



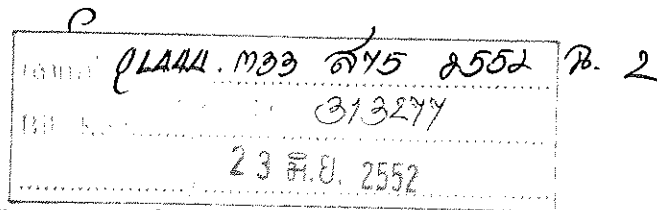
การศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนัง

ตลอดวงจรการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ

**Study of Protein Expression in the Epidermis during the Molting Cycle of
the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)**

สุวรรณี ขุนทองปาน

Suwannee Khunthongpan



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังตลอดวงจรการลอกคราบของกิ้งกูดาคำ
ผู้เขียน	นางสาวสุวรรณี ขุนทองปาน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน ตลอดวงจรการลอกคราบของกิ้งกูดาคำ ทั้ง 8 ระยะ ได้แก่ ระยะ D0 D1 D2 D3 D4 A B1 และ B2 ทำโดยเทคนิคแผ่นวุ้นสองมิติ (2D SDS-PAGE) และย้อมสีแผ่นวุ้นด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับสายตาพบว่ารูปแบบการแสดงออก และความเข้มของจุดโปรตีนในทุกระยะของวงจรการลอกคราบมีความแตกต่างกันไม่มากนัก เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนบนแผ่นวุ้นจากตัวอย่างทั้ง 8 ระยะ จำนวน 3-4 จุด ด้วย Imagemaster 2D platinum software (Amersham Biosciences) พบว่าความเข้มของจุดโปรตีนจำนวน 48 จุด มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดวงจรการลอกคราบเมื่อทดสอบด้วยสถิติอนพาราเมตริก จุดโปรตีนจำนวน 15 จุด จากจำนวน 48 จุดนี้ถูกนำไปศึกษาต่อเพื่อระบุชนิดของโปรตีนด้วย LC-MS/MS ผลในขณะนี้มีจุดโปรตีนที่วิเคราะห์และสืบค้นได้เป็นผลสำเร็จจำนวน 2 จุด และจุดโปรตีนที่เหลือยังอยู่ระหว่างการวิเคราะห์โดยโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่พบนี้มีการแสดงออกสูงสุดในระยะ B1 โปรตีน 2 ชนิด ดังกล่าวคือ allergen Pen m 2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ในคน และเป็นไปได้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในชั้นดีเอ็นเอเยื่อผิวหนัง เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเปลือกให้แข็งแรงขึ้น และ crustacyanin-C1 subunit ซึ่งเป็นรงควัตถุสำคัญในการเกิดสีของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง การค้นพบในครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการที่เกิดขึ้นทั้งหมดภายในเนื้อเยื่อผิวหนัง การศึกษาต่อเนื่องเพื่อค้นหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบมีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการต่อไป เพื่อให้ความรู้เชิงลึกเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการลอกคราบของกิ้งกูดาคำมีมากขึ้น ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเลี้ยงกุ้งของเกษตรกร และเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการค้นคว้าวิจัยกิ้งกูดาคำ ซึ่งเป็นสินค้าทางการเกษตรส่งออกที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย

Thesis Title Study of Protein Expression in the Epidermis during the Molting Cycle of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)
Author Miss Suwannee Khunthongpan
Major Program Biotechnology
Academic Year 2008

ABSTRACT

The protein profilings of epidermal protein throughout 8 different molting stages; including D0, D1, D2, D3, D4, A, B1 and B2, of the black tiger shrimp were investigated by two dimension gel electrophoresis (2D SDS-PAGE) followed with silver staining. The result showed that the protein expression profilings and intensity from all stages were not much different when compared by eyes. When the gels of 8 molting stages in 3-4 replicated experiments were analyzed by the Imagemaster 2D platinum software (Amersham Biosciences), it was found that the intensity of 48 protein spots was significantly different ($\alpha < 0.05$) throughout the molting cycle, when analyzed by non-parametric statistics. A total of 15 from 48 protein spots were analysed with LC-MS/MS. 2 protein spots were so far successfully identified, while the others were being analysed. The 2 proteins were allergen Pen m2 and crustacyanin-C1 subunit. Both protein spots were highest expressed in stage B1. Allergen Pen m 2 may involve in carbohydrate metabolism in the sub-epidermis, which is for development of cuticle. Crustacyanin-C1 subunit is a pigment, which produces coloration in invertebrate. This finding is a part of the whole process occurred in epidermis during molting. Further investigation for protein identifications is required for more understanding of the regulatory mechanism of the molting cycle of the black tiger shrimp (*P. monodon*). This study will be beneficial to shrimp farming and advanced research in the black tiger shrimp, which is an important agricultural export product of Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ พรหมวิกร อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษา ค้นคว้าวิจัยและแก้ปัญหาต่างๆ รวมไปถึง
การอบรมสั่งสอน แนะนำแนวทางในการดำเนินชีวิต และมอบโอกาสและสิ่งดีๆ ให้มาโดยตลอด
ขอขอบพระคุณ ดร.วรสันต์ โสภณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ใน
การศึกษาทำให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สุทรวัดน์ เบญจกุล กรรมการ
สอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเพื่อทำให้โครงร่างวิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น
ขอขอบพระคุณ ดร.อภิชาติ อุโฬจิตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์
ดร.บุญเสริม วิทขำนาญกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไข
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สัตว์ที่ใช้ในการทำวิจัย คุณอัจฉรา มาฆทาน ที่ให้ความช่วยเหลือด้าน
การทำวิจัย ดร.จันทรา สุขเกษม ที่กรุณาให้คำปรึกษาเรื่องสถิติ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่กรุณาให้ความ
ช่วยเหลือในการหาชนิดของโปรตีน และขอขอบพระคุณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
ที่ให้ความกรุณาเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขล
นครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเงินทุนด้านการศึกษาและการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย และพี่ ที่ให้การ
สนับสนุนทุนการศึกษาและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และ น้องๆ ทุกคนที่
ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

สุวรรณี ขุนทองปาน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(3)
Abstract.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
รายการตาราง.....	(7)
รายการภาพประกอบ.....	(8)
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
ตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	15
2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ.....	19
วัสดุและอุปกรณ์.....	19
วิธีดำเนินการ.....	23
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	32
4 สรุป.....	68
เอกสารอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	75
ภาคผนวก ก สารละลายและบัฟเฟอร์.....	76
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของจุดโปรตีน.....	78
ภาคผนวก ค ผลการสืบค้นชื่อ โปรตีน.....	104
ประวัติผู้เขียน.....	106

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. สรุปผลการศึกษารายการแสดงออกของยีนและโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังในกุ้งและปู.....	16
2. ตัวอย่างการป้อนข้อมูลของค่าที่อ่านได้จากความเข้มของจุดโปรตีน 1 จุดในโปรแกรม SPSS version 13.....	31
3. หมายเลขโปรตีน (ID) จำนวน 48 จุดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha < 0.05$) ตลอดวงจรการลอกคราบ.....	51
4. ชนิดและคุณสมบัติของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญตลอดวงจรการลอกคราบสืบค้นจากฐานข้อมูล NCBI nr ผ่านระบบสารสนเทศ.....	67
5. ค่าความเข้มของจุด โปรตีน (raw value) จำนวน 604 จุด ที่ได้จากการวัดด้วย ImageMaster 2D Platinum software.....	78

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. ภาพถ่ายกุ้งกุลาดำ <i>Penaeus monodon</i>	3
2. สัณฐานวิทยาของกุ้งกุลาดำ.....	3
3. สูตรโครงสร้างของไคติน.....	4
4. ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังของสัตว์ในตระกูลครัสเตเชียน.....	5
5. ระยะเวลาของวงจรการลอกคราบกุ้งกุลาดำ.....	8
6. ระยะของการลอกคราบแขนหางของกุ้งกุลาดำ.....	10
7. เกณฑ์ทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ใช้สำหรับแยกระยะการลอกคราบเปลือกของกุ้งกุลาดำ.....	12
8. กุ้งกุลาดำอายุ 90 วันที่เลี้ยงในบ่อเพาะฟัก.....	33
9. เนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำข้อมเนื้อเยื่อด้วย PAS.....	34
10. แถบ PCR product ของเชื้อ Monodon baculovirus (MBV) จากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) จากขำว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำจำนวน 4 ชุด.....	36
11. แถบ PCR product ของเชื้อ Hepatopancreatic parvovirus (HPV) จากปฏิกิริยา Chain Reaction (PCR) จากขำว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำจำนวน 4 ชุด.....	37
12. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำในระยะ D0 ที่ข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตใช้โปรตีนปริมาณ 100 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่ง เท่ากับ 17.5 กิโลวัตต์ต่อชั่วโมง.....	39
13. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำในระยะ D0 ที่ข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตใช้โปรตีนปริมาณ 70 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่ง เท่ากับ 17.5 กิโลวัตต์ต่อชั่วโมง.....	40
14. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำในระยะ D0 ที่ข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตใช้โปรตีนปริมาณ 70 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่ง เท่ากับ 18.8 กิโลวัตต์ต่อชั่วโมง.....	42
15. 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำในระยะ D3 ที่ข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต แสดงการข้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตให้ได้รับความเข้มของจุดโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน.....	43
16. 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำระยะ D0 และ D1 ข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงจุดโปรตีนที่พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามี ความแตกต่างกัน.....	47

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
17. 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำระยะ D2 และ D3 ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงจุดโปรตีนที่พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามี ความแตกต่างกัน.....	48
18. 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำระยะ D4 และ A ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงจุดโปรตีนที่พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามี ความแตกต่างกัน.....	49
19. 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำระยะ B1 และ B2 ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงจุดโปรตีนที่พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามี ความแตกต่างกัน.....	50
20. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำในระยะ D0 และ D1 ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีนจำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	62
21. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำในระยะ D2 และ D3 ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีนจำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	63
22. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำในระยะ D4 และ A ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีนจำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	64
23. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำในระยะ B1 และ B2 ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีนจำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	65
24. 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำย้อมด้วย 0.1% Coomassies blue R-250 โดยใช้ปริมาณ โปรตีน 500 ไมโครกรัม ลูกศรระบุจุดโปรตีนที่นำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS.....	66

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กึ่งกลาดำเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นสินค้าส่งออกอันดับต้นๆ ของประเทศไทยทั้งในรูปแบบของกึ่งสดและกึ่งแปรรูป ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาดำในฟาร์มมีความจำเป็นและสำคัญต่อเศรษฐกิจไทยมาก เพราะผลผลิตกึ่งกลาดำที่ได้จากธรรมชาติมีแนวโน้มลดลง เนื่องมาจากความเสื่อมโทรมของทรัพยากรธรรมชาติ สภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิศาสตร์ที่เปลี่ยนแปลงไป การเลี้ยงกึ่งกลาดำประสบปัญหาหลายประการ เช่น กึ่งโตช้า แคระแกรนและเป็นโรค ซึ่งปัญหาเหล่านี้ได้กระจายวงกว้าง และครอบคลุมพื้นที่เลี้ยงกึ่งกลาดำทั่วประเทศ (สิริ เอกมหาราช และคณะ, 2548) ปัญหาเหล่านี้ทำให้ต้นทุนในการผลิตกึ่งกลาดำสูง ทำให้เกษตรกรที่เลี้ยงกึ่งขาดทุนและก่อให้เกิดความเสียหายในด้านการผลิต

การเลี้ยงให้กึ่งโตไว แข็งแรง และไม่เป็นโรค เป็นหัวใจสำคัญในการเลี้ยงกึ่งกลาดำ การเจริญเติบโตของกึ่งกลาดำขึ้นอยู่กับ การลอกคราบ การลอกคราบคือการที่กึ่งสลัดเปลือกเก่าออกเพื่อสร้างเปลือกใหม่ กึ่งจะอาศัยจังหวะที่เปลือกยังมีอยู่ขยายขนาดลำตัวใหญ่ขึ้น ทำให้การลอกคราบมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของกึ่งกลาดำ ในเชิงวิชาการแม้จะทราบว่า Y-organ และ X-organ เป็นอวัยวะที่ผลิตฮอร์โมนควบคุมการลอกคราบ (Duran, 1956; Dell *et al.*, 1998) แต่กลไกการลอกคราบในเชิงลึกนั้นยังไม่มีความชัดเจน ดังนั้นการศึกษากลไกการลอกคราบของกึ่งกลาดำในเชิงลึกจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาไปสู่การหาวิธีการควบคุมการลอกคราบ ให้มีแบบแผนและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

การศึกษากายแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์จะช่วยให้ทราบถึงการแสดงออกของโปรตีนได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพสูงซึ่งในการศึกษารุ่นนี้ได้ใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์โดยใช้ 2D SDS-PAGE ร่วมกับ LC-MS/MS เพื่อศึกษาถึงลักษณะการแสดงออกและชนิดของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังของกึ่งกลาดำ ที่มีความสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบของกึ่งกลาดำ ซึ่งผลการศึกษานี้จะทำให้ทราบแบบแผนการแสดงออกของโปรตีน และชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ อันจะเป็นพื้นฐานต่อการค้นหาวีธีที่จะส่งเสริมให้กึ่งกลาดำโตเร็ว ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการเลี้ยงกึ่งและลดต้นทุนในการผลิตได้ นอกจากนี้ยังอาจเป็นประโยชน์ต่อขั้นตอนการผสมเทียมกึ่ง ทำให้การผสมเทียมสามารถทำได้เร็วขึ้นเนื่องจากสามารถกำหนดเวลาการลอกคราบได้ และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตกึ่ง ส่งเสริมและ

สนับสนุนการส่งออกกุ้งของไทยให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ปรับปรุงกระบวนการเลี้ยงกุ้งเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่และลดต้นทุนการผลิต และปรับปรุงมาตรฐานการผลิตให้สอดคล้องกับความต้องการของประเทศผู้นำเข้า และเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันในเวทีการค้าโลก

ตรวจเอกสาร

1. อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus *Penaeus* Fabricius, 1798

Species *monodon*

ชื่อภาษาไทย : กุ้งกุลาดำ กุ้งกุลาดำ กุ้งทะเล กุ้งเสือดำนก กุ้งเสือดำนก กุ้งลาย

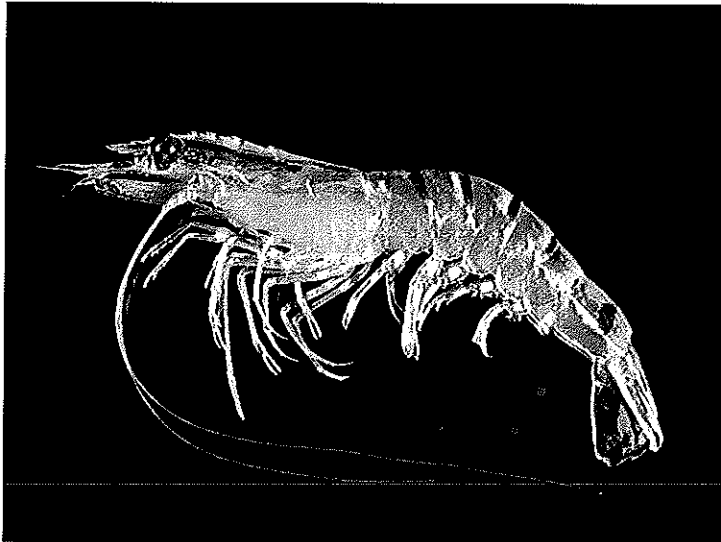
ชื่อภาษาอังกฤษ : Giant tiger prawn หรือ Black tiger shrimp

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Penaeus monodon* Fabricius, 1798

2. ลักษณะภายนอกของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเล ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีเปลือกคลุม (cuticle) ตลอดตัวโดยเปลือกมีลักษณะเกลี้ยงไม่มีขน มีสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มสลับกับแถบสีขาวพาดขวางลำตัวประมาณ 9 ลาย ลำตัวของกุ้งมีลักษณะเป็นข้อปล้องจำนวน 19 ปล้อง โดยแบ่งออกเป็น ส่วนหัว 5 ปล้อง (แต่รวมเป็นปล้องเดียว) ส่วนอก 8 ปล้อง และส่วนลำตัว 6 ปล้อง (ภาพที่ 1) มีรยางค์ 5 คู่ โดย 2 คู่แรกเป็นหนวด หนวดคู่สั้น เรียกว่า antennules และหนวดคู่ยาว เรียกว่า antenna หนวดทั้ง 2 คู่ใช้ในการสัมผัส รยางค์คู่ที่ 3 เป็นขากรรไกรล่างมีหน้าที่ขบเคี้ยวอาหาร รยางค์คู่ที่ 4 และ 5 เป็นขากรรไกรบนมีหน้าที่เหมือนกับขากรรไกรล่าง ส่วนอก มีรยางค์ 8 คู่ โดยรยางค์คู่ที่ 6-8 เรียกว่า maxillipeds มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร รยางค์คู่ที่ 9-11 มีลักษณะเป็นก้ามมีหน้าที่ช่วยในการจับฉวยอาหารเข้าปากหรือใช้ป้องกันตัวเอง รยางค์คู่ 12-13 มีลักษณะสีแดงปนดำ เป็นขาใช้สำหรับเดิน เคลื่อนไหวและทำความสะอาดลำตัว ส่วนหัวและอกเชื่อมติดกันมักเรียกรวมกันว่า หัว-อก (cephalothorax) ซึ่งปกคลุมด้วยเปลือกชั้นเดียวเรียกว่า carapace ปลายด้านหน้าของ carapace มีลักษณะยื่นยาวเป็นหยักคล้ายฟันเลื่อยขึ้นไปข้างหน้าเรียกว่า กรี (rostrum) ขอบด้านบนของกรีมียาว 7-8 ซี่ ด้านล่าง 3 ซี่ โดยใต้กรีมียาว 1 คู่ ส่วนลำตัว มีรยางค์ 6 คู่ โดยรยางค์คู่ที่ 14-18 มีลักษณะคล้ายใบพาย (pleopod) ทำหน้าที่เป็นขาค่ายน้ำ

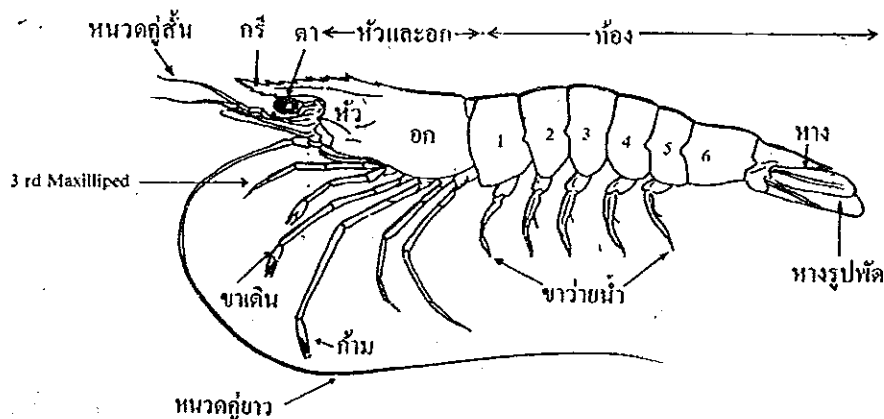
ซึ่งโคนขาว่ายน้ำจะมีแถบสีเหลืองพาดเป็นปล้องๆ ส่วนหาง (telson) มีลักษณะแหลม ขนาบข้างด้วยแพนหางหรือหางรูปพัด (uropods) ซึ่งเป็นรยางค์คู่ที่ 19 โดยหางและแพนหางทำหน้าที่คล้ายใบพายพัดโบกให้กุ้งเคลื่อนที่ไปตามทิศทางที่ต้องการ (ภาพที่ 2) (บรรจง เทียนสังรัมย์, 2530; Harrison and Humes, 1992)



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

Figure 1. The black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

ที่มา : <http://images.google.co.th/images?q=penaeus+monodon&hl=th&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=wi> (18 มีนาคม 2551)



ภาพที่ 2 สัณฐานวิทยาของกุ้งกุลาดำ

Figure 2. External morphology of *Penaeus monodon*.

ที่มา: บรรจง เทียนสังรัมย์ (2530)

3. เปลือกกุ้งกุลาดำ

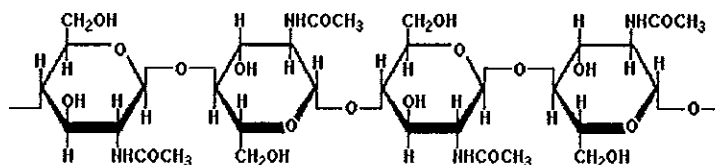
กุ้งมีโครงร่างภายนอกเป็นเปลือกหุ้มลำตัว โดยมีลักษณะหนาและแข็งเช่นเดียวกับปูซึ่งเป็นสัตว์ใน order Decapoda เหมือนกัน เปลือกกุ้งและปูประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่เรียกว่า ไคติน ซึ่งเป็นสารประกอบพวก nitrogenous polysaccharide (บพิช จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์, 2547; Moore, 2006) (ภาพที่ 3) โดยไคตินจะรวมกับแคลเซียมในลักษณะที่เป็นโครงร่างแข็งเป็นตัวทำให้เปลือกแข็งและรวมอยู่กับสารประกอบของโปรตีน (ประจวบ หล้าอุบล, มปป) เปลือกของกุ้ง แบ่งออกเป็นชั้นต่างๆ ได้ 4 ชั้น (ภาพที่ 4) คือ

1. Epicuticle เป็นเปลือกชั้นนอกสุดของกุ้ง ประกอบด้วย ไขมันและโปรตีน แต่ไม่มีไคติน (Ruppert and Barner, 1994; บพิช จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์, 2540; วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, 2545; Promwikorn *et al.*, 2005) โดยชั้นนี้จะเป็นตัวกำหนดหรือจำกัดปริมาณการเข้าออกของเกลือแร่และไอออนที่จะผ่านเข้าในร่างกาย (ประจวบ หล้าอุบล, มปป) ชั้นนี้มีสีเหลืองอ่อนเมื่อดูสด (Dennell, 1947 อ้างโดย Bliss and Mantel, 1985)

2. Exocuticle ชั้นนี้ประกอบด้วย ไคติน แคลเซียม เม็ดสีจำพวกเมลานิน และโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนพวก sclerotin ซึ่งช่วยทำให้เปลือกมีความแข็งแรง (เสาวภา สนธิไชย, 2525; วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, 2545; Promwikorn *et al.*, 2005)

3. Endocuticle ชั้นนี้ประกอบด้วย ไคติน โปรตีน และแคลเซียม ชั้นนี้อาจจะมีหรือไม่มีรงควัตถุและเป็นชั้นที่ค่อนข้างนุ่มจึงทำให้เปลือกมีคุณสมบัติยืดหยุ่นได้ (เสาวภา สนธิไชย, 2525) ชั้นนี้เป็นชั้นที่ทำให้ความหนาและความแข็งของเปลือกของสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันปฏิมเปลือกชั้นนี้หนาและแข็งกว่ากุ้ง

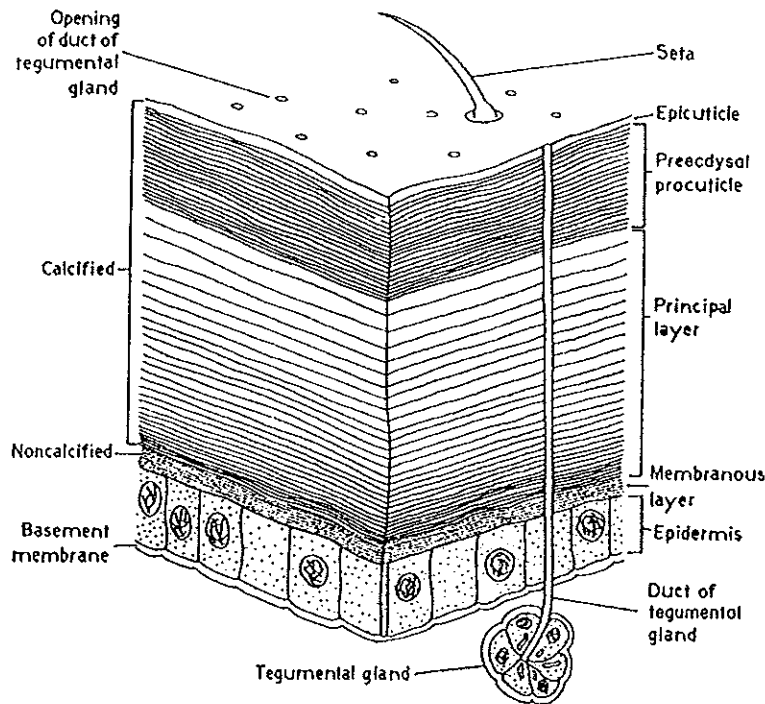
4. Membranous layer เป็นชั้นในสุดของเปลือกโดยชั้นนี้ประกอบด้วย ไคตินและโปรตีน ไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ (ประจวบ หล้าอุบล, มปป) ชั้นนี้อยู่ติดกับชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังแต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด (Bliss and Mantel, 1985)



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของไคติน

Figure 3. Chitin structural formula.

ที่มา : Bliss และ Mantel (1985)



ภาพที่ 4 ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังของสัตว์ในตระกูลครัสเตเชีย

Figure 4. Epidermal tissue of the crustacean.

ที่มา : Bliss และ Mantel (1985)

4. เนื้อเยื่อผิวหนัง

เนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis หรือ hypodermis) เป็นชั้นที่อยู่ได้เปลือก การเรียงตัวของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังจะมีการเรียงตัวเป็นแถวเดียว (Moore, 2006; Promwikorn *et al.*, 2007) เซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมทรงสูง (ภาพที่ 4) ถัดจากเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังจะเป็นชั้นของเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (sub-epidermis) ซึ่งประกอบด้วย เซลล์เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง tegumental glands และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยเซลล์เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังจะมีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมเรียงชิดกัน (Promwikorn *et al.*, 2007) เนื้อเยื่อผิวหนังมีหน้าที่สังเคราะห์สารอินทรีย์ ได้แก่ ไคติน โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และพลังงานที่มีเอนไซม์ที่ใช้สำหรับย่อยเปลือกชั้นในของเปลือกเก่า ในขณะที่เนื้อเยื่อผิวหนังจะทำหน้าที่ในการดูดซับสารที่ย่อยจากเปลือกเก่าและสร้างเปลือกใหม่ขึ้นมา (Bliss and Mantel, 1985) ซึ่งการเจริญเติบโตของเซลล์ในเนื้อเยื่อผิวหนังจะเกิดขึ้นในช่วงระยะก่อนการลอกคราบ และลดลงในระยะหลังการลอกคราบ (Promwikorn *et al.*, 2007)

5. การลอกคราบของกุ้งกุลาดำ

5.1 ความหมายของการลอกคราบ

การลอกคราบหมายถึง ปราศฎการณ์ที่กุ้งสลัดเอาเปลือกเก่าที่หุ้มลำตัวออกและสร้างเปลือกใหม่ขึ้นมาทดแทน และขณะที่เปลือกสร้างขึ้นใหม่ยังไม่ทันแข็งตัวนั้นร่างกายสามารถเพิ่มขนาดขึ้นได้เต็มที่จนกระทั่งเปลือกใหม่แข็งตัว ร่างกายก็จะหยุดการเพิ่มขนาดทำให้การลอกคราบมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของสัตว์ในตระกูลครัสเตเชียน (Highnam and Hill, 1978 อ้างโดย พุทธ ส่องแสงจินดา, 2531; บพิท จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์, 2540; Promwikorn *et al.*, 2004)

5.2 วงจรการลอกคราบ

วงจรการลอกคราบของกุ้งหรือสัตว์ในตระกูลครัสเตเชียนจะใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ อายุ เพศ และสปีชีส์ การลอกคราบในระยะลูกกุ้งวัยอ่อนจะมีความถี่กว่าระยะตัวเต็มวัย เช่น ในระยะ nauplius (เป็นระยะลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ) มีการลอกคราบ 6 ครั้ง ภายในเวลาประมาณ 1-5 วัน ระยะ zoea มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ภายในเวลาประมาณ 5 วัน ระยะ mysis มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ภายในเวลาประมาณ 7 วัน และกุ้งตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีการลอกคราบทุก 18-21 วัน ในขณะที่เพศผู้จะมีการลอกคราบทุก 22-30 วัน (ศุภชัย นิลวานิช, 2540) ความถี่ของการลอกคราบแตกต่างกันในสัตว์แต่ละสปีชีส์ กุ้งก้ามกรามขนาด 36-60 กรัม จะมีการลอกคราบทุก 22-42 วัน (Segal, 1974 อ้างโดย บรรจง เทียนส่องรัมย์, 2530) และปูทะเลที่มีอายุระหว่าง 34-38 วัน ขนาดความกว้างของกระดอง 4.8-7.5 เซนติเมตร จะมีการลอกคราบทุก 4 วัน (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม, 2539) จากการศึกษาวงจรการลอกคราบของกุ้งตัวเต็มวัยพบว่า วงจรการลอกคราบประกอบด้วย ระยะย่อย 4 ระยะ ตามลำดับ (Drach, 1974 อ้างโดย ประจวบ หล้าอุบล, มปป.; Promwikorn *et al.*, 2004) ได้แก่

1. ระยะก่อนการลอกคราบ (pre-molt, D) เป็นระยะเตรียมตัวเพื่อการลอกคราบ ในระยะนี้เปลือกเก่าจะถูกย่อยและเปลือกใหม่เริ่มก่อตัวขึ้น กุ้งจะกินอาหารน้อยลงในระยะ D2 และหยุดกินในระยะ D3 การเคลื่อนที่ของร่างกายเริ่มช้าลง เริ่มมีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น แคลเซียม และสารอินทรีย์ที่ตับ ในระยะนี้ยังสามารถแบ่งเป็นระยะย่อยตามลักษณะทางกายภาพได้อีก 5 ระยะ คือ ระยะ D0 D1 D2 D3 และ D4

2. ระยะลอกคราบ (ecdysis, E) เป็นระยะขณะสลัดเปลือก น้ำจะถูกดึงเข้าตัวอย่างรวดเร็ว ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการกินอาหาร การลอกคราบเป็นเวลาที่สั้นมากและวิกฤตที่สุดสำหรับกุ้ง

3. ระยะหลังการลอกคราบ (post-molt, A, B, C1-C2) หลังการลอกคราบใหม่ๆ เปลือกจะนิ่มมาก ความหนาของเปลือกใหม่จะเพิ่มมากขึ้นเปลือกเริ่มมีความแข็งมากขึ้น โดยมีขบวนการ calcification และการสร้างเปลือกยังคงดำเนินต่อไปตลอดระยะนี้ ในช่วงที่เปลือกนิ่มมากน้ำหนักตัว

เพิ่มขึ้น เนื่องจากดูดซึมน้ำเข้าไปมาก น้ำหนักตัวเริ่มคงที่เมื่อเปลือกเริ่มแข็งมากขึ้นในระยะนี้กุ้งจะไม่กินอาหารจนกระทั่งเข้าสู่ระยะ B ระยะนี้สามารถแบ่งเป็นระยะย่อยตามลักษณะทางกายภาพได้อีก 6 ระยะ คือ ระยะ A1 A2 B1 B2 C1 และ C2

4. ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt, C3-C4) เป็นระยะสุดท้ายของวงจรการลอกคราบ ระยะนี้ขบวนการสร้างเปลือกยังคงดำเนินต่อไปจนเปลือกแข็งตัวอย่างสมบูรณ์และปรากฏชั้นของเปลือกทุกชั้น ไม่มีการขยายขนาดของลำตัวต่อไป กุ้งจะกินอาหารเต็มที่ เคลื่อนไหวว่องไว ระยะนี้แบ่งเป็นระยะย่อยตามลักษณะทางกายภาพได้อีก 2 ระยะ คือ ระยะ C3 และ C4

ช่วงเวลาโดยเฉลี่ยของวงจรการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 90 วัน พบว่าใช้เวลาทั้งหมด 9-12 วัน ในระยะก่อนการลอกคราบใช้เวลา 6-7 วัน ระยะหลังการลอกคราบ 2-3 วัน และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ 1-2 วัน (Promwikorn *et al.*, 2007) (ภาพที่ 5)

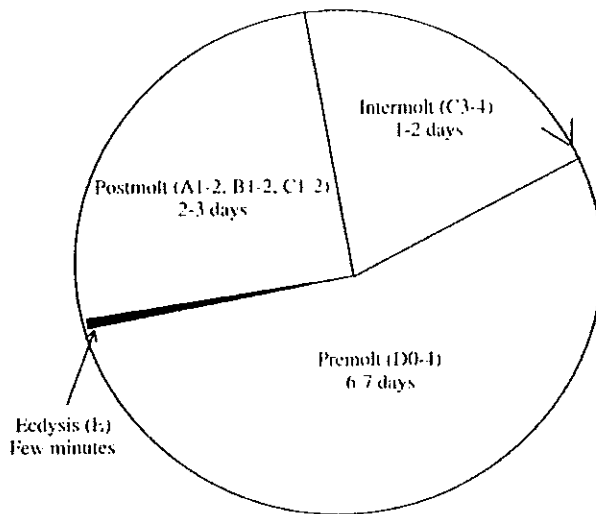
5.3 ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ

ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบมี 2 ชนิด คือ

1. ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (molt inhibiting hormone; MIH) เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากเซลล์ประสาทส่วนกลางที่เรียกว่า neurosecretory cell เมื่อสร้างแล้วจะหลังไปสะสมไว้ที่บริเวณก้านตาตรงส่วนของ X-organ sinus gland complex ซึ่งเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อที่มีความสัมพันธ์กับระบบประสาทบริเวณก้านตา (Lockwood, 1967 อ้าง โดย พุทธ ส่องแสงจินดา, 2531)

2. ฮอร์โมนกระตุ้นการลอกคราบ (molting hormone; MH) เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากอวัยวะที่เรียกว่า Y-organ ที่พบอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อของ maxillary segment และหลังออกสู่กระแสเลือดทาง antennary segment นอกจากจะสร้างจาก Y-organ แล้วฮอร์โมน MH ยังสามารถสร้างจากอวัยวะส่วนอื่นๆ ได้อีกเช่น รังไข่ และเนื้อเยื่อที่มีการงอกใหม่ (regeneration) (Skinner, 1985)

การที่ครัสเตเชียนเริ่มหรือหยุดการลอกคราบ เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงการหลั่งฮอร์โมน MIH และฮอร์โมน MH หลังจากครัสเตเชียนลอกคราบเสร็จใหม่ๆ การหลั่งฮอร์โมน MIH จาก X-organ sinus gland complex เข้าสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้นมีผลไปยับยั้งการทำงานของ Y-organ ทำให้การผลิตและหลั่งฮอร์โมน MH เข้าสู่กระแสเลือดลดลง เมื่อถึงระยะก่อนการลอกคราบ ปริมาณของฮอร์โมน MIH ที่หลั่งออกมาจาก X-organ จะลดลงทำให้ Y-organ ผลิตและหลั่งฮอร์โมน MH ออกมามากขึ้นทำให้กุ้งเกิดการลอกคราบ โดย Lee และคณะ (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ mRNA ของ MIH และ ecdysteroid ในวงจรการลอกคราบของปูสีน้ำเงิน (*Callinectes sapidus*) พบว่าระดับ mRNA ของ MIH เริ่มลดลงในระยะก่อนการลอกคราบ (pre-molt, D1-D4) และลดต่ำสุดในระยะ D3/D4 หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า ในระยะหลังการลอกคราบ (postmolt, A/B) และยังคงอยู่ในระดับสูงในระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt, C4) ในทางกลับกันระดับ ecdysteroids จะเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบ โดยมีระดับสูงสุดในระยะ D3 และจะเริ่มลดลงในระยะ D4 และมี



ภาพที่ 5 ระยะเวลาของวงจรการลอกคราบ กุ้งกุลาดำอายุ 90 วัน จำนวน 100 ตัว ถูกเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงที่มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา ภายใต้แสงธรรมชาติ (กลางวัน-กลางคืน 12:12 ชม.) และ อุณหภูมิตามสภาพแวดล้อมจริง (กลางคืนอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และกลางวันอุณหภูมิประมาณ 34 องศาเซลเซียส) หนึ่งวงจรการลอกคราบใช้เวลา 9-12 วัน ระยะเวลาโดยเฉลี่ยของแต่ละระยะได้จากการเลี้ยงกุ้ง 10-12 ตัว ในการเลี้ยงติดต่อกัน 3 วงจรการลอกคราบ

Figure 5. Timing of the molting cycle. One hundred *P. monodon*, aged 90 days, were cultured in aerated aquarium in natural day-light (12:12 h cycle) and at atmospheric temperatures (approximately 28 °C at night-time and 34 °C at day time). A molting cycle takes a period of 9-12 days. Averaged duration of each stage was obtained from 10-12 shrimps culturing in three continued molting cycle.

