ± 0 , 342.53 ± 7.07 และ 466.03 ± 15.60 หน่วย/มก.โปรตีน หรือคิดเป็นปริมาณแอกทิวิตีที่จำเพาะที่เพิ่มขึ้นเป็น 4.00, 4.71, 5.94 และ 8.36 เท่า ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมซึ่งมีค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ (87.00 ± 2.90 หน่วย/มก.โปรตีน, 1.36 เท่า) เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 (64.03 ± 8.56 หน่วย/มก.โปรตีน, 1 เท่า) (ตารางที่ 9) ดังได้กล่าวแล้วว่ากุ้งที่ฉีดเชื้อแต่ละปริมาณมีค่าโปรตีนในซีรัมลดลงตามเวลาหลังการฉีด และมีอัตราการลดที่ไม่ต่างจากของกุ้งชุดควบคุม

ลักษณะการตอบสนองของเลคตินจากการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ทุกปริมาณไม่ว่าในช่วง 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 และ 5×10^7 เซลล์/ตัวกุ้ง (ผลในข้อ 3.2) หรือในช่วง 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์/ตัวกุ้ง (ผลในข้อ 3.4) มีรูปแบบเช่นเดียวกัน กล่าวคือเลคตินในซีรัมมีแอกทิวิตี (หน่วย/มล.ซีรัม) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เป็น 1.30 - 2.72 เท่า ที่ 6 ชั่วโมง หลังการฉีด เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ก่อนการฉีด และมีค่าเพิ่มสูงสุด (อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99%) เป็น 2.12 - 5.43 เท่า ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีด เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 จากนั้นจะมีแอกทิวิตีลดลงเป็น 1.75 - 1.83 เท่า ณ ชั่วโมงที่ 18 หลังการฉีด เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 และลดลงสู่ระดับใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 0 เมื่อวัด ณ ชั่วโมงที่ 24 หลังการฉีด (ไม่ได้แสดงผลไว้) บ่งชี้ว่าการกระตุ้นให้กุ้งแซบวัยติดโรคโดยการฉีดด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* กุ้งจะป้องกันตนเองด้วยการตอบสนองโดยการหลั่งเลคตินออกสู่อิมโมลิฟโดยพบแอกทิวิตีของเลคตินในซีรัม (อิมโมลิฟ) เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ 6 และ 12 ชั่วโมง และ/หรือกุ้งมีตอบสนองการติดโรคด้วยการสังเคราะห์เลคตินในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมงหลังการฉีด ทั้งนี้เพราะพบว่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน

ช่วงเวลาดังกล่าว ในขณะที่โปรตีนอื่นในฮีโมลิมฟ์มีปริมาณลดลงอันเนื่องมาจากการอดอาหารมากกว่าเป็นผลมาจากการติดเชื้อ หรือกึ่งอาจหยุดสร้างโปรตีนอื่นที่ใช้ในการดำรงชีวิตชั่วคราว เพื่อสังเคราะห์ pathogen-related protein เช่นเลคตินเพื่อป้องกันตนเองและต่อสู้กับแบคทีเรียที่มารุกราน ซึ่งสอดคล้องกับผลงานของ Rittidach (2006) ที่รายงานว่าปริมาณโปรตีนของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เป็น 73.12 ไมโครกรัม/มล.ซีรัม (1.5 เท่า) และ 99.23 ไมโครกรัม/มล.ซีรัม (2.0 เท่า) ที่ชั่วโมง 6 และ 12 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเวลา 0 ก่อนการฉีด (48.55 ไมโครกรัม/มล.ซีรัม, 1 เท่า) ในกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* 1.38×10^8 เซลล์/ตัวกุ้ง แต่เนื่องจากเลคตินในฮีโมลิมฟ์มีโปรตีนปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนอื่นทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ (ตารางที่ 3) ดังนั้นจึงพบปริมาณโปรตีนรวมในซีรัมมีค่าลดลงตามเวลาที่ศึกษา เป็นการยากที่จะเทียบผลการทดลองการตอบสนองของเลคตินกับงานของผู้อื่นหรือในกุ้งชนิดอื่น เพราะยังไม่เคยมีรายงานการทดลองในลักษณะเช่นนี้ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองจากงานวิทยานิพนธ์นี้และของ Rittidach (2006) บ่งชี้ว่าเลคตินมีบทบาทในการป้องกันตนเองของกุ้งแซบวัยต่อการติดเชื้อก่อโรคเพราะมีทั้งแอกทิวิตีและปริมาณโปรตีนของเลคตินเพิ่มขึ้นตามเวลาหลังการติดเชื้อและตามปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีดกระตุ้น คล้ายกับการพบปริมาณของเลคตินในซีรัมของกุ้งกุลาดำที่เพิ่มขึ้นจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่วิเคราะห์ด้วยการทำ immunoblotting โดยพบแถบเลคตินมีความเข้มมากขึ้นในกุ้งที่ติดเชื้อก่อโรค *V. vulnificus* (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992) ในทำนองเดียวกับการกระตุ้นแอกทิวิตีของเลคตินในหอยนางรม Pacific oyster *Crassostrea gigas* ด้วยแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* (Hardy et al., 1977) และในแมลง fresh fly (*Sarcophaga peregrina*) ที่มีระดับเลคตินในฮีโมลิมฟ์สูงขึ้นสัมพันธ์กับการเกิดบาดแผลของผนังลำตัว (Komano et al., 1980) จากรายงานเหล่านี้แสดงบทบาทของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อหรือต่อสิ่งแปลกปลอม

เลคตินของกุ้งแซบวัยที่ศึกษาในงานวิทยานิพนธ์นี้เป็นชนิดที่มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิกและน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติกเป็นองค์ประกอบ เช่น NAcGlc, NAcGal, NAcMan เป็นต้น (Rittidach et al., 2007; Utarabhand et al., 2007) เช่นเดียวกับเลคตินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนส่วนมากที่มีความจำเพาะต่อกรดไซอะลิกและน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติกเป็นองค์ประกอบ น้ำตาลเหล่านี้มักพบบนผนังเซลล์หรือผิวของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น แบคทีเรียแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ (Kowal et al., 2001) ซึ่งรวมถึงเซลล์ของ *V. harveyi* ด้วย ดังนั้นเลคตินที่สามารถจับจำเพาะกับกรดไซอะลิกหรือน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติก ย่อมเกี่ยวข้องต่อการจดจำเพื่อป้องกันตนเองจากเซลล์จุลชีพที่บุกรุกซึ่งมีน้ำตาลเหล่านี้บนผิวเซลล์ได้ โดยผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยรูปแบบที่เฉพาะตัวหรือ PAMPs ต่างๆ (Hao wang et al., 2007; Janeway and Medzhitov, 2002) เช่น มีลิโปโพลีแซคคาไรด์ที่มี 9-O- sialoglyconjugate ทางปลาย หรือมี

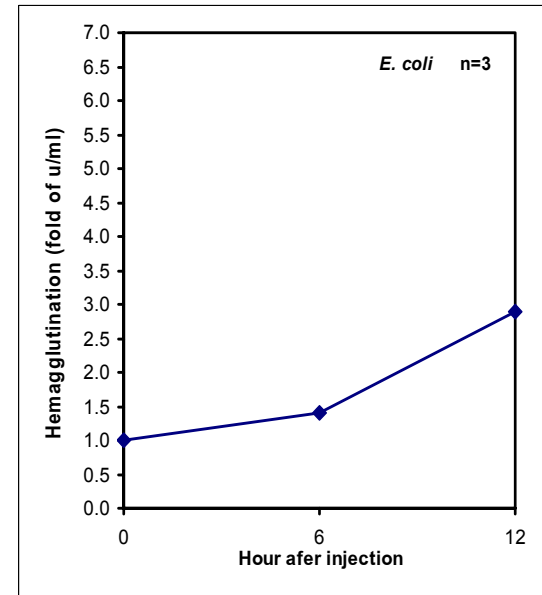
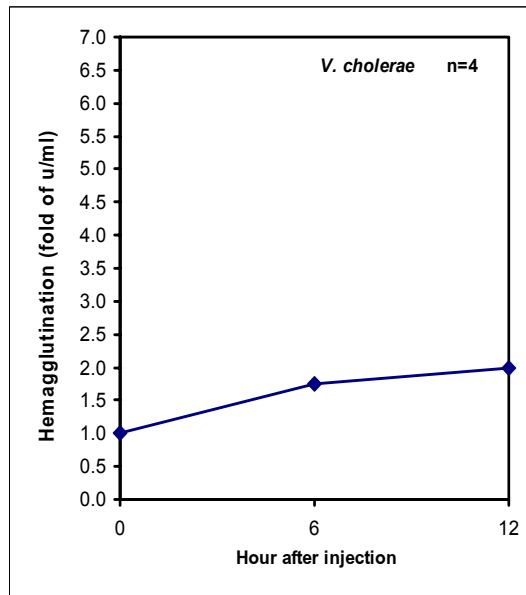
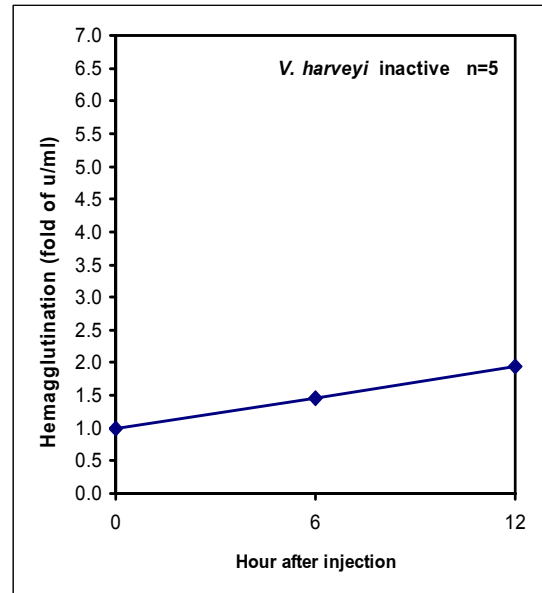
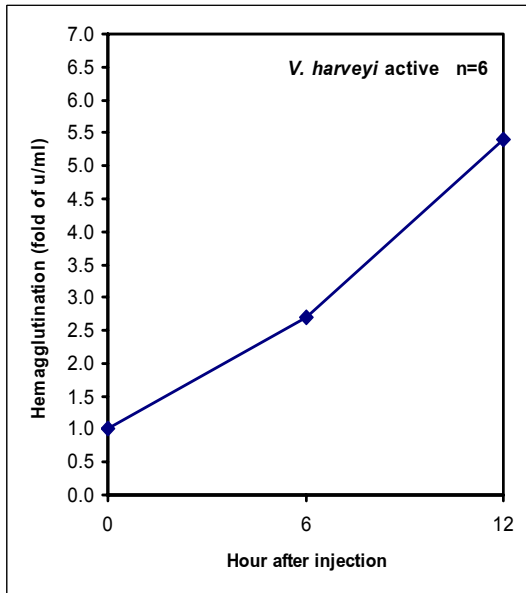
2-keto-3-deoxy-octonate ในส่วนกลางที่มีกรดไขมันหรือน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติกประกอบอยู่ (Cominetti *et al.*, 2002) บ่งชี้ว่ากรดไขมันจากกึ่งแซบวียน่าจะจับอย่างจำเพาะกับผนังเซลล์ของ *V. harveyi* บริเวณที่มีกรดไขมันหรือน้ำตาลที่มีหมู่อะซิติกเป็นองค์ประกอบ เมื่อฉีดกึ่งแซบวียด้วยเชื้อ *V. harveyi* ในปริมาณที่เหมาะสมจึงพบแอกทิวิตีของกรดไขมันและปริมาณโปรตีนของกรดไขมันในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้น (Rittidach, 2006) ตามเวลาหลังการติดเชื้อและตามปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีดกระตุ้น แสดงให้เห็นว่าเมื่อเชื้อก่อโรค *V. harveyi* บุกรุก กุ้งจะค่อยๆ ตอบสนองโดยสร้างสารในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเพื่อต่อต้าน กรดไขมันเป็นโปรตีนที่สามารถจดจำโมเลกุลต่างๆ หรือเป็น pathogen-related protein ที่สำคัญชนิดหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด มีการสร้างเพิ่มขึ้นและมีแอกทิวิตีที่สูงขึ้นเพื่อทำการเกาะกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไปหลังการฉีด ความเป็นไปได้ของกรดไขมันในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งคือเกาะกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคหรือเซลล์แปลกปลอม แล้วนำไปสู่การทำลายเซลล์แปลกปลอมด้วยกิจกรรมอื่นๆ โดยกรดไขมันจับกับเซลล์แบคทีเรียแล้วกระตุ้นให้เกิดกระบวนการออปโซนิซิซิงกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์กำจัดเซลล์แปลกปลอมด้วยวิธีฟาโกไซโทซิส ดังที่พบในกุ้งกุลาดำ (Luo *et al.*, 2006) หรือเกิดการห่อหุ้ม การสร้างเมลานินเพื่อยับยั้งการเติบโตของเชื้อ เป็นต้น ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในกุ้งแซบวีย