ที่มา : Promwikorn และคณะ (2007)

ระดับต่ำในระยะหลังการลอกคราบ (postmolt, A/B) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt, C4) การควบคุมการลอกคราบในลักษณะที่เกิดจากฮอร์โมน 2 ชนิดทำงานควบคุมซึ่งกันและกัน เรียกว่าเป็น two step hormonal sequence (Highnam and Hill, 1978 อ้างโดย พุทธ ส่องแสงจินดา, 2531)

5.4 การแยกระยะการลอกคราบด้วยเกณฑ์ทางกายภาพ

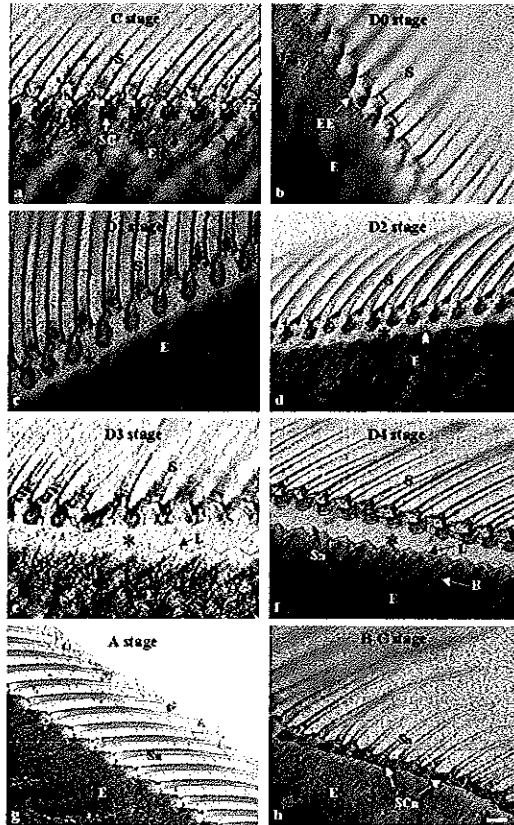
Promwikorn และคณะ (2004) ได้อธิบายเกณฑ์การแยกระยะการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตามลักษณะทางกายภาพของเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนัง ดังนี้

1. ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt, C) ตุ่มขนเจริญเต็มที่เนื้อเยื่อผิวหนังกระจายเต็มบริเวณระหว่างตุ่มขน (ภาพที่ 6a)
2. ระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) ซึ่งประกอบด้วย
 - 2.1 ระยะ D0 ขอบของเนื้อเยื่อผิวหนังมีลักษณะเรียบและอยู่ติดกับตุ่มขน (ภาพที่ 6b)
 - 2.2 ระยะ D1 ระหว่างเนื้อเยื่อผิวหนังและตุ่มขนมีช่องว่างแคบๆ (ภาพที่ 6c)
 - 2.3 ระยะ D2 ระหว่างเนื้อเยื่อผิวหนังและตุ่มขนมีช่องว่างที่กว้างมากขึ้น และขอบของเนื้อเยื่อผิวหนังมีลักษณะเป็นรอยหยัก (ภาพที่ 6d)
 - 2.4 ระยะ D3 ระหว่างเนื้อเยื่อผิวหนังและตุ่มขนมีช่องว่างที่กว้างมากขึ้น และบริเวณขอบของเนื้อเยื่อผิวหนังมีลักษณะของรอยหยักที่สูงขึ้น และจะมีชั้นบางของเนื้อเยื่อที่บริเวณขอบของเนื้อเยื่อผิวหนัง (ภาพที่ 6e)
 - 2.5 ระยะ D4 ระหว่างเนื้อเยื่อผิวหนังและตุ่มขนมีช่องว่างอย่างชัดเจนขอบของเนื้อเยื่อผิวหนังมีลักษณะเหมือนฟันปลาที่ขอบของเนื้อเยื่อผิวหนังจะมีเนื้อเยื่อสีเหลืองอ่อนสะท้อนแสงและจะเห็นลักษณะของเนื้อเยื่อผิวหนังเป็นเส้นขนานกัน (ภาพที่ 6f)
3. ระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) ประกอบด้วย
 - 3.1 ระยะ A ขนนุ่มและขนไม่มีตุ่มขน (ภาพที่ 6g)
 - 3.2 ระยะ B มีการปรากฏตุ่มขนอ่อนขนาดเล็ก (ภาพที่ 6h)

5.5 การแยกกระดงการลอกคราบด้วยเกณฑ์เนื้อเยื่อวิทยาของเปลือก

Promwikorn และคณะ (2007) ได้อธิบายเกณฑ์การแยกกระดงการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตามลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเปลือกเมื่อย้อมด้วย PAS และ Hematoxylin ดังนี้

1. ระยะ C4 เปลือกมีครบทั้ง 4 ชั้น (ภาพที่ 7a) ชั้นนอกสุดบาง (epicuticle) และยึดติดสีม่วงเข้ม ชั้นต่อมา (exocuticle) ย้อมติดสีน้ำเงินของ hematoxylin และประกอบด้วยชั้น endocuticle ย้อมติดสีชมพูของ PAS และมีลักษณะต่างๆ ชั้น membranous layer มีลักษณะเหมือนชั้น endocuticle แต่เห็นได้ชัดเจนเมื่อย้อมด้วย hematoxylin โดยชั้นแรกยึดติดสีแดงขณะเห็นสีน้ำเงินบางๆ เมื่อย้อมด้วย modified Masson's trichrome (ภาพที่ 7b)
2. ระยะ D0-D2 มีชั้น epicuticle exocuticle endocuticle แต่ไม่มีชั้น membranous layer เห็นได้ชัดเมื่อย้อมด้วย PAS และ hematoxylin (ภาพที่ 7c)
3. ระยะ D3 มีการปรากฏของชั้น new epicuticle อยู่ถัดจากชั้น endocuticle-membranous layer (ภาพที่ 7d)
4. ระยะ D4 มีชั้น new exocuticle อยู่ด้านในของชั้น new epicuticle (ภาพที่ 7e)



ภาพที่ 6 ระยะของการลอกคราบ แพนหางของกุ้งกุลาดำถูกนำมาสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX51) ซึ่งใช้เกณฑ์ตาม Drach แต่ละภาพแสดงลักษณะทางสรีรวิทยาของระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (a) ระยะก่อนการลอกคราบ (b-f) และระยะหลังการลอกคราบ (g, h) แถบ = 50 ไมโครเมตร EE = ขอบของเนื้อเยื่อผิวหนัง B = ลายของเนื้อเยื่อผิวหนัง L = ชั้นสีขาวที่ขอบของเนื้อเยื่อผิวหนัง S = ขน SC = ตุ่มขน SCn = ตุ่มขนที่สร้างขึ้นใหม่ Sn = ขนที่สร้างขึ้นใหม่ \sum = รอยหยักที่ขอบของเนื้อเยื่อผิวหนัง * = ช่องว่างระหว่างเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนัง

Figure 6. Determination of molting stage. Uropods of the black tiger shrimps were examined and photographed under a light microscope (Olympus BX51) connected to a digital camera (Olympus DP11). The criteria used for molt staging followed Drach's staging. The images of physical characteristics indicate intermolt stage (a), premolt stage (b-f) and postmolt stage (g,h). Bar = 50 μ m. EE = epidermal edge, B = indent pattern of the epidermis, L = white layer at the edge of the epidermis, S = setae, SC = seta cone, SCn = newly-formed setal cones, Sn = newly-formed seta, \sum = wavy edge of epidermis, * = clear zone between cuticle and epidermis.

ที่มา : Promwikorn และคณะ (2004)

5. ระยะ A เป็นระยะหลังจากการลอกคราบทันที จะเห็นชั้น epicuticle และ exocuticle เท่านั้น ซึ่งก่อนหน้านี้เป็นชั้น new epicuticle และ new exocuticle (ภาพที่ 7f)

6. ระยะ B1 เป็นระยะหลังจากลอกคราบ 10 ชั่วโมง จะเห็นชั้น endocuticle ถูกสร้างขึ้นมาเป็นชั้นเล็กๆ (ภาพที่ 7g)

7. ระยะ B2 เป็นระยะหลังจากกึ่งลอกคราบ 1 วัน เปลือกชั้นที่ 3 จะหนาขึ้น (ภาพที่ 7h) เปลือกชั้น endocuticle จะหนาขึ้นเรื่อยๆ และชั้น membranous layer จะถูกสร้างขึ้นดังภาพที่ 7a

5.6 การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะ เนื้อเยื่อ และเซลล์ตลอดวงจรการลอกคราบ

1. เนื้อเยื่อผิวหนัง

การจัดเรียงตัวและความสูงของเซลล์ในเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำมีการเปลี่ยนแปลงตลอดวงจรการลอกคราบ โดยในระยะระหว่างวงจรการลอกคราบเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมีการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ เซลล์มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 3.12 ไมโครเมตร ในระยะก่อนการลอกคราบความสูงของเซลล์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นทำให้รูปร่างของเซลล์เป็นรูปสี่เหลี่ยมทรงสูง การจัดเรียงตัวของเซลล์มีความเป็นระเบียบ ความสูงของเซลล์เฉลี่ยในระยะ D2-D4 เท่ากับ 8.75 ไมโครเมตร โดยเพิ่มขึ้นเป็น 2.8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ หลังจากเปลือกหลุดออก ความสูงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังจะค่อยๆ ลดลงโดยความสูงของเซลล์เฉลี่ยในระยะ B1-B2 เท่ากับ 7.33 ไมโครเมตร เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (sub-epidermis) ก็มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบ โดยในระยะ D1 จนถึง A พบการสะสมคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนใน sub-epidermal cell และต่อม tegumental มีขนาดและจำนวนเพิ่มขึ้น ในระยะ B-D0 การสะสมคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนลดลงและต่อม tegumental มีขนาดและจำนวนลดลง (Promwikorn *et al.*, 2007)

2. X-organ

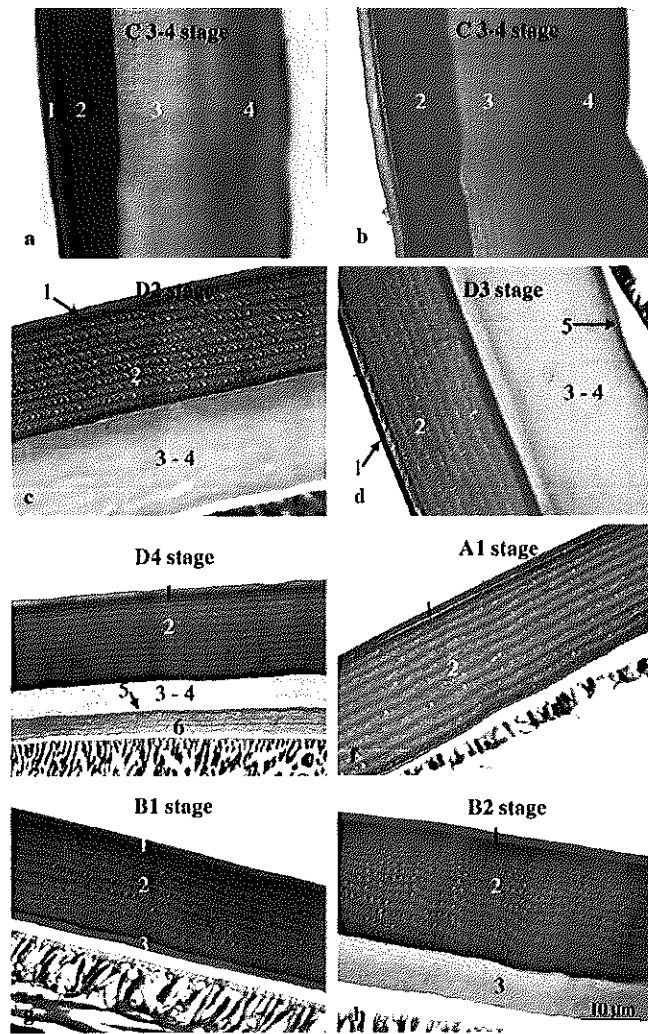
X-organ ของกิ้งก่าหลายชนิดได้ถูกศึกษาด้วย light microscopy พบว่า X-organ ของ *Orconectes virilis* มีเซลล์ neurosecretory 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 มีเซลล์มากที่สุดอยู่ในส่วนของ X-organ ชนิดที่ 2 อยู่ติดกับ X-organ และเซลล์อีก 2 ชนิดอยู่ในสมองและก้านตา เซลล์ชนิดที่ 2 เท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบ ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของ MIH (Durand, 1956)

3. Y-organ

ในช่วงก่อนการลอกคราบเซลล์ของ Y-organ ใน *Astacus astacus* *Cancer antennarius* และ *Palaemon paucidens* มีการเพิ่มปริมาณของไซโตพลาซึม และมีหลักฐานชี้ว่าปริมาณไซโตพลาซึมเพิ่มเป็นสองเท่าในระยะ D2-D3 (Aoto *et al.*, 1974; Birkenbeil and Gersch, 1979; Hinch *et al.*, 1980)

4. Mandibular organs

เซลล์ของ mandibular organs ในสัตว์บางชนิด เช่น กุ้ง *P. paucidens* (Aoto *et al.*, 1974) และปู *Carcinus maenas* (Demeusy, 1975) มีปริมาณไซโตพลาซึมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีปริมาณ



ภาพที่ 7 เกล็ดทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ใช้สำหรับแยกการลอกคราบ เปลือกของกุ้งกุลาดำใน
 ระยะเวลาการลอกคราบต่างๆ ผ่านกระบวนการตัดเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาและ
 ย้อมด้วย PAS และ hematoxylin (a, c-h) หรือ modified Masson's trichrome (b) แต่ละ
 ชั้นของเปลือกแสดงด้วยเลข 1 = ชั้น epicuticle 2 = ชั้น exocuticle 3 = ชั้น endocuticle
 4 = ชั้น membranous layer 5 = ชั้น epicuticle ใหม่ และ 6 = ชั้น exocuticle ใหม่
 ทุกภาพมีกำลังขยายเท่ากัน

Figure 7. Histological criteria used for molt staging. The cuticles of the black tiger shrimps in
 different molting stages were routinely processed for histological study and stained
 with PAS and Hematoxylin (a, c-h) or modified Masson's trichrome (b). Each
 cuticular layer is indicated in numbers 1 = epicuticle, 2 = exocuticle, 3 =
 endocuticle, 4 = membranous layer, 5 = new epicuticle, 6 = new exocuticle. All
 figures are with the same magnification.

ที่มา : Promwikorn และคณะ (2007)

โมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้นเป็น 15 เท่าในระยะก่อนการลอกคราบ จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ น้ำหนัก mandibular organs กับเพศและระยะการลอกคราบของปู (*Oziotelphusa senex senex*) พบว่า ปูทั้งเพศผู้และเพศเมียมีน้ำหนัก mandibular organs เพิ่มขึ้นเมื่อเข้าใกล้ระยะลอกคราบ (ecdysis) (Nagaraju *et al.*, 2004)

5. เนื้อเยื่อตับ

Zilli และคณะ (2003) ศึกษาจำนวนและชนิดของเซลล์ในตับของกิ้ง (*Marsupenaeus japonicus*) สัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบ พบว่า R-cell ซึ่งทำหน้าที่สะสมไขมัน ไกลโคเจน และ แคลเซียมมีการลดจำนวนลงในระยะ A F-cell ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในระยะ A ส่วน B-cell ซึ่งทำหน้าที่สะสมของเสีย และ E-cell ซึ่งทำหน้าที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ มีจำนวนค่อนข้างคงที่ตลอดวงจรการลอกคราบ

6. เลือด

เลือดเป็นเส้นทางในการลำเลียงสารต่างๆ เพื่อส่งไปยังอวัยวะเป้าหมาย การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ในเลือดสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบ พบว่าระดับความเข้มข้นของ แคลเซียม แมกนีเซียม สารอินทรีย์ ฟอสเฟตรวม คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนรวมในปูและกิ้งเพิ่มขึ้นในระยะก่อนการลอกคราบและลดลงหลังจากระยะนี้ (Glynn, 1968; Vijayan and Diwan 1996; Cheng *et al.*, 2002; Pratoomchat *et al.*, 2002)

6. การแสดงออกของยีนและโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบของสัตว์ในตระกูลครัสเตเชียน

เนื่องจากการศึกษาการแสดงออกของยีน และโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังในกิ้งมีน้อยจึงต้องรวบรวมข้อมูลการศึกษาในสัตว์ตระกูลครัสเตเชียน ซึ่งเป็นสัตว์ในตระกูลเดียวกันกับกิ้งเอาไว้ด้วย กันเพื่อเป็นพื้นฐานของความเข้าใจที่ดีขึ้น โดยสามารถสรุปการแสดงออกของยีนและโปรตีนตามระยะต่างๆ ของการลอกคราบได้ดังนี้

6.1 ระยะก่อนการลอกคราบ

จากการศึกษาการสังเคราะห์ rRNA ในเนื้อเยื่อผิวหนังของปู *Gecarcinus lateralis* พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเกือบห้าเท่าในช่วงระยะก่อนการลอกคราบและลดลงในช่วงหลังการลอกคราบ (Skinner 1966, 1968) โดยการสังเคราะห์ RNA รวมในเนื้อเยื่อผิวหนังของ *Orconectes limosus* และ *O. obscurus* มีปริมาณมากที่สุดในระยะ D4 (Keller and Adelung, 1970; Stevenson and Tung, 1971) ในเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้ง (*Astacus leptodactylus*) พบ polypeptide ขนาด 18 kDa มีการแสดงออกให้เห็นอย่างเด่นชัดในช่วงก่อนการลอกคราบ (Bielefeld *et al.*, 1986) Buda และ Shafer (2005) พบว่า

ยีน prophenoloxidase-activating factor (PPAF) มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณกระดอง (mid-dorsal hyperdermis) และบริเวณข้อต่อของขา (arthodial hyperdermis) ของปูสีน้ำเงิน (*Callinectes sapidus*) โดยมีการแสดงออกในปริมาณสูงสุดในระยะ D3 และลดลงทันทีเมื่อมีการลอกคราบ (ecdysis) ในขณะที่ Promwikorn และคณะ (2007) พบว่าโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 57 kDa มีการแสดงออกในระยะก่อนการลอกคราบและแสดงออกสูงสุดในระยะ D4-A

6.2 ระยะหลังการลอกคราบ

polypeptide ที่มีขนาด 15 kDa หรือน้อยกว่า มีการแสดงออกมากขึ้นในระยะหลังการลอกคราบไปจนถึงระยะ C4 (intermolt) (Bielefeld *et al.*, 1986) มีโปรตีน 5 ชนิด ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 46-67 kDa ในชั้น cuticle-epidermis ของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* มีการแสดงออกอย่างจำเพาะต่อระยะหลังการลอกคราบ (Cariolou and Flytzanis, 1994) ยีน *DD9A* (ขนาด 0.6 kb) *DD9B* (ขนาด 1.0 kb) และ *DD5* (ขนาด 4.3 kb) ในกุ้ง *Penaeus japonica* มีการแสดงออกเฉพาะเนื้อเยื่อผิวหนังในระยะหลังการลอกคราบเท่านั้น (Watanabe *et al.*, 2000; Ikeya *et al.*, 2001) โปรตีน *DD5* มี signal peptide ที่คาดว่าทำหน้าที่จับกับไคตินในเปลือก ยีน prophenoloxidase-activating factor (PPAF) ในเนื้อเยื่อผิวหนังของปูสีน้ำเงิน (*Callinectes sapidus*) นอกจากจะมีการแสดงออกในระยะก่อนการลอกคราบ ดังที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้แล้ว ยังมีการแสดงออกในระยะหลังการลอกคราบอีกด้วย โดยการแสดงออกของยีน *PPAF* ในเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณกระดองปูมีปริมาณต่ำภายหลังการลอกคราบใหม่ แต่จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังการลอกคราบ (Buda and Shafer, 2005)

6.3 ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ

polypeptide ที่มีขนาด 15 kDa หรือน้อยกว่า มีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในระยะหลังการลอกคราบไปจนถึงระยะ C4 (intermolt) (Bielefeld *et al.*, 1986) โปรตีนที่กระจายอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 29 และ 44 kDa ในเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ศึกษาด้วย 2D SDS-PAGE มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ และมีโปรตีนอย่างน้อย 6 ชนิดในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 26-32 kDa ที่แสดงออกเฉพาะระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (Cariolou and Flytzanis, 1994) ส่วนโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 57 kDa ใน *P. monodon* มีการแสดงออกต่ำสุดในระยะ C (Promwikorn *et al.*, 2007)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาจะเห็นว่าการศึกษาในด้านนี้ยังมีไม่มากนัก เท่าที่ข้อมูลปรากฏจากสัตว์ในตระกูลครัสเตเชียหลายสปีชีส์สามารถสรุปได้ว่า ระยะก่อนการลอกคราบมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ rRNA polypeptide ขนาด 15 -18 kDa และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 57 kDa ระยะหลังการลอกคราบมีการแสดงออกของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 46-67 kDa polypeptide ขนาด 15 kDa หรือน้อยกว่า ยีน *DD9A*, *DD9B*, *DD5* และ *PPAF* และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบมีการแสดงออกของ polypeptide ขนาด 15 kDa โปรตีนที่มีน้ำหนัก 29, 44 และ 26-32 kDa (ตารางที่ 1)

วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังในแต่ละระยะ
ของวงจรการลอกคราบของกิ้งกูดาค้ำด้วยวิธี Two-Dimensional Gel Electrophoresis

ตารางที่ 1 สรุปผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังในกุ้งและปู

Table 1. Summary of gene and protein expression in the epidermis of shrimp and crab.

Gene/protein	Molecular weight		Stage of expression		Role of gene/protein	Species	Reference	Remark
	Increased	Decreased	Specific					
rRNA synthesis	No data	Premolt	Postmolt	No reported	No reported	<i>Gecarcinus lateralis</i>	Skinner 1966, 1968	
RNA synthesis	No data	Premolt (D4)	No reported	No reported	No reported	<i>Orconectes limosus</i> ; <i>O. obscurus</i>	Keller and Adeung, 1970; Stevenson and Tung, 1971	
Polypeptide	15 kDa	Postmolt-intermolt (C4)	Early premolt	No reported	No reported	<i>Astacus leptodactylus</i>	Bielefeld <i>et al.</i> , 1986	
Polypeptide	18 kDa	Premolt	No reported	No reported	No reported	<i>Astacus leptodactylus</i>	Bielefeld <i>et al.</i> , 1986	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1. (cont.).

Gene/protein	Molecular weight	Stage of expression			Role of gene/protein	Species	Reference	Remark
		Increased	Decreased	Specific				
No data	29, 44 kDa	Intermolt	No reported	No reported	No reported	<i>Penaeus vannamei</i>	Carioulou and Flytzanis, 1994	Studies in cuticle-epidermis
No data	26-32 kDa	No reported	No reported	Intermolt	No reported	<i>Penaeus vannamei</i>	Carioulou and Flytzanis, 1994	
No data	46-67 kDa	Postmolt	No reported	No reported	No reported	<i>Penaeus vannamei</i>	Carioulou and Flytzanis, 1994	
<i>DD9A</i>	0.6 kb	No reported	No reported	Postmolt	Rigidity on the exoskeleton	<i>Penaeus japonica</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 2000	
<i>DD9B</i>	1.0 kb	No reported	No reported	Postmolt	Rigidity on the exoskeleton	<i>Penaeus japonica</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 2000	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1. (cont.).

Gene/protein	Molecular weight	Stage of expression			Role of gene or protein	Species	Reference	Remark
		Increased	Decreased	Specific				
<i>DDS</i>	4.3 kb	No reported	No reported	Postmolt	Rigidity on the exoskeleton	<i>Penaeus japonicus</i>	Ikeya <i>et al.</i> , 2001	
<i>PPAF</i>	1.5 kb	Premolt and Postmolt	Ecdysis	No reported	Tanning	<i>Callinectes sapidus</i>	Buda and Shafer, 2005	
No data	57 kDa	Premolt (D4)- Postmolt (A)	Intermolt (C)	No reported	No reported	<i>Penaeus monodon</i>	Promwikorn <i>et al.</i> , 2007	

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาคือ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่มีน้ำหนักตัว 10-20 กรัม มีอายุ 90 วัน ซึ่งนำมาจากฟาร์มของเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองชนิด Molecular grade

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. 30% Acrylamide/Bis solution	Bio-Rad
2. Ammonium persulfate ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Amersham Biosciences
3. Agarose powder	Amersham Biosciences
4. Bromophenol blue	Amersham Biosciences
5. Brilliant blue R-250	Amersham Biosciences
6. Boric acid (B(OH) ₃)	P. S. Science Chemical
7. 3[[Cholamidopropyl]dimethylammonio]- 1-propane sulphonate (CHAPS)	Amersham Bioscience
8. 2D Clean-Up Kit	Amersham Biosciences
9. 10 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Invitrogen
10. DNA ladder 100 bp	SBBU
11. Dithiothreitol (DTT) ((CHOHCO ₂ SH) ₂)	Amersham Biosciences
12. DNA lysis buffer	SBBU
13. Drystrip cover fluid	Amersham Biosciences
14. Ethanol (CH ₂ OH)	J.T. Baker
15. Ethidium bromide (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Amersham Biosciences

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
16. 37% Formaldehyde solution (CH ₂ O)	BDH
17. 87% w/w Glycerol (HOCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH)	Amersham Biosciences
18. Glutaraldehyde solution (C ₅ H ₈ O ₂)	Fluka
19. Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Amersham Biosciences
20. HPV 441-IC primers	SBBU
21. Immobilized pH gradient (IPG) buffer pH 3-10	Amersham Biosciences
22. Iodoacetamide (IAA) (C ₂ H ₄ INO)	Amersham Biosciences
23. Methanol (CH ₃ OH)	J.T. Baker
24. 50 mM Magnesium chloride (MgCl ₂)	Invitrogen
25. MBV 533 IC primers	SBBU
26. N, N, N', N'-Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, dehydrate (EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O)	Amersham Biosciences
27. Protein assay	Bio-Rad
28. Rainbow protein molecular weight marker	GE Healthcare
29. N, N, N', N'-Tetramethylethylene diamine ((CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂)	Amersham Biosciences
30. Silver nitrate (AgNO ₃)	BDH
31. Sodium thiosulfate anhydrous (Na ₂ O ₃ S ₂)	Amersham Biosciences
32. Sodium acetate anhydrous (CH ₃ COONa)	Amersham Biosciences
33. Sodium carbonate anhydrous (Na ₂ CO ₃)	Fisher
34. Sodium dodecyl sulfate (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na)	Amersham Biosciences
35. 5 units/μl <i>Taq</i> polymerase	Invitrogen
36. 1.5 M Tris-HCl Buffer pH 8.8	Bio-Rad
37. Tris-HCl pH 8.8	Bio-Rad
38. Thiourea (CH ₂ N ₂ S)	Amersham Biosciences
39. Tris-base (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	Amersham Biosciences
40. Trypsin	Bio Active
41. Urea (NH ₂ CONH ₂)	Amersham Biosciences

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองชนิด Analytical grade

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Acetonitrile (CH ₃ CN)	J.T. Baker
2. Ammonium bicarbonate (NH ₄ HCO ₃)	Fluka
3. Basic fuchsin (C ₂₀ H ₂₀ ClN ₃)	BDH
4. Calcium chloride (CaCl ₂)	MERCK
5. Citric acid (C ₆ H ₈ O ₇ •H ₂ O)	MERCK
6. Charcoal activated	BDH
7. Chloral hydrate (CCl ₃ CH(OH) ₂)	CARLO ERBA
8. Di sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na ₂ HPO ₄ •H ₂ O)	CARLO ERBA
9. Formaldehyde (HCHO)	LAB-SCAN
10. Formic acid (HCOOH)	MERCK
11. Glacial acetic acid (CH ₃ COOH)	J.T. Baker
12. Hemotoxylin (C ₁₆ H ₁₄ O ₆)	Fluka
13. Hydrochloric acid (HCl)	J.T. Baker
14. Permunt	Fisher
15. Potassium chloride (KCl)	Fluka
16. Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	Sigma
17. Periodic acid (H ₅ IO ₆)	Fluka
18. Potassium aluminium sulfate-12-hydrate (AlK(SO ₄) ₂ •12H ₂ O)	Riedel-de Haen
19. Potassium ferricyanide (C ₆ N ₆ FeK ₃)	MERCK
20. Sodium chloride (NaCl)	Ajax Finechem
21. Sodium iodate (KIO ₃)	Fluka
22. Sodium metabisufite (Na ₂ S ₂ O ₃)	BDH
23. Trifluoroacetic acid (C ₂ HF ₃ O ₂)	MERCK
24. Xylene (C ₈ H ₁₀ (C ₆ H ₄ C ₂ H ₆))	LAB-SCA

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์	ยี่ห้อ	รุ่น	ประเทศผู้ผลิต
1. เครื่องให้ออกซิเจน	Aquanic	M-3800	ญี่ปุ่น
2. เครื่องวัดความเค็ม	Atago	S/Mill-E	ญี่ปุ่น
3. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ	AO	820	สหรัฐอเมริกา
4. อ่างน้ำลอยชิ้นเนื้อ	MEDAX	Stork Tronic	เยอรมนี
5. เครื่องอุ่นสไลด์	MEDAX	Stork Tronic	เยอรมนี
6. กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ	Olympus	DP-11	ญี่ปุ่น
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ	Hermle	Z 360	เยอรมนี
8. เครื่องให้ความร้อนแบบหมุน	Biosan	TDB-120	แลตเวีย
9. เครื่อง Vortex mixer	Biosan	V 1 plus	แลตเวีย
10. เครื่องแยกโปรตีนตามความแตกต่าง ของ pH	Amersham Biosciences	Ettan IPGphor II	สวีเดน
11. เครื่องแยกโปรตีนตามความแตกต่าง ของน้ำหนักโมเลกุลขนาด 16x18 ซม.	Amersham Biosciences	SE 600 Ruby	สหรัฐอเมริกา
12. เครื่องเขย่า	Bibby Stuart	STR6	อังกฤษ
13. เครื่อง Microplate reader	Bio-Tex	PowerWaveX	สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องถ่ายภาพเจล	Amersham Biosciences	ImageScanner™	สวีเดน
15. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	MJ Research	PTC-200	สหรัฐอเมริกา
16. เครื่องชั่งสาร	Sartorius	ED 224S	เยอรมนี
17. เครื่องจ่ายไฟ	Amersham Biosciences	EPS 1001	สหรัฐอเมริกา
18. เครื่องหมุนเหวี่ยง	Hermle	Z 233 M-2	เยอรมนี
19. เครื่องแยกดีเอ็นเอแบบแนวนอน	Amersham Bioscience	Hoefer HE 33	สหรัฐอเมริกา
20. เครื่องกวนสารละลายชนิด แม่เหล็กไฟฟ้า	Barnstead/ Thermolyne	SP47230-26	สหรัฐอเมริกา
21. เครื่อง Gel documentation	UVP	BioDoc-It	อังกฤษ

เครื่องมือและอุปกรณ์	ยี่ห้อ	รุ่น	ประเทศผู้ผลิต
22. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศ	Labconco	Centrivap console	สหรัฐอเมริกา
23. เครื่อง Liquid chromatography tandem mass spectrometer	Waters	Micromass Q-ToF micro TM	อังกฤษ
24. เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง	Elma	Transsonic digitals	เยอรมนี

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเลี้ยงกุ้ง

เตรียมน้ำสำหรับเลี้ยงกุ้งโดยจะผสมน้ำทะเลต่อน้ำจืด ให้ได้ความเค็มเท่ากับน้ำที่ใช้เลี้ยงในฟาร์ม และใส่ออกซิเจนไว้ตลอดเวลาเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วันก่อนการเลี้ยง หลังจากนั้นนำกุ้งจากฟาร์มในเขตจังหวัดใกล้เคียงมาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เตรียมไว้ ตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียทุกวัน ถ้าปริมาณแอมโมเนียที่ตรวจวัดได้มีค่ามากกว่า 0.10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนึ่งลิตร จะต้องมีการเปลี่ยนน้ำใหม่ อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งเป็นอาหารเม็ดให้วันละ 3 เวลา คือ 8.00 12.00 และ 17.00 น. การตรวจระยะการลอกคราบทำทุกวันวันละ 1 ครั้ง เมื่อได้กุ้งตามระยะที่ต้องการจะนำกุ้งไปทำตามขั้นตอนการเก็บตัวอย่างตามข้อ 4.2

4.2 การเก็บตัวอย่างกุ้ง

นำกุ้งมาชั่งน้ำหนัก ตัด carapace ของกุ้งทั้งสองข้างด้วยกรรไกร แล้วล้างด้วย Phosphate buffer solution (PBS) และนำมาใส่ใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน นำกุ้งมาตัดลำตัวปล้องที่ 1 นำไปทำตามขั้นตอนตามข้อ 4.3.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

4.3 การตรวจระยะการลอกคราบ

4.3.1 การตรวจประจำวัน

เป็นการตรวจระยะการลอกคราบ โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นกับเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณหางของกุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อทำการคัดเลือกกุ้งที่อยู่ในระยะการลอกคราบตามที่ต้องการ หลักการตรวจอ้างอิงจาก Promwikom และคณะ (2004) โดยมีเกณฑ์โดยสังเขปดังนี้คือ ระยะ D0 เนื้อเยื่อได้เปลือกจะลอยร่อนออกมาจากตุ่มขนเล็กน้อยทำให้เกิดช่องว่างระหว่างตุ่มขนและทำให้เห็นแนวของเนื้อเยื่อได้เปลือกอยู่ใต้ตุ่มขน ระยะ D1 เนื้อเยื่อได้

เปลือกจะถอยร่นออกมาอีก ทำให้เห็นช่องว่างระหว่างตุ่มขนและแนวของเนื้อเยื่อได้เปลือก ระยะ D2 เนื้อเยื่อได้เปลือกจะถอยร่นออกมามากขึ้น ทำให้ช่องว่างระหว่างตุ่มขนและแนวของเนื้อเยื่อได้เปลือกกว้างขึ้น และบริเวณเนื้อเยื่อได้เปลือกมีการเปลี่ยนแปลงเป็นรอยหยักเดี่ยวๆ ระยะ D3 เนื้อเยื่อได้เปลือกจะถอยร่นออกมามากขึ้น ทำให้ช่องว่างระหว่างตุ่มขนและแนวของเนื้อเยื่อได้เปลือกกว้างมากขึ้น รอยหยักสูงขึ้นและที่บริเวณขอบขนรอยหยักจะเห็นเป็นชั้นเนื้อเยื่อต่างๆ สีขาวระยะ D4 เนื้อเยื่อได้เปลือกจะถอยร่นมากขึ้น ทำให้เห็นช่องว่างระหว่างตุ่มขนและแนวเนื้อเยื่อได้เปลือกอย่างเห็นได้ชัด รอยหยักจะสูงขึ้น ขอบของรอยหยักจากเดิมที่เป็นเนื้อเยื่อสีขาวจะกลายเป็นสีเหลือง ซึ่งจะสะท้อนแสงไฟเมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และในขณะนี้ลายของเนื้อเยื่อได้เปลือกมีลักษณะเป็นเส้นขนาน ซึ่งต่างจากระยะอื่นที่มีลักษณะคล้ายไขแมงมุม ระยะ A เมื่อกึ่งลอกคราบใหม่ๆ ไม่เกิน 2 ชั่วโมง เปลือกกึ่งจะอ่อนนุ่มอยู่มากจะเห็นเส้นขนอ่อน และที่โคนของเส้นขนจะไม่ปรากฏตุ่มขน ระยะ B เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน เปลือกกึ่งจะแข็งขึ้นขณะเดียวกัน โคนของเส้นขนจะมีตุ่มขนขนาดต่างๆ เจริญขึ้นมา และระยะ C (ระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ) เปลือกแข็งมากขึ้น ตุ่มขนมีการเจริญอย่างสมบูรณ์ เนื้อเยื่อได้เปลือกเจริญเต็มเนื้อที่ระหว่างตุ่มขนไปจนถึงเปลือก

4.3.2 การยึดยันระยะลอกคราบ

(1) การคงสภาพเนื้อเยื่อ (Fixation)

นำกึ่งมาตัดส่วนของลำตัวโดยตัดปล้องที่ 1 และคงสภาพเนื้อเยื่อไว้ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 3 วัน และเปลี่ยน Davidson's fixative ใหม่ทุกวัน

(2) กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ (Tissue processing)

เอาชิ้นตัวอย่างออกจาก Davidson's fixative แล้วนำมาดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้คือ นำชิ้นตัวอย่างมาใส่ใน 70% ethanol ค้างคืน ต่อจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างมาใส่ใน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 ชม. นำชิ้นตัวอย่างมาใส่ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 ชม. แล้วนำชิ้นตัวอย่างมาใส่ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 ชม. หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างมาใส่ในพาราฟินเหลว (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) 3 ครั้งๆ ละ 2 ชม. แล้วจึงนำชิ้นตัวอย่างออกจากตู้อบแล้วนำไปวางในเบ้าแล้วเทพาราฟินเหลว และรอให้พาราฟินแข็งตัวเป็นบล็อกสีเหลือง

(3) การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (Sectioning)

นำบล็อกชิ้นเนื้อประกอบเข้ากับเครื่องตัดชิ้นเนื้อ และตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางแล้วนำแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วไปลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อที่ตั้งอุณหภูมิของน้ำไว้ประมาณ 45-47 องศาเซลเซียส (ละลายเจลาตินในอ่างลอยเนื้อเยื่อไว้แล้ว) จากนั้นใช้ปากคีบแยกแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อแต่ละชิ้นออกจากกันแล้วใช้สไลด์ซ้อนเนื้อเยื่อที่ลอยอยู่ในอ่างลอย จากนั้นวางสไลด์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่บนเครื่องอุ่นสไลด์ร้อนจนกระทั่งเนื้อเยื่อและสไลด์แห้งสนิท

(4) การย้อมเนื้อเยื่อด้วย Periodic Acid Schiff's reagent (PAS)

นำสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อไป deparafinization โดยแช่ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้น นำสไลด์ไปแช่ใน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำสไลด์แช่ใน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา 10 นาที โดยเปิดน้ำให้ไหลเบาๆ หลังจากนั้นแช่สไลด์ใน 0.5% periodic acid 5 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา 1 นาที แช่สไลด์ใน Schiff's reagent 30 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา 10 นาที ต่อจากนั้นแช่สไลด์ใน Mayer's hematoxylin 15 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา 5 นาที แช่สไลด์ใน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่สไลด์ใน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำสไลด์มาพักใน xylene 10 นาที นำเนื้อเยื่อมาหาคด้วย permount และปิดด้วย cover slip

(5) การแยกระยะการลอกคราบตามลักษณะของเนื้อเยื่อวิทยา

เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของชั้นต่างๆ ของเปลือกกุ้ง หลักการตรวจอ้างอิงจาก Promwikorn และคณะ (2007) โดยการแยกระยะการลอกคราบทำได้โดยดูจากชั้นของเปลือกกุ้งที่ปรากฏ โดยมีเกณฑ์พอสังเขปดังนี้คือ ระยะ D3 พบชั้น Epicuticle ใหม่ ซึ่งอยู่ใต้ชั้นของเปลือกเก่า ระยะ D4 จะเห็นชั้นของเปลือกกุ้งเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นเปลือกเก่าและชั้นเปลือกใหม่ โดยชั้นเปลือกเก่าจะอยู่ด้านบน ซึ่งทั้งเปลือกใหม่และเปลือกเก่าจะประกอบด้วยชั้น Epicuticle และ Exocuticle ระยะ A เปลือกกุ้งประกอบด้วยชั้น Epicuticle และ Exocuticle ของเปลือกใหม่และไม่ปรากฏเปลือกเก่า ระยะ B ปรากฏชั้น Endocuticle ต่อจากชั้น Exocuticle ระยะ C ปรากฏชั้น Membranous layer ต่อจากชั้น Endocuticle เมื่อกุ้งอยู่ในระยะนี้กุ้งจะมีเปลือกครบทั้ง 4 ชั้น (หมายเหตุ : ระยะ D0 D1 และ D2 แยกได้ไม่ชัดเจนด้วยวิธีนี้)

4.4 การตรวจการติดเชื้อแฝงภายในกุ้ง

การตรวจการติดเชื้อแฝง Hepatopancreatic parvovirus (HPV) และ Monodon baculovirus (MBV) ภายในกุ้งโดยใช้วิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) มีขั้นตอนต่างๆ ตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำดังนี้

4.4.1 การสกัด DNA

นำขาว่ายน้ำของกุ้ง 1 ขา มาบดในสารละลาย Lysis buffer (SBBU) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปใช้ในการทำ PCR

4.4.2 การทำ Polymerase chain reaction (PCR)

(1) การตรวจการติดเชื้อแฝงของโรค MBV มี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 นำ DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ PCR master mix (PCR buffer, 10mM dNTPs, 10 μ M MBV 533

IC-F primer, 10 μ M MBV 533 IC-R primer, 0.625 U Taq polymerase) 45 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler โดยทำปฏิกิริยาตามที่โปรแกรมกำหนด ขั้นตอน pre-heating อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน pre-denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยา Polymerase chain reaction 40 รอบ ตามขั้นตอนต่อไปนี้ denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และ cooling อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขั้นตอนที่ 2 นำ PCR product จากขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาผสมกับ PCR master mix (PCR buffer, 10mM dNTPs, 10 μ M MBV 361 IC-F primer, 10 μ M MBV 361 IC-R primer, 0.625 Units Taq polymerase) ปริมาตร 49 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องสำหรับทำ PCR โดยทำปฏิกิริยาตามโปรแกรมที่กำหนด ขั้นตอน pre-heating อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน pre-denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยา Polymerase chain reaction 40 รอบ ตามขั้นตอนต่อไปนี้ denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และ cooling อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(2) การตรวจการติดเชื้อแฝงของโรค HPV โดยนำ DNA ปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาผสมกับ PCR master mix (PCR buffer, 10 mM dNTPs, 10 μ M HPV441 IC-F primer, 10 μ M HPV441 IC-R primer, 0.625 U Taq polymerase) ปริมาตร 22 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler โดยทำปฏิกิริยาตามโปรแกรมที่กำหนด ขั้นตอน pre-heating อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยา Polymerase chain reaction 40 รอบ ตามขั้นตอนต่อไปนี้คือ denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ขั้นตอน post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาทีและ cooling อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4.3 การแยก PCR product ใน agarose gel และการย้อมสี

เตรียม 1.5% agarose gel โดยชั่งผง agarose 0.75 กรัม มาละลายใน TBE electrophoresis buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลอมให้ละลายโดยใช้เตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเทในแท่นหล่อเจล รอให้เจลแข็งใช้เวลาประมาณ 30 นาที

เตรียมตัวอย่างที่จะนำมาหยอดใส่ในเจล โดยผสม loading dye ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร กับ PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เมื่อเจลแข็งดีแล้วนำแผ่นเจลมาวางในชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส

เติม TBE electrophoresis buffer ปริมาตร 220 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเปิดตัวอย่างที่เตรียมไว้ มาใส่ใน หลุมตัวอย่าง ให้กระแสไฟฟ้า 130 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที และนำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (1 µg/ml) เป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำ เป็นเวลา 30 นาที และดูผลภายใต้รังสี ultraviolet ด้วยเครื่อง Gel documentation

4.5 การแยกโปรตีนด้วย Two-Dimension Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D SDS-PAGE)

4.5.1 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดาคำ

นำเนื้อเยื่อผิวหนังใต้ carapace ของกิ้งกูดาคำที่เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส มาสกัด โปรตีนโดยบดใน 2D lysis buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว แล้ว นำมาวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสมาหา ความเข้มข้นของโปรตีน

4.5.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธีการของ Bradford

เปิด deionized water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้วมา 10 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุม ของ microtiter plate หลังจากนั้นใส่โปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin) 1.5 ng ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลุมที่หนึ่งของแถวที่หนึ่งแล้วทำการเจือจางให้ได้ 0.75 0.35 0.1875 0.0937 0.04687 0.0234 และ 0.0117 ng ตามลำดับ และทำเหมือนกันอีกครั้งในแถวที่ 2 ต่อมาเปิดโปรตีนตัวอย่างมา ใส่ในหลุมของ microtiter plate แล้วทำการเจือจางไปจนถึงหลุมสุดท้ายทำตามขั้นตอนนี้ไปจนครบ ทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นเปิด dye ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ทุกหลุมหลังจากนั้นนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ 1.5 mg/ml

4.5.3 การ Clean-up โปรตีนตัวอย่างด้วย 2D Clean-up Kit

นำโปรตีนตัวอย่างมา 70 ไมโครกรัม ใส่ precipitant ปริมาตร 300 ไมโครลิตร วางใน น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใส่ co- precipitant ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าหลังจากนั้นนำมา หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเปิดส่วนใสทิ้งจากนั้นใส่ co- precipitant ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้ววางในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเปิดส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นใส่ deionized water ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่า ให้ตะกอนแตกเป็นชิ้นเล็กแล้วใส่ chilled wash buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วใส่ wash additive ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวางที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

โดยนำออกมาแช่เป็นเวลา 20-30 วินาที ในทุกๆ 10 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเปิดส่วนใสทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นใส่ rehydration buffer ปริมาตร 120 ไมโครลิตร

4.5.4 การแยกโปรตีนในมิติที่ 1 (First dimension electrophoresis)

เป็นการแยกโปรตีนตามความแตกต่างของ pH ด้วยเครื่อง Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences) โดยมีขั้นตอนคือ นำ Immobiline DryStrip gel (Amersham Biosciences) ยาว 13 เซนติเมตร มา rehydrate ใน rehydration buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำ Immobiline DryStrip gel ที่ผ่านการ rehydration แล้วมาวางบน focusing tray (manifold) แล้วเท drystrip cover fluid ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ให้ทั่ว manifold จากนั้นหยอดโปรตีนตัวอย่าง 120 ไมโครลิตร ในหลุมตัวอย่างประกอบขั้วไฟฟ้าให้กับ Immobiline DryStrip gel แล้วให้กระแสไฟฟ้า 18.8 kVh

4.5.5 การปรับสภาพของ Immobiline DryStrip gel

การปรับสภาพของ Immobiline DryStrip gel ด้วยสารละลาย equilibration I (equilibration buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมด้วย dithiothreitol 0.1 กรัม) และแช่เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำ Immobiline DryStrip gel ไปปรับสภาพต่อในสารละลาย equilibration buffer II (equilibration buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมด้วย iodoacetamide 0.25 กรัม) แช่เป็นเวลา 15 นาที

4.5.6 การแยกโปรตีนในมิติที่ 2 (Second dimension electrophoresis)

เป็นการแยกโปรตีนตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล ในแนวตั้งด้วยเครื่องแยกโปรตีนตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลขนาด 16x18 cm (SE 600 Ruby) เตรียม SDS Polyacrylamide gel (12.5%) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปล่อยให้เจล polymerized เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เท SDS electrophoresis buffer ที่ปิดหน้าเจลออกและนำ Immobiline DryStrip gel ที่ผ่านการทำ Equilibration มาแล้วมาวางบนผิวหน้าเจล นำกระดาษกรองที่หยด Rainbow marker ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร มาวางที่ปลายของ Immobiline DryStrip gel ใส่ 0.5% agarose ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดทับที่ผิวหน้าเจล ประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วเติม SDS electrophoresis buffer ปริมาตร 2.5 ลิตร ทั้งใน upper และ lower chambers จากนั้นให้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมป์ต่อเจล เป็นเวลา 15 นาที และ 20 มิลลิแอมป์ต่อเจล เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 30 นาที

4.5.7 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (Silver staining)

นำแผ่นเจลที่ผ่านการแยกในมิติที่ 2 แล้วมาแช่ในสารละลาย fixative ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบาๆ ตลอดเวลา นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย sensitizer ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบาๆ ตลอดเวลา ล้างแผ่นเจลด้วย deionized water 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย silver nitrate ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบาๆ ตลอดเวลา ล้างแผ่นเจลด้วย deionized water 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย developer ที่มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร จนมีจุดโปรตีนขึ้นโดยเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา จึงนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย stopper ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที เขย่าเบาๆ ตลอดเวลา และล้างแผ่นเจลด้วย deionized water 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

4.5.8 การย้อมเจลด้วย 0.1% Coomassie blue R-250

นำแผ่นเจลที่ผ่านการแยกในมิติที่ 2 มาย้อมด้วย 0.1% Coomassie blue R-250 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างสีออกด้วยสารละลาย De-staining 3 ครั้งๆ ละ 20 นาที

4.6 การวัดปริมาณการแสดงออกของจุดโปรตีน

วัดปริมาณการแสดงออกของโปรตีนด้วย ImageMaster 2D Platinum software (Amersham Biosciences) โดยนำแผ่นเจลที่ทำการทดลองทั้งหมดจำนวน 30 แผ่น มาสแกนด้วยเครื่องสแกนเจล (ImageScanner™) เลือกภาพเจลจำนวน 1 ภาพ เป็นภาพเจลอ้างอิง หลังจากนั้นนำภาพเจลแต่ละภาพมาซ้อนทับกับภาพเจลอ้างอิง ตรวจสอบดูว่าจุดโปรตีนแต่ละภาพเจลจับคู่กับภาพเจลอ้างอิงถูกต้องหรือไม่ ถ้าไม่ถูกต้องจะต้องทำการแก้ไขให้ถูกต้องแล้วอ่านค่าความเข้มของจุดโปรตีนที่สนใจในแต่ละภาพเจล

4.7 การวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของจุดโปรตีนด้วยสถิติ

การวิเคราะห์ค่าการแสดงออกของจุดโปรตีนด้วยสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 13 โดยออกแบบตาราง แล้วป้อนข้อมูลที่ได้จากการวัดปริมาณความเข้มของจุดโปรตีนด้วย ImageMaster 2D Platinum software โดยจัดกลุ่มตัวอย่างเป็น 8 กลุ่ม คือ กลุ่ม D0 D1 D2 D3 D4 A B1 และ B2 ในแต่ละกลุ่มมีจำนวนตัวอย่าง 3-4 ตัวอย่าง ตัวอย่างการป้อนข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS แสดงในตารางที่ 2 โดย ID หมายถึง หมายเลขของจุดโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ImageMaster 2D Platinum software STAGE 1-8 หมายถึง ระยะเวลาการลอกคราบ D0 D1 D2 D3 D4 A B1 และ B2 ตามลำดับ และ VALUE หมายถึง ค่าความเข้มของจุดโปรตีนของ ID นั้นๆ จากแผ่นเจลทั้งหมด 30 แผ่น หลังจากนั้นใช้สถิติ Nonparametric ในการทดสอบโดยใช้การทดสอบแบบ Kruskal-Wallis เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเข้มของจุดโปรตีนแต่ละจุดในระยะเวลาการลอกคราบต่างๆ กับระยะอื่นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่โดยกำหนดให้ $\alpha < 0.05$

และใช้การทดสอบแบบ Wilcoxon Mann Whitney ในกรณีจุดโปรตีนใดๆ ที่เมื่อทดสอบด้วย Kruskal-Wallis แล้วมีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha < 0.05$ เพื่อเปรียบเทียบว่า สถิติโดยกำหนดให้ $\alpha < 0.05$

4.8 การเตรียมโปรตีนเพื่อการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน

แยกโปรตีนด้วยวิธี Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis แล้วนำแผ่นเจลมาเชื่อมด้วยสารละลาย 0.1% Coomassies blue R-250 แล้วตัดแผ่นเจลตรงตำแหน่งที่มีจุดโปรตีนที่สนใจใส่ใน eppendorf และนำมาล้างสีออกด้วยสารละลาย de-staining จนสีที่เชื่อมจุดโปรตีนออกหมดจากนั้นล้างด้วย deionize water หลังจากนั้นนำไปทำ in gel digestion โดยตัดเจลเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยใบมีดปลายแหลมโดยตัดใน eppendorf แล้วเติมสารละลายผสมระหว่าง 0.1 M ammonium bicarbonate 10 mM DTT และ 1 mM EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปแช่อยู่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ดูดสารละลายทิ้งแล้วเติมสารละลายผสมระหว่าง 100 mM IAA และ 0.1 M NH_4HCO_3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แช่ที่อุณหภูมิห้อง ในความมืดเป็นเวลา 30 นาที ล้างเจลด้วยสารละลายผสมระหว่าง 0.05 M Tris-HCl pH 8.5 และ 50% acetonitrile 3 ครั้งๆ ละ 50 ไมโครลิตร ต่อจากนั้นทำเจลให้แห้งด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศ เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย digestion buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก็บไว้ใน eppendorf ใหม่ เติม 2% trifluoroacetic acid (TFA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในเจลจากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดสารละลายมารวมกับสารละลายที่เก็บไว้ก่อนหน้านี้ หลังจากนั้นเติม 0.05M Tris-HCl pH 8.5/1mM CaCl_2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในเจลแล้วนำไปแช่ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเขย่าสาร โดยใช้เสียงความถี่สูงเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย acetonitrile ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในเจลแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเขย่าสาร โดยใช้เสียงความถี่สูง เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายมารวมกับสารละลายที่เก็บไว้ หลังจากนั้นเติม สารละลาย 5% formic acid ในสารละลาย acetonitrile ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเขย่าสาร โดยใช้เสียงความถี่สูงเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายมารวมกับสารละลายที่เก็บไว้ ต่อจากนั้นนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปทำให้แห้งด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศแล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปหาชนิดของโปรตีนด้วยเครื่องวิเคราะห์มวลโปรตีน Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) หรือเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4.9 การหาชนิดของโปรตีน

นำตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการทำ in gel digestion แล้วมาละลายด้วย formic acid ปริมาตร 6 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำขึ้นเพปไทด์ไปวิเคราะห์มวลด้วย LC-MS/MS และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของขึ้นเพปไทด์แต่ละชิ้นโดยใช้โปรแกรม MassLynx™ เวอร์ชัน 4.0 แล้วนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปสืบค้นเพื่อระบุชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล NCBI nr โปรตีนผ่านทางโปรแกรม Mascot

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการป้อนข้อมูลของค่าที่อ่านได้จากความเข้มของจุดโปรตีน 1 จุดในโปรแกรม SPSS version 13

Table 2. An example of data analysis for a protein spot with SPSS program version 13.

ID	STAGE	VALUE
5262	1	.00000
5262	1	.00350
5262	1	.00000
5262	1	.00272
5262	2	.00000
5262	2	.00094
5262	2	.00230
5262	3	.00064
5262	3	.00000
5262	3	.00235
5262	3	.00000
5262	4	.00000
5262	4	.00000
5262	4	.00000
5262	4	.00000
5262	4	.00000
5262	5	.00040
5262	5	.00000
5262	5	.00000
5262	5	.00000
5262	6	.00052
5262	6	.00000
5262	6	.00000
5262	6	.00085
5262	7	.00000
5262	7	.00065
5262	7	.00308
5262	7	.00000
5262	8	.00000
5262	8	.00000
5262	8	.00000

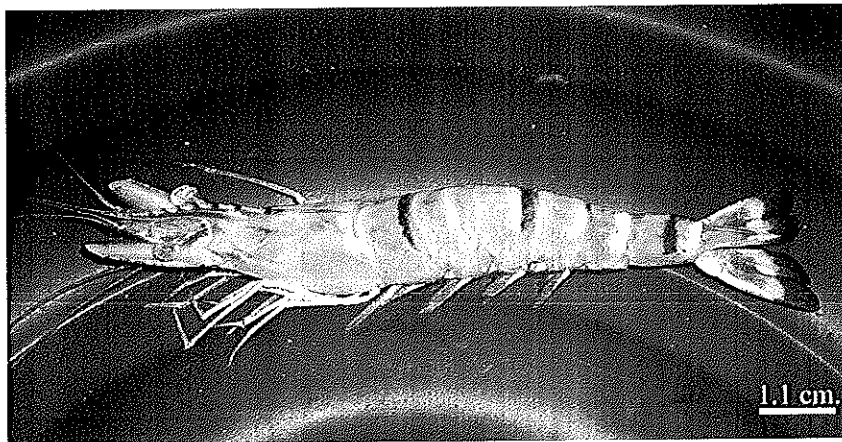
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเลี้ยงกุ้ง

กุ้งกุลาค่าทุกตัวที่นำมาเลี้ยงในห้องทดลองมาจากฟาร์มเดียวกันทั้งหมด มีอายุเฉลี่ย 90 วัน กุ้งอายุ 90 วันมีวงจรการลอกคราบที่ไม่แน่นอนเกินไปคือ 10-12 วันทำให้กุ้งเหมาะสำหรับการเลี้ยงกุ้งให้ได้ตามระยะที่ต้องการมีความแข็งแรง เพราะเป็นกุ้งเต็มวัยในช่วงเดือนสุดท้ายก่อนการจับขาย น้ำหนักเฉลี่ย 10-20 กรัม น้ำทะเลที่นำมาเลี้ยงกุ้งเป็นน้ำทะเลจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งมีแร่ธาตุที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตของกุ้ง ความเค็มของน้ำทะเลอยู่ระหว่าง 10-30 ส่วนในพันส่วน ซึ่งจะทำให้แรงดันน้ำภายในและนอกร่างกายอยู่ในสภาวะสมดุลเหมาะต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง (เบญจมินทร์ ทองเปิง, 2544) แสงที่ให้เป็นแสงแดดธรรมชาติเพื่อจำลองสภาพให้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงกุ้งในฟาร์มมากที่สุด แสงแดดจะช่วยให้แพลงก์ตอนพืชที่อยู่ในน้ำสังเคราะห์แสง ทำให้เพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำและลดปัจจัยที่ทำให้น้ำเน่าเสีย ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอมโมเนียและมีเทน ทำให้กุ้งกินอาหารได้มากขึ้นและมีสุขภาพแข็งแรง แต่ถ้าแพลงก์ตอนพืชมีปริมาณมากเกินไปจะก่อให้เกิดผลเสียต่อกุ้งได้ กล่าวคือจะมีผลทำให้น้ำขุ่นเนื่องจากความโปร่งแสงของน้ำลดลง (วิภูษิต มั่นตะจิตร และคณะ, 2534) แสงแดดยังเป็นปัจจัยร่วมในการจัดการอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง โดยระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาค่าอยู่ระหว่าง 26-30 องศาเซลเซียส หากต่ำหรือสูงกว่านี้อาจทำให้อาหารน้อยลงหรือไม่กิน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอัตราเมตาบอลิซึมภายในร่างกายกุ้ง อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้เมตาบอลิซึมในการดำรงชีวิตสูงขึ้น ซึ่งเมตาบอลิซึมที่สำคัญได้แก่ การหายใจ การเคลื่อนที่ เช่น การเดิน การว่ายน้ำ การกิน และการย่อยอาหาร เป็นต้น (เบญจมินทร์ ทองเปิง, 2544) ระหว่างการเลี้ยงกุ้งจะมีการกำจัดของเสียและตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียทุกวัน แอมโมเนียเกิดมาจากอาหารที่เหลือจากการกินรวมทั้งของเสียจากการขับถ่ายของกุ้ง โดยปกติกุ้งจะขับแอมโมเนียออกจากร่างกายผ่านทางเลือดและปล่อยออกที่เหงือกในระหว่างที่กุ้งหายใจ ปริมาณแอมโมเนียในน้ำจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของของกุ้ง (พรรณีภา หาญวิวัฒน์กิจ, 2531) น้ำที่มีปริมาณแอมโมเนียต่ำจะทำให้กุ้งขับแอมโมเนียได้ดีทำให้กุ้งเจริญเติบโตดี ถ้าน้ำมีปริมาณแอมโมเนียสูงจะทำให้แอมโมเนียในน้ำแพร่เข้าไปในเลือดของกุ้งได้ เลือดที่มีปริมาณแอมโมเนียสูงจะมีพีเอชสูงขึ้นทำให้เกิดเป็นพิษและส่งผลให้เอนไซม์ในเลือดของกุ้งทำงานผิดปกติ ปริมาณแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งจึงควรมีค่าน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียที่อยู่ในช่วง 0.1-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้อาหารที่กุ้งกินเข้าไปมีปริมาณแอมโมเนียที่มากกว่า 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลให้กุ้งเครียดจนอาจทำให้อาหารที่กุ้งกินเข้าไป

นำมาเลี้ยงมีลักษณะที่ปกติคือมีสีเทาดำและมีลายสีเหลืองพาดขวางลำตัว ไม่มีจุดดำใดๆ ปรากฏให้เห็นดังภาพที่ 8 กุ้งกุลาดำที่มีอายุ 90 วัน เมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะมีวงจรการลอกคราบเฉลี่ย 10-12 วัน (Promwikorn *et al.*, 2007) ซึ่งจะแตกต่างกับวงจรการลอกคราบของสัตว์ในตระกูลครัสเตเชียชนิดอื่น เช่น ปู กุ้ง และกุ้งชนิดอื่นๆ โดยวงจรการลอกคราบของกุ้งแชบ๊วยที่มีขนาดน้ำหนัก 20-60 กรัม ความยาวลำตัว 12-16 เซนติเมตร ใช้เวลา 18.67 วัน (พุทธ ส่องแสงจินดา และสุเมธ ชัยวัชรากุล, 2531) ปูทะเลที่มีอายุระหว่าง 34-38 วัน ขนาดความกว้างของกระดอง 4.8-7.5 เซนติเมตร จะมีการลอกคราบทุก 4 วัน (ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม, 2539)



ภาพที่ 8 กุ้งกุลาดำอายุ 90 วันที่ยังอยู่ในบ่อเพาะที่ถ่ายด้วยกล้องดิจิทัลยี่ห้อ CASIO รุ่น EX-Z50 (แถบ = 1.1 เซนติเมตร)

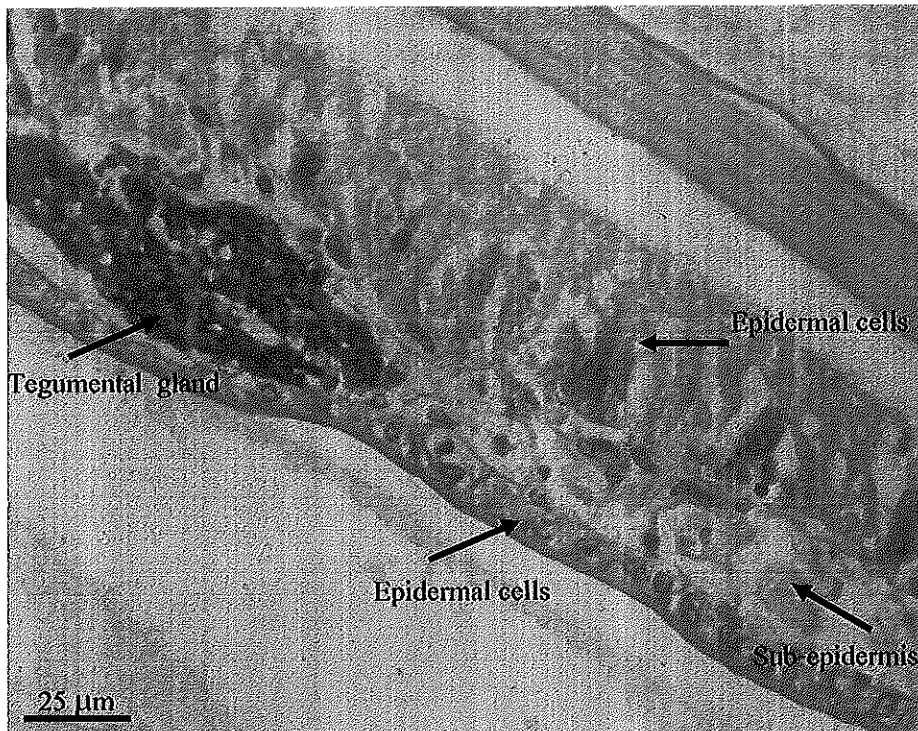
Figure 8. The 90 days old black tiger shrimp cultured in the aquarium was photographed with a digital camera, EX-Z50. (Bar = 1.1)

2. ลักษณะของเนื้อเยื่อผิวหนังที่ใช้ในการทดลอง

เนื้อเยื่อผิวหนังที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังที่อยู่ได้เปลือกบริเวณ carapace เนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณนี้ประกอบด้วย เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังซึ่งเป็นรูปสี่เหลี่ยมทรงสูงเรียงตัวชั้นเดียว เซลล์เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง และต่อม Tegumental (ภาพที่ 9)

3. การเตรียมตัวอย่างและตรวจการติดเชื้อแฝงภายในกุ้ง

ในการทดลองจะเลือกกุ้งที่มีการตรวจสอบระยะการลอกคราบที่ถูกต้อง และกุ้งที่นำมาใช้มีทั้งหมด 30 ตัว แบ่งตามระยะการลอกคราบ ระยะ D0 D1 D2 D3 D4 A B1 และ B2 ระยะละ 3-4



ภาพที่ 9 เนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งกุลาดำที่นำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ประกอบด้วยเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว เซลล์ใต้ชั้นเยื่อบุผิว และต่อม tegumental ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี PAS (แถบ = 25 μm)

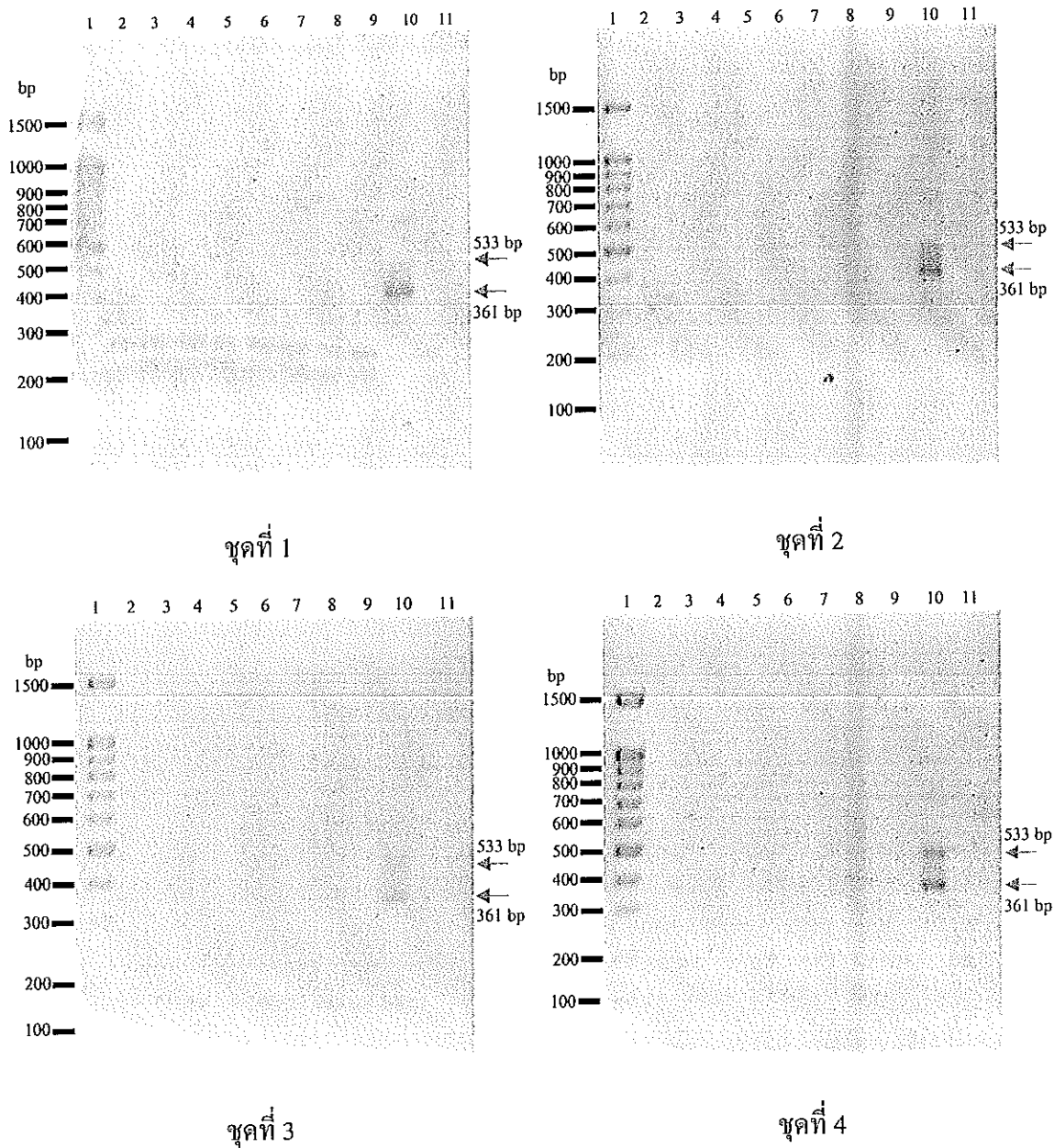
Figure 9. Epidermal tissue of black tiger shrimp used in protein expression study, is composed of epidermal cell, sub-epidermis and tegumental gland. The tissue was stained with PAS. (Bar = 25 μm)

ตัวกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะได้รับการแยกระยะเบื้องต้นตามลักษณะทางกายภาพทุกวัน และยืนยันความถูกต้องของระยะการลอกคราบด้วยวิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยาอีกครั้งหนึ่งตามที่ได้อธิบายไว้ โดย Promwikorn และคณะ (2007) กุ้งที่มีระยะการลอกคราบที่ถูกต้องจะถูกนำมาตรวจการติดเชื้อแฝงเป็นลำดับต่อไป กุ้งที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นแม้ว่าจะมีลักษณะภายนอกที่ดูปกติและแข็งแรง แต่อาจมีการติดเชื้อโรคแฝงที่เป็นสาเหตุให้โตช้าได้ เชื้อโรคแฝงที่ติดมากับกุ้งแล้วทำให้กุ้งโตช้า เช่น Monodon baculovirus (MBV) และ Hepatopancreatic parvovirus (HPV) อาจจะมีผลทำให้ลักษณะการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบเปลี่ยนแปลงไปจากกุ้งปกติได้ เพื่อเป็นการไม่ทำให้ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งในงานวิจัยนี้ ได้รับผลกระทบต่อการติดเชื้อแฝง จึงต้องทำการตรวจสอบให้มั่นใจว่ากุ้งที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นเป็นกุ้งปกติที่ปลอดโรค โดยในการทดลองนี้ได้ทำการตรวจเชื้อแฝง 2 ชนิดคือ MBV และ HPV การตรวจ

การติดเชื้อแฝงใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่เพิ่มขยายปริมาณ DNA ของเชื้อ MBV และ HPV ในหลอดทดลองให้มีปริมาณมากขึ้นหลายเท่าและสามารถตรวจพบได้หากมีเชื้อโรคดังกล่าวอยู่