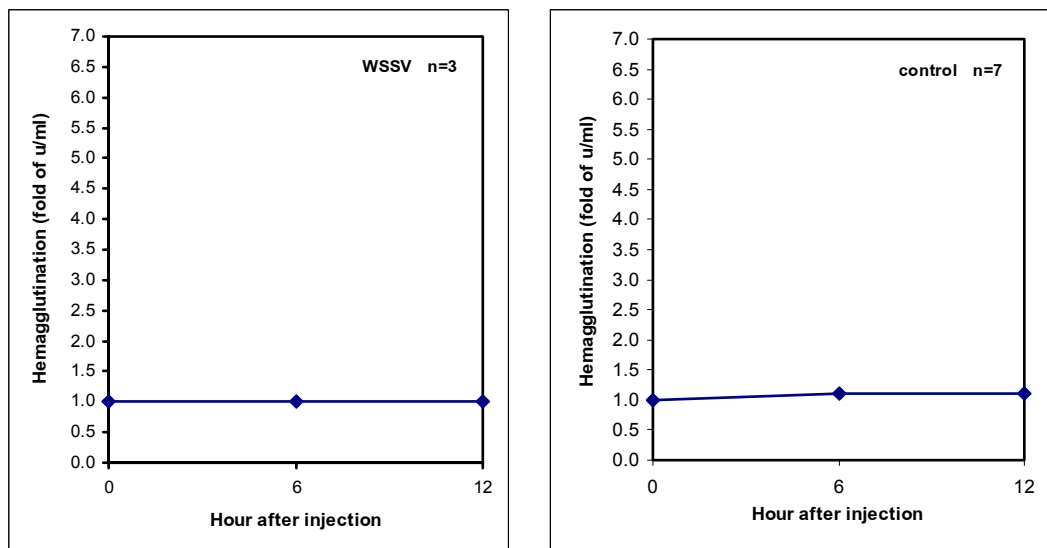
4. ระดับแอกทิวิตีของกรดไขมันในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วยจุลชีพชนิดต่าง ๆ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA

4.1 การเปลี่ยนแปลงของระดับแอกทิวิตีของกรดไขมันในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วยจุลชีพ

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^9 เซลล์/ตัวกุ้ง จะกระตุ้นแอกทิวิตีของกรดไขมันในซีรัมได้ดีกว่าปริมาณอื่น ๆ จากระดับก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) ให้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ณ ชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 โดยไม่ทำให้กุ้งตายภายใน 18 ชั่วโมง จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการกระตุ้นการติดเชื้อของกึ่งแซบวีย ดังนั้นเพื่อทดสอบความจำเพาะของกรดไขมันต่อจุลชีพชนิดอื่น ได้ทดลองฉีดแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ที่ปริมาณเดียวกันนี้ โดยใช้กุ้งทดลองตัวผู้ขนาดกลางจำนวน 5 ตัว ต่อเชื้อแต่ละชนิด แล้วเปรียบเทียบแอกทิวิตีของกรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการฉีดเชื้อ กับของกุ้งชุดที่ฉีดด้วย *V. harveyi* แบบ active

จากการทดลองในรูปแบบที่ 14A และตารางที่ 10 พบว่าเมื่อฉีดกึ่งแซบวียด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active กุ้งแสดงอาการติดโรคชัดเจนคือว่ายน้ำอย่างไร้ทิศทาง และค่อยๆ อ่อนแอลง จากนั้นจะนอนนิ่งๆ และอาจตายก่อน 24 ชั่วโมง เมื่อวัดค่าแอกทิวิตีของกรดไขมันในซีรัมที่ชั่วโมงต่างๆ พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% ทั้งชั่วโมงที่ 6 และ 12 เป็น 2.72 และ 5.43 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่าก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) ซึ่งต่างจากการฉีดด้วย *V. harveyi* ที่ทำให้เป็นแบบ inactive ซึ่งกุ้งแสดงอาการติดเชื้อไม่ชัดเจน อ่อนแอ





E

F

รูปที่ 14 แอคทิวิตีของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดแบคทีเรียหรือ WSSV

- A-D กุ้งที่ฉีดแบคทีเรีย ตัวละ 5×10^9 เซลล์
- E กุ้งที่ฉีด WSSV ตัวละ 5×10^5 เท่าของหัวเชื้อ
- F กุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ

ลงเล็กน้อย ว่ายนํ้าน้อยลง และมีแอกทิวีทีของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้นน้อยกว่า โดยมีแอกทิวีทีเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 6 และ 12 เป็น 1.46 และ 1.94 (อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%) เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 อาจเป็นเพราะเลคตินยังสามารถจดจำต่อคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของเชื้อ *V. harveyi* แบบ inactive ได้ แอกทิวีทีจึงเพิ่มขึ้นเพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่บุกรุก แต่เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียแบบ inactive ไม่มีการเพิ่มจำนวนหลังการฉีดเข้าตัวกุ้ง ดังนั้นจึงอาจมีจำนวนไม่มากพอที่จะกระตุ้นให้กุ้งตอบสนองได้มากนัก จึงพบแอกทิวีทีของเลคตินมีค่าเพิ่มขึ้นน้อยกว่าการฉีด *V. harveyi* แบบ active (ตารางที่ 10 และรูปที่ 14B)

เมื่อฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรียไม่ก่อโรคกุ้งคือ *V. cholerae* พบว่าหลังจากฉีด กุ้งมีอาการอ่อนแอลงเล็กน้อย บางตัวมีอาการเป็นปกติ ณ ชั่วโมงที่ 6 และ 12 สาเหตุที่กุ้งอ่อนแอลงทั้ง ๆ ที่ไม่มีการติดเชื้อจากแบคทีเรียไวรัสชนิดนี้ อาจเป็นเพราะกุ้งถูกเจาะฮีโมลิมพ์ทุก 6 ชั่วโมงทำให้อ่อนเพลียจากการเสียเลือด เมื่อนำซีรัมไปหาไตเตอร์และคำนวณหาแอกทิวีทีของเลคตินพบว่ามีความเพิ่มขึ้นไม่มากนัก เมื่อเทียบกับแอกทิวีทีของเลคตินของกุ้งชุดที่ฉีดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active โดยมีความเพิ่มขึ้นเป็น 1.75 และ 2.00 เท่า ณ ชั่วโมงที่ 6 และ 12 เมื่อเทียบกับค่าก่อนฉีด ดังแสดงผลในตารางที่ 10 และรูปที่ 14C

ในทำนองเดียวกัน เมื่อฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรียไม่ก่อโรคและไม่ได้อยู่ในสกุลไวรัสคือ *E. coli* ในขั้นตอนการเลี้ยงพบว่าขนาดโคโลนีของ *E. coli* ใหญ่กว่าขนาดโคโลนีของ *V. harveyi* ประมาณ 2 เท่า และเมื่อเตรียม *E. coli* ให้มีความเข้มข้นเป็น 5×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีความขุ่นมากกว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นเดียวกันมาก ดังนั้นหลังจากฉีดพบว่ากุ้งมีอาการอ่อนแอลงอย่างเห็นได้ชัด คือนอนนิ่ง ไม่ว่ายนํ้า บางตัวนอนตะแคง ดิ้นเล็กน้อย และบางตัวตายก่อนชั่วโมงที่ 12 เมื่อนำซีรัมไปทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง กระต่าย พบแอกทิวีทีของเลคตินมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกุ้งชุดที่ฉีด *V. cholerae* คือเพิ่มขึ้น 1.37 และ 2.23 เท่า ณ ชั่วโมงที่ 6 และ 12 เมื่อเทียบกับแอกทิวีทีชั่วโมงที่ 0 (ตารางที่ 10 และรูปที่ 14D)

เมื่อพิจารณาค่าแอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินของกุ้งชุดต่าง ๆ เหล่านี้ (ตารางที่ 11) เนื่องจากกุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือหรือแบคทีเรียเหล่านี้มีปริมาณโปรตีนในซีรัมลดลงตามเวลาในอัตราที่ไม่แตกต่างกันในระหว่างแต่ละชุด ดังนั้นค่าแอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินที่หาได้จึงมีค่าเพิ่มขึ้นที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ในทำนองเดียวกับค่าแอกทิวีที (หน่วย/มล.ซีรัม ดังแสดงในตารางที่ 10) แต่มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าเพราะตัวหารคือปริมาณโปรตีนมีค่าลดลงตามเวลา แต่เมื่อเปรียบเทียบแอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังการฉีด ซึ่งเป็นเวลาที่เลคตินในซีรัมมีการตอบสนองมากที่สุดโดยมีค่าเพิ่มขึ้นมากที่สุด ในระหว่างกุ้งที่ฉีดด้วยแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยกำหนดให้แอกทิวีทีจำเพาะของเลคตินของกุ้งชุดควบคุมมีค่าเป็น 1 เท่า (ค่า #Fold ในตารางที่ 11) พบว่าการฉีดกุ้งด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active จะกระตุ้นให้มีเลคตินเพิ่มขึ้นมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 6.15 เท่า ส่วน

แอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ inactive มีค่าเพิ่มขึ้น 1.99 เท่า ทั้งนี้เพราะแม่เป็นเชื้อก่อโรค *V. harveyi* เช่นกัน แต่ไม่มีการเติบโตหลังการฉีดจึงมีปริมาณไม่มากพอที่จะกระตุ้นให้กุ้งสังเคราะห์เลคตินเพิ่มขึ้นเท่าแบบ active ส่วนการฉีดกุ้งด้วยเชื้อไม่ก่อโรค *V. cholerae* หรือ *E. coli* ให้ผลใกล้เคียงกันกับการฉีด *V. harveyi* แบบ inactive แม้เลคตินของกุ้งแซบวัยไม่มีความจำเพาะต่อ *V. cholerae* หรือ *E. coli* และไม่สามารถทำให้แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เกาะกลุ่มได้ (Utarabhand *et al.*, 2007) แต่การที่ค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า อาจเป็นเพราะกุ้งพยายามต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกซึ่งมีปริมาณมากและไม่ได้เป็นเชื้อก่อโรคได้ในระดับหนึ่งเพื่อการอยู่รอดของตนเอง ดังเช่นที่มีการกระตุ้นปริมาณเลคตินในอีโมลิมพ์ให้เพิ่มขึ้นในปูม้า *Callinectes sapidus* (Pauley, 1973) และใน *Scylla serrata* ด้วยการฉีดด้วยเม็ดเลือดแดงของคนและกระต่าย (Mercy and Ravindranath, 1994)

ส่วนการฉีดด้วยไวรัสก่อโรคตัวแดงดวงขาว WSSV (Lightner, 1999) ในกุ้งแซบวัย ด้วยปริมาณตัวละ 1×10^{-5} เท่าของปริมาณหัวเชื้อ ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้ในการกระตุ้นให้กุ้งกุลาดำเกิดโรค (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2542) พบว่าแอกทิวิตีของเลคตินมีค่าเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดการทดลองหลังการฉีด (ตารางที่ 10-11 และรูปที่ 14E) จึงได้ลองทดสอบหาแอกทิวิตีของกุ้งที่ฉีด WSSV ที่ปริมาณต่างๆ กัน คือ 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} และ 1×10^{-6} เท่าของหัวเชื้อ เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่มีผลต่อระดับเลคติน ก็ยังพบว่า WSSV ที่ปริมาณต่างๆ เหล่านี้ทำให้แอกทิวิตีของเลคตินมีค่าเปลี่ยนแปลงน้อยมาก หรือเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ไม่ได้แสดงผลไว้) แสดงให้เห็นว่าเลคตินของกุ้งแซบวัยไม่ตอบสนองต่อไวรัสก่อโรคกุ้ง อาจเป็นเพราะ WSSV เป็นไวรัสที่ไม่มีผิวเซลล์ ประกอบไปด้วยโปรตีนที่เลคตินจดจำไม่ได้ จึงไม่พบการตอบสนองของเลคตินจากการฉีดไวรัสชนิดนี้

จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งแซบวัยตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active มากที่สุดโดยมีระดับแอกทิวิตีที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *E. coli*, *V. cholerae*, *V. harveyi* แบบ inactive และ WSSV ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของ *E. coli* ที่ใช้ฉีดอาจไม่เหมาะสมในการทดลองนี้เพราะ *E. coli* มีขนาดใหญ่กว่า *V. harveyi* มาก และจากงานของ Utarabhand *et al.* (2007) ที่พบว่าเลคตินในอีโมลิมพ์ของกุ้งแซบวัยสามารถทำให้เฉพาะแบคทีเรียก่อโรคกุ้งคือ *V. harveyi*, *V. parahemolyticus* และ *V. vulnificus* เกาะกลุ่มได้ แต่ไม่ทำให้แบคทีเรียไม่ก่อโรคกุ้งคือ *E. coli* หรือ *V. cholerae* เกาะกลุ่ม ซึ่งบ่งบอกถึงความจำเพาะของเลคตินต่อชนิดของแบคทีเรียและสอดคล้องกับงานวิทยานิพนธ์นี้ที่พบแอกทิวิตีของเลคตินเมื่อกระตุ้นด้วย *E. coli* หรือ *V. cholerae* รวมถึงไวรัส WSSV มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากเมื่อเทียบกับ *V. harveyi* แสดงให้เห็นว่าเลคตินมีบทบาทเกี่ยวข้องกับป้องกันตนเองของกุ้งแซบวัยโดยตอบสนองอย่างจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคที่รุกราน เช่น *V. harveyi* แบบ active แต่ไม่มีผลจากแบคทีเรียไม่ก่อโรคในกุ้งแซบวัย เช่น *E. coli* และ

V. cholerae หรือ WSSV ซึ่งคล้ายกับการเพิ่มขึ้นของค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่มีบทบาทป้องกันตนเองในกุ้งแชบ๊วย 2 ชนิดคือเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส (β -1,3-glucanase) และเอนไซม์ NAGase (N-acetyl glucosaminidase) ที่ร้อยละ 2549 รายงานว่ามีค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ NAGase ในซีรัมเพิ่มขึ้นตามเวลาและเพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เป็น 2.57 และ 1.99 เท่า ตามลำดับเวลา 12 ชั่วโมง หลังกระตุ้นให้กุ้งติดเชื้อด้วยการฉีดด้วย *V. harveyi* แบบ active ปริมาณ 5×10^9 เซลล์/ตัวกุ้ง เมื่อเทียบกับค่าแอกทิวิตีจำเพาะในซีรัมก่อนฉีด ส่วนการกระตุ้นด้วยการฉีดด้วย *E. coli* และ *V. cholerae* หรือ WSSV มีผลทำให้แอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในซีรัมมีค่าเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

4.2 การเปลี่ยนแปลงของระดับแอกทิวิตีของเลคตินในสารสกัดตับของกุ้งที่ฉีดด้วยจุลชีพ

จากผลศึกษาการกระจายของเลคตินในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งที่จับจากธรรมชาติ (ผลข้อ 2) ที่พบว่าซีรัมมีแอกทิวิตีรวมของเลคตินมากที่สุด (15,600 หน่วย) รองลงมาคือสารสกัดตับและรังไข่ เนื่องจากกุ้งที่ใช้ในการฉีดจุลชีพต่างๆ เป็นกุ้งตัวผู้ ดังนั้นจึงได้วัดระดับแอกทิวิตีของเลคตินเฉพาะในสารสกัดตับเทียบกับในซีรัม (ฮีมอลิมฟ์) เพื่อดูผลของจุลชีพเหล่านี้ โดยการฉีดด้วยแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* (แบบ active และ inactive) แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคกุ้ง (*E. coli* และ *V. cholerae*) ในปริมาณเท่ากันคือ 5×10^9 เซลล์/ตัวกุ้ง หรือฉีดด้วย WSSV ปริมาณ 10^{-5} เท่าของหัวเชื้อ หลังการฉีด 12 ชั่วโมง เจาะฮีมอลิมฟ์และตัดตับเพื่อไปเตรียมเป็นซีรัมและสารสกัดตับ ตามลำดับ แล้วนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ดังผลที่แสดงในตารางที่ 12 ที่พบว่าแอกทิวิตีจำเพาะของเลคตินในสารสกัดตับของกุ้งที่ฉีด *V. harveyi* แบบ active มีค่าเพิ่มขึ้นมากที่สุด (47.2 ± 10.4 หน่วย/มก.โปรตีน) คือเพิ่มขึ้น 1.81 เท่า อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ (26.1 ± 14.2 หน่วย/มก.โปรตีน, 1 เท่า) สารสกัดตับของกุ้งที่ฉีดด้วย *E. coli* มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นเป็น 1.22 เท่า การฉีดด้วย *E. coli* ในปริมาณที่เท่ากัน (5×10^9 เซลล์/ตัวกุ้ง) พบว่าสารแขวนลอย *E. coli* ที่ใช้ฉีดมีความขุ่นมากกว่า เนื่องจากขนาดโคโลนีของ *E. coli* มีขนาดใหญ่กว่า *V. harveyi* ประมาณ 2 เท่า ดังนั้นการฉีดด้วยจำนวนเซลล์ที่เท่ากันเมื่อเทียบเป็นปริมาณผิวเซลล์แล้ว การฉีดด้วย *E. coli* จึงมีปริมาณมากกว่าของ *V. harveyi* อาจเป็นผลทำให้พบค่าแอกทิวิตีของเลคตินเพิ่มขึ้นได้ สำหรับกุ้งที่ฉีด *V. harveyi* แบบ inactive, *V. cholerae* หรือ WSSV พบว่าแอกทิวิตีจำเพาะของเลคตินในสารสกัดตับมีค่าลดลง เป็น 0.78 เท่า อย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 12)

เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของกุ้งต่อจุลชีพเหล่านี้ ต่อระดับเลคตินในฮีโมลิมพ์พบว่า มีผลในทำนองที่คล้ายกับในสารสกัดตับ กล่าวคือ ณ เวลา 12 ชั่วโมงหลังการฉีด กุ้งที่กระตุ้นด้วย *V. harveyi* แบบ active มีแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้น 6.15 เท่า อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เมื่อเปรียบเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ (87.00 \pm 2.90 หน่วย/มก.โปรตีน, 1 เท่า) แต่การกระตุ้นกุ้งด้วยการฉีด *V. harveyi* แบบ inactive, *V. cholerae*, *E. coli* หรือ WSSV ทำให้ค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้น เป็น 1.99, 2.12, 2.46 และ 1.61 เท่า ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 12) ด้วยเหตุผลดังได้กล่าวแล้วในข้อ 4.1

การฉีดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active อาจกระตุ้นทำให้เลคตินที่จำเพาะต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ในตับตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคจึงทำให้มีค่าแอกทิวิตีที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การฉีดด้วย *V. harveyi* แบบ inactive เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มจำนวนในกุ้งได้อีก อาจมีจำนวนเซลล์ไม่มากพอที่จะกระตุ้นให้กุ้งตอบสนองได้ จึงพบระดับแอกทิวิตีในตับไม่เพิ่มขึ้นแต่ลดลงเล็กน้อย ส่วนการฉีดกุ้งด้วย *E. coli* หรือเชื้อก่อโรคในคน *V. cholerae* ไม่มีผลต่อระดับเลคตินเพราะเลคตินของกุ้งแซบวัยที่ศึกษาไม่มีความจำเพาะหรือจดจำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ (Rittidach *et al.*, 2007; Utarabhand *et al.*, 2007) สำหรับการฉีดกุ้งด้วยไวรัสก่อโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งแซบวัย WSSV (Lightner, 1999) ด้วยปริมาณ 1×10^{-5} เท่าของหัวเชื้อ ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้ในการกระตุ้นให้กุ้งกุลาดำเกิดโรค (กิจการ ศุภมาตย์, 2542) ให้ผลทำนองเดียวกันคือไม่มีผลต่อระดับเลคตินในสารสกัดตับเพราะเลคตินของกุ้งแซบวัยไม่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของไวรัส WSSV เป็นการยากที่จะเทียบผลการทดลองการตอบสนองของเลคตินในตับต่อการฉีดเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรคร่วมกันของผู้อื่น เพราะยังไม่มีรายงานการทดลองในลักษณะเช่นนี้ แต่จากการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ที่มีบทบาทในการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมและเชื้อก่อโรค โดยทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ราหรือจุลชีพที่บุกรุก (Truschel *et al.*, 1987) อรัญญา คงแก้ว (2549) พบว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในตับของกุ้งแซบวัยที่ฉีดด้วย *V. harveyi* แบบ active เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 1.97 และ 1.50 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ บ่งชี้ว่าตับอาจเป็นแหล่งสังเคราะห์เลคตินและเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งต้องยืนยันผลด้วยการศึกษาระดับยีนต่อไป สำหรับบทบาทของเลคตินที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของกุ้งแซบวัยต่อแบคทีเรียก่อโรค กุ้งอาจถูกกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เลคตินในตับในสภาวะที่กุ้งได้รับเชื้อก่อโรคในปริมาณที่มากเกินไปพอ แล้วหลังเลคตินออกสู่อีโมลิมพ์เพื่อร่วมทำลายเชื้อหรือยับยั้งการรุกรานด้วยกิจกรรมอื่น ๆ แต่กลไกแท้จริงเป็นเช่นไรต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป

5. ระดับแอกทิวทิฟของเลคตินในซีรัมของกุงที่ฉีดด้วย *V. Harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร

เหลว TSB

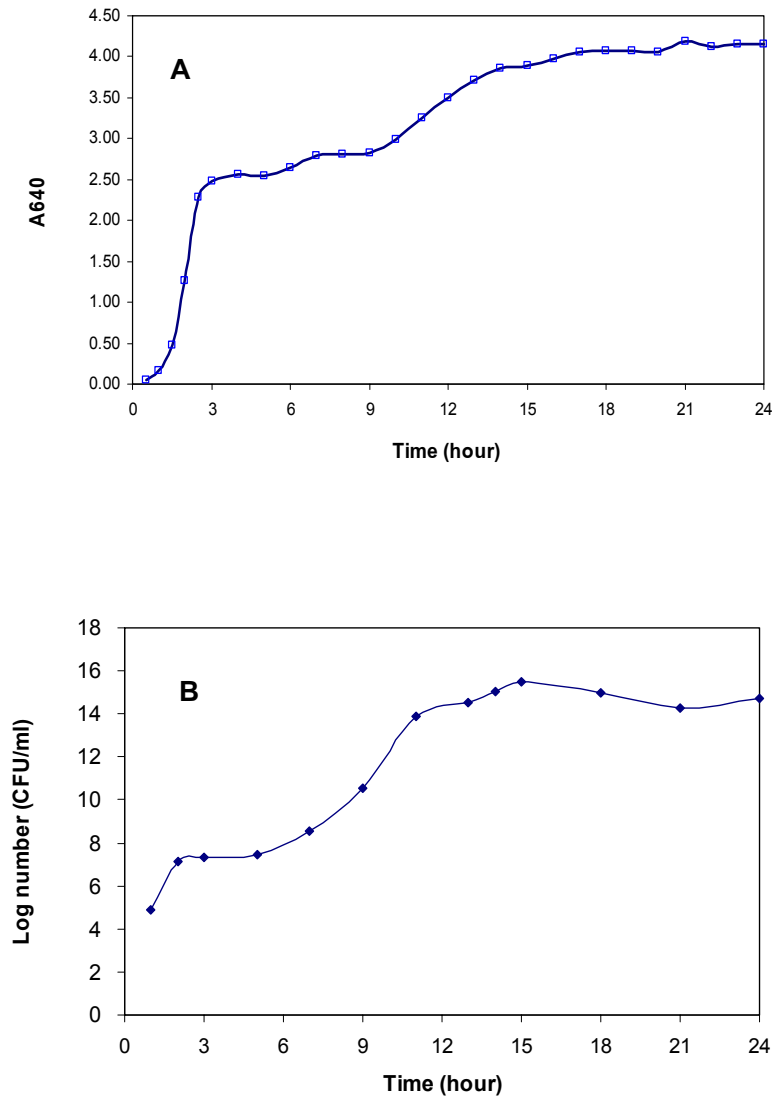
เพื่อทดสอบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งเป็นอาหารที่ทำให้เซลล์เติบโตได้ดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) มีผลในการกระตุ้นให้กุงตอบสนองได้ต่างกันหรือไม่ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการเลี้ยง *V. harveyi* ในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) แล้วนำไปฉีดกระตุ้นกุงแซบวัยในทำนองเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา

5.1 การเติบโตของ *V. Harveyi* ในอาหารเหลว TSB

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *V. harveyi* ในอาหารเหลว TSB และติดตามการเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร (A640) ทุก 1 ชั่วโมงของการเลี้ยงใน 12 ชั่วโมงแรก และทุก 3 ชั่วโมง ใน 12 ชั่วโมงหลังพบว่าในช่วง 1-2 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง มีค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นน้อยมาก ความขุ่นหรือค่า A640 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3-11 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง หลังจากนั้นค่า A640 ยังคงเพิ่มขึ้นแต่เป็นอย่างช้าๆ และค่อย ๆ คงที่ที่ 15-24 ชั่วโมง (รูปที่ 15 A)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงที่เวลาต่าง ๆ ไปเกลี่ยบนเพลทที่มีอาหารนับเชื้อ PCA เพื่อนับจำนวนเซลล์ *V. harveyi* ที่เจริญในเพลท พบว่าการเติบโตของ *V. harveyi* ในอาหารเหลวแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คล้ายกับแบคทีเรียอื่นทั่วไปคือ ระยะแรกเป็น lag phase ซึ่งอยู่ในช่วง 0-2 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง จะมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นน้อยมาก จากนั้นปริมาณแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง log phase หรือในช่วง 2-11 ชั่วโมงของการเลี้ยง หลังจากนั้นการเติบโตยังคงเพิ่มขึ้นแต่เป็นอย่างช้าๆ และค่อย ๆ คงที่ที่ 13-24 ชั่วโมง ซึ่งเป็น stationary phase (รูปที่ 15B) เมื่อเปรียบเทียบการวัดความขุ่นกับการนับเซลล์ที่เจริญบนอาหาร PCA พบว่าแบบแผนกราฟการเติบโตจะคล้ายกัน แม้การวัดความขุ่นในช่วงที่มีปริมาณเซลล์มาก ทำให้ต้องเจือจางตัวอย่างซึ่งส่งผลทำให้ค่าคลาดเคลื่อนได้บ้าง แต่ก็ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวช่วงกลางของ log phase คือเลี้ยงในอาหาร 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์กำลังเติบโตดี อายุยังน้อยและ active ไปฉีดกุงในช่วง 5×10^6 - 5×10^7 เซลล์/ตัวกุง กลับพบว่าปริมาณดังกล่าวไม่มีผลกระตุ้นทำให้ระดับแอกทิวทิฟของเลคตินในซีรัมเปลี่ยนแปลง (ไม่ได้แสดงผลไว้) ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียที่เลี้ยงในช่วง log phase แม้เซลล์จะ active แบ่งตัวเติบโตได้ดี แต่ไม่มีความคงทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เช่นในตัวกุง ดังนั้นจึงตายได้ง่าย และมีผลคล้ายกับการฉีดกุงด้วย *V. Harveyi* แบบ inactive ดังนั้นในการทดลองที่เหลือทั้งหมดจึงได้เลี้ยง *V. harveyi* ในอาหารเหลวเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เซลล์แบคทีเรียที่แข็งแรงและทนต่อสิ่งแวดล้อม (ภายใต้คำแนะนำของรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)



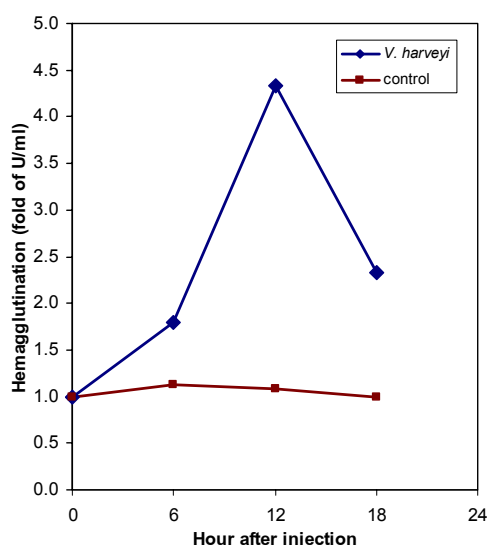
รูปที่ 15 การเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

A ความขุ่น (A640) ของ *V. harveyi* ที่ชั่วโมงต่างๆ จาก 3 การทดลอง

B Log number (CFU/ml) ของ *V. harveyi* ที่ชั่วโมงต่างๆ

5.2 การเปลี่ยนแปลงระดับแอกทีวิตีของเลคตินตามเวลาหลังการฉีด *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB

ในการหาเวลาที่เหมาะสมในการตอบสนองของเลคติน จากการฉีดเชื้อ *V. harveyi* แบบ active ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^6 เซลล์/ตัวกุ้ง ซึ่งทดลองเช่นเดียวกันกับการฉีดเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน TSA แล้วเจาะฮีโมลิมพ์จากกุ้งแต่ละตัวที่เวลาต่างๆ คือเวลาก่อนฉีดและหลังการฉีดคือ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมง พบว่าแอกทีวิตีในการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินในซีรัมมีค่าเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ($7,680 \pm 61$ หน่วย/มล.ซีรัม) ณ ชั่วโมงที่ 6 ($13,824 \pm 60$ หน่วย/มล.ซีรัม) และเพิ่มสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ณ ชั่วโมงที่ 12 ($33,254 \pm 49$ หน่วย/มล.ซีรัม) จากนั้นมีค่าลดลง ณ ชั่วโมงที่ 18 ($17,894 \pm 58$ หน่วย/มล.ซีรัม) ดังแสดงผลดังในรูปที่ 16 และตารางที่ 13 ซึ่งกุ้งมีการตอบสนองตามเวลาในรูปแบบเดียวกันกับของกุ้งที่ฉีดด้วยแบคทีเรียชนิดนี้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง TSA (รูปที่ 11)



รูปที่ 16 แอกทีวิตีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^6 เซลล์/ตัวกุ้ง
 กุ้งที่ฉีดแบคทีเรีย ตัวละ 5×10^6 เซลล์ (N=4)
 กุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ (N=7)

ตารางที่ 13 แอคทิวิตีของเลคตินในซีรัม ณ เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^6 เซลล์/ตัวกึ่ง

Time after injection (hour)	Injection			
	Control (0.85% NaCl), N=7		<i>V. harveyi</i> , N=4	
	Activity (U/ml)	Fold	Activity (U/ml)	Fold
0	7,680 ± 45	1.00	7,680 ± 61	1.00
6	8,678 ± 21	1.13	13,824 ± 60	1.80
12	8,294 ± 17	1.08	33,254 ± 49	**4.33
18	7,680 ± 0	1.00	17,894 ± 58	*2.33

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง

* เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

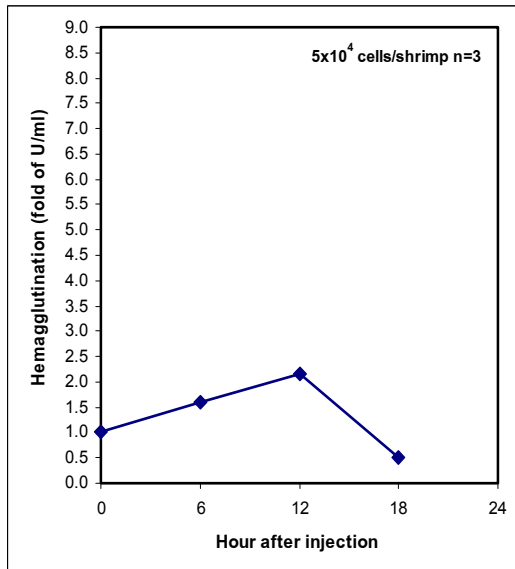
5.3 การเปลี่ยนแปลงระดับแอคทิวิตีของเลคตินตามปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ฉีด

จากผลการทดลองในข้อ 5.2 ที่พบว่าระดับเลคตินในซีรัมของกึ่งซึ่งฉีดด้วย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณ 5×10^6 เซลล์/ตัวกึ่ง มีค่าแอคทิวิตีที่เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 จึงได้เลือกทำการทดลองต่อโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเลคตินให้ครอบคลุมเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้ระดับเลคตินเปลี่ยนแปลง ในการหาปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้กึ่งตอบสนอง ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารแข็ง TSA โดยขั้นตอนฉีดกึ่งด้วย *harveyi* แบบ active ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ในช่วง 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง หลังจากฉีดกึ่งพบว่าเชื้อปริมาณ 5×10^8 และ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง ทำให้กึ่งอ่อนแรงลงอย่างรวดเร็ว กึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง ตายภายใน 1 ชั่วโมงหลังฉีด ส่วนกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ 5×10^8 เซลล์ต่อตัวกึ่ง ตายภายใน 6 ชั่วโมงหลังการฉีด ต่างจากอาการของกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ปริมาณเท่ากันที่กึ่งค่อย ๆ แสดงอาการติดเชื้อในเวลาที่ยาวกว่าและไม่ตายภายใน 18 ชั่วโมง ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองต่อด้วยการฉีด *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวด้วยปริมาณที่น้อยลงคืออยู่ในช่วง 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 และ 5×10^7

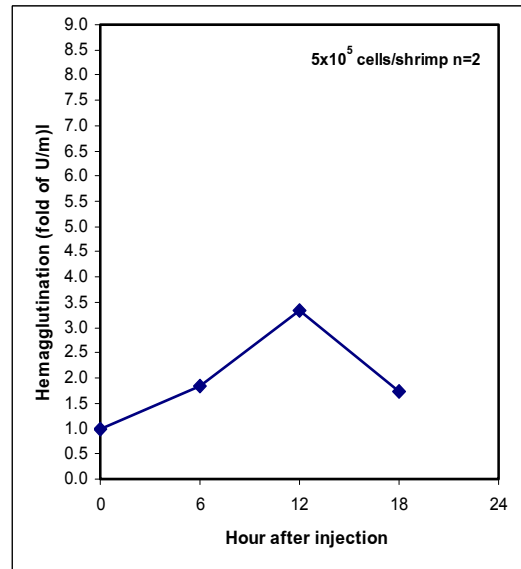
เซลล์/ตัวกึ่ง และใช้ตัวกึ่งขนาดกลางตัวผู้ พบว่าหลังการฉีด 6 ชั่วโมง กึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง แสดงอาการอ่อนเพลีย บางตัวนอนนิ่ง ส่วนกึ่งที่ฉีดด้วย *V. harveyi* ปริมาณที่น้อยกว่าไม่แสดงอาการมากนัก แต่หลังการฉีด 12 ชั่วโมง กึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อปริมาณต่างๆ เริ่มแสดงอาการอ่อนแอมากขึ้นตามปริมาณเชื้อที่ฉีด กึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ 5×10^4 เซลล์/ตัวกึ่ง ไม่ค่อยแสดงอาการอ่อนแอมากนัก บางตัวมีอาการเป็นปกติจนถึงชั่วโมงที่ 18 แสดงว่าปริมาณเชื้อน้อยเกินไปที่จะทำให้กึ่งอ่อนแอ