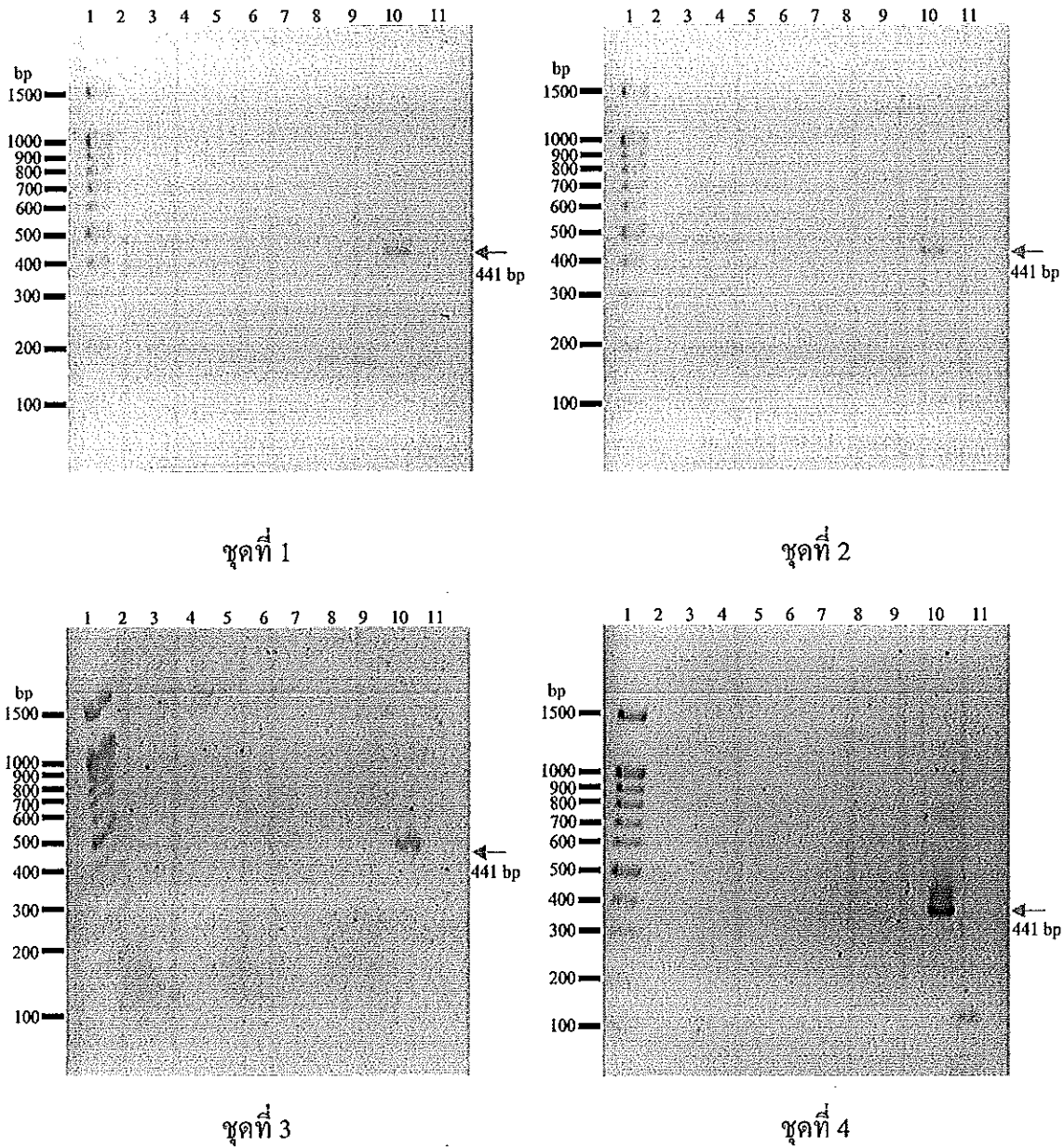
ผลการตรวจสอบการติดเชื้อแฝงในกุ้งจำนวน 4 ชุด ซึ่งในแต่ละชุดประกอบด้วย 8 ระยะเวลาการลอกคราบ ได้แก่ ระยะเวลา D0 D1 D2 D3 D4 A B1 และ B2 พบว่า ไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ของเชื้อ MBV (ภาพที่ 10) และ HPV (ภาพที่ 11) ในตัวอย่างกุ้ง (คอลัมน์ 2-9) โดยทุกการทดลองมี positive control ในคอลัมน์ที่ 10 และ negative control ในคอลัมน์ที่ 11 เชื้อ MBV มี PCR product ขนาด 533 และ 361 คู่เบส และ HPV มี PCR product ขนาด 441 คู่เบส โดยเปรียบเทียบกับ DNA ladder ในคอลัมน์ที่ 1 จึงเป็นการยืนยันว่ากุ้งทุกตัวที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นกุ้งที่ปราศจากเชื้อแฝง MBV และ HPV

โรคที่เกิดในกุ้งมีหลายชนิดและมีอาการที่แตกต่างกันโรคเหล่านั้นได้แก่ โรค Taura Syndrome Virus (TSV) White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHN) Laem Singh Virus (LSNV) Monodon baculovirus (MBV) และ Hepatopancreatic parvovirus (HPV) จากการสอบถามประวัติของกุ้งที่นำมาเลี้ยงในห้องทดลองพบว่ากุ้งไม่มีอาการของโรคต่างๆ เหล่านี้ และในการที่จะตรวจโรคทั้งหมดเหล่านี้จะต้องใช้งบประมาณที่สูงมากซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการตรวจเฉพาะการติดเชื้อแฝงของโรค MBV และ HPV เนื่องจากสองโรคนี้ไม่ได้ทำให้กุ้งตายแต่ทำให้กุ้งโตช้าและแคระแกรน (Flegel, 2006) ซึ่งแตกต่างจากโรคอื่น ๆ ที่จะมีการปรากฏอาการให้เห็นจากภายนอกอย่างเด่นชัด เช่น โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) จะปรากฏจุดสีขาวขนาด 1-2 มิลลิเมตร บริเวณเปลือกโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณส่วนหัว (carapace) และอาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น ลำตัวเป็นสีแดง ว่ายน้ำลอยเข้าหาฝั่งและทยอยตายไปเรื่อยๆ อาจตายหมดบ่อได้ภายใน 7-10 วัน โรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus, YHV) อาการที่เห็นเด่นชัดคือ บริเวณหัวจะบวมมีสีเหลืองชัดเจนและจะมีการตายอย่างรวดเร็วและตายหมดบ่อภายใน 3-5 วัน (นิตยสารสัตว์น้ำ, 2546) โรค MBV ในกุ้งกุลาดำจะไม่ปรากฏอาการที่ชัดเจนว่ากุ้งติดเชื้อไวรัส แต่ในลูกกุ้งระยะโพสลาวาอาจจะสังเกตได้โดยการนำลูกกุ้งมาส่องด้วยแสงไฟที่บริเวณตับซึ่งจะเห็นเป็นก้อนกลมเล็กๆ (Flegel, 2006) ไวรัส MBV เป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) อยู่ในกลุ่ม occluded baculovirus แม้ว่าโรคติดเชื้อ MBV จะเป็นโรคที่ไม่รุนแรงกับกุ้งกุลาดำแต่จะมีผลต่อการเลี้ยงทำให้กุ้งโตช้า (Flegel *et al.*, 2004) โรคติดเชื้อ HPV ในกุ้งกุลาดำจะสังเกตได้ยากเช่นเดียวกับโรคติดเชื้อ MBV ซึ่งโรคนี้จะไม่มีอาการเด่นชัด ไวรัสชนิดนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ตับและตับอ่อน ไวรัส HPV เป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22-23 นาโนเมตร จัดอยู่ในกลุ่ม *Parvoviridae* มีรูปร่างหลายแบบ ไม่มีผนังหุ้ม (Flegel, 2006) การติดเชื้อ HPV จะไม่ค่อยทำให้กุ้งตายแต่มีความสัมพันธ์กับการโตช้ามากกว่า (Flegel *et al.*,



ภาพที่ 10 แถบ PCR product ของเชื้อ Monodon baculovirus (MBV) จากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) จากข่าว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำจำนวน 4 ชุด คอลัมน์ที่ 1 DNA ladder คอลัมน์ที่ 2-9 ตัวอย่างกุ้งในระหว่างการลอกคราบ D0 D1 D2 D3 D4 A B1 และ B2 ตามลำดับ คอลัมน์ที่ 10 positive control และคอลัมน์ที่ 11 negative control

Figure 10. PCR products of Monodon baculovirus (MBV) from shrimp's leg. Lane 1: molecular weight marker. Lane 2-9: samples of D0, D1, D2, D3, D4, A, B1 and B2 stage, respectively. Lane 10: positive control and lane 11 negative control.



ภาพที่ 11 แถบ PCR product ของเชื้อ Hepatopancreatic parvovirus (HPV) จากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) จากขาว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำจำนวน 4 ชุด คอลัมน์ที่ 1 DNA ladder คอลัมน์ที่ 2-9 ตัวอย่างกุ้งในระยะเวลาการลอกคราบ D0 D1 D2 D3 D4 A B1 และ B2 ตามลำดับ คอลัมน์ที่ 10 positive control และคอลัมน์ที่ 11 negative control

Figure 11. PCR products of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from shrimp's leg. Lane 1: molecular weight marker. Lane 2-9: samples of D0, D1, D2, D3, D4, A, B1 and B2 stage, respectively. Lane 10: positive control and lane 11 negative control.

1999) สองโรคดังกล่าวอาจมีผลทำให้วงจรการลอกคราบของกิ้งกูดาคำผิดปกติและรบกวนการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังผิวหนังได้

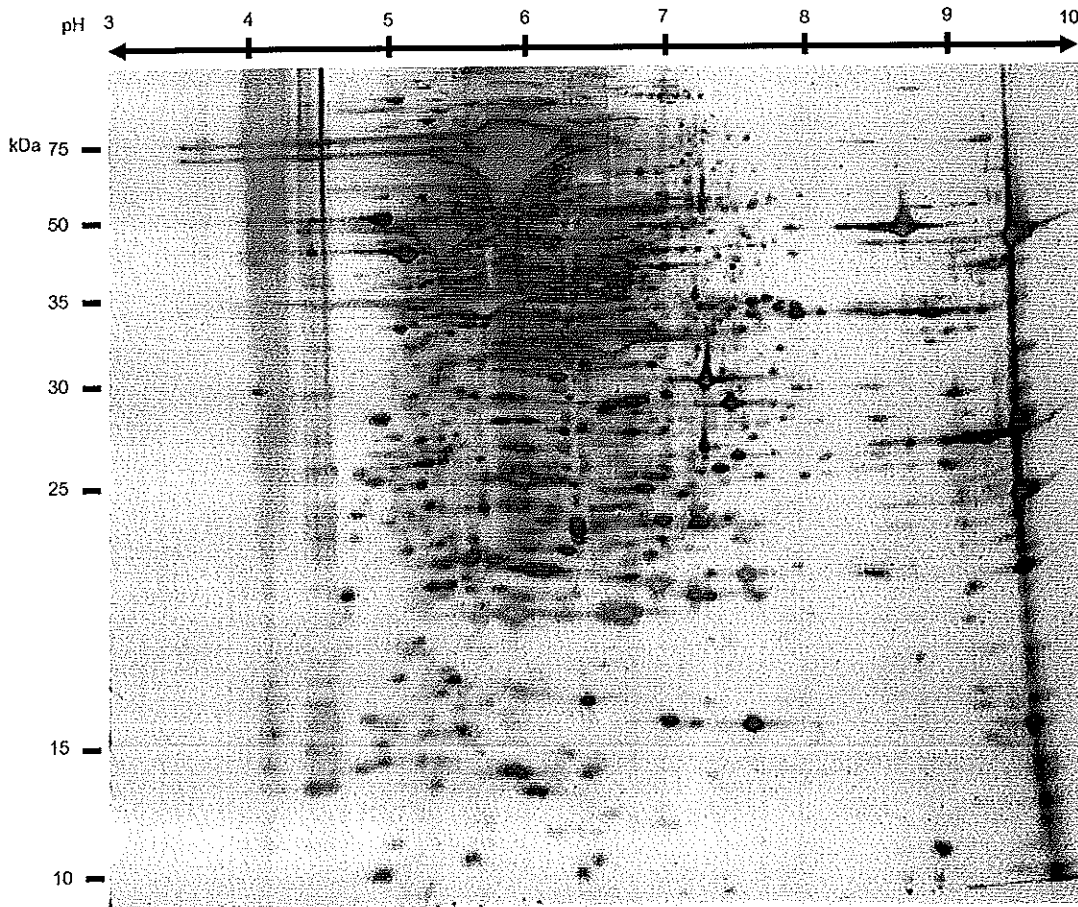
4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ 2D SDS-PAGE

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกโปรตีนแบบสองมิติ การทดลองนี้ทำเพื่อหาปริมาณโปรตีนและกำลังไฟฟ้าที่ใช้แยกโปรตีนในมิติที่หนึ่งที่เหมาะสม เพื่อให้โปรตีนแต่ละชนิดหยุดการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าตรงกับจุด Isoelectric point (pI) ของตนเองมากที่สุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการแปลและวิเคราะห์ผล

การทดลองที่ 1 เริ่มโดยการหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมโดยเริ่มต้นใช้ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่ง 17.5 กิโลโวลต์ต่อชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง 41 นาที และนำโปรตีนไปแยกต่อในมิติที่สองตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล เมื่อนำเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตพบว่า จุดโปรตีนส่วนใหญ่เกาะกลุ่มอยู่ในช่วง pH 5-8 น้ำหนักโมเลกุล 15-75 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 12) โดยลักษณะของจุดโปรตีนในบริเวณ pH 6-7 น้ำหนักโมเลกุล 15-50 กิโลดาลตัน ส่วนใหญ่เป็นแถบขาวในแนวนอน จุดโปรตีนในบริเวณ pH 7-9 น้ำหนักโมเลกุล 15-50 กิโลดาลตัน มีลักษณะเป็นจุดที่ค่อนข้างกลมแต่มีบางบริเวณที่เป็นแถบในแนวตั้ง โดยภาพรวมแล้วการแยกโปรตีนในมิติที่หนึ่งยังไม่ได้ผลดี การปรากฏแถบขาวในแนวนอนซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณโปรตีนมากเกินไป ทำให้การแยกโปรตีนในมิติที่หนึ่งยังไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงทดลองปรับลดปริมาณโปรตีนลงโดยใช้กำลังไฟฟ้าเท่าเดิมในการทดลองถัดไป

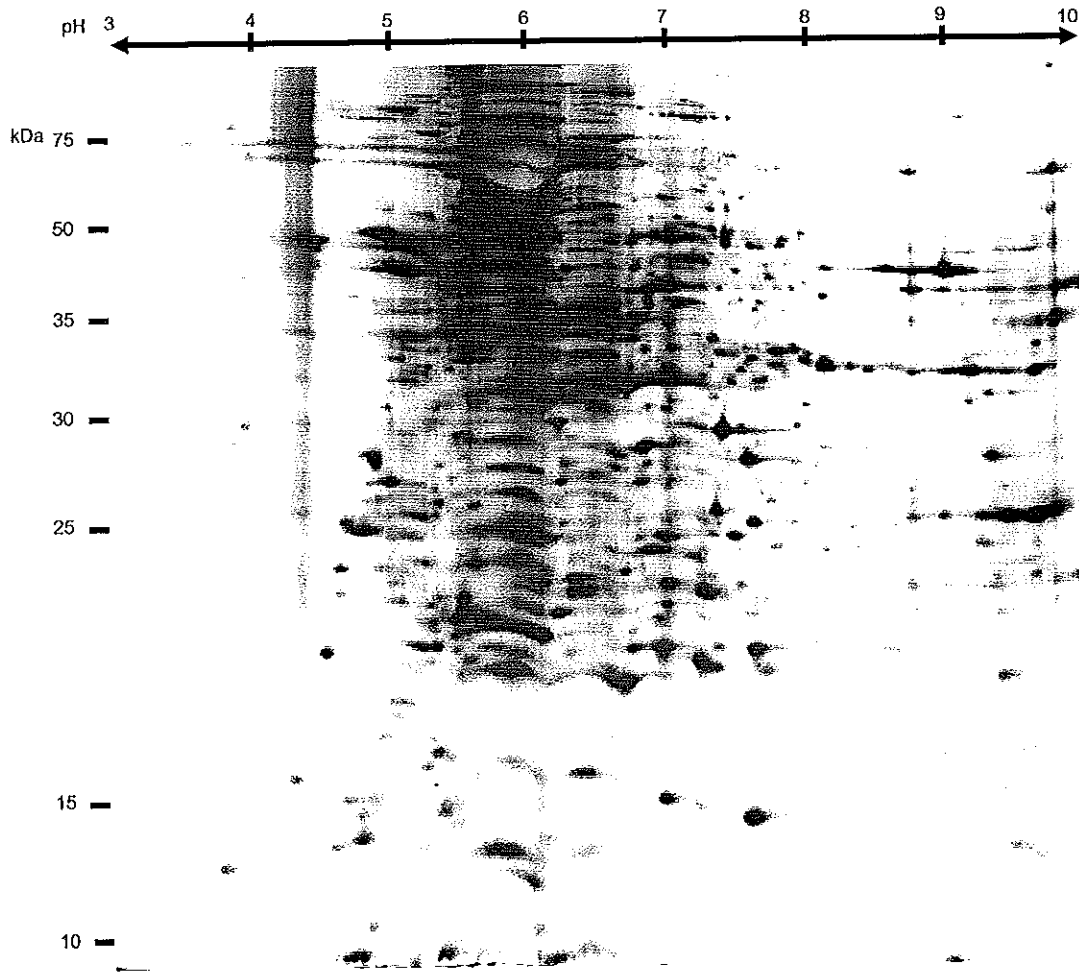
การทดลองที่ 2 ปรับลดปริมาณโปรตีนเป็น 70 ไมโครกรัม ใช้กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่งเท่าเดิมคือ 17.5 กิโลโวลต์ต่อชั่วโมง เป็นเวลา 13 ชั่วโมง 8 นาที เมื่อนำโปรตีนไปแยกในมิติที่สองด้วยเครื่องแยกโปรตีนตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล และย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตพบว่า ลักษณะจุดโปรตีนยังคงคล้ายกับการทดลองแรก กล่าวคือจุดโปรตีนในช่วง pH 5-7 ยังคงแยกได้ไม่ดี ปรากฏโปรตีนเป็นแถบในแนวนอนและมีลักษณะคล้ายคลื่น (ภาพที่ 13) การที่จุดโปรตีนไม่กลมและมีลักษณะเป็นแถบขาวในแนวนอนแสดงว่าปัญหาน่าจะยังอยู่ที่การแยกโปรตีนในมิติที่หนึ่งแม้ว่าปรับลดปริมาณโปรตีนลงไปแล้ว ดังนั้นจึงอาจไปได้ว่ากำลังไฟฟ้าที่ให้ในมิติที่หนึ่งนั้นน้อยเกินไป จึงทดลองปรับเพิ่มกำลังไฟฟ้าในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3 ใช้ปริมาณโปรตีน 70 ไมโครกรัม และกำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่งเท่ากับ 18.8 กิโลโวลต์ต่อชั่วโมง และนำโปรตีนไปแยกในมิติที่สองด้วยเครื่องแยกโปรตีนตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตพบว่า จุดโปรตีนแยกออกจาก



ภาพที่ 12 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดาคำในระยะ D0 ซ้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตใช้โปรตีนปริมาณ 100 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่งเท่ากับ 17.5 กิโลวัตต์ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง 41 นาที

Figure 12. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage D0. The gel was stained with silver nitrate. 100 μ g of epidermal protein was electrofocussed with 17.5 kWh electric power in the first dimension. Time of first dimension is 12:41 hr.



ภาพที่ 13 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะ D0 ที่ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตใช้โปรตีนปริมาณ 70 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่งเท่ากับ 17.5 กิโลวัตต์ชั่วโมง เป็นเวลา 14 ชั่วโมง 2 นาที

Figure 13. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage D0. The gel was stained with silver nitrate. 70 μ g of epidermal protein was electrofocussed with 17.5 kWh electric power in the first dimension. Time of first dimension is 14:02 hr.

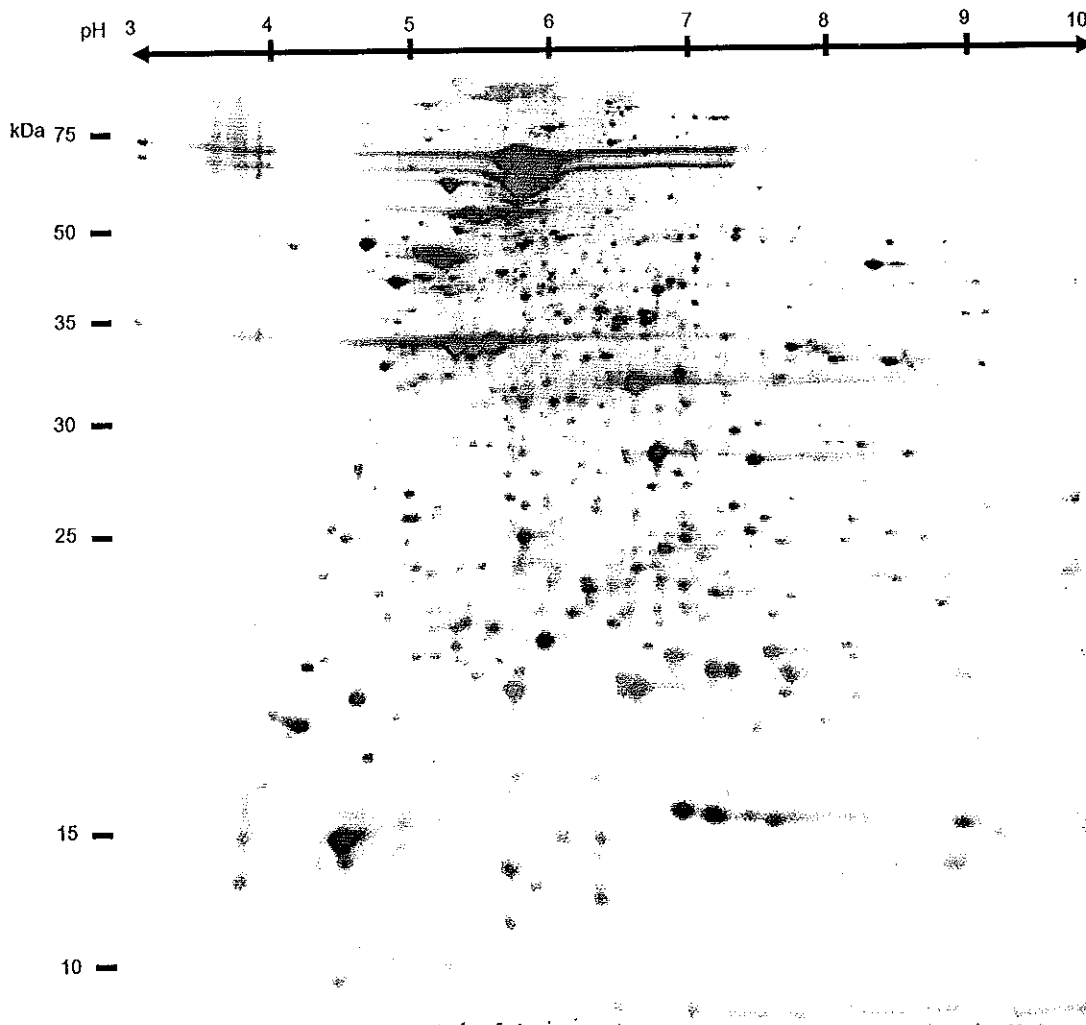
กันได้ดี เป็นจุดโปรตีนที่กลม มีการกระจายตัวดี ไม่เกาะกันเป็นกลุ่ม โดยโปรตีนที่แยกได้จะอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10-75 กิโลดาลตัน pH 3-10 และในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 15-50 กิโลดาลตัน pH 4-8 ปรากฏจุดโปรตีนเป็นจำนวนมาก โดยจุดโปรตีนจะมีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ มีทั้งที่อยู่ติดกันและแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ส่วนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10-15 กิโลดาลตัน pH 8-10 ถึงแม้จะมีจุดโปรตีนปรากฏอยู่ไม่มากนัก แต่ก็แยกออกจากกันได้ดี (ภาพที่ 14) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ปริมาณโปรตีน 70 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่ง เท่ากับ 18.8 กิโลวัตต์ต่อชั่วโมงเป็นเวลา 10 ชั่วโมง 5 นาที การแยกโปรตีนโดยวิธี 2D SDS-PAGE ใช้หลักการแยกโปรตีนตามประจุและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยขั้นตอนการแยกตามประจุของโปรตีนจะใช้เทคนิค Isoelectric focusing (IEF) แยกตัวอย่างโปรตีนบน Immobiline Drystrip gel ให้ไปหยุดการเคลื่อนที่บนแถบเจลตรงกับประจุของตนเองซึ่งเรียกว่าจุด Isoelectric point (pI) เมื่อมีการจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้าไปยังแถบเจลโปรตีนจะเกิดการเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่ทำให้โปรตีนมีประจุเป็นศูนย์ ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยโปรตีนที่มีประจุเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทด (cathode) ทำให้ประจุบวกของโปรตีนลดลงและเมื่อเคลื่อนที่ไปจนถึงจุด pI ก็จะมีประจุเป็นศูนย์ ในทำนองเดียวกัน โปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแอโนด (anode) ทำให้โปรตีนมีประจุลบน้อยลงและมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ในที่สุด (Görg, 2004) การให้กระแสไฟฟ้าที่มากหรือน้อยเกินไปจะส่งผลให้จุดโปรตีนแยกได้ไม่ดีและเกิดแถบในแวนอน (Berkelman *et al.*, 2000; Görg, 2004)

การย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรด มีการควบคุมให้ระดับความเข้มของสีย้อมใกล้เคียงกันทุกการทดลองดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 15 เพื่อเป็นการควบคุมความคลาดเคลื่อนระหว่างแต่ละการทดลองให้น้อยที่สุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ความเข้มของจุดโปรตีนในขั้นตอนถัดไป

5. การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะต่างๆ ของการลอกคราบด้วย

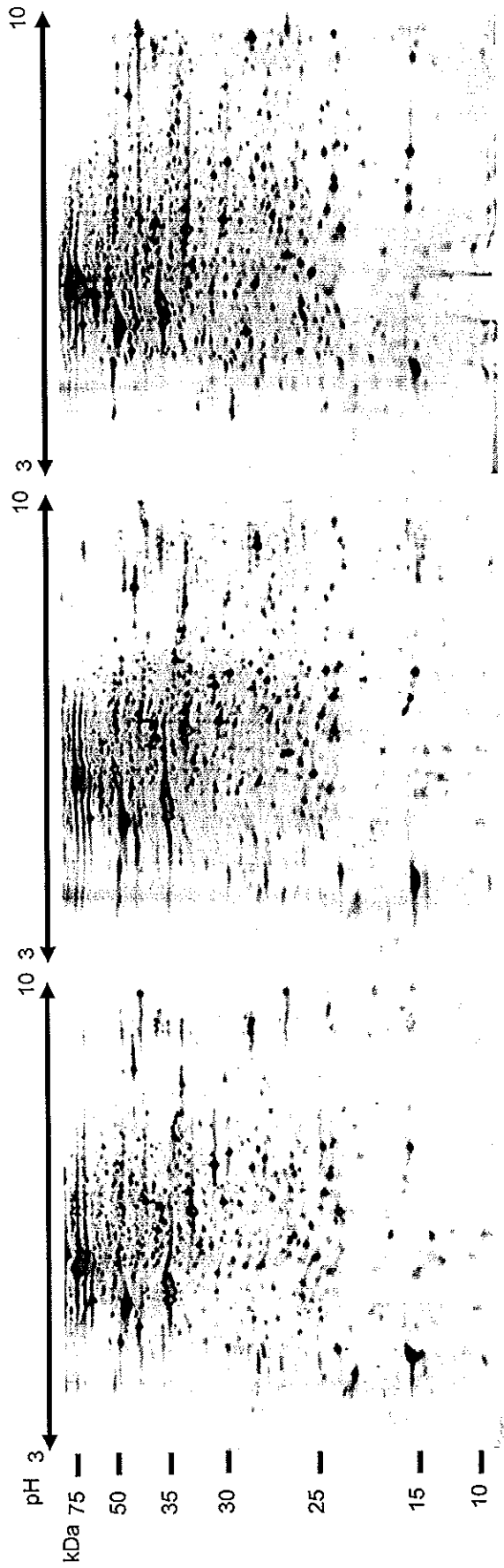
2D SDS-PAGE

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำ 2D SDS-PAGE แล้วจึงทำการแยกโปรตีนที่สกัดจากเนื้อเยื่อผิวหนังของแต่ละระยะการลอกคราบทั้งหมดจำนวน 8 ระยะ ได้แก่ ระยะก่อนการลอกคราบ (D0 D1 D2 D3 D4) และระยะหลังการลอกคราบ (A B1 B2) ทุกระยะการลอกคราบทำการทดลอง 4 ครั้งโดยใช้กิ้งตัวใหม่ทุกครั้ง ยกเว้นระยะ D1 และ B2 ทำ 3 ครั้ง เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้ไม่ดีพอ การทดลองครั้งนี้ไม่ได้แยกระยะ A1 A2 C1 C2 C3 C4 และ E เนื่องจากระยะเหล่านี้จะแยกได้ยาก เมื่อใช้เกณฑ์การแยกด้วยลักษณะทางกายภาพประกอบกับระยะเวลาระหว่างระยะเหล่านี้สั้นมากทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างกิ้งได้ เมื่อพิจารณาภาพเจลที่แยกได้ทั้งหมดด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 14 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะ D0 ที่ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตใช้โปรตีนปริมาณ 70 ไมโครกรัม กำลังไฟฟ้าในมิติที่หนึ่งเท่ากับ 18.8 กิโลวัตต์ชั่วโมง เป็นเวลา 10 ชั่วโมง 5 นาที

Figure 14. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage D0. The gel was stained with silver nitrate. 70 μ g of epidermal protein was electrofocussed with 18.8 kWh electric power in the first dimension. Time of first dimension is 10:05 hr.



ภาพที่ 15 2D SDS-PAGE ของ โปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งก่าดำในระยะ D3 ที่เชื่อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต แสดงการเชื่อม, จุดด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตให้ได้รับความเข้มของจุดโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน

Figure 15. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage D3. Three gels from separated experiments were stained with silver nitrate solution to obtain similar intensity of protein spots.

พบว่ารูปแบบการแสดงออกของจุดโปรตีน ในทุกระยะการลอกคราบมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีการปรากฏของโปรตีนอยู่ในช่วง pH 3-10 น้ำหนักโมเลกุล 10-75 กิโลดาลตัน โดยจุดโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในช่วง pH 4.5-8 น้ำหนักโมเลกุล 15-50 กิโลดาลตัน ขนาดของจุดโปรตีนมีทั้งใหญ่และเล็ก จุดโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 35-50 กิโลดาลตัน มีขนาดเล็กและอยู่ชิดกันมากกว่าในช่วงน้ำหนักโมเลกุลอื่นๆ จุดโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 15-35 กิโลดาลตัน มีขนาดใหญ่และอยู่ห่างกัน และมีจุดโปรตีนปริมาณไม่มากนักในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10-15 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 16-19)

เมื่อพิจารณาภาพเจลในเบื้องต้นด้วยสายตา จะพบความแตกต่างของภาพเจลทั้ง 8 ระยะ ที่พอจะสรุปได้คือ ในแต่ละระยะของการลอกคราบครั้งหนึ่งๆ จะมีจุดโปรตีนจำนวนหนึ่งที่มีการแสดงออกอย่างเฉพาะตัว และในบางระยะการลอกคราบจุดโปรตีนจำนวนหนึ่งจะไม่มีการแสดงออก (ซึ่งแสดงจุดโปรตีนในภาพที่ 16-19) และจำนวนจุดโปรตีนในภาพเจลระยะ D4 มีมากกว่าระยะการลอกคราบอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่พบว่าการสังเคราะห์ RNA มีการแสดงออกสูงสุดใน D4 (Keller and Adelung 1970; Stevenson and Tung 1971) และ Promwikorn และคณะ (2007) พบว่าโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 57 kDa มีการแสดงออกสูงสุดในระยะ D4 ซึ่งเป็นการสะท้อนให้เห็นว่าเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งก่าดำในระยะ D4 มีการสร้างโปรตีนมากกว่าช่วงเวลาอื่นของวงจรการลอกคราบ

6. การวัดปริมาณการแสดงออกของจุดโปรตีน

การวัดปริมาณการแสดงออกของจุดโปรตีนทำได้โดยวัดจากค่าความเข้มของจุดโปรตีนที่ปรากฏบนภาพเจลโดยใช้ Imagemaster 2D platinum software ซึ่งเป็นการอ่านค่าความเข้มของจุดโปรตีนแต่ละจุดในแต่ละภาพเจล ค่าที่อ่านได้เป็นค่าเปรียบเทียบกับจุดโปรตีนในภาพเจลอ้างอิง (reference gel) ที่กำหนดไว้ โดยภาพเจลอ้างอิงที่ใช้ในครั้งนี้เป็นภาพเจลในระยะ D4 เนื่องจากมีจำนวนจุดโปรตีนมากที่สุด โดยมีจุดโปรตีนทั้งหมด 632 จุด และเมื่อทำการซ้อนทับกับภาพเจลอีก 29 เจล พบว่ามีจุดโปรตีนที่ซ้อนทับกันได้จำนวน 604 จุด ผลของการวัดค่าความเข้มของจุดโปรตีนจำนวน 604 จุดได้แสดงไว้ในภาคผนวก ข

7. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทางสถิติ

นำค่าความเข้มของจุดโปรตีนแต่ละจุดทั้ง 604 จุด ในทุกระยะการลอกคราบจำนวน 3-4 จุด การทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติทีละจุด เพื่อศึกษาว่ามีโปรตีนจุดใดบ้างที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดวงจรการลอกคราบ โดยใช้สถิติ Nonparametric Kruskal Wallis และ Wilcoxon Mann Whitney ผ่านโปรแกรม SPSS version 13 ผลการ

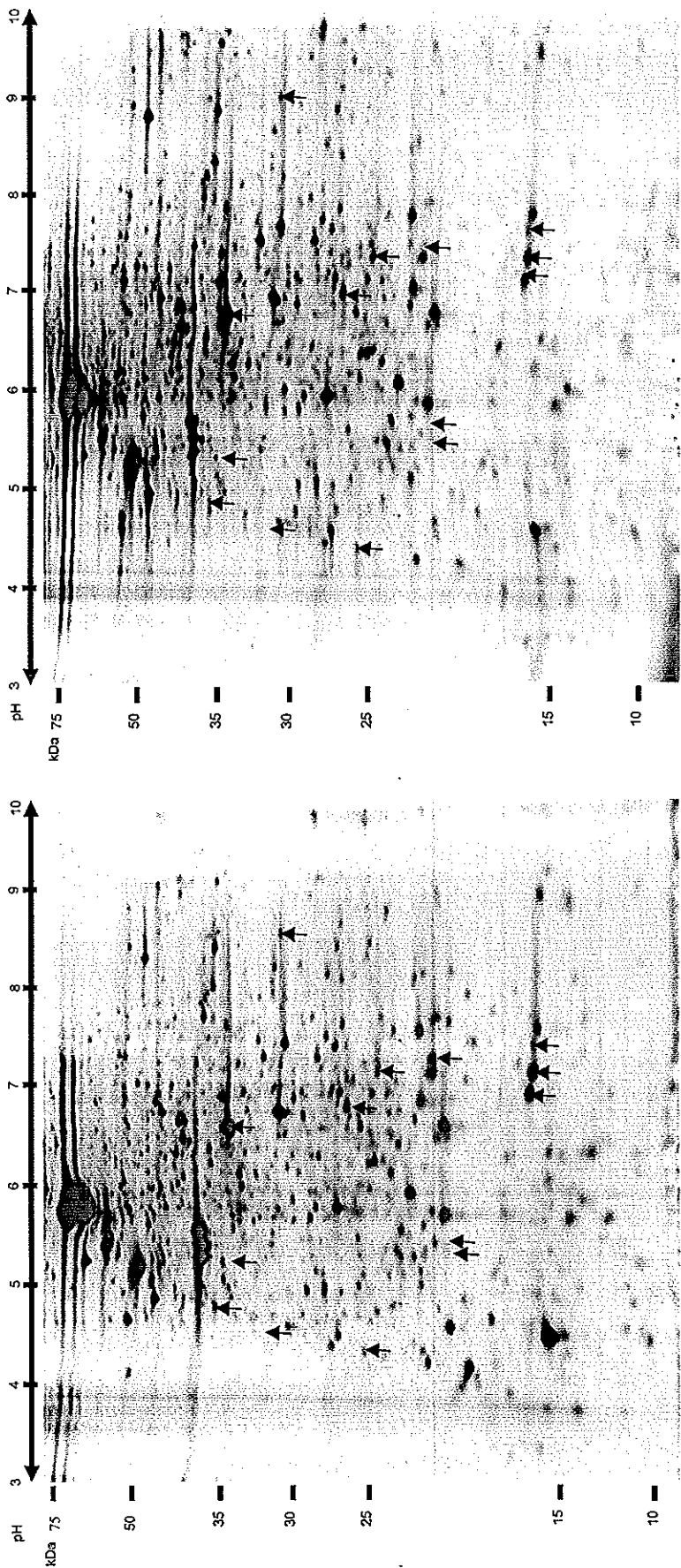
วิเคราะห์พบว่ามียูโปรตีนจำนวน 48 จุด ที่มีการแสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha < 0.05$) ตลอดจนจรรยาการลอกกราบ (ตารางที่ 3) โดยตำแหน่งของจุดโปรตีนทั้ง 48 จุด ซึ่งแสดงด้วยหมายเลขโปรตีน (ID) ในภาพเจลดังภาพที่ 20-23

8. การจำแนกชนิดของโปรตีน

จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตลอดจนจรรยาการลอกกราบถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วย LC-MS/MS ทำโดยตัดจุดโปรตีนจากเจลที่ย้อมด้วย 0.1% Coomassies blue R-250 จำนวน 15 จุด (ภาพที่ 24) ไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ในขณะที่จุดโปรตีนอีก 33 จุด ไม่ได้นำมาวิเคราะห์เพราะไม่ปรากฏบนเจลที่ย้อมด้วย 0.1% Coomassies blue R-250 เนื่องจากจุดโปรตีนเหล่านั้นมีขนาดเล็ก เมื่อนำมาข้อมด้วย 0.1% Coomassies blue R-250 ซึ่งมีความไวในการตรวจจับกับโปรตีนน้อยกว่าการข้อมจุดโปรตีนด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดทำให้ไม่ปรากฏจุดโปรตีนบนแผ่นเจล ผลการวิเคราะห์สามารถจำแนกทั้งชนิดและคุณสมบัติของจุดโปรตีนได้เป็นผลสำเร็จในขณะนี้จำนวน 2 จุด คือ จุดโปรตีนที่มีหมายเลข (ID) 4699 คือ allergen Pen m 2 และ หมายเลข 5131 คือ crustacyanin-C1 subunit ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยแสดงผลการสืบค้นที่ได้จากฐานข้อมูลไว้ในภาคผนวก ค ส่วนจุดโปรตีนที่เหลือยังอยู่ระหว่างการวิเคราะห์

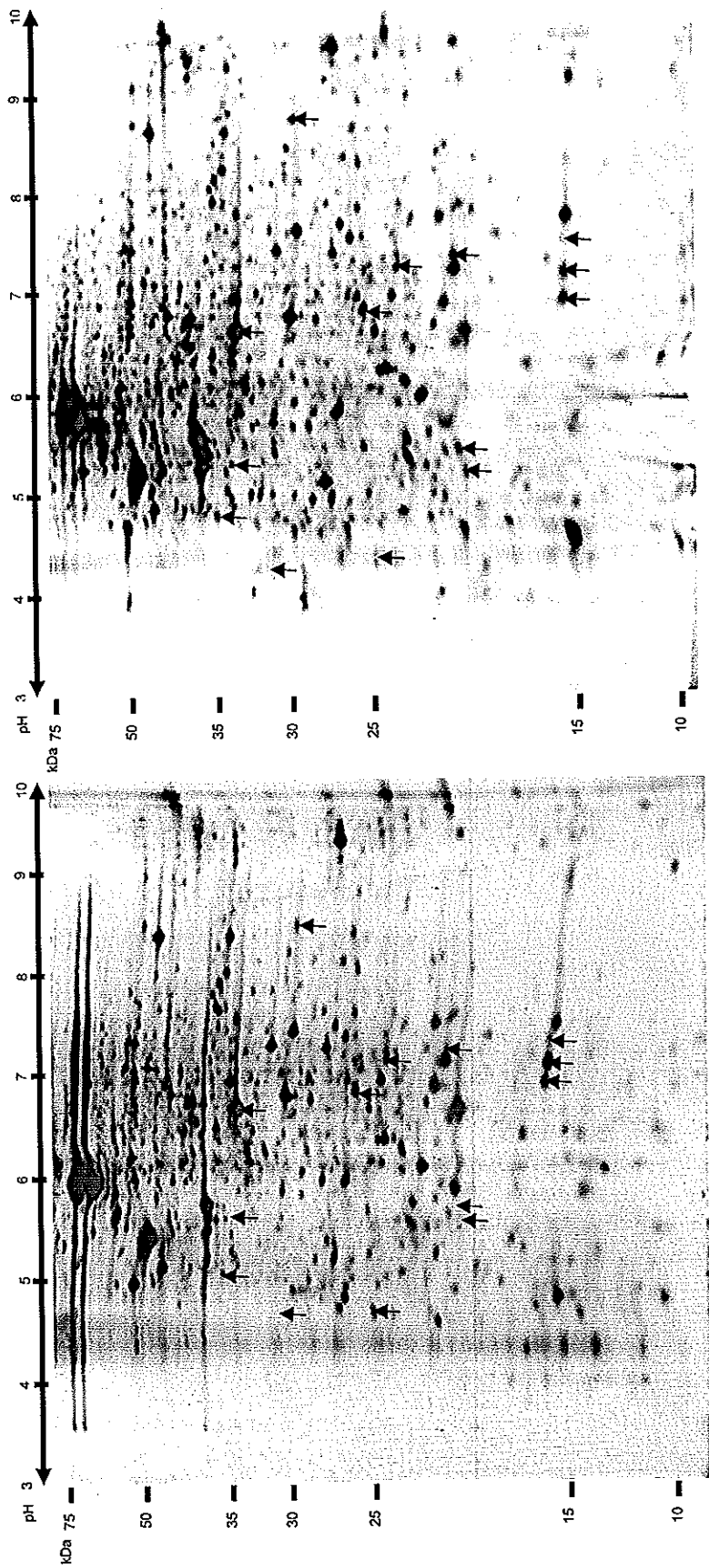
Allergen Pen m 2 เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกตลอดจรรยาการลอกกราบมีการแสดงออกสูงสุดในระยะ B1 และมีการแสดงออกต่ำสุดในระยะ D2 และ โดย allergen Pen m 2 เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ในคน มีหลักฐานว่า allergen Pen m 2 มีลำดับกรดอะมิโนประมาณ 90% ที่เหมือนกับ arginine kinase ของสัตว์น้ำจำพวกที่มีเปลือก (Yu *et al.*, 2003) จึงคาดคะเนว่า allergen Pen m 2 น่าจะมีหน้าที่เหมือนหรือคล้ายกับ arginine kinase ซึ่งเกี่ยวข้องกับ ATP buffering system มีทำหน้าที่ควบคุมระดับฟอสเฟตในปฏิกิริยา glycogenolysis (Ellington, 2001) โดยที่ฟอสเฟตจะไปทำปฏิกิริยากับกลูโคส 1 โมเลกุลโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อให้ได้ glucose-1-phosphate ที่จะเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางในกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรต (glycolysis) ในปัจจุบันยังไม่มีความชัดเจนที่ใช้ในการอธิบายถึงหน้าที่ของ allergen Pen m 2 ที่มีต่อสัตว์ในตระกูลครัสเตเชีย อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Promwikorn และคณะ (2007) พบว่าในระยะ B1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในชั้นใต้เนื้อเยื่อผิวหนัง (sub-epidermis) มีปริมาณลดลงหลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณมากในช่วงก่อนการลอกกราบ อาจจะเป็นไปได้ว่า allergen Pen m 2 ในกุ้งกุลาดำมีความเกี่ยวข้องกับคาร์โบไฮเดรตในชั้นใต้เนื้อเยื่อผิวหนัง

Crustacyanin-C1 subunit เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกตลอดวงจรการลอกคราบเช่นกันโดยมีแสดงออกสูงสุดในระยะ B1 และการแสดงออกต่ำสุดในระยะ D2 crustacyanin-C1 subunit เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ lipocalin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลาย ได้แก่ การขนย้ายโมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่ละลายน้ำ การขนย้ายเรตินอล และการเกิดสีของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เป็นต้น (Flower, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่า crustacyanin เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีน้ำเงินใน carapace ของกุ้งมังกร (*Homarus gammarus* (L.)) โดยจะจับกับ astaxanthin (Wald *et al.*, 1948) การที่ crustacyanin มีการแสดงออกสูงสุดในระยะ B1 น่าจะสะท้อนให้เห็นว่าการเกิดสีของกุ้งมีการพัฒนาสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ (B1)



ภาพที่ 16 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดในระยะ D0 และ D1 ช้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต จุดที่แสดงจุดโปรตีนที่
พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามีความแตกต่างกัน

Figure 16. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage D0 and D1, stained with silver nitrate. Protein spots visually different in intensity, were indicated
with arrows.

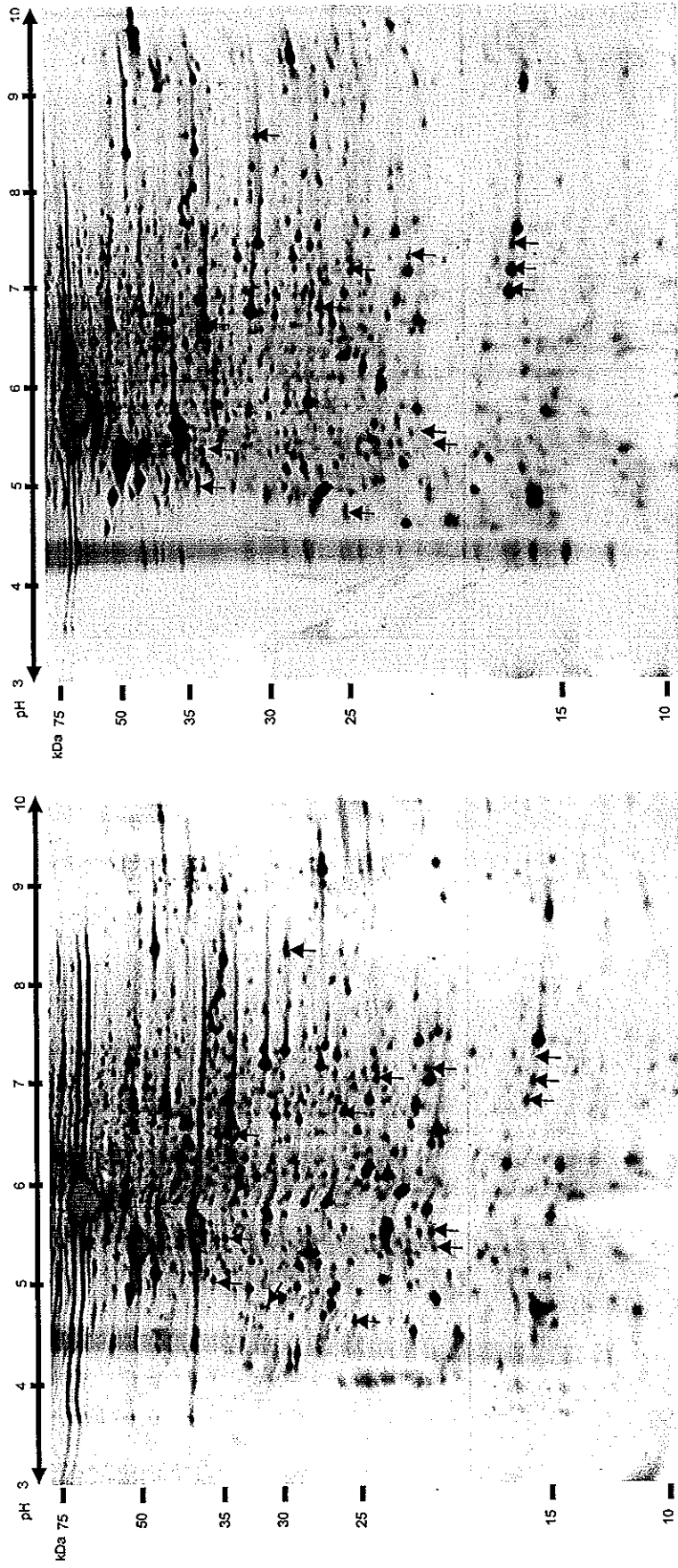


ระยะ D2

ระยะ D3

ภาพที่ 17 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำระยะ D2 และ D3 ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงจุดโปรตีนที่พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามีความแตกต่างกัน

Figure 17. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage D2 and D3, stained with silver nitrate. Protein spots visually different in intensity, were indicated with arrows.

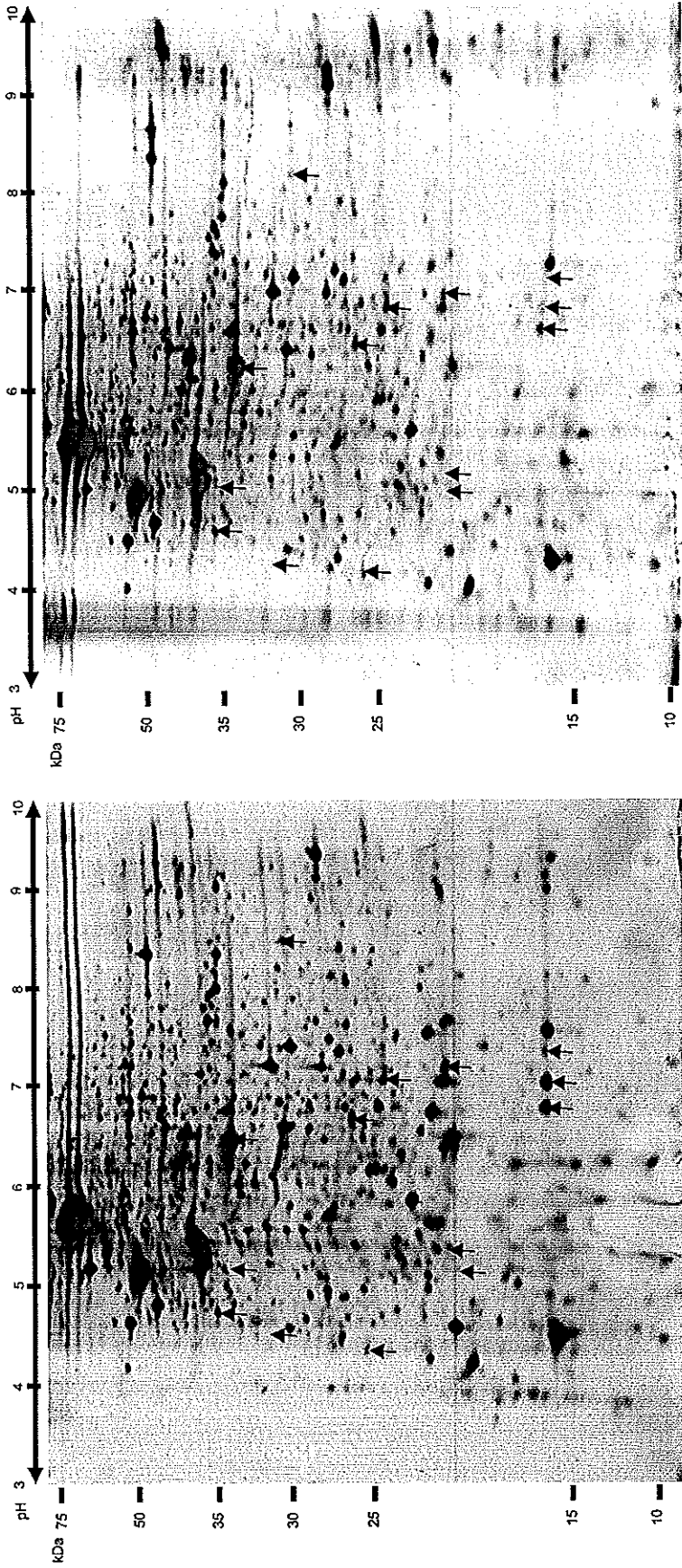


ระยะ D4

ระยะ A

ภาพที่ 18 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งก่าในระยะ D4 และ A ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงจุดโปรตีนที่พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามีความแตกต่างกัน

Figure 18. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage D4 and A, stained with silver nitrate. Protein spots visually different in intensity, were indicated with arrows.



ภาพที่ 19 2D SDS-PAGE ของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำระยะ B1 และ B2 ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ครึ่งแสดงจุดโปรตีนที่พิจารณาด้วยตาเปล่าแล้วพบว่ามีความแตกต่างกัน

Figure 19. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stage B1 and B2, stained with silver nitrate. Protein spots visually different in intensity, were indicated with arrows.

ตารางที่ 3 หมายเลขจุดโปรตีน (ID) และค่าเฉลี่ยความเข้มของจุดโปรตีนจำนวน 48 จุดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha < 0.05$)
ตลอดวงจรการลอกคราบ

Table 3. Identity of protein spots (ID) and mean intensity of 48 protein spots that were different significantly expressed throughout the molting cycle.

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)								p-value (Mann-whitney test)
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2	
3922	0	0	0	0	4.18	2.21	2.97	0	0.014 (D4-D0, D4-D2, D4-D3); 0.028 (D4-D1, D4-B2); 0.047 (A-D0, A-D2, A-D3, B1-D0, B1-D2, B1-D3)
3974	4.276	4.47	0	5.33	2.44	7.33	7.312	21.18	0.014 (D3-D2, A-D2, B1-D2); 0.019 (B2-D2); 0.032 (B2-D4); 0.034 (B2-A); .047 (D0-D2)
3992	6.815	22.1	9.41	10.99	10.48	9.3	5.3	4.99	0.021 (D2-B1, D3-B1, D4-B1, A-B1); 0.034 (D1-D2, D1-D4, D1-A, D1-B1, D2-B2)
4000	1.12	2.17	0.938	1.36	6.57	10.22	3.19	2.61	0.018 (D4-D3, A-D3); 0.021 (D4-D0, D4-D2, A-D0, A-D2); 0.034 (D4-D1, D4-B2, A-D1); 0.043 (A-B1)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.)

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)								p-value (Mann-whitney test)	
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2		(Kruskal-wallis test)
4072	0	0.744	0.715	1.08	1.97	10.41	1.85	0	0.009	0.014 (D4-D0, A-D0); 0.018 (A-D2); 0.019 (D1-D0); 0.02 (A-D3); 0.021 (A-D4); 0.028 (A-B2, B2-D4); 0.034 (A-D1); 0.037 (D1-B2)
4103	0.046	0	0	0	1.58	2.4	0	0.25	0.02	0.014 (D4-D2, D4-D3, D4-B1); 0.028 (D4-D1); 0.032 (D4-B2)
4165	1.07	0.65	1.45	3.94	4.4	2.725	0.853	0.777	0.023	0.014 (D4-D0, D4-B1); 0.019 (D0-D1, B1-D1); 0.028 (D4-B2); 0.034 (B2-D1); 0.047 (D3-D0, D3-B1)
4170	7.33	6.86	9.23	22.39	13.36	9.23	4.49	0.383	0.027	0.021 (D3-B1); 0.032 (D0-B2, D2-B2, D3-B2, D4-B2, B1-B2); 0.046 (D1-B2)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)							p-value (Mann-whitney test)		
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1		B2	(Kruskal-wallis test)
4246	0	0	1.69	3.21	5.01	2.49	0	0	0.002	0.014 (D4-D0, D4-B1, A-D0, A-B1); 0.028 (D4-D1, D2-B2, A-D1, A-B2); 0.043 (D4-A); 0.047 (D2-D0, D2-B1, D3-D0, B1-D3)
4276	0	0	0	2.69	10.89	2.99	0	0	0.001	0.014 (D4-D0, D4-D2, D4-B1); 0.021 (D4-D3, A-D4); 0.028 (D4-D1, D4-B2); 0.047 (D3-D0, D3-D2, -D2, D3-B1, A-D2, A-B1)
4339	4.19	8.52	9.88	20.62	32.08	9.1	7.15	5.04	0.039	0.021 (D4-D0, D4-D2, D4-B1, A-D0, A-D4); 0.034 (D4-D1, D4-B2)
4400	2.35	3.35	2.67	5.84	12.66	5.08	4.57	2.322	0.03	0.014 (D4-D3); 0.018 (D4-B1); 0.020 (D4-D2); 0.021 (D4-A); 0.032 (D4-B2, A-B2); 0.034 (D4-D1, A-D1); 0.043 (D4-D0)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)										p-value (Mann-whitney test)
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2	(Kruskal-wallis test)		
4582	52.17	45.34	27.52	75.07	32.28	77.93	68.61	91.02	0.02	0.021 (D2-D3, D2-A); 0.034 (B2-D2, B2-D4); 0.043 (A-D4, B1-D2, B1-D4)	
4591	1.17	1.56	0.455	0.936	4.02	0.948	0	0	0.043	0.014 (D4-B1); 0.018 (D4-D2); 0.028 (D4-B2); 0.038 (D4-D3); 0.042 (D4-A)	
4592	36.67	24.57	26.23	17.29	34.81	60.43	36.41	37.27	0.041	0.021 (D2-A, A-D3, A-D4); 0.034 (A-D1); 0.043 (B1-D3, A-B1)	
4635	0	0	0.23	7.87	25.45	0	0	0	0.002	0.014 (D4-D0, D4-A, D4-B1), 0.018 (D4-D2); .020 (D4-D3); 0.028 (D4-D1, D4-B2)	
4699	281.8	291.6	223.2	231.2	245.3	331.4	449	408	0.007	0.021 (B1-D0, B1-D2, B1-D3, B1-D4); 0.034 (D1-D2, D1-D3, D1-D4, B1-D1, B2-D0, B2-D2, B2-D3, B2-D4)	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)										p-value (Mann-whitney test)	
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2	(Kruskal-wallis test)			
4729	0	0	0	3.649	11.44	0	0	0	0	0	0.024	0.047 (D4-D0, D4-D2, D4-A, D4-B1)
4756	0.863	1.32	1.27	1.5	8.358	6.416	2.11	1.077	0.011	0.018	0.018 (D4-D0, D4-D2, A-D0); 0.02 (D4-D3, D4-B1); 0.032 (D4-B2, A-B2); 0.034 (D4-D1, A-D1); 0.038 (A-D2); 0.042 (A-D3, A-B1)	
4774	0	0	0	4.95	22.27	0	0	0	0.001	0.014	0.014 (D4-D2, D4-A, D4-B1); 0.028 (D4-D1, D4-B2); 0.029 (D4-D0)	
4780	14.3	12.97	4.86	12.64	8.024	25.16	20.99	27.65	0.016	0.021	0.021 (D3-D2, A-D2, B1-D2, B1-D3, B1-D4); 0.034 (B1-D1, B2-D2, B2-D3, B2-D4); 0.043 (A-D4)	
4791	0	0	0	4.234	13.18	0	0	0	0.024	0.047	0.047 (D4-D0, D4-D2, D4-A, D4-B1)	
4821	0	0	0	4.31	6.108	2.686	1	0	0.006	0.014	0.014 (D4-D0, D4-D2); 0.018 (D4-B1); 0.028 (D4-D1, D4-B2); 0.042 (D4-A); 0.047 (D3-D0, D3-D2)	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)								p-value	
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2	(Kruskal-wallis test)	(Mann-whitney test)
4843	13.86	10.72	19.73	25.17	33.29	26.96	11.24	9.01	0.019	0.021(D4-B1); 0.034 (D3-D1, D4-D1, D4-B2, A-D1); 0.043 (D4-D0, D4-D2, A-B1)
4862	7.35	8.57	4.45	10.84	11.7	0.062	0	4.15	0.021	0.014 (D3-B1, D4-B1); 0.019 (D1-B1, D3-A, D4-A, B2-B1); 0.032 (D1-A, D3-B2, D4-B2, B2-A); 0.047 (D2-B1)
4864	40.44	31.32	29.25	29.84	24.42	24	22.01	24.33	0.016	0.021 (D0-D4, D0-A, D0-B1, D3-D4, D3-A, D3-B1); 0.029 (D0-D3); 0.034 (D0-B2, D1-A, D3-B2)
4876	4.64	13.88	15.67	19.86	193.5	14.26	8.37	5.51	0.025	0.021 (D2-D0, D4-D3, D4-D0, D4-D2, D4-A, D4-B1); 0.034(D1-D0, D2-B2, D4-D1, D4-B2)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)							p-value (Mann-whitney test)		
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1		B2	(Kruskal-wallis test)
4909	8.604	1.6	0	14.66	9.21	21.64	0.743	1.11	0.02	0.014 (D3-D2, D4-D2); 0.018 (D3-B1, D4-B1); 0.032 (D3-D1, D3-B2, D4-D1, D4-B2); 0.047 (A-D2)
4928	7.071	11.18	11.26	8.023	5.219	5.408	2.749	4.628	0.047	0.020 (D2-B1); 0.032 (D1-B1); 0.034 (D1-D4, D1-A); 0.043 (D2-D4, D2-A)
4950	39.55	43.05	53.44	16.16	47.14	61.87	26.65	36.33	0.032	0.021 (D0-D3, D2-D3, A-D3); 0.034 (A-B2); 0.043 (D2-D0, D2-B1, D4-D3, A-D0, A-B1)
4954	11.86	11.5	25.54	34.07	15.19	47.32	1.481	2.055	0.014	0.018 (D2-B1, D3-B1, D4-B1, A-B1); 0.032 (D2-B2, D3-B2, D4-B2, A-B2)
4981	75.69	74.93	72.9	71.77	65.56	56.84	48.06	41.27	0.023	0.021 (D0-A, D0-B1); 0.034 (D0-B2, D1-A, D1-B1, D2-B2, D3-B2); 0.043 (D3-B1)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^4$)										p-value (Mann-whitney test)
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2	(Kruskal-wallis test)		
5006	15.99	16.62	24.34	15.69	29.87	27.61	8.88	6.57	0.001	0.021 (D0-B1, D2-D0, D2-B1, D3-B1, D4-D0, D4-B1, A-D0, A-B1); 0.034 (D0-B2, D1-D4, D1-B1, D2-B2, D3-B2, D4-B2, A-B2, B1-B2); 0.043 (D4-D3)	
5021	8	6.463	14.23	10.7	15.16	12.18	6.217	4.7	0.045	0.021 (D2-B1); 0.034 (D2-B2, A-B2); 0.043 (D2-D0, D4-B1)	
5052	48.44	42.34	43.78	35.66	28.54	30.84	33.96	45.1	0.02	0.021 (D0-D4, D0-A, D2-D4); 0.034 (D1-D4, D1-A, D2-A, D4-B2, B2-A)	
5064	45.75	42.38	40.2	44.5	52.86	31.01	10.4	25.23	0.018	0.021 (D0-B1, D2-B1, D3-B1, D4-A, D4-B1, A-B1); 0.034 (D1-B1, D4-B2, B2-B1)	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)								p-value	
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2		(Kruskal-wallis test)
5076	0.439	0.013	0.583	3.146	12.78	0.028	0	0	0.003	0.014 (D3-B1, D4-B1); 0.018 (D4-D0); 0.020 (D3-A, D4-D2, D4-A); 0.024 (D3-D1); 0.028 (D3-B2, D4-B1); 0.032 (D4-D1); 0.038 (D3-D0); 0.042 (D3-D2); 0.043 (D4-D3)
5129	0	2.23	6.9	16.3	42.14	9.862	6.248	0	0.035	0.014 (D4-D0); 0.020 (D4-D2, D4-A); 0.021 (D4-B1); 0.028 (D4-B2); 0.032 (D4-D1); 0.047 (B1-D0)
5131	42.79	27.64	3.465	29.95	12.82	14.81	53.39	26.58	0.022	0.018(D0-D2, D3-D2, B1-D2); 0.021 (B1-D4); 0.028 (B2-D2); 0.034 (B2-D4); 0.043 (D0-D4, B1-A)
5134	0	0	3.241	11.93	20.48	8.2	0.57	0	0.034	0.014 (D4-D0); 0.028 (D4-D1, D4-B2); 0.038 (D4-D2); 0.042 (D4-B1)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

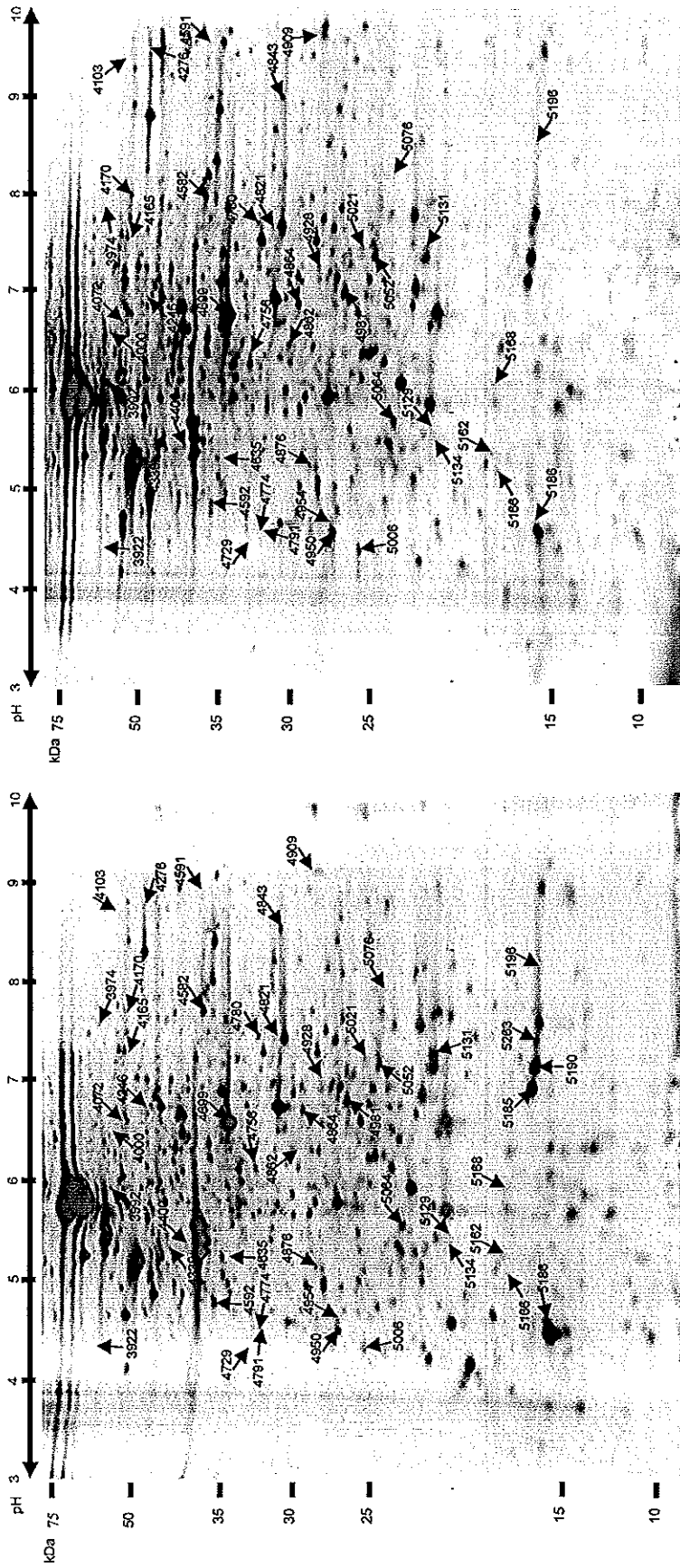
Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^4$)								p-value	
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2	(Kruskal-wallis test)	(Mann-whitney test)
5162	0	3.719	0	0.878	2.657	13.4	3.982	0	0.048	0.014 (D3-D0, D3-D2, D3-B2); 0.047 (A-D0, A-D2)
5166	4.39	1.93	8.748	7.579	10.49	27.73	6.442	3.73	0.024	0.020 (A-B1); 0.021 (A-D0, A-D2, A-D3, A-D4); 0.032 (D4-D1, A-D1); 0.034 (D4-B2, A-B2); 0.043 (D4-D0)
5168	0	0.315	0.278	0.086	13.2	0	0	0	0.045	0.047 (D4-D0, D4-A, D4-B1)
5185	145	47.99	374.2	94.35	141.3	49.14	57.23	2.72	0.048	0.032 (D0-B2, D4-B2); 0.034 (D2-B2, D3-B2, A-B2)
5186	0	0	2.22	2.43	8.837	114	166.9	106.9	0.031	0.019 (B2-D0); 0.028 (B2-D2, B2-D3); 0.032 (B2-D4); 0.037 (B2-D1); 0.047 (A-D0, B1-D0)
5190	91.31	82.77	180.8	36.24	89.4	29.48	92.7	5.59	0.048	0.021 (D2-D3); 0.034 (D0-B2, D2-B2, D3-B2, D4-B2); 0.043 (D2-A)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

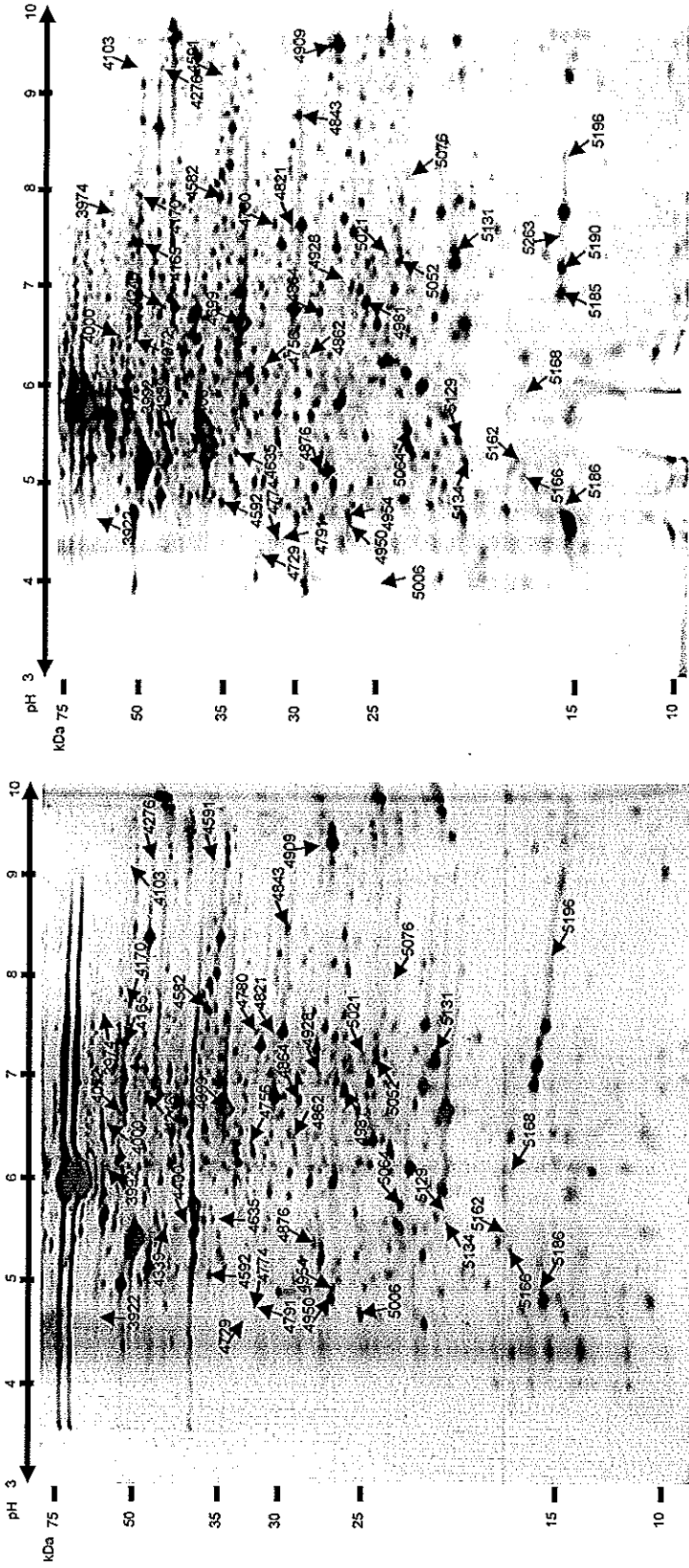
Table 3. (cont.).