เมื่อติดตามระดับของเลคตินในซีรัมของกึ่งเหล่านี้ที่ฉีดด้วย *V. harveyi* ปริมาณต่าง ๆ พบว่ากึ่งแต่ละชุดทุกปริมาณมีรูปแบบการตอบสนองของเลคตินในทำนองเดียวกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 13 กล่าวคือการฉีดกึ่งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ในช่วง 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 และ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง สามารถกระตุ้นให้แอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95-99% เป็น 1.60, 1.83, 1.80 และ 3.33 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 17) และเพิ่มสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 2.17, 3.35, 4.33 และ 6.83 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 17) แต่มีแอกทิวิตีลดลง ณ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด โดยมีค่าเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เป็น 0.50, 1.73, 2.33 และ 1.67 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกึ่งชุดเดียวกัน ณ ชั่วโมงที่ 0 (ตารางที่ 14 และรูปที่ 17) จะเห็นได้ว่ากึ่งทดลองทั้ง 4 ชุด มี การตอบสนองต่อเชื้อในทำนองเดียวกันคือมีแอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมง 12 จากนั้นมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 18 หลังการฉีด (รูปที่ 17) และเช่นเดิมการฉีดกึ่งด้วยน้ำเกลือไม่ทำให้ระดับของเลคตินในซีรัมเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาที่ทดลอง (รูปที่ 17E)

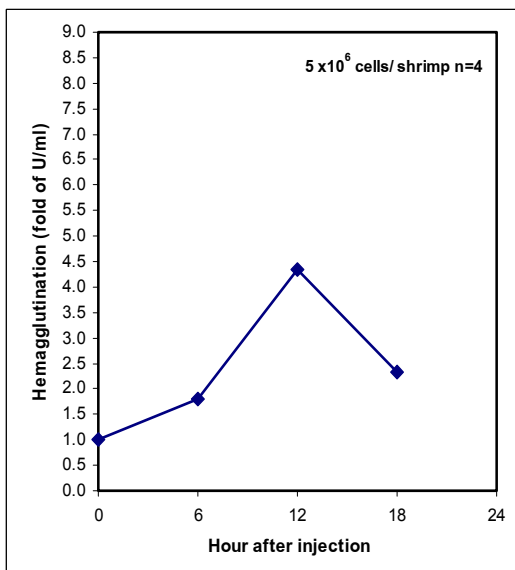
นอกจากนี้กึ่งมีการตอบสนองต่อปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีดอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบแอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้นแปรผันตามปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้ฉีดและเพิ่มสูงสุดเมื่อใช้เชื้อ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง (รูปที่ 17D และตารางที่ 14) ดังจะเห็นได้ว่าค่าแอกทิวิตีของเลคตินในซีรัมของกึ่งชุดนี้มีการเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดอื่น ณ ที่ 6 (3.33 เท่า) และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด (6.83 เท่า) และลดลงอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันที่ชั่วโมงที่ 18 (1.67 เท่า) ดังนั้นการฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้กึ่งติดเชื้อและตอบสนองได้ดี รวมทั้งไม่ทำให้กึ่งตายภายใน 18 ชั่วโมง ที่ทำการศึกษา



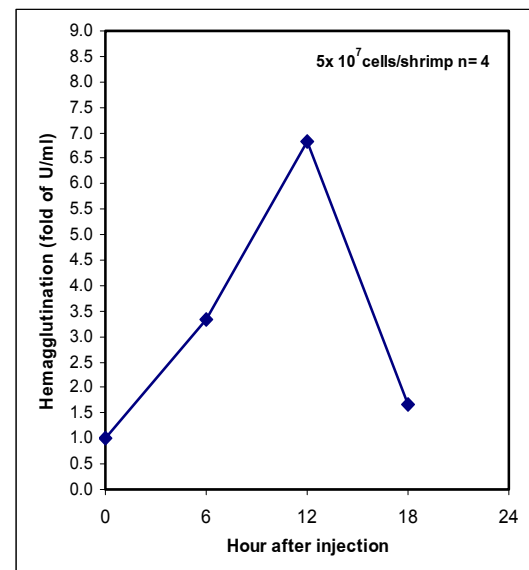
A



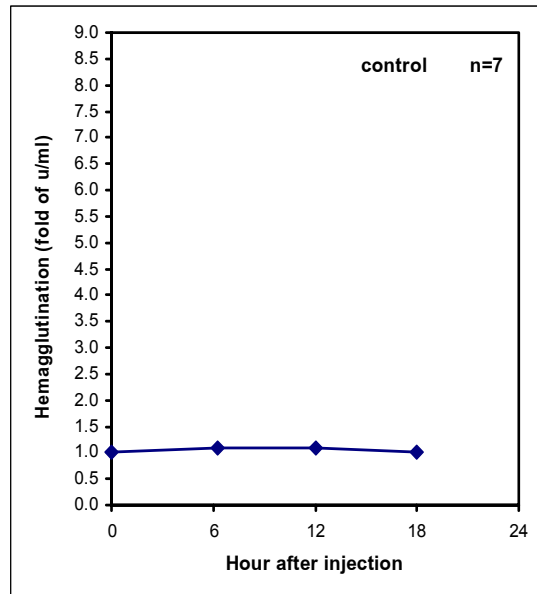
B



C



D



E

รูปที่ 17 แอคติวิตีของเลือดหินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยง
ในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^4 - 5×10^7 เซลล์/ตัวกุ้ง
กุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ

เมื่อพิจารณาค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินในซีรัมของกุ้งที่ฉีดด้วย *V. harveyi* แบบ active ที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าการฉีดกุ้งด้วยปริมาณ 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 และ 5×10^7 เซลล์/ตัวกุ้ง มีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่าแอกทิวิตีของเลคติน (หน่วย/มล.ซีรัม, ตารางที่ 14) กล่าวคือในแต่ละชุดของกุ้งที่ฉีดเชื้อแต่ละปริมาณ ค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินมีรูปแบบแผนที่เหมือนกัน คือมีค่าเพิ่มมากขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และเพิ่มมากที่สุดที่ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีการลดลงในชั่วโมงที่ 18 หลังการฉีด (ตารางที่ 15) เช่นการฉีดกุ้งปริมาณ 5×10^7 เซลล์/ตัวกุ้ง จะมีแอกทิวิตีที่จำเพาะ ณ ชั่วโมงที่ 0, 6, 12 และ 18 เป็น 52.88 ± 5.93 , 193.16 ± 10.26 , 555.34 ± 9.58 และ 168.43 ± 0 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ หรือคิดเป็นปริมาณแอกทิวิตีที่จำเพาะที่เพิ่มขึ้นเป็น 1, 3.65, 10.50 และ 3.18 เท่า ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่าง ณ เวลาต่างๆ นี้ เป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น **95-99%** (ตารางที่ 15)

นอกจากนี้ ค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินเมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเดียวกันหลังการฉีด จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณเชื้อที่ใช้ฉีด ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 15 ดังเช่น ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีดซึ่งเป็นเวลาที่กุ้งตอบสนองดีที่สุด กุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อปริมาณ 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 และ 5×10^7 เซลล์/ตัวกุ้ง มีแอกทิวิตีที่จำเพาะเป็น 223.85 ± 6.14 , 364.35 ± 11.07 , 453.52 ± 9.37 และ 555.34 ± 9.58 หน่วย/มก.โปรตีน หรือคิดเป็นปริมาณแอกทิวิตีที่จำเพาะที่เพิ่มขึ้นเป็น 3.77, 5.57, 7.60 และ 10.50 เท่า ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น **95-99%** เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมซึ่งมีค่าแอกทิวิตีที่จำเพาะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ (87.00 ± 2.90 หน่วย/มก.โปรตีน, 1.36 เท่า) เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 (64.03 ± 8.56 หน่วย/มก.โปรตีน, 1 เท่า) (ตาราง ที่ 15) ดังได้กล่าวแล้วว่ากุ้งที่ฉีดเชื้อแต่ละปริมาณมีค่าโปรตีนในซีรัมลดลงตามเวลาหลังการฉีด และมีอัตราการลดที่ไม่ต่างจากของกุ้งชุดควบคุม

จากทั้งค่าแอกทิวิตีและแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินในซีรัมพบว่าการฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้กึ่งตอบสนองได้ดีที่สุดโดยติดเชื้อได้ดีและไม่ทำให้กึ่งตายภายใน 18 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับระดับของเลคตินในซีรัมของกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA พบว่าเมื่อใช้ปริมาณ *V. harveyi* เท่ากันคือ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB สามารถกระตุ้นทั้งแอกทิวิตีและแอกทิวิตีที่จำเพาะของเลคตินในซีรัมให้มีค่าเพิ่มขึ้นสูงกว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงใน TSA ไม่ว่าจะที่เวลา 6, 12 หรือ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด (ตารางที่ 16) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในระหว่างการเติบโตสัมผัสกับอาหารได้มากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีพื้นที่จำกัดกว่าและแย่งชิงอาหารกันมากกว่า ทำให้แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวเจริญเติบโตและแข็งแรงมากกว่า เมื่อบุกรุกเข้าสู่ร่างกายกึ่งจึงคงทนต่อสิ่งแวดล้อมในกึ่งได้ดีกว่าและสามารถขยายเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ร่างกายกึ่งพยายามต่อต้านและทำลายมากกว่าจึงเป็นการกระตุ้นกึ่งให้ตอบสนองโดยหลังสารที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า ซึ่งเลคตินเป็นโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียจนถึงถูกกระตุ้นให้มีแอกทิวิตีเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นการป้องกันตนเองจากเชื้อโรค มาจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Locker *et al.*, 2004) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียซึ่งรวมทั้งกึ่งแซบวัย ล้วนแล้วเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ซึ่งเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ที่ผ่านมายังไม่พบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับระดับแอกทิวิตีของเลคตินที่เปลี่ยนแปลงหลังการฉีดด้วยเชื้อชนิดต่างๆ เหมือนในการงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ได้ยาก แต่ส่วนใหญ่จะศึกษาการตอบสนองของเลคตินต่อเชื้อก่อโรคต่างๆ โดยวิธีทดสอบการเกาะกลุ่มของเซลล์ของเชื้อที่ต้องการศึกษา และทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เนื่องจากเลคตินสามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์แปลกปลอมที่ไม่ใช่เซลล์เจ้าบ้านได้ (Christiane *et al.*, 2004) โดยบริเวณผิวเซลล์เหล่านั้นมีรายละเอียดย่อยๆ ที่บอกถึงความแตกต่างของเชื้อจุลชีพแต่ละชนิด (Hao wang *et al.*, 2007) แบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่มีกรดไซอะลิกหรือน้ำตาลที่มีหมู่อะซิเตลเป็นองค์ประกอบ แต่ลำดับการเรียงตัวของน้ำตาลแตกต่างกันในผนังเซลล์ เช่น ในสายใยไกลแคนประกอบด้วย NAcGlc และ NAcMur ต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกสลับกันตลอดสาย (<http://en.wikipedia.org/wiki/Peptidoglycan>, retrived April 13, 2008) สำหรับผนังเซลล์ของเชื้อ *V. harveyi* มีโครงสร้างประกอบด้วยเยื่อชั้นนอกซึ่งมีโครงสร้างเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีฟอสโฟลิพิดและโปรตีนน้อยกว่า ในแบคทีเรียบางชนิดพบว่ามีลิโปโพลีแซคคาไรด์ด้วย และอาจเป็นชนิดที่มี O-antigen

เป็นองค์ประกอบ แต่บางชนิดไม่มี ด้วยเหตุนี้ทำให้การจับของเลคตินมีความแตกต่างกัน และเป็นสาเหตุที่ทำให้แอกทิวิตีของเลคตินในกุ่มแซบวัยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ

ก่อโรค *V. harveyi* แต่กลับเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อกระตุ้นด้วยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ล้วนเป็นแบคทีเรียแกรมลบด้วยกันทั้งสิ้น ยกเว้นเชื้อไวรัส WSSV ซึ่งอาจมีน้ำตาลที่ไม่จำเพาะต่อเลคตินของกุ้งแพรวัย มีงานวิจัยต่างๆ ที่ศึกษาเลคตินซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนและส่วนใหญ่พบว่าเลคตินในสัตว์ชนิดที่ศึกษาสามารถเกาะกลุ่มเซลล์ของเชื้อก่อโรคได้ เช่น Tunkijjanukij และคณะ (1999) พบเลคตินในหอยนางรม *C. gigas* สามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรค *V. salmonicida*, *V. viscosus*, และ *V. wodanis* เกิดการเกาะกลุ่มได้ ส่วนแบคทีเรีย *V. anguillarum*, *V. ordalii* และ *S. putrefaciens* เกาะกลุ่มได้เล็กน้อย ส่วน Bulgakov และคณะ (2004) ศึกษาเลคตินในหอยกาบมะนิลา *R. philippinarum* พบเป็นชนิดจับจำเพาะกับ hypnospore บริสุทธิ์ของเชื้อโปรโตซัว *Perkinsus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในหอยชนิดนี้ได้ Gokudan และคณะ (1999) พบว่าเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของแมงดาทะเล *T. tridentatus* ชนิด TLs-5 สามารถเกาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดได้ และมีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่มีหมู่อะซิติกเป็นองค์ประกอบ เลคตินโมโนตินในกุ้งกุลาดำทำให้แบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำเกาะกลุ่มได้ (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990; 1992) ส่วน Luo และคณะ (2006) พบเลคตินในกุ้งกุลาดำชนิดที่มีความจำเพาะต่อลิโปโพลีแซคคาไรด์สามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำ ซึ่งได้แก่ *M. lysodeikticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus* และ *V. parahemolyticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ และการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคตินชนิดนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ที่มี O-antigen เป็นองค์ประกอบจาก *E. coli* O127:B8 แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยลิโปโพลีแซคคาไรด์ของ *E. coli* EH100 ซึ่งไม่มี O-antigen เป็นองค์ประกอบ Yang และคณะ (2007) ศึกษาเลคตินในกุ้งลายเสือพบว่า เป็นเลคตินชนิด C มีความจำเพาะกับ NAcMan, NAcNeu และลิโปโพลีแซคคาไรด์ และสามารถทำให้เชื้อก่อโรคในกุ้งลายเสือ เช่น *V. parahemolyticus*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus* และ *M. lysodeikticus* เกิดการเกาะกลุ่มได้ นอกจากเลคตินส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มักเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบซึ่งทำให้เลคตินสามารถทำให้เซลล์เหล่านี้เกิดการเกาะกลุ่มได้ดีแล้ว เลคตินยังสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ทำงานได้เช่น เลคตินจาก Japanese horseshoe crab และเลคตินจากแมลงสาป (*B. discoidalis*) สามารถจับจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนจากยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดได้ จากนั้นจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่อต้านและทำลายโดยระบบโปรตีนออกซิเดส (Kilpatrick, 2002) เลคตินจากหนอนใยสาบ (*Manduca sexta*) สามารถกระตุ้นให้ระบบโปรตีนออกซิเดสทำงานได้เช่นกัน (Yu et al., 2000) ในสัตว์บางชนิดอาศัยความเป็นพิษของเลคตินเอง เช่น เลคตินที่เป็นพิษ (venom) ในหนาม (spine) ของหอยเม่นทะเล *T. pileolus* (Seike et al., 1992) มีรายงานว่าเมื่อเลคตินจับกับเซลล์แปลกปลอมกระตุ้นให้มีการจับของเซลล์ฟาโกไซท์ในกระบวนการออปโซไนซ์ เพื่อทำลายเซลล์แปลกปลอม เช่นในกุ้งกุลาดำ มี

รายงานพบเลคตินที่จำเพาะต่อลิโปโพลีแซคคาไรด์สามารถทำให้เกิดการออปโซไนซ์และนำไปสู่การเกิดฟาโกไซโทซิสของเซลล์บุกรุกได้ (Luo *et al.*, 2006) สำหรับในกึ่งแซบวัย ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาว่าเลคตินในกึ่งแซบวัยจะกระตุ้นให้โปรตีนหรือเอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ทำงานเมื่อมีการบุกรุกของเชื้อก่อโรคด้วยหรือไม่

6. ผลการยับยั้งของลามินารินต่อการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของเลคตินในซีรัม

เมื่อทดสอบผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายของเลคตินในซีรัมของกึ่งแซบวัยด้วยลามินาริน (laminarin) ซึ่งเป็นเบตา-1,3-กลูแคน ที่ความเข้มข้นในช่วงต่าง ๆ พบว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ 100% คือ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าเลคตินในซีรัมของกึ่งแซบวัยมีความจำเพาะต่อเบตา-1,3-กลูแคนด้วย เบตา-1,3-กลูแคนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ของจุลชีพเป็นตัวกระตุ้นให้สัตว์ทั้งมีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเกิดการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกด้วยวิธีต่างๆ ทางชีวภาพ เช่น ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เบตา-1,3-กลูแคนที่จับอยู่กับเลคตินหรือโปรตีนอื่นๆ เป็นตัวริเริ่มให้เกิดวิถีต่างๆ ให้เซลล์แมคโครฟาจและโมโนไซต์ (monocyte) กำจัดเซลล์แบคทีเรียหรือพาราไซต์อื่นๆ (Bögdwald *et al.*, 1982; Diluzio *et al.*, 1979) ในขณะเดียวกัน เลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเข้าจับอย่างจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนของเซลล์บุกรุก ก่อให้เกิดการต่อต้านการรุกรานของเห็ด รา หรือยีสต์ได้ (Unestam *et al.*, 1977) และยิ่งกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์สิ่งแปลกปลอมในแมงดาทะเลด้วย (Morita *et al.*, 1981) ส่วนในแมลงสาบ *Blaberus craniifer* และ *Bombyx mori* รวมถึงกึ่งนาง เบตา-1,3-กลูแคนสามารถกระตุ้นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสให้มีแอกทิวิตีเพิ่มขึ้น (Duvic *et al.*, 1990; Ochiai *et al.*, 1988) เลคตินจากแมลงสาบ *B. discoidalis* สามารถจับจำเพาะกับเบตา-1,3-กลูแคนจากยีสต์ (baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*) และแบคทีเรียบางชนิดได้ จากนั้นจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่อต้านและทำลายโดยระบบโปรตีนฟีนอลออกซิเดส (Chen *et al.*, 1999; Kilpatrick, 2002) ดังนั้นการที่เลคตินในกึ่งแซบวัยมีความจำเพาะต่อเบตา-1,3-กลูแคน จึงอาจเป็นหนึ่งในกลไกการป้องกันตนเองของกึ่งแซบวัยในการกำจัดเชื้อก่อโรคที่มีเบตา-1,3-กลูแคนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยการจับระหว่างเลคตินกับเซลล์ดังกล่าวแล้วนำไปสู่การทำลายเซลล์ต่อไป ซึ่งยังต้องมีการศึกษาต่อไป

4. สรุป

จากการศึกษา การทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกึ่งแซบวัย ศึกษาผลการตอบสนองของกึ่งต่อการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ตามเวลาและตามปริมาณของเชื้อที่ใช้ฉีดกระตุ้น รวมทั้งการศึกษาผลของการฉีดเชื้อ *V. harveyi* และจุลชีพอื่นๆ ที่มีต่อระดับแอนติบอดีและแอนติบอดีจำเพาะของเลคตินในซีรัมและในตับ ในงานวิทยานิพนธ์นี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สามารถทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมได้โดยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose 2 ครั้ง แยกได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,898 เท่า และคิดเป็น 25% ของเลคตินในซีรัมเริ่มต้น และปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

2. ลามินารีนความเข้มข้นต่ำสุด 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเลคตินในซีรัมในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายได้ 100%

3. พบเลคตินมีค่าแอนติบอดีสูงสุดในซีรัม รองลงมาคือตับและรังไข่ พบบ้างในกระเพาะและลำไส้ แต่ไม่พบแอนติบอดีของเลคตินในกล้ามเนื้อ หัวใจ รวมถึงสารสกัดฮีโมไซท์

4. ในการฉีดกึ่งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ในช่วง $2-5 \times 10^7$ และในช่วง $5 \times 10^4 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกึ่ง พบว่ากึ่งที่ฉีดเชื้อทุกปริมาณมีการตอบสนองการติดเชื้อ *V. harveyi* ตามเวลา กล่าวคือมีแอนติบอดีและแอนติบอดีจำเพาะของเลคตินเมื่อเทียบกับเวลาก่อนฉีด (ชั่วโมงที่ 0) มีค่าเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีด อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95-99% จากนั้นมีค่าลดลงตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 18 และ 24 หลังการฉีด ในขณะที่แอนติบอดีของเลคตินในซีรัมของกึ่งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือมีระดับไม่แตกต่างกัน ณ เวลาต่างๆ บ่งชี้ว่าเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกึ่งแซบวัยถูกกระตุ้นให้มีระดับเพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกึ่ง

5. จากการฉีดกึ่งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณเดียวกันในกึ่งขนาดเล็ก (15-25 กรัม) ขนาดกลาง (26-35 กรัม) และขนาดใหญ่ (36-50 กรัม) พบว่ามีการตอบสนองต่อการกระตุ้นไม่แตกต่างกัน แต่กึ่งขนาดกลางเหมาะต่อการศึกษากการตอบสนองต่อการติดเชื้อตลอดช่วงเวลาของการศึกษามากกว่าขนาดอื่น เพราะหาได้ง่ายและแข็งแรงเพียงพอ

6. จากการฉีดกึ่งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ปริมาณต่างๆ ในช่วง $5 \times 10^6 - 5 \times 10^9$ เซลล์/ตัวกึ่ง เทียบกับการฉีดกึ่งด้วย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ในช่วง $5 \times 10^4 - 5 \times 10^7$ เซลล์/ตัวกึ่ง พบว่ากึ่งทุกชุดการทดลองมีการตอบสนองตามเวลาในทำนองเดียวกับผลสรุปข้อ 4 โดยพบแอนติบอดีของเลคตินในซีรัมเพิ่มขึ้นจากเวลา

ก่อนฉีดและเพิ่มสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด นอกจากนี้พบว่าเลคตินในซีรัมมีระดับแอกทิวิตีที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณเชื้อที่ใช้กระตุ้น และเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB มีความสามารถในการกระตุ้นกึ่งแซบไวได้สูงกว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA เมื่อเทียบจากการใช้ปริมาณเชื้อที่เท่ากันในการฉีดกึ่ง โดยเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^9 และ 5×10^7 เซลล์/ตัวกึ่ง สำหรับเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA และที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ตามลำดับ จัดเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการใช้กระตุ้นการตอบสนองของกึ่งแซบไว ซึ่งทำให้กึ่งติดเชื้อได้ดี และไม่ทำให้กึ่งตายภายในเวลา 18 ชั่วโมง

7. จากการติดตามระดับแอกทิวิตีและแอกทิวิตีจำเพาะของเลคตินในซีรัมของกึ่งที่ฉีดด้วยแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งมีทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคกึ่ง และเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA ในปริมาณที่เท่ากันคือ 5×10^9 เซลล์/ตัวกึ่ง รวมทั้งการฉีด WSSV ปริมาณ 10^5 เท่าของหัวเชื้อ พบว่าแอกทิวิตีของเลคตินในกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% เป็น 5.43 เท่า ที่ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด เมื่อเปรียบเทียบกับของกึ่งที่ฉีด *V. harveyi* แบบ inactive ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเพียง 1.94 เท่า ที่ใกล้เคียงกับระดับของเลคตินในกึ่งที่ฉีดด้วยแบคทีเรียไม่ก่อโรค *V. cholerae* และ *E. coli* รวมถึง WSSV ที่มีค่าเพิ่มขึ้น 2.00, 2.23 และ 1.25 เท่า ตามลำดับ ณ เวลาเดียวกัน บ่งชี้ว่าเลคตินเป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นให้ตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคที่จำเพาะและมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของกึ่งแซบไวต่อเชื้อก่อโรคที่รุกราน เช่น *V. harveyi* แต่ไม่มีผลกับแบคทีเรียไม่ก่อโรคในกึ่งแซบไว เช่น *E. coli*, *V. cholerae* หรือ WSSV

8. ตับของกึ่งที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ active พบว่ามีแอกทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 1.81 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับของตับในกึ่งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ส่วนตับของกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ inactive, *V. cholerae*, *E. coli* และไวรัส WSSV พบว่ามีแอกทิวิตีจำเพาะของเลคตินเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แสดงให้เห็นว่าตับอาจเป็นเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค โดยอาจเป็นแหล่งสังเคราะห์เลคติน แล้วหลังเลคตินออกสู่อิมโมลิมพีเพื่อใช้ในกระบวนการป้องกันตนเองของกึ่ง