ID	Mean of intensity of protein spots at each molting stage ($\times 10^{-4}$)								p-value	
	D0	D1	D2	D3	D4	A	B1	B2		(Kruskal-wallis test)
5196	0	0	0	4.822	10.31	4.163	0	0	0.024	0.047 (D3-D0, D3-D2, D3-B1, D4-D0, D4-D2, D4-B1)
5263	2.53	4.2	26.28	0.161	0.362	0.039	0.263	0	0.04	0.028 (D1-A, D1-B1); 0.032 (D1-D4); 0.034 (D1-D3); 0.037 (D1-B2)



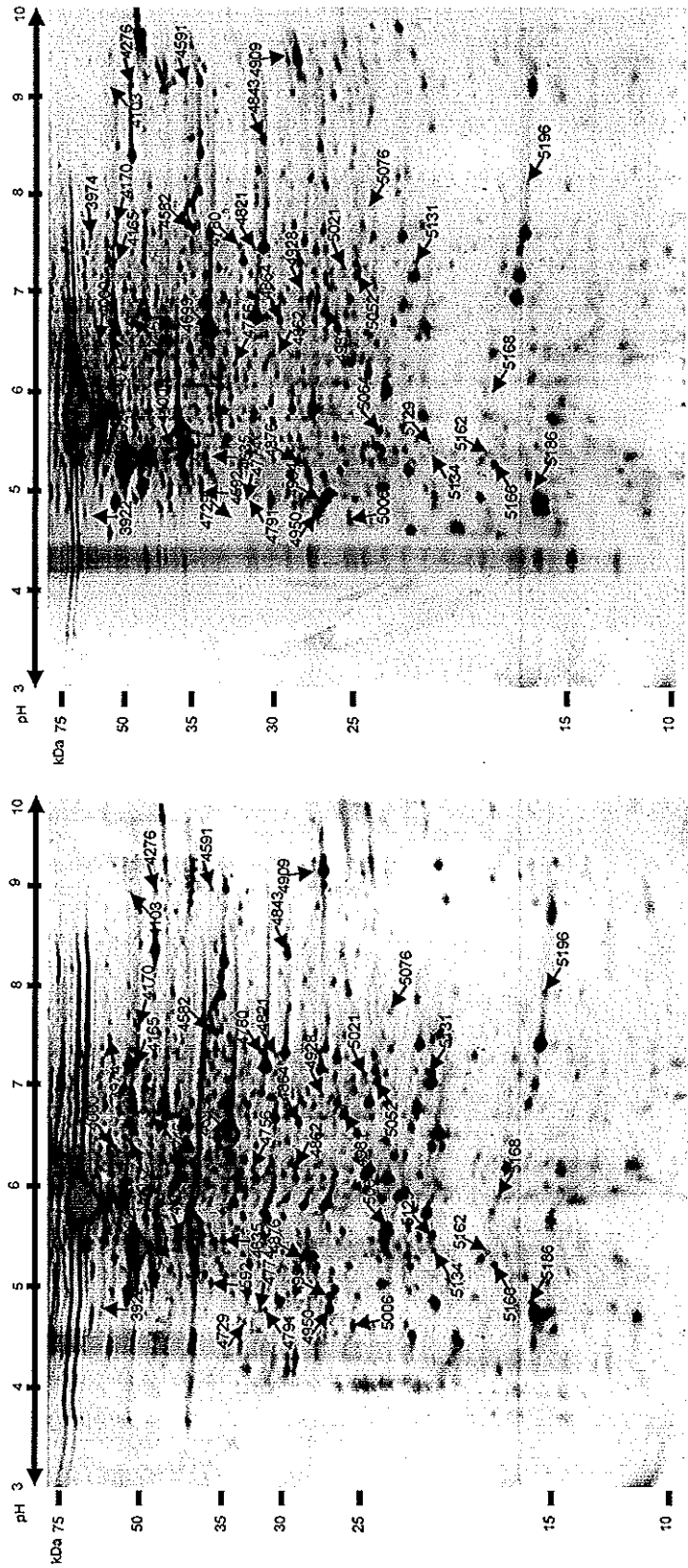
ภาพที่ 20 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งก่าดำในระยะ D0 และ D1 ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีนจำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Figure 20. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stages D0 and D1, stained with silver nitrate solution. 48 protein spots, those were significantly expressed, were indicated with arrows and ID.



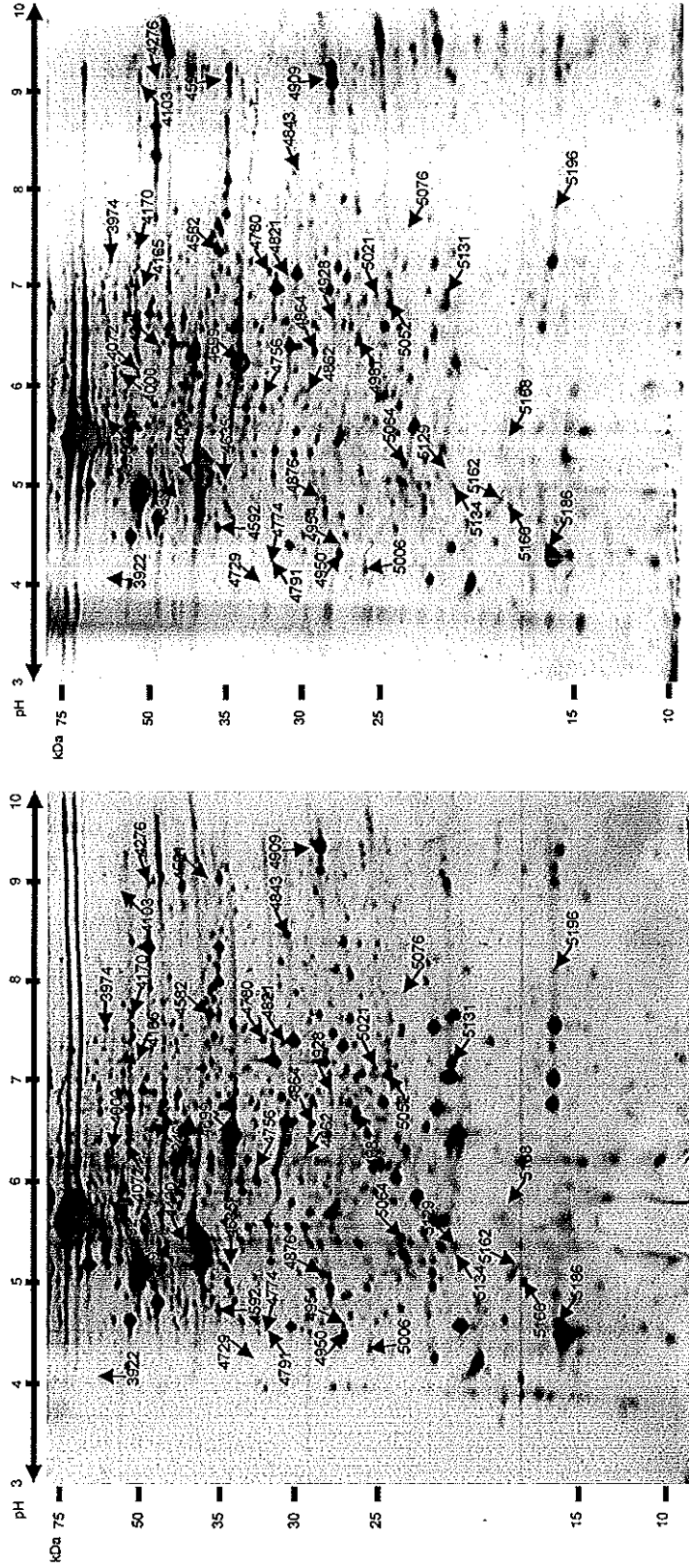
ภาพที่ 21 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะ D2 และ D3 ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต ดูครีที่แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีนจำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Figure 21. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stages D2 and D3, stained with silver nitrate solution. 48 protein spots, those were significantly expressed, were indicated with arrows and ID.



ภาพที่ 22 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะเวลา D4 และ A ชัดด้วยซิลเวอร์ไนเตรด ที่แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีน จำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Figure 22. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stages D4 and A, stained with silver nitrate solution. 48 protein spots, those were significantly expressed, were indicated with arrows and ID.

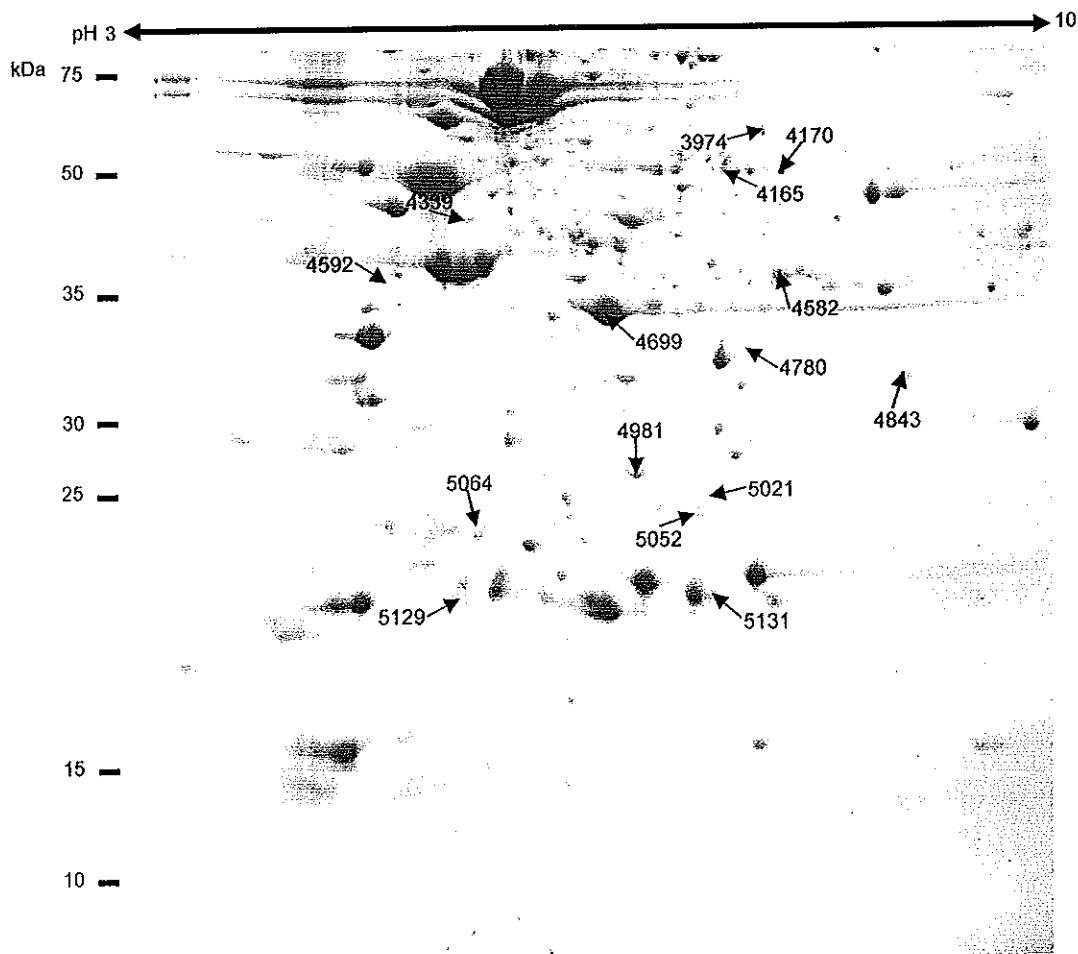


ระยะ B1

ระยะ B2

ภาพที่ 23 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดดำในระยะ B1 และ B2 ชื่อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรด ที่แสดงตำแหน่งและบอกหมายเลข ID ของโปรตีน จำนวน 48 จุด ที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Figure 23. 2D SDS-PAGE of epidermal protein in stages B1 and B2, stained with silver nitrate solution. 48 protein spots, those were significantly expressed, were indicated with arrows and ID.



ภาพที่ 24 2D SDS-PAGE ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดาคำย้อมด้วย 0.1% Coomassies blue R-250 โดยใช้ปริมาณโปรตีน 500 ไมโครกรัม ลูกศรระบุจุดโปรตีนที่นำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

Figure 24. 2D SDS-PAGE of epidermal protein. The gels were stained with 0.1% Coomassies blue R-250. 500 μ g of epidermal protein was used. Protein spots with arrows were taken to LC-MS/MS analysis.

ตารางที่ 4 ชนิดและคุณสมบัติของ โปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญตลอดวงจรการลอกคราบสืบค้นจากฐานข้อมูล NCBI nr ผ่านระบบ สารสนเทศ

Table 4. Lists and properties of significantly change proteins during the molting cycle were searched against NCBI nr database.

ID	Successfully matched fragment	Protein name	Species	Accession No.	Observed pI/MW (kDa)	Theoretical pI/MW (kDa)	Score	Based mouse score	SC (%)	Matched peptide sequence	Function of protein	Stage of expression		
												Highest	Lowest	
4699	876	Allergen Pen m 2	<i>Penaeus monodon</i>	gi 27463265	7.9/33.53	6.05/40.09	78	> 42	> 53	4	DFGDVNTFVNVDPEGK	IgE-binding protein	B1	D2
5131	486	Crustacyanin-C1 subunit	<i>Homarus gammarus</i>	gi 117423	8.49/19.83	6.89/20.65	34	> 39	> 57	4	IPDFVVP GK	transporters for small hydrophobic molecules	B1	D2

หมายเหตุ

* หมายถึง significant homology

** หมายถึง extensive homology ($\alpha < 0.05$)

SC หมายถึง sequence coverage

บทที่ 4

บทสรุป

การศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปรตีน ในเนื้อเยื่อผิวหนังของกิ้งกูดำตลอดวงจรการลอกคราบด้วยวิธี 2D SDS-PAGE วิเคราะห์ค่าความเข้มของจุดโปรตีนโดยใช้ Imagemaster 2D platinum software และนำค่าความเข้มของจุดโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน โดยเปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนด้วยสถิติ Nonparametric Kruskal Wallis และ Wilcoxon Mann Whitney พบว่ามีจุดโปรตีนจำนวน 48 จุดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha < 0.05$) ตลอดวงจรการลอกคราบ ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วย LC-MS/MS ในขณะนี้สามารถวิเคราะห์ได้เป็นผลสำเร็จจำนวน 2 จุด (จุดโปรตีนอื่นๆ อยู่ระหว่างการวิเคราะห์) คือ จุดโปรตีนหมายเลข (ID) 4699 allergen Pen m 2 และ หมายเลข 5131 crustacyanin-C1 subunit ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีการแสดงออกสูงสุดในระยะ B1 โดย allergen Pen m 2 เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ในคน แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนในการอธิบายถึงหน้าที่ของ allergen Pen m 2 ที่มีต่อสัตว์ในตระกูลครัสเตเชียน แต่ก็มีหลักฐานว่า allergen Pen m 2 มีลำดับกรดอะมิโนประมาณ 90% ที่เหมือนกับ arginine kinase ของสัตว์น้ำจำพวกที่มีเปลือก จึงคาดว่า allergen Pen m 2 อาจจะมีหน้าที่คล้ายกับ arginine kinase ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมระดับฟอสเฟตในกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรต (glycolysis) จึงอาจจะเป็นไปได้ว่า allergen Pen m 2 ในกิ้งกูดำน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในชั้นใต้เนื้อเยื่อผิวหนังเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเปลือกให้แข็งแรงขึ้น ส่วน crustacyanin-C1 subunit เป็นรงควัตถุที่สำคัญในการเกิดสีของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แสดงให้เห็นว่าการเกิดสีของกิ้งกูดำน่าจะมีการพัฒนาสูงสุดในระยะหลังการลอกคราบ (B1)

การค้นพบในครั้งนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของกระบวนการที่เกิดขึ้นทั้งหมดภายในเนื้อเยื่อผิวหนังตลอดวงจรการลอกคราบ เพราะยังมีจุดโปรตีนอีกจำนวนมากที่ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ การศึกษาต่อเนืองเพื่อค้นหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำต่อไป เพื่อให้มีความรู้เชิงลึกมากขึ้นเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการลอกคราบของกิ้งกูดำ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเลี้ยงกิ้งกูดำของเกษตรกร อย่างไรก็ตาม การค้นพบครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการค้นคว้าวิจัยกิ้งกูดำซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- ชลธิ์ ชีวเศรษฐกรรม. 2539. การเจริญเติบโต. ใน การเพาะเลี้ยงปูทะเล. หน้า 40-47. แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ปัตตานี.
- นิตยสารสัตว์น้ำ. 2546. การเพาะฟักและอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำ. ใน คู่มือการเพาะลูกกุ้งเชิงธุรกิจ ทำเนียบโรงเพาะฟัก. พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 26-28. กรุงเทพฯ.
- บรรจง เทียนสงรัสมิ. 2530. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. พิมพ์ครั้งที่ 2. อักษรเจริญทัศน์. กรุงเทพฯ.
- บพิท จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์. 2540. อาร์โธรโพดา. ใน สัตววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 78-98. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เบญจมินทร์ ทองเปิง. 2544. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน. ฐานเกษตรกรรม. นนทบุรี.
- บพิท จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์. 2547. บทปฏิบัติการที่ 8 อาร์โธรโพดา. สัตววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ประจวบ หล้าอุบล. มปป. กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- พุทท ส่องแสงจินดา. 2531. การลอกคราบในตระกูลครัสตาเซีย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 1/2531. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. สงขลา.
- พรรณีภา หาญวิวัฒน์กิจ. 2531. การวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตกุ้งกุลาดำในประเทศไทย. ฝ่ายวิจัยเศรษฐกิจการประมงกองนโยบายและแผนงานประมง กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- ภาพถ่ายกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (ออนไลน์). 2008. สืบค้นจาก : <http://images.google.co.th/images?q=penaeus+monodon&hl=th&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=wi> (18 มีนาคม 2551)
- วิญญิต มั่นหะจิตร, วรวิทย์ ชีวาพร และสมถวิล จริตควร. 2534. ปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี.

วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. 2545. ระบบประสาทของแมลง. ใน *กีฏวิทยาเบื้องต้น*. หน้า 68-73. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก.

ศุภชัย นิลวานิช. 2540. กุ้งกุลาดำ ทางเลือก-ทางรอด. มติชน. กรุงเทพฯ.

เสาวภา สนธิไชย. 2525. ผังลำตัว. ใน *กีฏวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 21-28. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สิริ เอกมหาราช, ชนินทร์ แสงรุ่งเรือง, สุธีวัฒน์ สมสืบ, เนตรดาว วิเศษโส และทวี จินคามัยกุล. 2548. การศึกษาปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่สำคัญต่อการผลิตกุ้งกุลาดำขนาดใหญ่เพื่อการส่งออก. กรมประมง. กรุงเทพฯ.

Aoto, T., Kamiguchi, Y. and Hisano, S. 1974. Histological and ultrastructural studies on the Y organ and the mandibular organ of the freshwater prawn, *Palaemon paucidens*, with special reference to their relation with the molting cycle. J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. 6: 295-308.

Birkenbeil, H. and Gersch, M. 1979. Ultrastructure of the Y-organ of *Astacus astacus* (L) (Crustacea) in relation to the moult cycle. Cell Tissue Res. 196: 519-524.

Bliss, D. E. and Mantel, L. H. 1985. The biology of crustacea. Vol. 9. Academic press. USA.

Bielefeld, M., Gellissen, G. and Spindler, K. 1986. Protein production and the moulting cycle in the crayfish *Astacus leptodactylus*. I. stage-specificity of polypeptide patterns in the hypodermis and hepatopancreas. Insect Biochem. 16:175-180.

Berkelman, T., Brubacher, M. G., Chang, H., Cross, T and Strong, W. 2000. Electrophoresis tip to prevent streaking on 2-D gels. Bio-Rad laboratories. USA.

Buda, E. S. and Shafer, T. S. 2005. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus*. Comp. Biochem. Physiol. B 140:521-531.

- Cariolou, M. A. and Flytzanis, C. N. 1994. Differential expression of cuticle-epidermis proteins in the shrimp *Penaeus vannamei* during molting. *Comp. Biochem. Physiol. B* 108: 367-373.
- Cheng, W., Liu, C., Yan, D. And Chen, J. 2002. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molting stage. *Aquaculture*. 211: 325-339.
- Duran, J. B. 1956. Neurosecretory cell types and their secretory activity in the crayfish. *Biol. Bull.* 111: 62-76.
- Demeusy, N. 1975. Observations sur le fonctionnement des glandes mandibulaires du decapode brachyoure *Carcinus maenas* L. Animaux temoins et animaux sans pedoncules oculaires. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 281: 1887-1889.
- Dell, S., Sedlmeier, D., Böcking, D. and Villemant, C. D. 1998. Ecdysteroid biosynthesis in crayfish Y-organ: feedback regulation by circulating ecdysteroids. *Arch. Int. Biochem. Physiol.* 41: 148-155.
- Ellington, W. R. 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 289-325.
- Flower, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318: 1-14.
- Flegel, T. M., Thamavit, V., Pasharawipas, T. and Sanz, V. A. 1999. Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. 174: 197-206.
- Flegel, T. M., Nielsen, L., Thamavit, V., Kongtim, S. and Pasharawipas, T. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*. 240: 55-68.
- Flegel, T. M. 2006. Review detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. 258: 1-33.
- Glynn, J. P. 1968. Studies on the ionic, protein and phosphate changes associated with the moult cycle of *Homarus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 26: 937-946.

- Görg, A. 2004. 2-D electrophoresis principle and methods. Amersham Biosciences. UK.
- Hinsch, G. W., Spaziani, E. And Vensel, W. H. 1980. Ultrastructure of the Y-organ of Cancer antennarius in normal and de-eyestalked crabs. J. Morphol. 163: 167-174.
- Harrison, F. W. and Humes, A. G. 1992. Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 10. Wiley-Liss. USA.
- Ikeya, T., Persson, P., Kono, M. and Watanabe, T. 2001. The *DD5* gene of the decapod crustacean *Penaeus japonicus* encodes a putative exoskeletal protein with a novel tandem repeat structure. Comp. Biochem. Physiol. B128: 379-388.
- Keller, R. and Adelung, D. 1970. Vergleichende morphologische und physiologische untersuchungen des integumentgewebes und des hautungs-hormongehaltes beim flussskreb *Orconectes limosus* wahrend eines hautungszyklus. Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.164: 209-221.
- Lee, K. J., Watson, R. D. and Roer, R. D. 1998. Molt-Inhibiting Hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249: 624-627.
- Moore, J. 2006. Arthropoda: general. In An introduction to the invertebrates. 2nd ed. p. 153-167. Cambridge University. New York.
- Nagaraju, G. P. C., Reddy, P. R. and Reddy, P. S. 2004. Mandibular organ: its relation to body weight, sex, molt and reproduction in the crab, *Oziotelphusa senex senex fabricius* (1791). Aquaculture. 232: 603-612.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Pakkong, P. and Machado, J. 2002. Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 131A: 243-255.
- Promwikorn, W., Kirirat, P. and Thaweethamsewee, P. 2004. Index of molting cycle in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakarin J. Sci. Technol. 26(5): 765-772.

- Promwikorn, W., Boonyoung, P. and Kirirat, P. 2005. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakarin J. Sci. Technol. 27(3): 499-509.
- Promwikorn, W., Kirirat, P., Intasaro, P. and Withyachumnarkul, B. 2007. Changes in integument histology and protein expression related to the molting cycle of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. 148B: 20-31.
- Ruppert, E. E. and Barnes, R. D. 1994. Invertebrate zoology. 6th ed. Harcourt college. USA.
- Skinner, D. M. 1966. Macromolecular changes associated with growth of crustacean tissue. Am. Zool. 6: 235-242.
- Skinner, D. M. 1968. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid from the crustacean, *Gecarcinus lateralis*. J. Exp. Zool. 169: 347-355.
- Stevenson, J. R. and Tung, D. A. 1971. Inhibition by actinomycin D of the initiation of eumun biosynthesis in the crayfish. Comp. Biochem. Physiol. 39B: 559-567.
- Skinner, D. M. 1985. Molting and regeneration. In: Bliss, D. E. and Mantel, L. H. The biology of crustacean, Academic Press, New York, Vol. 9: 43-128.
- Vijayan, K. K., Diwan, A. D. 1996. Fluctuations in Ca, Mg and P level in the hemolymph, muscle, midgut gland and exoskeleton during the moult cycle of the Indian white prawn, *Penaeus indicus* (Decapod: Penaeidae). Comp. Biochem. Physiol. 114B: 91-97.
- Wald, G., Nathanson, N., Jenks, W. P. and Tarr, E. 1948. Crustacyanin, the blue carotenoid-protein of the lobster shell. Biol. Bull. 95: 249-250.
- Watanabe, T., Persson, P., Endo, H. and Kono, M. 2000. Molecular analysis of two genes, *DD 9A* and *B*, which are expressed during the postmolt stage in the decapod crustacean *Penaeus japonicus*. . Comp. Biochem. Physiol. Part B 125:127-136.
- Yu, C. J., Lin, Y. F., Chiang, B. L. and Chow, L. P. 2003. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. Immunol. 170: 445-453.

Zilli, L., Schiavone, R., Scordella, G., Zonno, V., Verri, T., Storelli, C. and Vilella, S. 2003. Changes in cell type composition and enzymatic activities in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* during the moulting cycle. *J. Comp. Physiol.* 173: 355-363.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารละลายและบัฟเฟอร์

1. 2D lysis buffer (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% IPG buffer)
2. Davidson's fixative (3.30% Alhocol, 2.2% Formalin, 1.15% Glacial acetic acid)
3. Developer (2.5% Sodium carbonate, 0.0074% Formaldehyde)
4. Equilibration buffer (74.1mM Tris-HCl pH 8.8, 6M urea, 30.015% Glycerol, 69.35 mM Sodium Dodecyl Sulfate, traceed Bromophenol blue)
5. Fixative (40% Ethanol, 10% Acetic acid glacial)
6. Periodic Acid Schiff's reagent (PAS) (Schiff's reagent: Basic fuchin, Sodium metabisulfite, Hydrochloric acid; Mayer's hematoxylin; 0.5% Periodic acid: Periodic acid; Xylene; Absolute ethanol; 95% ethanol)
7. Rrehydration buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 0.28% (20 mM) DTT, 2% IPG buffer)
8. Sensitizer (30% Ethanol, 0.125% Glutardialdehyde, 0.2% Sodium thiosulphate, 6.8% Sodium acetate)
9. Silver nitrate (0.25% Silver nitrate, 0.0148% Formaldehyde)
10. Stopper (1.46% EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มของจุดโปรตีน (raw value) จำนวน 604 จุด ที่ได้จากการวัดด้วย ImageMaster 2D Platinum software (x10³)

Table 5. Intensity value of 604 protein spots (raw value) measured by ImageMaster 2D Platinum software (x10³).

Stages	3860	3863	3864	3872	3900	3901	3903	3906	3908	3912	3915	3916	3917	3919	3920	3922	3923	3928	3929	3935	3938	3940	3944	3953
D0	0	0	5.34	0	4.22	4.62	3.82	5.47	5.68	2.17	0	9.29	0	0	0	0	1.53	1.43	0	2.64	43.5	0	0	0
D0	4.05	0	0	7.83	0	0	0	2.05	0	2.86	0	4.21	0	4.17	0	0	6.97	1.47	3.68	0	8.3	0.02	14.9	0
D0	0	0	0	18.4	4.86	2.52	2.64	3.43	7.47	4.19	13	12.5	0	0	1.9	0	0	2.48	3.24	5.29	14.7	69.7	0	0
D0	17	0	0	0	4.17	0	0	13.6	0	0	17	31.1	0	16.3	0	0	7.02	0	33.8	64.5	0	194	27.3	0
D1	0	0	0	12.3	2.83	2.46	0	3.02	0	2.77	0	4.54	0	11.8	0	0	4.57	5.14	3.15	6.82	12.1	62.8	7.87	15.4
D1	0	0	0	6.66	6.97	7.06	3.46	4.19	6.93	3.01	2.69	5.79	0	5.62	0	0	2.74	4.66	2.26	0	15	100	0	0
D1	0	0	13.1	0	4.53	0	3.76	4.23	4.43	4.16	0	6.04	0	1.86	4.34	0	7.72	0	3.93	17.9	8.44	15.8	10.3	0
D2	0	0	0	35	0	4.89	7.04	4.97	0	6.25	0	13	20.7	0	0	0	11.9	2.19	5.61	0	19.9	106	0	0
D2	16.9	0	0	0	5.62	3.83	2.61	3.76	4.8	4.96	0	9.5	0	3.39	0	0	3.75	1.72	3.31	6.74	16.4	4.64	0	20.5
D2	0	0	3.68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.68	0	17.1	0	2.96	86.2	0	0
D2	0	0	0	0	0	3.56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.68	1.13	0	0	0	150	45	21.8
D3	0	2.73	0	0.7	5.77	6.96	10	3.74	0	1.64	0	4.4	1.43	10.2	4.68	0	0	0	2.9	0	9.68	50	0	0
D3	0	0	0	0	4.68	2.94	0	1.33	0	3.22	0	1.21	0	13.8	3.95	0	5.52	2.26	3.18	78.4	1.68	103	16.1	0
D3	0	0	0	0	2.49	4.54	2.96	1.98	0	1.78	5.28	7.12	0	0	4.08	0	2.94	0	0	20.2	19.2	92.7	9.23	0
D3	0	3.06	0	0	2.33	5.58	3.8	0	0	2.99	0	3.41	1.12	6.69	0	0	4.06	0	1.68	0	8.95	75.1	0	20.4
D4	2.76	4.23	3.78	2.58	6.52	5.27	2.49	3.34	14.9	4.98	2.46	8	1.6	5.69	6.6	2.51	2.14	2.39	5.63	13.1	15.8	31.9	5.38	6
D4	0	0	0	0	0	0	1.43	3.51	4.2	8.45	3.05	6.81	0	0	2.05	3.22	3.73	1.34	6.59	28.3	11.4	90.7	13.7	21.8
D4	6.12	0	0	0	2.28	0	2.01	0	0	2.84	0	4	0	7.84	0	3.41	4.14	0	4.29	94.7	8.93	81.4	9.49	3.17
D4	3.34	9.32	10.9	5.72	1.31	2.78	0	3.49	0	0	0	3.19	4.75	0	0	7.56	4.77	1.82	7.05	0	9.87	102	22.7	11.1
A	0	0	0	18.4	3.12	4.92	0	0	0	5.89	0	0	0	0	3.82	2.49	1.86	3.41	7.21	0	17.1	0	0	5.24
A	19.3	0	0	0	6.18	7.61	0	4.35	4.02	0	0	12.3	0	12.6	0	4.49	3.12	4.18	6.01	0	11.9	52.4	0	12.9
A	0	0	0	0	4.47	5.12	0	4.09	7.2	5.3	2.03	8.51	0	8.9	2.11	3.35	3.87	1.87	3.98	0	12.5	45.7	0	0
A	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.43	0	10.7	0	2.41	51.6	15.4	64.6	14.4	0	
B1	0	0	0	0	4.41	9.33	2.28	5.48	3.69	3.45	8.04	12.7	0	7.35	0	2.16	4.38	1.11	3.37	18.9	15.6	62.8	5.04	11.5
B1	0	0	0	0	4.32	3.91	13.5	4.06	3.27	6.17	17.9	0	0	24.5	0	0	4.48	1.34	3.49	12.3	13.5	117	19.6	14
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	4.9	0	0	1.79	0	12.9	0	2.57	1.33	2.63	2.47	30.5	5.7	101	28.4	0
B1	0	0	0	9.6	0	0	5.91	1.54	0	0	6.32	3.49	3.88	0	0	6.53	0	0	0	16.2	11.1	0	0	0
B2	0	7.56	0	0	2.64	2.11	0	0	0	0	15.8	5.05	5.27	0	0	1.14	6.83	7.84	3.21	12.7	48.4	0	2.82	
B2	0	0	0	0	4.15	3.52	2.18	4.82	17.8	2.95	0	13.5	0	6.62	5	0	2.06	3.66	9.29	0	24	35.8	0	17.6
B2	4.01	0	0	0	3.41	3.58	0	2.13	0	5.49	3.2	13.9	0	7.08	0	3.3	0	0	3.58	0	19.6	28.2	4.69	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																								
	3954	3957	3958	3959	3960	3962	3963	3964	3967	3972	3974	3976	3980	3981	3982	3985	3988	3998	4000	4001	4002	4004	4005	4011	4014
D0	0	7.81	1.69	14.8	0	0	0	15	30.3	0.71	0	10.7	0	4.98	0	16.4	5.38	0	5.65	0	0	0	2.52	2.28	18.6
D0	0	4.85	17.2	0	0	0	0	0	10.8	2.29	2.16	0	41.1	6.61	8.22	3.59	3.03	0	6.42	0	0	0	0	1.27	37.2
D0	0	4.26	6.09	20.4	0	0	0	13.7	26.6	4.18	8.32	8.44	5.92	19	10.1	9.63	0	0	11.1	0	0	0	3.78	0	24.7
D0	0	0	22	30.7	28.9	0	0	0	0	0	13.2	0	41.9	6.49	0	0	0	0	4.47	0	0	0	1.71	0	20.4
D1	8.84	2.72	0	8.03	0	0	0	14.6	21.8	1.28	8.2	8.19	8.88	4.3	6.19	5.79	0	0	0	0	4.71	2.07	2.07	1.17	23.1
D1	31.7	4.06	13.9	7.83	0	24.8	0	36.4	26.2	1.2	9.17	12.1	4.81	32	8.13	5.97	0	0	11.5	0	0	0	2.97	1.59	22.8
D1	0	6.2	18.3	0	0	0	0	45.7	27	0	7.2	26.6	3.37	21.5	6.46	5.74	0	0	7.96	0	0	0	2.08	1.3	35.7
D2	12.5	4.74	11.5	0	0	0	0	0	31.9	1.41	9.9	13.8	11	10	7.15	7.68	0	0	11.1	0	0	0	4.26	0	23.3
D2	13.4	7.2	0	12.9	0	0	0	20.4	27.3	1.61	12.4	6.08	10.4	9.9	9.17	9.62	0	0	11.1	0	0	0	4.23	0	13.4
D2	0	0	56.4	0	0	6.33	0	0	17.9	1.51	9.37	25.7	3.79	9.6	22.1	4.74	0	0	6.02	0	0	6.85	0	0	49
D2	18.3	0	38.3	0	0	7.48	3.65	36.4	15.1	0	0	47.7	17	8.25	3.13	0	0	0	3.41	0	0	0	6.53	0	40.1
D3	0	3.64	0	0	0	0	0	0	32	2.34	18.5	0	5.43	8.6	9.98	11.8	0	0	14.6	0	0	0	2.44	1.85	23.7
D3	36.1	4.42	0	0	0	0	0	0	22.7	3.03	9.5	19.8	8.72	8.66	6.39	1.67	0	0	8.59	0	0	0	0.75	1.98	46.1
D3	5.01	0	0	0	0	0	0	0	39	1.79	8.51	14.6	7.67	6.59	6.38	7.39	0	0	13.8	11.6	15.9	1.63	0	0	18.1
D3	17.9	4.16	9.02	0	0	0	0	36.4	25.1	0	2.55	13.8	10.3	1.83	10	4.99	3.65	0	11	0	0	8.44	1.11	0	35.3
D4	9.13	4.96	3.88	3.23	2.95	3.98	10.2	6.25	23.8	1.67	5.9	16.3	5.82	9.8	6.6	9.53	8.76	0	10.3	2.61	3.9	32.8	2.8	2.8	18.1
D4	9.83	5.32	0	0	0	0	0	41.9	23.3	2.43	10.1	21	5.37	9.91	7.99	3.9	0	0	9.28	0	0	0	0	0	35.2
D4	10.2	3.08	17.9	0	14.3	38.1	0	5.72	24.7	1.95	3.55	7.46	38.9	5.7	7.59	6.31	1.28	0	6.07	0	0	0	0	0	27.1
D4	7.52	1.76	37.5	0	45.1	40.4	8.32	16.4	11.3	2.12	8.04	17.9	11.9	14.7	6.75	1.35	0	0	11.5	0	0	0	0	0	35.2
A	5.55	7.17	0	6.49	0	6.97	0	4.88	33.3	0	13.8	3.54	9.84	7.85	8.75	7.52	0	0	14.9	0	7.56	2.74	0	0	22.3
A	15.4	8.08	17.6	13.4	0	0	0	11.7	38.5	1.72	18.9	3.16	8.78	10.6	15.8	5.38	0	0	16.6	0	5.88	3.3	1.83	0	24.2
A	10.8	3.52	0	6.52	0	0	0	45.1	24.3	2.37	14.6	7.56	4.96	5	16.4	6.75	0	0	13.2	0	0	0	3.7	0	15.9
A	0	0	6.15	16.6	0	14.1	0	0	14.7	0	13.5	0	18.3	11.6	3	14.3	3.11	0	7.33	0	0	0	2.22	0	28.8
B1	11.9	2.13	7.75	11.3	0	18.5	0	17.4	26.4	2.49	2.5	6.22	17.4	9.91	5.3	6.55	6.07	0	11.1	0	0	0	2.61	0	24.4
B1	18.6	3.35	0	10	35.1	0	0	32.9	9.77	2.13	2.2	2.85	26.9	4.92	2.2	4.63	1.92	0	8.13	0	9.53	0	0	1.04	43
B1	0	0	37	0	3.53	13.8	0	0	0	0	13.2	0	20.9	0	0	0	1.11	0	6.41	3.43	17.6	0	0	0	89.7
B1	0	7.1	0	0	0	0	32.1	0	10	0	6.57	0	12.7	3.9	12.1	8.58	0	0	13.5	0	5.72	1.96	0	0	16
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	12.3	0	5.93	0	7.47	3.98	5.91	8.74	0	0	11.1	0	0	3.95	1.03	0	23.2
B2	0	4.93	0	17.6	0	4.37	0	10.2	16.8	1.49	7.04	3.87	10.6	10.9	10.1	7.95	0	0	13.2	0	0	2.99	4.25	0	30.8
B2	2.94	4.11	0	3.3	6.4	0	0	15.3	31.7	1.33	8.2	10	2.59	8.64	13.7	7.13	0	0	17.7	0	8.9	3.47	5.58	0	24.4

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stage	ID																							
	4016	4020	4025	4026	4027	4028	4029	4030	4031	4035	4036	4037	4038	4041	4046	4049	4050	4051	4052	4053	4054	4057	4059	4061
D0	0	11.7	19.2	12.5	7.74	0	1.6	0	7.5	23.5	9.25	0	6.94	0	14.3	33.8	16.8	0	0	0	6.02	2.04	147	27.8
D0	0	5.42	6.15	8.39	0	3.53	0	11.4	0	19.2	2.85	0	0	0	6.4	32.1	6.69	0	0	0	0	4.39	119	22.1
D0	0	13.5	18.3	5.15	0	4.2	3.41	14.2	6.17	26.3	6.92	0	13.4	4.76	16.9	12.5	16.5	0	3.9	3.68	0.92	1.47	112	26.4
D0	0	0	0	0	0	4.54	0	42	9.93	18.8	0	0	0	21.8	0	79.2	0	0	0	0	0	14.3	142	0
D1	0	7.48	7.98	3.86	0	3.02	3.22	3.11	7.97	24.6	5.51	0	7.3	0	9.31	26.4	12.5	0	0	0	0.86	0.74	161	24.4
D1	0	8.51	21.9	7.3	4.48	5.23	0	15.3	7.61	0	5.8	4.51	0	6.19	9.44	59.9	0	0	0	3.95	0	0	135	28.1
D1	0	11.1	9.65	8.45	1.99	5.51	0	14.2	4.06	22.1	6.71	2.37	9.39	4.28	8.37	45.5	7.25	1.84	0	0	0	0	79.4	16.3
D2	0	11.2	9.38	5.65	4.28	4.59	0	6.18	7.09	25.9	5.66	1.17	16.8	0	17.9	43.4	0	7	0	8.05	0	0	145	50.2
D2	0	6.36	17.5	0	0	3.22	0	17.2	10	39.1	4.85	0	20.9	6.14	18.5	63.9	5.95	28.8	0	0	1.25	23.9	178	44.6
D2	2.77	0	8.17	10.5	0	0	0	45.1	0	15.9	0	0	0	0	1.23	26.5	0	0	0	0	0	0	106	7.56
D2	0	9.66	4.41	11.8	0	0	23.3	22.3	0	14.5	0	0	0	0	0	9.89	0	0	0	0	0	0	124	10.6
D3	0	18.4	27.2	5.12	6.06	1.87	1.1	8.23	10.9	44.8	7.43	2.45	18.3	0	17.3	61	17.3	4.6	0	0	0	4.52	118	33.6
D3	4.01	11.7	27.4	17.9	6.96	3.81	6.74	14	7.65	25.6	4.33	3.51	12.1	13.1	13.1	41.5	0	12.2	0	2.17	0	9.19	162	40.8
D3	0	6.01	14	0	5.18	0	6.92	0	10.5	25.2	3.36	0	19.3	11.9	16.9	16	13.5	0	0	5.85	0	0	231	35.8
D3	0	9.59	0	7.04	7.64	8.22	4.06	3.37	5.97	26.8	3.74	0	11.6	12.6	12.1	40.3	6.74	7.55	0	0	0	0	209	27.6
D4	2.24	14.4	26.6	5.99	4.65	5.56	8.63	14.7	14.3	14.4	5.85	4.26	7.99	7.17	36.9	20.6	10.8	2.62	3.94	1.91	2.46	5.25	215	41.5
D4	0	7.73	6.6	7.93	11.8	2.13	4.26	12.5	4.98	35.6	4.78	0	11.1	0	16.2	46.2	9.36	0	0	0	0	0	181	39.6
D4	0	7.53	5.38	12.5	5.46	4.03	3.48	3.9	2.47	27.5	3.23	0	4.11	0	6.32	51.4	4.7	0	0	0	0	1.43	151	24.3
D4	0	7.76	9.55	10.5	2.83	6.86	7.95	138	2.94	32.8	4.65	0	9.47	12.5	8.13	35.5	0	0	0	0	0	0	198	12.4
A	6.06	20.5	17.7	0	6.33	5.42	5.32	1.29	12.9	34.1	7.26	3.5	0	11.4	41.3	42.3	14.6	1.31	0	5.88	0	0	197	33.9
A	0	11.6	7.96	0	6.62	9.84	7.02	5.08	13.3	28.9	7.81	1.46	0	0	36	48.8	0	2.44	0	3.51	0	0	204	43.5
A	0	15	41.6	16	10.7	2.38	3.92	28.5	13.9	0	6.1	4	10.8	9.07	21.2	39.3	0	8.63	0	0	0	0	163	36.9
A	3.45	0	11.3	6.85	0	4.76	4	10.4	4.56	25.5	0	0	8.86	11.5	5.63	28.8	5.4	3.66	0	3.83	3.28	0	181	30.1
B1	0	20.5	31.1	9.55	3.25	4.81	0	6.82	6.18	21.8	4.62	5.77	12.4	7.7	13.9	28.7	6.78	3.34	0	0	0	1.02	113	34.5
B1	4.49	8.87	4.13	5.77	0	4.25	4.5	4.74	3.67	13.1	1.93	0	2.79	6.89	4.98	30.7	6.29	0	0	3	3.38	1.54	134	18.7
B1	3.62	19.3	5.05	8.6	0	0	0	29.5	0.96	11.6	0	0	0	0	0	18.4	0	0	0	2.15	0	0	35.3	6.31
B1	0	9.58	15.1	0	6.82	4.58	0	5.39	7.1	31	6.47	0	12.6	0	16.3	40.6	12.1	0	0	0	0	0	207	56.8
B2	0	5.23	17.8	0	3.77	1.88	4.05	0	8.36	0	4.06	2.2	15.5	0	14	30.7	8.45	0	0	0	0	0	131	22.2
B2	0	9.32	16.7	13.4	0	2.51	7.71	6.28	9.3	25.8	4.89	0	16.2	2.27	10.3	23.6	10.8	0	0	0	0	0	173	36.6
B2	0	12	23.5	0	0	2.47	4.25	3.58	8.16	29.3	5.65	2.85	17	0	15.9	0	14.1	0	0	2.23	0	0	163	24.8

Table 5. (cont.).

Stage	4063	4064	4065	4067	4069	4072	4086	4087	4094	4095	4101	ID	4103	4104	4105	4106	4108	4109	4110	4111	4112	4113	4114	4115	4120
D0	7.78	0	11.7	8.68	8.88	0	2.51	2.76	59.3	0	80	0	7.3	40.2	53.5	26.2	0	5.59	6.47	0	0	0	6.68	0	0
D0	0	0	5.56	30.3	2.71	0	4.16	0	29.3	0	18	0	4.03	10.6	15.1	12.9	0	2.25	0	0	0	0	0	0	0
D0	8.96	0	14.9	3.36	21.7	0	5	2.55	64.8	0	62.6	0	31.85	37.9	65.7	18	0	2.27	5.91	0	0	0	28.3	6.06	8.26
D0	0	16.8	0	0	0	0	1.86	0	33.1	0	24.9	0	10.3	3.46	9.15	57.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D1	0	7.17	7.64	18.3	8.06	0.92	3.54	1	30.2	0	46	0	0	23.1	35.2	21.2	2.35	3.51	0	0	2.32	9.62	0	0	0
D1	0	0	14.2	42.4	24.6	0.94	3.45	1.51	21.2	0	79	0	16.2	27.2	34.8	21.7	0	2.88	8.84	0	0	0	15.6	0	0
D1	0	0	7.77	41	0	0.95	4.19	0	34.8	0	39.3	0	11.8	18.2	29.6	14.6	0	1.75	5.15	0	0	17.2	0	0	0
D2	6.17	0	16.9	26.5	0	2.86	9.17	1.84	25.6	0	36.1	0	0	23.5	40.4	27.6	0	6.13	0	2.01	0	17	5.84	0	0
D2	10.8	0	19.5	22.1	7.81	0	7.88	0	30.8	0	99.5	0	6.53	28.6	55.9	44.5	0	8.33	18.8	18.5	0	25.5	0	4.74	0
D2	7.57	0	2.8	14.8	0	0	1.57	7.9	17.4	0	5.07	0	7.83	1.99	5.14	7.09	0	0	0	0	0	7.59	0	8.7	0
D2	0	0	4.71	5.92	0	0	3.17	2.84	13.3	0	15.1	0	0	0	6.56	7.02	0	0	0	0	0	14.4	0	0	0
D3	6.18	4.72	12	32.1	0	0.07	3.71	1.57	48.4	0	42.9	0	0	49.5	38.4	28.8	16	4.82	0	3.92	7.23	13.1	0	0	0
D3	7.58	0	8.86	25.4	0	0	4.06	2.31	27.9	0	54.2	0	0	9.94	27.6	37.5	0	8.36	12	0	0	26.6	0	0	0
D3	0	0	13.1	16.1	0	0	4.83	4.35	28.2	3.5	54.1	0	0	23.8	46.2	41.8	0	11.1	0	0	0	0	0	0	0
D3	0	0	8.57	21.7	6.54	0.22	0	1.21	28	0	43.4	0	0	16.5	24.3	20.9	0	3.49	7.73	1.81	0	0	0	0	0
D4	8.47	4.41	15.9	18.5	5.99	0.35	3.21	3.13	23.4	7.14	36.2	0	4.41	21.1	49.2	19.4	1.11	12.9	6.9	2.88	4.45	18.2	2.29	5.72	0
D4	4.58	0	9.13	44.9	4.01	0.33	3.59	1.98	29.4	0	33.4	0	2.19	15.7	33.9	14.4	0	3.03	16	0	0	15.2	1.3	0	0
D4	0	0	5.1	19.1	3.49	0.75	2.68	0	36.4	0	10.2	0	0.78	6.54	12.7	16.3	0	4.05	14.4	0	0	10.2	0	0	0
D4	7.94	0	3.83	51.4	0	1.25	0	1.64	41.4	0	22.8	0	0.88	11.4	14.3	14.9	0	4.9	0	0	0	14.3	0	0	0
A	5.02	0	21.4	15.8	15.7	1.22	5.11	7.58	46.2	0	69.2	0	2.49	26.5	59.7	26.1	13.9	2.97	10.5	0	0	0	14.9	6.08	8.61
A	23.1	0	4.63	25.3	22.5	1.43	4.05	1.85	66.3	0	64.5	0	7.1	32.7	55.9	30.2	0	8.22	0	9.48	0	0	30.7	9.86	6.16
A	16.1	0	15.5	24.8	0	0.22	6.52	22	48	0	51.1	0	0	28.1	44.2	30.6	0	5.32	0	0	0	25.7	0	0	0
A	25	4.84	4.49	22.2	13.3	5.35	2.84	0	10.7	0	26.8	0	9.73	10.7	20	25.4	0	4.8	9.41	10.9	0	22.1	0	0	0
B1	0	0	11.3	34.8	4.88	7.63	6.24	0	31.3	1.97	41.1	0	0	26	38.8	22.2	0	7.54	6.42	0	0	4.39	7.68	0	0
B1	1.84	0	4.38	12.6	6.21	0	2.14	0	23	0	20.3	0	0	19.8	14.9	0	0	2.08	3.99	0	0	5.91	0	2.56	0
B1	0	0	0.63	15	0	0	1.28	0	13.4	10.2	8.7	0	6.88	2.91	4.48	3.16	0	0	3.95	0	0	0	0	7.44	0
B1	0	0	15.5	36.9	0	0	7.65	0	62.3	0	57	0	0	30.1	70.6	20.4	0	9.89	3.4	13.5	0	4.31	0	0	0
B2	0	0	13.6	35.4	9.24	0	0	1.37	42.4	0	51.5	0	0	24.3	50.7	0	8.32	3.32	13.9	0	0	11	0	0	0
B2	3.96	0	17.3	23.9	31.4	1	3.58	2.09	27.8	0	66.9	0	30.7	22.9	63.7	22.5	5.01	8.81	10.7	7.95	0	16.5	21.7	0	
B2	0	0	14.1	48.2	17.2	0	3.93	1.7	39.5	0	65.1	0	10.5	32.4	54.9	19.4	0	6.55	13.5	0	0	6.95	0	0	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stage	4123	4128	4129	4134	4137	4143	4146	4147	4159	4165	ID	4168	4167	4168	4172	4174	4175	4178	4179	4180	4182	4185	4186	4188
D0	0	2.26	0	21	0	6.74	2.47	4.58	0	2.25	9.94	2.96	12.5	12.5	6.08	5.27	424	10.6	0	7.67	10.7	13.2	58.6	
D0	0	6.92	0	30.2	8.82	9.82	0	2.94	0	0.32	13	0	11.3	11.3	4.51	0	432	3.52	2.29	9.09	10.5	0	19.9	
D0	4.41	2.8	5.18	34.4	19.5	9.7	8.5	12.6	0	0.92	13.8	5.74	19.9	19.9	7.72	4.79	162	9.1	0	9.28	11.4	17.1	63.6	
D0	0	3.82	0	10.5	0	0	12.1	0	0	0	6.13	0	0	0	6.78	0	353	0	2.69	0	8.56	0	9.22	
D1	0	1.05	0	34.2	13.7	2.6	0	4.14	0	0.16	9.08	4.13	10.7	10.7	2.52	0	513	9.84	0	12.2	6.86	11.6	46.6	
D1	0	1.77	1.37	28.4	13.4	0	4.71	7.08	0	0.63	10.4	5.29	12.6	12.6	8.18	0	570	4.15	5.39	0	6.65	10.2	18.7	
D1	0	0	0	21.3	13	11	4.56	3.44	0	0.96	11.3	6.34	13.1	13.1	7.79	0	525	6.99	0	16.8	8.44	20	39.2	
D2	0	9.72	0	38.3	12.2	0	0	5.99	0	0.49	23.2	0	12.5	12.5	4.93	0	388	10.7	0	21.4	6.54	15.6	42.6	
D2	0	4.04	0	39	0	15.4	31.9	10.9	61	0.9	17.7	8.62	13.3	13.3	9.74	0	508	22.6	0	17.3	7.16	12.7	67.7	
D2	0	0	0	13.6	0	4.8	4.28	0	0	0	8.22	5.04	13.7	13.7	2.86	0	293	0	0	0	0	0	7.98	
D2	0	0	2.54	10.3	8.74	0	9.42	0	0	0	5.57	0	11.3	11.3	1.95	0	216	0	0	5.46	0	0	9.93	
D3	0	2.22	2.01	42.8	12.7	0	12	3.02	0	0.16	12.9	4.18	15.8	15.8	12.1	0	589	0	0	3.67	6.91	20.9	62.8	
D3	0	7.54	2.96	33.4	9.11	8.23	14.6	42.3	0	0.54	20.6	6.04	10.7	10.7	2.8	0	366	16	2.55	0	15.1	5.1	9.51	
D3	0	6.71	8.77	45.8	15.5	32	51.6	4.74	0	0.16	18.8	9.21	5.62	5.62	1.73	0	759	12.5	0	1.87	9.05	6.81	33.1	
D3	0	6.66	0	25.9	13.5	27.9	7.11	7.69	0	0	23.1	4.29	22.5	22.5	5.06	0	491	0	0	9.02	5.25	12.4	46.4	
D4	0.69	8.7	3.55	26.1	7.04	14.8	15.6	7.36	1.04	0.37	14.1	8.6	18.7	18.7	6.69	1.27	407	16.7	1.18	4.26	4.64	6.37	7.85	
D4	0.78	6.29	0	28.5	9.57	3.01	2.54	6.11	0	0.66	20	6.03	38.8	38.8	5.47	0	518	15.1	0	19.7	4.78	7.8	38.5	
D4	0	1.6	0	21.3	10.1	1.68	2.73	2.37	0	0.38	10.3	0	7.31	7.31	4.34	0	281	5.27	0	9.78	0	6.89	17.6	
D4	0	5.11	0	17.7	9.32	0	0	0	0	0	8.28	2.57	9.4	9.4	9.68	0	510	7.11	1.57	0	3.35	10.9	18.2	
A	0	0	5.73	28.9	9.28	4.21	0	7.52	0	0.9	20.6	6.89	18.9	18.9	7.07	10.4	438	14.5	0	15.3	5	10.8	0	63.9
A	6.88	2.81	3.55	39.6	16.6	0	0	10.1	3.57	0	14.8	3.45	16.8	16.8	4.1	6.8	489	17.1	3.59	0	10.8	8.36	13	65
A	0	4.45	0	44.4	6.24	18.8	20.4	7.76	0	0	19	14.7	27.6	27.6	5.4	0	576	19.2	0	10.8	5.03	7.8	43.6	
A	0	10.4	0	34.8	0	37.2	14.1	2.92	0	0	15.9	6.74	8.28	8.28	4.23	0	749	6.2	2.14	0	12.1	5.28	10.7	
B1	0	9.06	4.08	30	0	2.34	0	7.14	0	0	12.9	6.94	7.21	7.21	4.88	0	463	10.9	0	15.2	6.43	7.59	45.8	
B1	0	3.6	0	24.9	7.41	14.5	0	3.02	0	0.32	8.44	4.59	22.7	22.7	4.88	0	408	0	1.48	0	5.7	3.14	4.72	
B1	0	2.86	0	19.5	0	0	0	1.88	0	0.2	4.69	0	17.3	17.3	7.02	6.01	354	0	0	2	0	11.5	7.68	
B1	0	3.93	0	0	0	0	0	7.43	0	0	12.8	5.41	15	15	5.93	0	588	13.8	0	10.9	6.77	13.7	106	
B2	0	2.98	2.84	47	6.69	2.8	0	6.32	0	0	10.4	4.38	7.7	7.7	3.88	12	622	0	0	19	2.04	7.99	0	59.3
B2	0	4.36	3.43	32.8	0	0	0	7.22	0	0.19	10	6.18	9.38	9.38	3.87	0	472	3.79	0	3.62	9.39	17.6	75.2	
B2	0	3.46	5.02	30.6	15.4	0	0	8.48	0	0.72	6.81	10.4	14.4	14.4	12	0	652	16.7	0	5.26	7.65	22.6	59.6	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stage	4193	4194	4195	4201	4202	4208	4217	4219	4226	4227	4228	4229	4231	4233	4235	4238	4240	4242	4243	4244	4245	4247	4248		
D0	6.18	12.3	3.23	3.5	66.2	17.3	4.9	0	0	0	16.1	12.7	137	6.6	8.92	0	13.5	0	17.3	21.7	25.8	0	9.73	374	
D0	2.64	4.75	0	9.85	40	12.5	0	0	0	3.41	68.4	13	133	0	17.5	5.29	0	0	0	10.2	0	0	16.4	92	
D0	7.29	10.6	3.38	6.98	54.1	28	0	0	0	4.14	17.2	17.1	182	9.52	0	7.27	12.1	0	0	21	17	0	19.5	217	
D0	0	4.54	0	19.2	39.9	22.3	0	0	10.1	0	134	13.4	167	15.6	42.8	0	3.56	0	0	0	0	0	10.7	101	
D1	4.77	9.5	3.24	15.5	33.3	3.71	0	0	15.5	2.33	4	14.3	81.1	7.86	0	0	7.63	118	36.4	0	28.7	0	15.5	257	
D1	8.3	8.88	0	5.57	40.2	19.6	0	16.7	0	3.94	36.1	23.8	195	4.52	9.77	0	12.1	11	16	10.1	0	0	8.96	201	
D1	5.61	7.85	2.76	12.9	54.1	20.9	2.23	6.08	18.6	2.64	67	24.9	155	7.83	12.3	3.96	10.5	12.4	12.5	0	63.9	0	12.7	148	
D2	4.22	10.5	4.95	20.8	24.3	13.6	0	0	18.1	3.43	40.8	21.3	132	7.72	0	0	12.2	0	0	0	0	0	10.6	16.4	219
D2	4.53	11.6	0	12.5	28.9	19.6	6.61	0	12.6	2.86	46	23.3	187	12.4	0	0	15	0	0	0	0	0	12.3	14.5	313
D2	0	2.47	0	15.4	30	14.9	0	0	9.91	0	88.2	15.2	94.8	4.49	49.3	8.83	2.98	0	0	0	0	0	0.35	7.56	11.3
D2	0	3.62	0	13.9	14.3	10.2	3.61	0	0	4.09	148	0	96.4	0	34	10.8	0	0	0	0	4.45	0	12.1	36.5	
D3	6.1	10.2	4.03	6.53	41.6	18.7	9.14	0	32.2	1.92	7.34	25.6	128	0	0	0	18.6	7.41	0	17	0	0	15.4	194	
D3	2.26	8.55	4.34	13.2	53.4	6.32	0	0	13.2	4.14	47.1	13.4	125	4.32	19.1	0	18.9	0	0	0	0	0	3.09	18.4	156
D3	4.63	12.3	2.78	17.3	46.9	5.37	6.62	5.66	0	5.15	40.2	10.2	150	7.57	23.9	0	20.3	5.1	14.9	7.69	0	0	3.65	10.6	142
D3	4.95	9.64	3.3	2.73	43.5	20.7	1.14	0	18.2	3.88	38.1	17.5	186	0	28	4.11	12.4	5.12	23.4	0	27.4	6.08	24.3	224	
D4	11.5	17.4	3.88	6.74	25	15.4	2.18	2.94	5.92	4.85	28.5	6.04	97.4	4.75	7.55	3.76	19.2	2.23	3.85	8.37	13.4	4.52	8.25	198	
D4	3.4	8.77	4.35	8.6	56.7	26.9	3.53	5.82	0	2.61	53.1	18.8	136	5.13	25.1	0	14.1	0	0	21.1	0	0	3.16	13.7	207
D4	0	6.45	1.72	12.7	50	19.7	3.17	0	0	4.09	94	14.8	101	0	35.7	0	9.15	6.13	0	14.8	0	0	4.05	16.7	82.6
D4	0	8.52	1.03	32.5	24.1	34.2	0	0	13.8	0	89.6	17	156	3.18	33.8	0	7.09	0	11.8	0	0	0	3.62	13.6	205
A	5.14	20.6	4.12	3.06	29.6	13.3	0	0	0	2.07	6.48	12.4	294	0	0	5.27	15.2	0	0	19	0	0	2.77	5.86	211
A	6.08	17	1.3	13.9	30.4	14.5	0	0	21.4	1.39	36.1	19.9	194	0	15.2	0	20.7	1.6	0	12.3	0	0	3.42	15.2	161
A	4.31	15.9	2.82	7.61	52.2	21.8	2.57	0	0	2.59	18.2	0	137	7.7	15	0	17.6	0	7.67	16.4	0	0	1.24	8.08	149
A	3.58	8.34	2.43	18	32	16.9	1.2	0	13.2	8.36	70.7	12.5	167	3.27	24	5.22	10.5	0	0	0	0	0	2.58	15.4	114
B1	4.18	10.9	1.67	11.7	38.2	11.1	3.78	2.4	0	2.26	12.3	11.1	182	8.99	7.52	2.44	16.6	0	5.39	11.9	16.6	0	0	13.2	196
B1	4.31	4.03	1.47	12.1	33	5.29	0	0	4.97	0	56	8.66	121	0	10.8	3.31	11	3.12	6.9	0	0	0	0	15.6	92.3
B1	0	3.25	0	15.9	21.7	9.75	0	0	7.65	0	78.1	8.31	122	0	0	6.55	1.78	0	0	0	0	0	0	21	24
B1	6.25	9.44	2.9	4.18	39.3	20.4	0	0	19.4	0	6.46	8.95	279	6.73	0	0	17	0	0	6.82	8.51	0	0	7.11	218
B2	3.39	13.4	3.55	12.9	56.1	14.5	0	0	11.8	0	8.65	3.4	185	4.37	0	0	8.46	0	0	0	0	0	0	6.43	236
B2	3.33	18.2	3.46	12.1	35.1	7.16	0	0	14.6	3.05	37.8	3.24	246	6.18	0	0	14.7	2.93	0	0	0	0	0	14.3	157
B2	4.25	10.1	1.62	1.94	24.2	20.7	7.11	0	0	4.48	12.4	7.94	168	0	12.9	0	18.9	0	3.64	25.3	0	0	0	14.9	251

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																									
	4250	4251	4252	4255	4260	4267	4272	4274	4276	4277	4278	4283	4284	4285	4286	4289	4291	4292	4293	4301	4303	4309	4312	4313		
D0	9.14	0	26.2	7.45	5.25	3.22	0	0	0	0	21.3	0	3.86	0	0	1.32	16.3	18.8	33	0	11	0	0	15.8		
D0	0	0	5.1	10.9	3.35	0	6.35	0	0	25.9	10.6	17.8	5.16	0	5.33	0	23.7	39.4	29.9	0	9.16	7.85	0	7.01		
D0	14.2	0	16	11.8	8.11	0	6.23	0	0	8.25	16	4.72	4.34	4.08	10.7	0	12.3	22.5	40.9	0	12.7	25.9	0	17.2		
D0	21.4	0	5.61	0	4.03	20.4	16.4	27	0	0	12.4	32.4	0	0	0	0	89.7	17.2	29.9	0	18.9	0	0	4.3		
D1	0	3.04	11	6.31	6.68	2.55	2.54	8.18	0	0	0	0	2.99	0	6.29	0.88	5.13	25	14.4	0	7.49	10.8	0	6.73		
D1	4.35	3.67	13.4	17	5.32	3.51	7.72	2.97	0	4.11	22	0	7.27	0	11.3	0	17.5	28.6	33.1	0	11.8	11.1	0	6.46		
D1	0	0	10.1	7.64	5.73	2.57	3.78	7.55	0	16.8	14.1	22.1	3.97	0	7.06	1.89	21.1	18	36.8	0	15.4	0	0	7.96		
D2	4.46	0	10	12.3	7.72	5.86	0	0	0	0	15.6	0	7.51	0	5.38	2.82	21.9	30.3	24.7	0	5.92	0	0	12.4		
D2	10.3	0	12.9	12.9	12.2	0	0	11.5	0	0	22.8	0	8.27	0	0	0	25.6	21	39.8	0	13.8	0	0	11.7		
D2	0	0	49.8	0	2.49	4.64	7.66	0	0	0	0	0	1.46	0	7.51	15.8	41.6	10.2	22	0	10.7	0	0	3.14		
D2	0	0	0	0	3.49	0	16.6	18.2	0	46.9	22.7	0	1.99	0	0	0	149	10.6	15.9	0	9.68	0	0	4		
D3	0	0	9.33	13.9	6	2.49	8.84	0	0	11.7	15.5	7.46	9.08	0	3.81	2.76	12.8	34.3	33.9	0	7.5	4.62	0	9.93		
D3	5.5	0	8.64	0	6.93	59.5	13.3	5.54	0	16.1	24.7	5.55	6.63	0	6.66	0.78	36.4	28.2	21.9	0	0	0	0	6.29		
D3	2.02	0	9.27	0	9.12	35	12.4	0	0	5.62	25.5	13.9	5.36	0	6.18	4.94	23	22.2	10.7	0	10.4	0	0	10.4		
D3	6.89	6.7	9.26	7.12	11.3	2.82	9.87	0	0	0	8.12	0	8.55	0	10	0	26.2	16.7	22.4	0	11.5	16.1	0	16.3		
D4	5.44	1.38	6.08	7.66	6.9	40.2	27.2	4.48	0	13.3	17.6	13.7	5.71	5.21	9.3	3.45	16.2	22.6	32	6.6	15.7	3.54	3.98	9.63		
D4	3.99	0	7.98	10.7	5	101	0	7.18	0	0	24.7	19.9	4.89	0	5.47	0	34.7	0	40.5	0	8.94	3.65	5.15	10.7		
D4	0	3.18	3.75	6.71	4.11	103	80.9	0	0	20.2	27	22.2	1.98	0	0	0	40.9	19.8	32.8	0	18	25.2	10.8	6.8		
D4	8.58	0	7.85	0	53.6	60	9.08	0	0	10.7	28.1	25.2	2.1	0	0	0	53.9	17.7	60.2	8.6	6.7	0	0	6.94		
A	13.5	4.99	12.8	8.56	5.63	4.17	9.08	0	0	0	9.27	6.96	4.04	0	0	0	0	18.2	24.7	0	7.86	11.5	0	18.7		
A	0	0	14	4.55	7.96	0	0	0	0	0	6.46	0	3.86	0	0	0	18.7	24.7	25.7	2.96	15.7	0	15.9	15		
A	0	0	16.1	8.02	6.36	0.97	10	0	0	0	13.2	7.32	4.82	0	0	1.57	21.9	19.4	38.6	0	9.63	9.66	0	10.7		
A	5.18	0	6.07	0	5.19	2.4	8.72	0	0	14.9	9.25	11.6	4.37	0	3.5	2.38	27.1	26.3	32.8	0	18.6	0	0	5.56		
B1	6.32	0	15.4	2.83	6.64	1.37	11.9	4.32	0	9.89	12.9	7.37	6.83	0	0	0	9.84	29.8	26.1	0	28.9	0	0	8.29		
B1	0	0	0	5.93	3.14	2.77	7.97	10.3	0	37.2	21.1	7.39	4.67	0	9.28	0	22.3	41.7	27.3	0	5.06	0	0	3.37		
B1	0	0	0	0	3.05	7.8	5.82	0	0	0	0	0	1.99	0	8.4	0	22.2	13.8	29	0	27	0	0	7.87		
B1	0	4.91	15.2	16.1	4.65	3.84	0	0	0	0	12.4	0	4.02	0	2.79	0	0	38.8	44.9	0	7.02	0	0	0		
B2	0	0	9.72	9.61	8.62	3.76	7.37	0	0	0	13.8	0	4.29	0	4.24	0	0	20.1	24.9	0	7	0	0	11.9		
B2	0	0	14.5	9.18	8.15	3.31	6.54	7.63	0	0	17.4	12.4	6.48	0	6.77	0	26.2	22.6	15.3	0	22.6	0	0	14.8		
B2	0	0	12.3	13.6	5.96	1.33	8.64	0	0	5.4	17.3	4.89	4.5	0	4.94	3.21	0	25.6	25.6	0	9.65	0	5.29	12.3		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID	4315	4320	4322	4323	4325	4326	4330	4332	4334	4340	4341	4342	4343	4346	4352	4356	4357	4363	4368	4372	4374	4376	4378
D0	14.4	60.9	17.4	52.3	11.2	9.71	8.17	0	3.04	5.1	3.11	2.69	3.76	1.59	41.8	3.82	12.7	3.57	23.7	5.22	10	12.3	25.5	
D0	8.56	72.3	11.9	0	0	14.3	4.49	11.7	5.78	6.17	3.78	9.11	0	3.84	0	8.73	0	17.9	0	2.55	3.61	6.03	9.39	
D0	14	105	4.26	21.9	0	14.1	2.84	0	4.2	10.9	6.06	7.51	6.03	6.78	0	3.13	0	9.07	16.4	4.29	10.9	14.3	27.9	
D0	7.9	47.4	0	0	0	8.46	9.72	0	0	4.39	0	0	11.5	8.52	0	15.1	0	0	0	0	0	7.91	14.2	
D1	5.37	100	6.57	11.2	0	10.5	0	0	6.27	3.86	6.96	7.96	4.98	3.39	0	0	10.6	7.37	10.1	0	4.84	4.75	12.7	
D1	20.7	96.6	0	40.9	0	7.01	6.08	0	6.9	18.1	0	12.8	3.67	0	0	4.43	0	0	16.1	0	7.3	13.2	34.3	
D1	15.2	94.2	20.4	1.78	11.6	9.81	4.44	0	7.44	5.37	4.32	8.89	2.81	9.06	0	4.93	10.1	0	18.1	0	4.29	10.6	9.81	
D2	7.51	67	14.2	95.4	0	10.9	0	9.84	11.2	6.18	9.83	14.2	8.99	0	0	0	0	5.89	11.2	0	6.29	10.6	34.6	
D2	8.31	101	17.4	10.8	0	8.72	0	0	7.21	4.46	8.99	9.19	7.05	0	0	5.58	0	2.84	12.5	0	6.46	19.5	0	
D2	11.7	53.5	7.99	59.3	6.46	6.14	10.6	0	6.43	6.55	0	7.64	3.74	10.8	0	14.9	0	0	14.3	0	2.85	5.18	6.69	
D2	9.51	34.3	0	7.31	0	4.45	14.4	0	0	0	3.33	3.25	0	4.43	0	17.6	3.91	1.54	0	0	1.48	2.16	10.1	
D3	12.1	51.1	0	13.2	0	4.31	0	0	3.05	4.03	4.45	19.1	4.1	1.78	22	0	11.8	177	14.5	2.28	7.69	14	15.3	
D3	17.5	71.9	11.5	45.5	0	9.86	6.79	0	9.65	5.23	6.94	0	0	5.16	0	9.51	5.77	8.01	12.5	2.17	6.57	7.47	27.2	
D3	21.4	102	23	21.3	10.3	7.44	11.7	0	5.27	9.74	5.26	6.53	3.91	1.98	47.8	0	0	0	20.3	0	6.17	9.1	20.9	
D3	12.3	104	1.74	0	0	11.9	0	0	9.12	9.88	10	9.76	0	6.79	23.8	0	0	0	18.7	7.94	0	5.55	16.9	
D4	6.27	28.8	4.79	11.6	4.68	6.31	9.85	6.01	4.65	9.67	5.89	3.7	5	7.97	29	8.92	11.1	1.23	8.48	4.43	9.48	17.7	11.2	
D4	23.3	63	0	2.67	0	12.4	4.92	0	8.41	9.63	4.77	8.3	8.84	6.21	39.7	2.8	0	50.5	18.2	0	5.18	17.9	12.8	
D4	14.5	58.7	24.8	0	5.93	8.17	7.9	0	7.35	6.84	5	5.51	5.19	8.15	0	14.3	0	23.1	12.7	2.37	3.18	11.6	20.4	
D4	18	57.1	0	16.8	0	5.37	0	0	4.69	4.27	0	1.94	0	4.43	0	17.9	2.16	3.04	11.3	0	3.76	18.9	0	
A	13.4	117	16.7	31.9	0	10.3	0	0	2.78	7.05	4.87	5.33	4.91	4.25	27.4	3.1	0	36.2	18.6	4.22	8.59	8.38	11.8	
A	18.4	69.1	13.1	9.27	0	10.7	0	0	4.68	8.2	4.32	3.73	5.15	13.9	0	3.5	8.66	5.69	0	3.82	7.53	8.29	17.4	
A	11	94.6	108	0	0	12.6	0	0	7.79	24.4	0	13.9	11.9	4.81	0	2.04	13.4	79	19.2	4.3	10.3	19.7	16.6	
A	6.33	81.3	5.03	90.6	3.54	9.76	10.9	8.06	9.82	14.5	5.63	11.1	4.94	0	21.3	10.3	4.02	2.35	8.16	5.61	5.74	13.7	14.6	
B1	8.17	81.9	14.3	32.1	0	9.68	7.5	0	7.74	7.68	3.82	3.4	8.31	5.89	0	8.93	7.91	12.5	11.5	2.46	6.88	6.62	10.3	
B1	9.73	106	0	0	15.4	6.21	4.45	0	3.19	3.97	4.47	2.11	4.08	2.69	29.6	7.44	5.92	0	6.21	0	1.54	5.43	13.6	
B1	8.39	63.6	3.47	16.3	0	5.49	26.7	14.3	0	2.72	0	0	2.47	10.2	10.8	7.23	7.73	0	11.1	0	0	6.96	7.3	
B1	7.34	123	11.1	19.7	7.34	4.49	0	0	6.84	35	0	15.5	4.59	8.34	0	0	14	0	14.9	0	6.85	20.3	24.5	
B2	13	130	0	284	0	10.4	0	0	0	4.86	0	10.8	3.11	0	24.6	0	15.1	0	8.07	0	6.92	7.8	8.83	
B2	8.95	81.4	0	52.8	0	16.1	0	0	5.85	4.71	0	9.36	6.61	10.2	0	4.72	0	0	10.4	0	6.95	4.32	0	
B2	16.9	81.3	13.7	49.2	9.8	12.8	4.36	0	0	8.62	3.93	7.75	0	6.75	39.9	0	11.3	65.5	10.5	7.24	8.28	31.1	30.4	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4381	4382	4383	4384	4385	4387	4389	4390	4392	4394	4395	4397	4398	4400	4402	4403	4404	4405	4413	4418	4420	4426	4428	4442
D0	4.21	0	5.5	0	16.1	10.1	45.2	14.1	16.4	0	0	17.4	4.22	0	0	0	0	92.3	7.25	3.47	71.4	0	37.1	0
D0	0	5.66	7.9	7.67	13.2	4.11	19.3	11.2	3.58	7.52	0	7.72	2.04	0	0	0	0	155	12.6	0	50.3	7.23	16.9	12.6
D0	7.32	9.95	4.82	0	22.6	8.05	43.8	23.9	16.4	0	3.53	46.8	0	0.57	1.86	2.73	0	170	5.04	2.76	62.5	1.34	34.6	9.2
D0	0	0	0	0	16.3	6.63	25.5	14.9	0	4.52	6.08	13.7	0	0.57	0	0	0	141	32.2	0	55.3	0	23	0
D1	7.71	0	4.66	0	18.5	8.12	33.9	7.17	14.1	0	2.45	7.23	0	1.35	2.4	0	4.74	114	10.2	3.11	63.1	2.07	26.5	8.03
D1	2.28	15.4	5.17	0	21.2	10.1	31.1	10.2	11.8	9.8	0	13.9	2.86	0.50	3.43	0	0	108	7.41	3.46	60.9	2.13	19.3	0
D1	0	13.4	6.34	0	15.5	9.97	34.1	12.3	12.4	0	12	10.2	1.48	0.66	0	0	0	247	12.2	1.62	57.9	6.86	34.7	0
D2	0	0	7.58	0	6.81	7.92	35.4	8.58	9.1	0	0	9.59	0	0	0	0	0	143	0	4.59	66.1	0	19.9	0
D2	0	0	11	4.95	10.8	6.37	39.9	19.1	13.2	10.3	9.9	11.8	0	0	0	0	31.1	156	0	7.16	75.6	1.88	22.8	0
D2	3.27	0	3.89	0	15.5	3.96	11.7	7.56	0	0	6.46	7.83	0	0	0	0	4.13	112	22	10.3	39.3	0	5.6	0
D2	0	0	3.62	0	5.16	0	14	8.71	0	0	11	0	0	0	6.16	0	0	189	36.9	0	47.2	0	9.78	0
D3	0	0	0	1.41	26.6	8.45	32.4	22.8	11.6	0	0	50	0	0	0	6.74	0	159	0	3.98	33.2	1.52	32.1	11.6
D3	1.57	0	6.5	0	7.6	7.73	28.5	13.3	7.44	10.8	6.26	7.25	2.99	18.57	0	0	0	145	13.2	3.21	63.6	4.24	25.3	0
D3	0	8.59	6.71	16.1	6.69	9.54	28.8	6.24	12.7	0	21.4	12.7	0	0	3.21	0	0	170	21.5	3.25	60.5	5.22	19.4	13.9
D3	0	11.9	3.52	0	7.84	6.75	31.6	11.9	0	0	4.28	27.9	5.77	0	0	0	0	160	5.99	3.86	57.9	1.6	19.9	0
D4	2.92	6.81	3.21	2.91	19.8	6.84	30	14.5	8.09	15.1	13.7	25.7	2.18	0	4.26	3.53	15.1	142	3.97	3.22	22.6	2.72	19.2	6.31
D4	0	0	0	0	18.7	5.63	31.8	13.5	7.98	0	6.01	7.79	0	0	0	0	0	143	13.4	3.99	58.1	8.5	18.3	26
D4	0	0	3.62	0	8.53	4.15	19.5	11	3.23	0	5.37	6.16	1.76	0	0	7.33	0	155	19.3	0	50.6	10.8	16.9	24.5
D4	0	0	2.86	20.3	16.7	5.93	20.1	11.3	5.07	7.17	0	7.54	0	0	0	0	0	121	23.9	1.22	53.9	7.06	16.9	11.7
A	0	8.37	4.11	4	26.6	9.16	34.1	0	11.8	0	4.14	7.48	0	0	0	0	0	196	4.56	4.03	0	3.17	27.8	0
A	2.83	0	0	4.71	22.2	10.2	31.1	6.14	13.5	0	0	35.8	2.22	0	0	0	13.5	194	6.17	3.02	49.9	2.39	19.1	22.5
A	0	8.62	10.8	0	20.4	5.35	28.8	17.2	11.4	12	14.1	14.7	4	0	0	0	0	130	3.94	6.24	65	3.69	23.6	0
A	0	28.2	7.73	13.1	14.4	5.51	24.8	9.59	8.48	19.9	11.9	6.68	1.42	0	0	0	0	145	30.2	3.65	55.9	2.85	16	37.3
B1	3.16	2.6	8.85	4.81	22.9	6.31	29.8	9.38	9	0	0	8.91	2.86	0	3.33	5.04	15	110	11.4	4.45	73.5	5.58	0	0
B1	2.02	7.06	3.57	3.56	12	5.38	12.1	5.2	4.36	0	16	13.9	1.04	0	0	0	0	80.2	10.4	2.01	65.4	0	14.9	0
B1	0	10	2.71	0	0	5.48	11.9	9.61	0	0	6.08	2.22	2.15	0	0	0	10.2	136	92.5	0	36.7	0	20.1	0
B1	5.28	0	6.89	0	29.2	6.71	29.2	16.3	13.2	0	0	19.4	4.53	0	0	0	0	197	7.04	4.72	54.3	0	24.9	0
B2	0	10.1	4.91	0	13.1	6.58	38.1	0	18.5	0	0	23.8	0	0	0	0	0	129	3.31	4.01	61.5	0	24.8	0
B2	4.14	18.6	5.21	0	9.96	7.88	50.6	17.5	17	0	4.63	0	3.71	0	0	0	0	103	9.68	4.22	58.7	0	23.9	0
B2	1.49	14.4	5.43	0	17.5	9.24	41.6	0	14.4	5.82	3.99	37.9	0	0	3.9	0	0	180	3.24	5.89	38.6	5.9	34.1	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4447	4451	4456	4473	4474	4475	4476	4482	4483	4495	4506	4508	4509	4510	4512	4513	4528	4544	4545	4555	4556	4565	4566	4570
D0	0	5.58	46	21.6	0	0	0	8.09	15.1	0	28.2	198	0	40	20.6	74.8	17.1	0	9.73	0	8.59	11.5	13.3	67
D0	0	9.01	56.7	0	0	0	0	11.3	0	0	0	186	0	135	53.3	151	22.1	0	6.79	4.66	9.26	0	6.99	34.3
D0	0	9.71	67.1	21.7	5.93	11.6	8.82	12.2	0	16.1	0	214	0	77.3	32.5	83.5	15.9	0	5.45	8.35	10.7	13	14.1	65.7
D0	0	7.48	53	0	0	0	14.2	14.3	0	0	0	190	2.65	145	23.4	224	23.5	0	7.22	7.34	7.76	0	13.8	38.4
D1	0	0	0	19.7	12.2	0	0	9.73	0	0	0	253	0	146	37.1	129	24.9	2.92	5.8	0	0	4.59	9.99	51.7
D1	0	7.21	28	0	0	0	0	10.3	6.41	19.3	5.23	186	0	103	28.2	236	12.5	0	9.98	0	10.6	0	10.1	74
D1	3.89	5.86	83.4	12.6	0	0	0	12.1	0	0	0	187	0	84	44.9	153	26.9	4.76	7.48	4.03	8.04	10	7.31	71.7
D2	1.44	0	66.4	8.48	0	37.3	35.2	15.3	9.34	0	20.3	151	10.1	67.9	95.4	103	43.4	32.4	7.65	11	4.89	8.87	12.9	58.3
D2	0	6.26	0	23.7	22.9	0	24.5	20.9	35.4	0	0	257	0	51.2	28.6	91.9	55.5	0	6.67	13.4	4.44	0	13	45.7
D2	18.1	9.19	0	0	0	0	0	3.49	0	0	0	125	0	111	62.8	51.5	11.8	0	0	0	14.1	0	5.22	38.8
D2	0	5.05	42.3	0	15.5	0	16.8	8.43	0	0	0	197	0	189	12.7	127	0	17.8	12.3	0	12.6	0	10.3	35.3
D3	0	7.59	37.7	0	0	0	12.4	11.1	22.9	0	0	74.5	4.45	193	25.5	167	27.1	10.2	4.91	9.07	8.55	7.36	10.9	50.6
D3	0	9.91	58.6	0	0	21.3	0	15	0	23.7	0	185	0	121	24.6	144	13.8	9.41	3.21	8.95	13.4	0	10.8	40.8
D3	0	12	75.8	0	0	0	0	13.6	17	0	19.4	116	0	56.8	37.2	62.6	24.6	2.25	6.19	6.95	17.8	0	15.8	41.5
D3	0	0	65.5	11.5	0	19.5	34.9	8.26	15.9	0	0	197	0	76.8	89.7	194	10.9	4.57	5.25	10.1	5.11	0	6.47	49.7
D4	9.49	6.09	29.7	14.4	8.1	3.68	8.89	14.1	6.07	5.73	3.27	170	3.46	79.9	20.2	60.2	51.4	3.14	4.78	7.78	14.8	13.9	15.4	29.2
D4	0	9.12	80.2	16.2	10.9	15.1	0	9.81	0	7.27	0	263	0	29.1	18.2	63.6	38	5.1	11.1	5.85	7.52	0	9	48
D4	0	9.81	52.4	20.1	9.65	0	0	11.2	0	0	0	141	0	71.5	15.8	74.1	26.4	6.73	4.61	2.75	7.93	13.6	9.21	31.3
D4	0	23.5	43.6	0	7.62	0	0	13.9	0	0	0	215	0	22.1	23	65.3	23.8	0	9.65	3.33	8.34	4.67	6.04	40.5
A	0	0	0	26.3	0	7.57	25.4	18.6	0	0	0	144	0	23.9	45.4	79.1	26.2	0	11.3	6.33	34.4	7.44	13.2	39.6
A	0	0	18	34.1	35.2	0	0	17.7	0	0	0	201	0	188	117	123	25.7	0	7.49	14.7	28.9	6.97	13.8	31.9
A	0	8.91	71.5	19.6	0	0	0	9.24	0	0	0	218	13.5	109	19.7	105	34.5	9.61	9.35	2.44	28.3	6.44	11.3	34.1
A	1.63	8.75	73.6	2.32	0	0	0	9.43	0	0	0	174	0	76.7	67.6	125	19.9	7.95	7.36	2.92	8.68	4.07	8.54	27.7
B1	2.74	7.62	0	30.8	0	0	23.5	1.62	12.2	0	0	206	14.5	140	19.8	56.8	29.7	0	4.43	10.1	16	0	9.64	26.4
B1	0	4.12	78	15.2	0	0	0	17.1	0	0	0	251	0	301	22	190	9.87	3.15	4.59	21.2	13.8	2.96	7.23	23.9
B1	0	0	26.2	0	0	0	0	1.92	0	0	0	200	0	186	38.6	123	25.6	6.51	4.69	19.2	52.5	0	5.09	25.1
B1	0	9.79	31	13	0	0	0	8.5	0	0	0	214	0	169	23.1	149	48.8	0	4.3	0	8.4	30.1	11.5	64.5
B2	0	5.01	64.6	5.55	0	32	31.3	8.5	0	0	1.76	189	0	169	64.4	206	15.4	0	0	13.7	6.37	9.8	8.09	19.9
B2	0	24.3	28.8	0	30.2	0	25.2	13.1	11.6	0	8.34	138	31.8	29.7	49.2	58.8	16.8	0	6.85	7.21	8.91	0	13.6	31.2
B2	0	6.85	11.9	36.5	0	0	15.1	9.58	0	0	0	135	13	78.8	26.4	156	11.8	9.37	3.26	5.09	6.31	19.7	11.3	50.8