รายการเอกสารอ้างอิง

- กิจการ สุภมาตย์ และคณะ. 2542. เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสใน กุ้งกุลาดำ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 24-25 เมษายน 2542.
- กิจการ สุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffman. 2543. ระบบ ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมใน กุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ 22 (ฉบับพิเศษ), 581-588.
- ชะลอ ลี้มสุวรรณ. 2531. สาเหตุและการป้องกันโรคเสียน้ำในกุ้งกุลาดำ. คณะประมง ม. เกษตรศาสตร์ บทความย่อยจาก การสัมมนาเรื่อง โรคจุดดำในก้ามเนื้อกุ้งและแนวทางการ แก้ปัญหา ณ ห้องประชุมสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน. หน้า 5.
- ดารุณี แซ่ฮ่วย, อนันต์ ตันสุตะพานิช และ ลีลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรค แบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*). ว. การประมง. 40(2), 177-182.
- ธนิษฐ ศรีทองสุข. (2531). ธุรกิจการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งทะเล. ว. การประมง ปีที่ 41(4), 301-310.
- ธวัช ศรีวีระชัย และฐานันดร ทัดตานนท์. 2538. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบพัฒนาในบ่อดิน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 44/2538 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดนราธิวาส กอง เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ธวัชชัย สันติกุล. หนังสือพิมพ์เทคโนโลยีชาวบ้าน. 2550. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://www.nicaonline.com> (วันที่สืบค้น 12 เมษายน 2551)
- นิสา ไพจิตร. 2545. การวิเคราะห์สมบัติของเลคตินจากฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- เพ็ญศรี บุญตามช่วย และ อรอนงค์ คงทวี. 2548. การจำแนกเชื้อไวรัสโอในตับและตับอ่อนของ กุ้งกุลาดำปกติและกุ้งป่วยจากบ่อเลี้ยงในจังหวัดสงขลา. สัมมนาวิชาการด้านการ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจำปี 2548. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง, 16 พฤษภาคม 2548.

มณฑิเยร ส่งเสริม, บัญญัติ สุขศรีงาม และ ประภาศิริ ศรีโสภารณ. 2533. การศึกษาแบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. ว. ศรีนครินทร์วิโรฒวิจัยและพัฒนา. 4(1), 15-24.

เมธี วัฒนสิงห์. 2543. การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบพัฒนา ภูมิปัญญาคนไทย ตลาดในและนอกยัง เปิดกว้าง. วารสารสัตว์น้ำ 11(131), 5-16.

ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์. 2545. สัมมนา “แผนยุทธศาสตร์สินค้าประมง” ว. การประมง, 55 (4), 307-318

ลิลลา เรื่องแป้น. 2545. ปัญหาสารปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง. ว. การประมง, 55 (3), 203 212

วิวัฒน์ชัย พรหมสาขา ณ สกลนคร และสมพร โส้วสวัสดิ์กุล. 2532. การแพร่กระจายและความชุก ชุมของทรัพยากรกุ้งทะเลในอ่าวไทย. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2532 กรม ประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศรีรัตน์ สอดสุข และพนม กระจ่างพจน์. 2541. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วย จาก 3 แหล่งในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 19/2541 สถาบันวิจัยและพัฒนา พันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศรีวรรณ หัตยานานนท์ กฤษณา ภูริกิตติชัย กรองแก้ว สุภาวัฒน์ และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ.. มหันตภัยจากเชื้อ *Vibrio vulnificus*. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรม วิทยาศาสตร์การแพทย์. <http://www.dmsc.moph.go.th/net/res/data> (วันที่สืบค้น 19 กันยายน 2549)

สุปราณี ชินบุตร. 2545. เรื่องของยาดกค้ำในเนื้อกุ้ง. ว. การประมง, 55 (3), 213-214

สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2546, 2548. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ: กรมประมง.

สุพจน์ จึงแยมปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย. 2543. ผลงานชิ้นโบแดงสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ชายฝั่งจังหวัดตรังเลี้ยงพ่อแม่แชบ๊วยในบ่อดินสำเร็จ. วารสารสัตว์น้ำ 11(132), 37-44.

อรัญญา คงแก้ว. 2549. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* ของกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

Banerjee, S., Chaki, S., Bhowal, J. and Chatterjee, B.P. 2004. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: Purification and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 421, 125–134.

Barnum, S.R. and Brown, G.G. 1983. Effect of lectin and sugar on primary sperm attachment in horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Dev. Biol.* 95, 352-359.

Barondes, S.H. 1986. Vertebrate Lectin: Properties and function in the lectin. In: *The Lectin*, Liener, I.E. *et al.*, Eds. Academic Press Inc., New York, pp 437-466.

Bauchau, A. G. 1981. Crustaceans. In: *Invertebrate Blood Cells*, Ratcliffe, N. A. and Rowley, F.F., Eds. Academic Press Inc., London, Vol. 2, pp 385-420.

A cartoon of the peptidoglycan mesh. [online] Available: http://www.microbiologytext.com/index.php/module=Book&func=displayarticle&art_id=60 (retrieved 25/3/2008)

Bies, C., Lehr, C.-M. and Woodley, J.F. 2004. Lectin-mediated drug targeting: History and applications. *Advanced drug delivery reviews.* 56, 425-435.

Bögwald, J., Johnson, E. and Seljelid, R. 1982. The cytotoxic effect of mouse macrophages stimulated in vitro by A β -1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Scand. J. Immunol.* 15, 297-304.

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.

Brock, A.J. and Main, K.L. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute, Hawaii, p 242.

- Bulgakov, A.A., Park, K., Choia, K.-S., Limb, H-K. and Chob, M. 2004. Purification and characterization of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philipinarum* in Korea. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 487-499.
- Chen, C., Rowley, A.F., Newton, R.P. and Ratcliffe, N.A. 1999. Identification, purification and properties of a β -1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 122, 309-319.
- Chen, S.N., Huang, S.L. and Kou, G.H. 1992. Studies on epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon*, in Taiwan. In: *Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United State, Hawaii*, Fulks, W. and Main, K.L., Eds. The Oceanic Institute, pp 195-208.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Muller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P. and Kafatos, F.C. 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159-165.
- Colwell, R.R., Kaper. J. and Joseph, S.W. 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and Other *Vibrios*: Occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* 198, 394-396.
- Cominetti, M.R., Marques, F.M., Lorenzini, D.M., Löfgren, S.E., Daffre, S. and Barracco M.A. 2002. Characterization and partial purification of a pectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 715-721.
- Cooper, E.L., Rinkevich, B., Uhlenbruck, G. and Valembois, P. 1992. Invertebrate immunity: Another viewpoint. *Scand. J. Immunol.* 35, 247-266.

- Dalsgaard, A., Albert. M.J., Taylor, D.N., Shimada, T., Meza, R., Serichantalerg, O. and Echeverria, D. 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* non-01 serogroups obtained from and outbreak of diarrhea in Lima. Peru. J. Clin. Microbiol. 33, 2715-2722.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Methode and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- Devaraj, H., Kumar, D.S., Thanislass, J. and Niranjali, S. 1995. Isolation and characterization of high molecular weight glycoproteins from embryonated eggs of *Emerita asiatica*. Comp. Biochem. Physiol. 110, 175-181.
- Diluzio, N.R., Williams, D.L., McNamee, R.B., Edwards, B.F. and Kitahama, A. 1979. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. Int. J. Cancer 24, 773-9.
- Ding, J., Umstead, T.M., Floros, J. and Phelps D.S. 2004. Factors affecting SP-A-mediated phagocytosis in human monocytic cell lines. Respiratory Medicine 98, 637-650.
- 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.
- Drickamer, K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domain in animal lectin. J. Biol. Chem. 263, 9557-9560.
- Drickamer, K. P-type Lectin. http://www.imperial.ac.uk/research/animal_lectins/ctld/classes/P-type2.html (accessed 19/9/2006), part of animal lectin home. <http://www.imperial.ac.uk/research/animallelectins/default.html> (accessed 3/10/2006)
- Duvic, B. and Söderhäll K. 1990. Purification and characterization of a β -1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem. 256(93), 27-32.

- Elola, M.T. and Fink, N.E. 1996. Purification and partial biochemical characterization of an S-type lectin from blastula embryos of *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 115, 175-182.
- Endo, Y., Matsushita, M. and Fujita, T. 2007. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunol.* 212, 371-379.
- Endo, Y., Takahashi, M. and Fujita, T. 2006. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunol.* 211, 283-293.
- Gabius, H.J. 1988. Mamalian Lectin: Their structure and their glycobiological and glycoclinical roles. *Atlas Sci. Biochem.* 1, 210-214
- Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, R., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, N.S., Iwanaga, S. and Kawabata, S. 1999. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *PNAS.* 18(96), 10086-10091.
- Goldstein, I.J., Huges, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. What should be called a lectin. *Nature* 285, 66.
- Grey, D., Dall, W. and Baker, A. 1983. A guide to the Australian penaeid prawn. p 140.
- Harrison, F.W. and Corliss, J.O. 1992. Microscopic anatomy of invertebrates decapod crustacea. Wiley-Liss, New York, Vol. 10.
- 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.
- Huq, A., Snall, E.B., West, P.A., Huq, M.I., Rahman R. and Colwell, R.R. 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planthonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 275-283.
- Galectin. [online] Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Galectin> (retrieved 11/4/2008)

- Janeway Jr., C.A. and Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jensen, P.H., Laursen, I., Matthiesen, F. and Højru, P. 2007. Posttranslational modifications in human plasma MBL and human recombinant MBL. *Biochim. Biophys. Acta.* 1774, 335-344.
- Jiravanichpaisal, P. and Miyazaki, T. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health.* 6, 27-35.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the ProPO system. *Parasit. Today* 5, 171-176.
- Kamiya, H., Muramoto, K. and Goto, R. 1990. Purification and characterization of lectin from marine sponge *Halichondria panacea*. *Bull. Jap. Soc. So. Fish.* 56, 1159.
- Kamruzzaman, M. and Nishibuchi, M. 2008. Detection and characterization of a functional insertion sequence, ISVpa2, in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene* 409, 92-99.
- Kilpatrick, D.C. 2002. Animal Lectins: A historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 187-197.
- Kilpatrick, D.C. and Yeoman, M.M. 1978. Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochem. J.* 175, 1151-1153.
- Kocourek, J. and Horejsi, V. 1981. Defining a lectin. *Nature* 290, 188.
- Kocourek, J. 1986. Historical background. In: *The Lectins*, Liener I.E. *et al.*, Eds. Academic Press Inc, New York, pp 2-32.
- Komano, H., Mizuno, D. and Natori, S. 1980. Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Biol. Chem.* 255, 2919-2924.

- Kowal, A.K., Witkowska, P. and Gamian, A. 2001. Molecular of bacterial polysaccharides and their role in etiology of infectious and autoimmune diseases. NCBI. 55(2), 211-232.
- Kubo, T., Kawasaki, K. and Natori, S. 1990. Sucrose-binding lectin in regenerating cockroach *Periplaneta americana* legs: Its purification from adult hemolymph. Insect Biochem. 20, 585-591.
- Kubo, T. and Natori, S. 1987. Purification and some properties of a lectin from the hemolymph of *Periplaneta Americana* American cockroach. Eur. J. Biochem. 168, 75-82.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Lruz-Lalierda, E.R. and de la Pena, L.D. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture 91, 1-13.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage-T. Biochem. J. 244, 579-584.
- Le Groumellec, M., Haffner, P., Martin, B. and Martin, C. 1995. Comparative study of bacteria infections responsible for mass mortality in penaeid shrimp hatcheries of the Pacific zone. In: Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P., Eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp 163-173.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In CRC handbook of mariculture: Crustacean aquaculture, McVey, J.P., Ed. CRC Press, Boca Raton, pp 455-474.
- Lightner, D.V. 1988. *Vibrio* Disease of Penaeid Shrimp. In: Disease diagnosis and control in north American marine aquaculture, Sindermann, L.J. and Lightner, D.V., Eds. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, pp 42-47.

- Liu, Y.-C., Li, F.-H., Dong, B. and Wang, B. 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.* 44, 598-607.
- Liu, Y., Endo, Y., Iwaki, D., Nakata, M., Matsushita, M., Wada, I., Inoue, K., Munakata, M. and Fujita, T. 2005. Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. *J. Immunol.* 175, 3150-3156.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M. and Kepler, T.B. 2004. Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.* 198, 10-24.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X. and Xu, X. 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 607-617.
- Lysozyme. [online] Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lysozyme> (Retrieved 11/4/2008)
- Matin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., Mckrell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J. Inver. Pathol.* 62, 308-315.
- Matsushita, M. and Fujita, T. 2001. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.* 180, 78-85.
- Matsushita, M. and Fujita, T. 2002. The role of ficolins in innate immunity. *Immunol. Rev.* 205, 490-497.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. 2002. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. *Science* 296, 298-300
- Meglitsch, P.A. and Schram, F.R. 1991. *Invertebrate Zoology*. Oxford University Press, New York, pp 623

- Mercy, S.P.D. and Ravindranath, M.H. 1994. Hemolysis and clearance of erythrocytes in *Scylla serrata* are related to the agglutination by the native sialic Acid specific lectin. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 1075-1083.
- Mohney, L.L., Lightner, D.V. and Bell, T.A. 1991. An epizootic due to *Vibrio* spp. in pondreard *Penaeus vannamei* in ecuador. Abstract in World Aquaculture Meeting. San Juan, Puerto Rico, June 16-20, 1991. pp 45.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Kimura, T. and Nakano, H. 1995. Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.* 30, 263-269.
- Montisci, M.-J., Giovannuci, G., Duche[^]ne, D. and Ponchel, G. 2001. Covalent coupling of asparagus pea and tomato lectins to poly (lactide) microspheres. *Inter. J. Pharmaceutics* 215, 153-161.
- Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T. and Iwanaga, S. 1981. A new β -1,3-D-glucan-mediated coagulation pathway found in *Limulus* amebocytes. *FEBS lett.* 190, 118–22.
- Muramoto, K., Kado, R., Takei, Y. and Kamiya, H. 1991. Seasonal change in the multiple lectin compositions of the acorn banacle *Megabalanus rosa* as related to ovarian development. *Comp. Biochem. Physiol.* 98, 603-607.
- Nalin, D.R., Daya, V., Reid, A. Levine, M.M. and Cisnero. L. 1979. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect. Immun.* 25, 768-770.
- Nadesalingam, J., Reid, K.B.M. and Palaniyar, N. 2005. Collectin surfactant protein D binds antibodies and interlinks innate and adaptive immune systems. *FEBS. Letter* 579, 4449-4453.
- Nakano H., Koube H., Umezawa S., Momoyama K., Hiaoka M., Inouye K. and Oseko S. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol.* 29, 135-139.

- Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P. and Ruamthaveesub, P. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: Disease in Asian aquaculture I. Shariff, M., Subasinghe R.P. and Arthur J.R., Eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, The Philippines, pp 143-155.
- Natori, S.C. 1990. Dual functions of insect immunity proteins in defense and development. Res. Immunol. 141, 938-939.
- Ochiai, M. and Ashida, M. 1988. Purification of a β -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from the hemolymph of silkworm, *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 263(120), 56-62.
- Olafsen, J. 1994. Roles and regulation of multisubunit lectin in recognition and defence reactions of marine bivalves. International Marine Biotechnology Conference. 3, 56.
- Pantoja, C.R. and Lightner, D.V. 2003. Similarity between the histopathology of white spot syndrome virus and yellow head syndrome virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the America. Aquaculture 218, 47-54.
- Pauley, G.B. 1973. An attempt to immunize the blue crab, *Callinectes sapidus*, with vertebrate red blood cells. Experientia 29, 210-211.
- Pentraxin. <http://en.wikipedia.org/wiki/Pentraxin> (retrieved 4/4/2008)
- Peptidoglycan. [online] Available: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/P/peptidoglycan.html> (retrieved 25/3/2008)
- Peptidoglycan. [online] Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Peptidoglycan> (retrieved 13/4/2008)
- Pereyra, A., Zenteno, R., Va'zquez, L., Cairo, S.M., Rodr'iguez, A., Hern'andez G.M, Zenteno E. and Agundis, C. 2004. Characterization of lectin aggregates in the hemolymph of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Biochem. Biophys. Acta 1673, 122-130.

- 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 *V. 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.
- Renwrautz, L. 1986. Lectins in molluscs and arthropods: Their occurrence, origin and roles in immunity, *symp. zool. Soc. London* 56, 81-93.
- Rittidach, W. 2006. Characterization of sialic acid-specific lectin in the hemolymph of banana shrimp (*Penaeus merquiensis*). Ph.D. Thesis in Biochemistry, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Rittidach, W., Pajjit, N. and Utarabhand, P. 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merquiensis* hemolymph. *Biochem. Biophys. Acta* 1170, 106-114.
- Ruangpan, L. and Kitao, T. 1991. *Invertebrate Zoology*. Oxford University Press, New York, pp 623.
- Ruangpan, L., Tabkaew, R. and Sangrugruang, K. 1995. Bacterial Flora of Ponds with Different Stocking Densities of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. In: *Diseases in Asian aquaculture II*, Shariff, M., Arthur, J. R. and Subasinghe, R.P., Eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp 141-149.
- Seike, Y., Shibata, H. and Suyemitsu, T. 1992. Purification of a sperm lectin extracted from spermatozoa of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev. Growth Differ.* 34, 285-291.
- Sharon, N. and Lis, H. 1972. Lectin: Cell-agglutination and sugar-specific protein. *Science* 177, 949-958.

- Sharon, N. and Lis, H. 1995. Lectins, protein with a sweet tooth function in cell recognition. *Essays in Biochemistry* 30, 59-75.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean Immunity. *Annu. Rev. of Fish Dis.* 2, 3-23.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23-28.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. *Principle of Procedure of Statistics*. McGraw-Hill, New York.
- Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the ProPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 353-356.
- Sternsheim, D. J. and Burton, P.R. 1980. Light and electronmicroscopic studies of crayfish hemocytes. *J. Morphology* 165, 67-83.
- Suzuki, T. and Mori, K. 1989. A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92, 455-462.
- Takagi, T., Nakamura, A., Deguchi, R. and Kyojuka, K.I. 1994. Isolation, characterization, and primary structure of three major proteins obtained from *Mytilus edulis* sperm. *J. Biochem. Tokyo.* 116, 598-605.
- 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.
- The gram-negative cell wall [online] Available: <http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook> (retrieved 25/3/2008)

- Truschel M.R., Chambers, S.A., Wang, C.Y. and McClay, D.R. 1987. Stage-specific expression of β -1,3-glucanase in sea urchin embryos and hybrids. *J. Zool.* 244, 215-222.
- Tunkijjanukij, S. and Olafsen, J.A. 1999. Sialic acid-binding lectine with antibacterial activity from the horse mussel: Further characterization and immunolocalization. *Dev. Comp. Immunol.* 22(2), 139-150.
- Turner, M.W. 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molec. Immunol.* 40, 423-429.
- Unestam, T. and Söderhäll, K. 1977. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. *Nature* 267, 45-46.
- Utarabhand, P., Rittidach, W. and Paijit, N. 2007. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merquiensis*. *Science Asia* 33, 41-46
- Vasgar-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular response. *J. Mar. Biotechnol.* 3, 153-156.
- Vasta, G.R., Ahmed, H. and Odom, E.W. 2004. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 617-630.
- 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.
- Vazquez, L., Lanz, H., Montañó, L.F. and Zenteno, E. 1994. Biological activity of the lectin from *Macrobrachium Rosenbergii*, In: *Lectins, biology biochemistry, clinical chemistry*, Van Driessche, E. and Bog-Hansen, T.C., Eds. Textop, Hellerup, Denmark, Vol. 10, pp 261-265.
- V. vulnificus*. Centers of Disease Control and Prevation. [online] Available http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/vibriov_gi.html (retrieved 25/3/2008)

- Wang, H., Songa, L., Li, C., Zhaoa, J., Zhang, H., Ni, D. and Xu, W. 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molec. Immunol.* 44, 722-731.
- Wolin, M.J. 1973. The *cholerae Vibrio* and related form. In: Textbook of microbiology, 20th Ed. Burrows, W., Ed. WB. Saunders, Philadelphia, pp. 520-536.
- Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnukul, B. and Flegel T.W. 1995. DNA fragment of *Penaeus monodon* Baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture* 143, 23-32.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Pipe, R.K. and Ratcliffe, N.A. 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 65, 13-15.
- Yang, H., Luo, T., Li, F., Li, S. and Xu, X. 2007. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 88-97.
- Yu, X.-Q., Zhu, Y.-F., Ma, C., Fabrick, J.A. and Kanost, M.R. 2002. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32, 1287-1293.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารนับเชื้อ PCA (Plate count agar) ที่มี 1.5% NaCl ประกอบด้วย

PCA	23.5	กรัม
NaCl	15	กรัม
น้ำกลั่นปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °ซ จากนั้นนำไปวางในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เพื่อลดอุณหภูมิให้เหมาะสมแล้วนำเทใส่เพลทแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อและอบให้แห้งหรือเทใส่เพลทพลาสติก ตากจนอาหารแข็งและแห้งเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อในถุงพลาสติกสะอาด ที่ 4 °ซ ไว้สำหรับใช้ต่อไป ซึ่งเตรียมไว้ใช้ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

2. อาหารคัดเลือกเชื้อ TCBS (Thiosulphate citrate bile salt sucrose) Agar ประกอบด้วย

TCBS Agar	89.0	กรัม
น้ำกลั่นปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวในขวดดูแรน (duran) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ต้มให้เดือด ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50 °ซ เพื่อลดอุณหภูมิให้เหมาะสม แล้วนำไปเทใส่เพลทแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อและอบให้แห้งหรือเทใส่เพลทพลาสติก ตากจนอาหารแข็งและแห้งเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อในถุงพลาสติกสะอาด ที่ 4 °ซ ไว้สำหรับใช้ต่อไป ซึ่งเตรียมเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

หมายเหตุ : การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดัน หรือต้มอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยไมโครเวฟ เพราะจะทำให้คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง

3. อาหารเหลว TSB (Tryptic soy broth) ประกอบด้วย

TSB Soybean-Casein Digest Medium	12	กรัม
NaCl	6	กรัม
น้ำกลั่นปริมาตร	400	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ในขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปให้ความร้อนโดยไมโครเวฟ เบาๆ จนส่วนผสมละลายไม่จับกันเป็นก้อน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °ซ หลังจากนั้นเขย่าเบาๆ เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดีและพยายามไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ใส่กระบอกตวง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และปิดขวดให้สนิทด้วย foil ที่พับสองชั้น

เพื่อกันขาด ส่วนอาหาร TSB ที่เตรียมสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นหัวเชื้อ (stock) เตรียมโดยเทใส่กระบอกตวงปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเทใส่หลอดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้องไว้สำหรับใช้เลี้ยงขยายเชื้อต่อไป ซึ่งเตรียมเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

4. อาหารแข็ง TSA (Tryptic soy agar) ประกอบด้วย

TSB Soybean-Casein Digest Medium	12	กรัม
Agar	6	กรัม
NaCl	6	กรัม
น้ำกลั่นปริมาตร	400	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นในขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปให้ความร้อนโดยไมโครเวฟ เบาๆ จนส่วนผสมละลายไม่จับกันเป็นก้อน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 °ซ ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50 °ซ เพื่อลดอุณหภูมิให้เหมาะสม จากนั้นเทใส่เพลทแก้วที่หนึ่งฆ่าเชื้อและอบให้แห้งหรือเพลทพลาสติก ตากจนอาหารแข็งและแห้งเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อในถุงพลาสติกสะอาด ที่ 4 °ซ ไว้สำหรับใช้ต่อไป ซึ่งเตรียมเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวปิ่นนภา ลีมพานิช	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4822045	
วุฒิการศึกษา	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ศึกษาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์-เคมี)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ปิ่นนภา ลีมพานิช และ ประภาพร อุทาร์พันธุ์. 2550. การศึกษาระดับเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วยที่ตอบสนองต่อการฉีดเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรค. การประชุมทางวิชาการ กุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 6. อาคารไบโอเทค อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี, 29-30 เดือน มีนาคม 2550. หน้า 204-212.