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4572	4573	4574	4575	4576	4578	4580	4582	4587	4591	4592	4593	4594	4595	4596	4597	4598	4599	4601	4603	4604	4606	4607	4608
D0	3.82	4.94	24	9.63	15.7	6.09	22.3	3.7	20	2.39	1.13	17.2	2.38	10.9	2.83	0	0	3.08	5.1	26.8	0	10.3	0	4.03
D0	0	9.89	15.8	6.73	8.56	7.42	0	5.11	6.71	0	2.55	0	0	17.6	0	0	0	0	7.37	33.5	0	7.02	21.4	19
D0	4.2	12.3	16.8	9.68	13.2	10.2	41.4	3.35	14.2	0	11.8	5.07	0	41.5	0	16	0	0	8.76	16.9	0	10.2	14.5	4.18
D0	25.3	7.81	16.2	0	11.1	0	0	3.35	11	0	0	0	0	11.2	0	29.4	0	0	0	32.7	0	6.59	31.7	15.1
D1	11	15.2	19.6	10.7	0	0	19	2.5	14.6	0	7.47	0	0	0	8.91	0	0	5.7	2.82	40.5	0	13.8	9.21	0
D1	6.7	10.6	22.6	8.26	11.6	0	19.3	2.5	14.9	0	5.5	0	0	17.6	0	0	0	0	2.21	12.1	0	9.23	9.11	5.45
D1	0	8.51	15.1	6.19	8.52	12.2	20.9	36.1	0	5.3	5.6	3.34	0	36.5	0	20.8	2.34	3.08	3.08	12.2	0	6.04	24	7.83
D2	8.96	5.58	11.2	3.95	10.3	6.47	18	2.4	6.83	0	6.62	0	0	0	9.12	15.5	0	0	8.59	44.8	7.02	11.6	16	0
D2	0	29	25.3	4.71	9.3	0	31.5	2.7	9.4	0	16.7	0	0	6.52	0	13.3	0	0	0	42.1	0	14.9	12.5	0
D2	0	7.34	2.63	15.1	9.88	0	5.57	3.3	0	0	0	0	0	8.31	12.8	0	43.8	3.25	6.22	7.19	0	5.13	24.6	0
D2	0	0	0	8.35	9.71	11.5	6.02	3.3	4.64	0	44.4	9.12	0	14.1	0	37.2	0	0	0	9.81	59	6.92	30.7	0
D3	8.09	12.7	19.2	10.3	9.22	11.5	34.1	10.6	8.95	0	14.4	5.46	0	16.7	5.41	7.66	18.1	3.16	7.15	38.5	0	16.8	7.84	0
D3	7.05	8.14	18.6	9.81	11.8	14.2	17.9	45.6	11.6	0	5.47	2.65	0	19.9	3.51	0	26.1	5.45	5.97	13	0	10.6	19	16.1
D3	6.98	8.07	9.82	14.1	17.1	0	21.1	50.2	12.6	0	7.55	0	0	42.2	0	0	0	1.8	6.8	25.3	9.95	14.3	3.87	7.77
D3	7.83	16.8	13.7	7.69	18.2	8.55	29	95.8	0	0	7.24	7.62	0	5.87	0	0	0	0	11.7	47.9	4.5	30	21.3	14.5
D4	9.48	14.5	18.4	5.57	12	11	29.3	66.2	6.95	0	8.48	6.38	0	12.5	6.23	1.79	8.5	4.37	15.1	25	15.2	18.4	7.53	5.79
D4	4.8	6.09	18.7	10.7	0	6.99	22.8	25.9	8.41	0	6.92	0	0	44.9	6.03	0	13.6	0	4.68	0	0	11.5	10.6	6.45
D4	2.2	10.1	10.6	6	8.08	19.9	0	2.5	9.11	0	3.44	0	0	9.14	7.12	0	26.5	2.23	4.75	36.3	6.5	27.1	29	
D4	0	4.45	11	6.66	7.12	9.32	13.7	11.6	6.08	0	2.03	0	0	0	9.85	0	24.1	4	2.71	23.7	42.4	4.35	25.1	29.2
A	5.4	11.8	6.73	11.8	7.06	2.78	21.6	7.8	15.6	0	13.6	5.68	0	11.1	0	0	0	0	9.5	31.3	0	13	19.1	3.42
A	14.3	7.01	9.82	10.9	7.91	4.13	28.6	100	11	0	8.95	0	0	16.6	10.1	0	0	5.23	4.52	34.5	0	8.35	0	4.38
A	5.72	8	12.8	11.4	7.61	5.24	27.7	66.3	9.4	0	15.6	6.06	0	9.1	5.65	0	0	3.82	6.91	19	0	12.5	0	6.11
A	1.5	9.14	12.2	9.37	3.01	18.2	20	25.5	11.1	0	4.19	6.77	0	19.4	0	0	23	3.31	3.84	30.8	33.3	10.7	27.1	0
B1	4.23	8.01	10.8	16	9.12	5.19	26.4	73.8	8.66	0	9.79	7	0	0	3.45	0	0	0	9.62	39.5	0	16.7	12.7	15.9
B1	4.58	5.17	6.75	7.07	9.54	0	13.8	1.5	8.85	0	3.05	1.78	0	7.46	8.4	0	19.6	5.19	6.82	34.7	23.2	8.74	1.82	1.88
B1	2.98	6.33	21.9	31.9	8.35	36.9	4.73	3.5	14.3	0	7.89	23.7	0	0	19	0	62.9	0	2.35	0	169	3.98	17.6	160
B1	6.35	0	0	6.38	10.5	0	17.8	3.5	4.62	0	7.94	3.94	0	10.9	8.72	0	7.79	0	5.29	32.3	0	13.8	25.2	6.2
B2	0	14.3	4.35	10.6	4.57	0	28.9	1.5	14.3	0	12.7	0	0	15.1	0	6.29	0	0	0	30.7	0	13.3	0	3.74
B2	5.71	16	17.6	8.25	8.48	21.7	34	1.5	12.9	0	15.9	6.25	0	59.2	0	0	0	0	0	0	0	15.8	14.2	5.89
B2	4.67	10.7	0	19.2	13.4	9.25	0	3.5	6.84	0	15.7	0	0	37.8	8.61	7.95	0	4.46	1.78	57.3	0	11.5	0	3.51

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																							
	4609	4610	4611	4612	4613	4615	4617	4621	4622	4623	4624	4625	4627	4628	4630	4631	4632	4633	4634	4635	4636	4640	4641	4642
D0	0	4.97	3.94	2.78	0	0	22	8.03	0	3.16	0	5.67	0	105	0	34.3	8.81	13.5	88.4	0	17.5	6.27	0	93.8
D0	0	0	0	4.53	4.26	0	3.62	20.6	0	3.98	0	0	0	39.4	0	8.1	15.9	9.97	68.1	0	22.3	21.3	0	77.7
D0	0	5.71	5.22	0	6.22	10	13.7	10.9	0	4.15	0	4.46	0	74.6	19	30.3	6.11	15.4	72.5	0	16.1	33.6	0	94.7
D0	0	0	0	0	19.7	0	0	23.9	0	0	12.8	6.5	0	21.8	0	10.1	21.7	12.1	39.1	0	18.9	0	0	90
D1	0	4.72	3.3	1.72	19.7	3.93	5.67	4.84	0	8.51	0	0	3.06	42.5	16	17.2	0	4.5	96.5	0	8.46	14.8	0	89.1
D1	0	2.87	0	7.69	0	0	3.94	10.1	10.5	5.65	0	0	0	71	0	19.2	14.1	12.7	84.4	0	13	7.74	0	66.9
D1	0	2.32	0	0	7.13	0	0	11.3	0	3.9	0	0	0	50.8	0	0	9.77	12.6	70.3	0	13.9	38.4	2.33	139
D2	0	0	0	2.13	22.9	0	15.3	15	2.45	3.2	0	0	0	46.5	0	6.85	14.1	16.7	89	0	6.1	17.8	0	65.6
D2	0	0	0	0	24	0	10.8	9.59	0	7.83	0	0	0	49.1	0	17.9	10.2	13.8	97.6	0	13.2	0	0	113
D2	0	0	0	13.1	10.6	0	12.9	8.41	0	11.4	0	0	0	15.1	0	9.52	54.1	7.03	26.5	0	0	0	0	102
D2	3.03	0	0	16.3	11.5	0	3.32	42	0	13.2	0	5.11	0	15.7	0	4.81	37.4	0	20.4	0	0	0	0	102
D3	0	0	2.94	2.14	21.3	0	7.14	4.37	0	5.34	0	0	0	58.3	9.28	16.7	6.5	14.8	93	0	32.4	0	0	99.3
D3	0	2.67	0	8.16	7.32	0	4.01	18.8	0	5.16	0	0	5.33	48	0	9.81	22.2	8.54	53.7	0	8.22	4.31	0	84.2
D3	0	5.58	0	15.9	24.1	0	4.89	17	0	5.61	0	0	0	28.5	0	15.8	33.9	12.6	67	0	17.6	15.3	0	67.1
D3	0	0	0	0	26.3	3.76	8.79	13.9	11.5	8.39	0	0	0	39.5	0	1.83	0	20.4	52.7	0	12.4	11	0	84.1
D4	4.57	3.82	3.18	47.6	20.1	5.41	7.27	5.72	1.84	3.56	2.99	2.02	2.36	47.2	5.68	19.2	10.5	9.33	76.4	0	7.03	7.7	4.25	24.8
D4	0	0	8.84	10.9	0	0	11.6	8.95	0	4.91	0	0	3.57	68.8	0	17.4	14.2	18.2	85.1	0	18.7	0	0	75.2
D4	0	0	0	26.3	9.57	0	5.35	23.1	0	8.57	7.63	0	6.68	14.9	0	6.03	26.2	6.02	40.2	0	27.4	19.1	0	78.9
D4	0	0	0	16	5.05	0	4	18.3	0	3.13	0	0	0	48.1	0	5.91	28.5	0	46.7	0	9.18	22.2	0	75
A	0	0	2.09	0	22.8	0	14.7	6.15	0	0	0	0	0	49.5	0	19.5	15	10.8	74.7	0	5.49	5.62	0	112
A	4.5	2.39	5.92	140	28.5	0	6.87	7.46	0	6.11	0	0	0	59.5	0	17.4	11.4	14.3	0.01	0	8.26	12	19	95.1
A	0	0	7.27	0	23.2	0	11.3	11	0	6.57	0	0	7	31.6	8.63	21.7	16.7	14.7	73.3	0	13.4	5.04	0	69.2
A	0	2.79	0	3.89	20.3	0	5.74	19.5	1.35	7.43	5.64	0	0	44.4	0	13.9	18.1	10.8	66.5	0	12	4.57	0	101
B1	0	0	0	5.22	9.61	0	14.9	14	0	3.69	0	0	0	62.8	0	11.8	13	13	68.2	0	11.8	16	0	62.8
B1	0	3.38	0	3.58	2.46	0	4.24	34.4	0	4.65	0	11.8	0	0	0	0	16.4	6.31	34.2	0	18.4	0	0	58.6
B1	0	0	0	4.85	7.71	0	2.8	0	3.97	0	0	0	0	9.97	0	3.68	24.2	3.6	11.6	0	95.2	49.5	0	64.8
B1	0	0	5.09	5.65	9.13	6.34	15.6	7.95	0	6.13	7.35	0	0	78	0	33.9	0	12.9	102	0	22.6	0	0	94.8
B2	0	0	3.01	0	5.86	0	23.5	5.11	0	4.76	0	0	0	67.2	0	20.1	6.7	13.1	62.7	0	10.6	0	0	127
B2	0	0	0	3.04	32.1	0	39	14.2	11.4	3.03	0	0	0	53.2	0	22.8	11.6	17	57.8	0	8.86	0	16	130
B2	0	9.88	4.2	0	0	0	17.3	4.2	0	5.96	0	3.32	0	64.4	0	25.7	0	29.5	75.5	0	19.8	0	7.45	56.1

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4643	4646	4648	4652	4654	4656	4657	4658	4664	4666	4667	4668	ID	4670	4672	4677	4678	4679	4682	4683	4684	4685	4689	4690
D0	8.09	8.8	52.9	4.25	60.8	6.92	0	15.7	67.7	16.2	0	0	32.4	39.2	4.74	0	0	16.2	0	0	18	11.9	0	0
D0	3.35	0	11.8	0	28.8	12.7	19.1	6.68	32.5	0	27.7	0	33.4	14.3	15.6	18.2	2.19	6.29	6.24	0	13.3	0	0	0
D0	8.77	0	47.2	0	49.1	9.25	0	0	44.3	8.89	0	0	33.4	16	3.8	18.1	3.97	22.1	5.79	0	15.6	4.37	10.5	0
D0	0	0	20.1	0	27.1	16.7	28.1	12.3	41.8	0	0	0	20.5	11.6	31.7	48.2	39.8	0	0	3.34	0	20.8	26.7	19.5
D1	5.83	0	42.5	11.2	29.2	16.8	0	0	30.1	8.62	0	0	20.5	11.5	23.8	8.63	34.2	4.42	14.9	3.37	0	11	5.75	3.89
D1	8.98	6.02	19.8	0	52.6	13.1	11	10.7	46.3	18.9	0	5.08	20.5	0	22.9	0	15.3	3.64	6.28	0	0	14.4	7.77	0
D1	2.08	19.9	38.8	0	53.5	16.2	0	42.6	54.6	7.06	0	0	20.5	0	36.4	4.79	26	11.9	10.3	0	1.66	10.7	6.8	0
D2	7.69	0	19.3	0	22.8	10.9	4.34	13.6	32.6	13.5	36.8	0	20.5	3.4	33.1	8.56	11.4	2.8	23.6	0	0	5.86	0	5.1
D2	13.1	0	35.8	0	30.1	11.2	0	0	48.3	0	0	0	20.5	0	26.5	0	16.4	2.61	7.2	0	0	11.3	0	0
D2	0	18.2	0	0	29.6	36.6	30.7	19.9	4.33	0	37.1	0	20.5	36.1	72.2	0	25.6	0	16	9.4	0	28.9	7.94	32.4
D2	0	0	13.1	0	5.74	11.1	39.1	0	37.8	0	0	0	20.5	25.3	33.3	23.1	0	0	5.96	7.48	0	29.2	2.66	34.5
D3	7.18	0	18.8	0	59.5	10.8	7.84	0	48.6	0	3.56	0	20.5	12.2	14.5	1.37	6.31	18.8	8.12	1.7	0	17.8	3.41	0
D3	6.3	0	32.3	6.17	34.3	13.9	0	7.74	30.8	36.9	0	0	20.5	24.9	38.4	12	14.5	0	11.2	3.28	0	0	3.91	0
D3	4.68	0	28	0	30.9	20.7	3.66	0	38.5	26.1	6.22	6.61	20.5	0	33.1	6.19	0	0	10.5	6.42	5.7	14	7.65	9.88
D3	14.2	0	23	0	58.4	0	11.6	16.4	0	6.73	0	0	20.5	7.75	23.1	3.08	22.5	5.17	7.63	13.3	0	9.8	0	0
D4	6.29	4.06	32.5	4.39	32.7	10.5	6.86	6.82	14.1	7.82	3.38	6.04	20.5	7.64	11.1	4.15	6.99	1.26	13	4.46	2.82	12	4.18	15.6
D4	5.45	0	37.2	4.06	23.5	9.31	0	0	35.6	22.2	0	0	20.5	9.74	46.9	5.1	26.3	4.78	21.4	4.98	0	0	6.34	0
D4	0	0	20.3	0	24.5	12.5	7.05	0	35.4	13.5	12.2	6.67	20.5	34.7	23.7	9.94	5.23	4.93	10.2	8.52	0	24.5	9.94	19.2
D4	0	0	20.6	0	21.9	16.4	0	0	49.9	0	0	11.5	20.5	17.1	0	0	12.3	0	13.2	2.94	0	24.1	0	16.6
A	8.26	0	23.2	3.65	52.3	13	5.19	18.4	0	52.4	0	0	20.5	0	0	5.44	23.9	0	19.4	7.91	0	9.13	6.83	0
A	1.54	0	37.3	0	46.4	7.44	0	0	54.6	17.1	17.7	0	20.5	5.74	69.7	4.66	30.7	0	7.63	3.49	0	0	4.1	0
A	2.33	3.72	38.1	0	20.5	6.74	16	9.62	0	0	26.3	2.59	20.5	14.3	0	4.75	16.8	6.87	18.6	0	0	19.7	17.9	13.4
B1	3.78	0	42.8	0	46.3	10.3	0	0	0	0	20.5	0	20.5	0	16	3.07	13	4.21	7.76	13.2	0	40.2	4.51	0
B1	3.43	7.36	7.11	2.76	34.4	11.7	24	6.77	46.7	0	0	0	20.5	9.69	31.3	17.6	7.31	0	6.65	21.8	0	11.6	0	0
B1	1.1	18.2	3.85	22.3	38.5	15.4	11.4	6.13	0	18.1	0	0	20.5	32.3	25.5	12.7	12.7	0	14	79.2	0	18.2	24.8	19.9
B1	5.43	0	47.2	0	45.4	11.7	0	0	50.9	0	0	0	20.5	0	0	3.15	8.6	0	9.69	0	0	12.2	3.7	0
B2	12.6	0	35.8	0	36.6	16.1	0	0	47.6	0	0	0	20.5	0	0	0	9.43	0	17.3	6.72	0	0	3.78	0
B2	13	22.1	38	0	59.2	10.5	0	10.9	37.6	12.3	0	0	20.5	0	0	14.4	23.2	0	8.87	0	0	9.6	12.1	0
B2	6.13	0	54	0	46.6	10.9	6.15	21.2	9.96	0	0	0	20.5	0	43.7	6.2	11.6	9.05	19	0	0	15.5	5.99	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																							
	4692	4696	4697	4699	4702	4703	4706	4708	4709	4710	4712	4713	4714	4717	4718	4719	4720	4721	4722	4723	4724	4725	4728	4729
D0	0	0	56.3	227	45.2	0	55.2	10.5	0	4.31	17.9	5.95	7.75	0	5.99	0	3.7	10	0	7.08	3.51	33	3.15	0
D0	0	0	40.5	130	14.6	0	34	15.8	0	0	15.5	2.11	5.04	5.78	17.5	0	0	11.5	0	28.2	4.35	11.9	5.47	0
D0	0	0	70.9	108	0	0	48.6	8.55	0	2.98	14	1.63	9.33	0	10.3	0	2.02	16.3	0	14.3	2.97	20.9	3.15	0
D0	0	0	53.6	336	39.3	0	31.4	8.31	0	0	27.2	0	3.77	10.7	27.1	0	0	12.4	0	0	0	7.42	0	0
D1	0	0	55.1	287	0	0	38.4	5.26	0	0	14.3	6.66	8.34	1.66	9.24	0	2.99	5.34	0	15.1	0	22.8	3.35	0
D1	0	0	40.3	341	29.8	0	45.8	11.6	0	2.11	15.3	5.16	0	0	6.39	0	0	0	0	7.79	5.84	20.7	8.2	0
D1	0	46.8	65	371	0	0	33.3	12.2	0	0	24.2	2.7	4.33	4.76	13.2	0	3.28	3.22	0	17.5	3.37	14.4	3.54	0
D2	0	0	48.4	143	0	0	44.8	0	13.5	0	43.6	4.15	5.01	2.32	12.7	0	0	0	0	14.1	3.97	18.7	9.99	0
D2	0	0	80.6	302	0	0	57.9	0	0	0	0	8.52	5.49	0	8.68	0	0	14.1	0	6.46	4.16	24.7	14	0
D2	0	0	57.6	212	16.6	0	39.2	24.7	0	0	40.7	5.99	4.1	0	8.26	0	26.6	14.5	0	59.3	6.06	12.1	10.4	0
D2	0	14	39.2	285	43	0	28.2	38	0	0	40.6	3.92	0	11.8	10.2	0	0	0	11.7	0	0	7.39	0	0
D3	0	6.77	82.2	231	0	0	35.7	5.53	0	1.46	13.7	0	2.74	0	5.65	0	0	8.49	0	4.94	4.91	23.7	1.72	0
D3	0	7.69	52	175	0	0	26.4	18.8	0	0	12.5	4.24	0	2.1	5.72	10.8	2.19	14.3	0	15.7	2.91	12.3	6.31	0
D3	4.46	4.63	46	207	0	0	30.9	12.3	0	2.05	0	4.05	3.78	0	9.41	0	3.81	6.13	0	6.09	6.97	24.3	2.1	14.6
D3	0	0	60	217	0	0	29.5	5.66	0	0	19.1	2.72	6.31	0	12.7	0	0	0	0	18.4	4.97	16.9	0	0
D4	4.5	4.78	43.5	223	7.39	5.89	38.2	8.66	4.6	2.12	25.3	4.05	3.94	5.31	6.61	9.03	2.22	9.88	3.69	8.69	4.72	27.4	10.3	4.53
D4	0	0	69.5	257	0	0	40.9	13.2	0	0	11.7	6.38	4.03	1.07	7.94	0	4.8	16.9	0	7.99	35.3	19.6	0	12.1
D4	0	0	58.5	144	48	0	33.3	16.7	0	0	25.9	2.88	3.13	0	10.2	0	7.88	21.4	0	21.9	3.29	16.4	2.6	0
D4	0	0	54.8	264	45.1	0	34.3	23.7	17.4	0	18.6	3.11	3.88	5.99	4.69	0	3.62	10.8	0	12.5	6.52	10.7	5.39	29.2
A	0	0	66.9	229	0	0	31.2	5.96	0	2.76	14.8	8.34	0	0	5.75	0	4.8	15.9	0	3	5.9	29.7	7.65	0
A	0	0	66.7	20.9	4.51	0	30.8	0	0	2.75	0	4.01	6.66	4.42	6.06	0	0	5.95	0	6.24	5.56	27.7	0	0
A	0	0	64.3	67.8	0	3.3	29.3	11.8	0	2.21	10.1	3.22	3.94	0	8.19	0	2.64	19.2	0	7.01	5.68	19.1	7.6	0
A	6.08	0	37.4	161	0	0	30	18.8	0	0	19.7	3.43	5.27	3.67	12.2	0	0	17.6	0	24.1	4.78	12.7	5.15	0
B1	0	0	36.3	270	0	0	22	19.9	0	3.14	0	4.3	5.74	3.52	11.6	0	10	17.2	0	10.8	5.09	23.1	11.3	0
B1	0	0	30.8	396	24	4.9	34.4	12.3	0	1.29	12.2	0	4.4	0	7.76	0	2.68	0	0	30.8	5.36	9.2	4.11	0
B1	11.7	0	31.7	242	56.3	0	46.9	34.7	0	0	28.4	0	0	4.81	15.2	0	5.99	20.4	0	0	0	8.06	0	0
B1	0	0	85.6	429	0	0	43.6	0	0	2.32	0	4.49	5.96	0	6.34	0	0	0	15.9	0	4.69	43.5	11.7	0
B2	0	0	33.4	240	17.3	0	26.9	0	0	0	7.56	0	3.14	0	5.93	0	2.62	0	11.7	4.82	0	14.1	7.14	0
B2	0	13.7	39.2	250	0	0	27.6	0	0	0	16.7	0	5.11	0	8.15	0	1.73	11.3	0	12.9	5.39	25.2	10.4	0
B2	0	0	68.8	143	0	0	41.8	6.24	0	1.87	18.2	6.29	6.19	0	4.6	0	5.31	28.5	0	4.47	4.81	39	1.65	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4730	4732	4735	4738	4739	4740	4741	4742	4747	4750	4754	4755	ID	4755	4757	4762	4763	4764	4768	4771	4773	4774	4776	4777	4778
D0	11.3	7.55	4.91	6.31	7.05	5.28	13.4	1.06	5.45	5.27	0	0	4755	2.69	0	5.84	43.8	5.43	0	6.4	0	0	11.2	0	13.9
D0	6.24	0	14.3	11.8	3.21	0	9.4	0	4.15	2.43	0	0	4755	0	2.53	4.76	0	9.47	0	0	0	0	7.43	7.8	10.7
D0	3.65	7.95	18.2	11.2	8.3	1.43	10.9	0	4.95	2.56	0	0	4755	4.96	2.96	9.54	53.9	3.97	14.7	0	0	0	14.7	3.24	6.03
D0	15	11.5	0	0	0	5.34	36.9	0	16.3	0	0	0	4755	0	0	3.58	13.7	5.12	0	0	0	0	16	0	7.25
D1	3.55	10.5	0	9.39	6.69	1.54	13.9	0	0	2.6	0	0	4755	0	0	5.16	27	3.55	0	0	0	0	11.7	0	11.6
D1	6.47	16	36.6	7.3	4.81	2.84	7.77	0	3.84	3.88	0	0	4755	4.38	0	3.1	29.4	2.72	0	0	0	0	9.45	16.9	16.7
D1	8.23	3.46	9.82	7.81	5.08	3.52	0	0	4.12	1.89	0	0	4755	0	4.61	4.51	31.7	4.01	0	0	0	0	9.25	0	6.4
D2	8.5	7.86	0	6.15	10.2	0	11.7	0	5.27	3.43	0	0	4755	3.35	0	0	26.3	3.19	0	0	0	0	3.24	0	6.32
D2	0	11.2	0	5.99	7.87	0	12.5	0	4.02	3.7	0	0	4755	0	0	5.19	33.6	5.26	0	0	0	10.2	9.66	11.7	
D2	26.7	0	42.3	22.3	3.51	0	0	21.5	0	0	0	0	4755	0	2.12	10.9	10.3	7.49	0	7.94	0	8.89	3.09	14.3	
D2	35.5	0	31.7	0	1.84	3.38	77.6	35.6	0	0	0	0	4755	0	0	8.54	4.53	10.3	0	8.12	0	0	12.9	12.5	
D3	0	0	16	5.5	9.99	0	7.34	0	6.01	1.84	0	0	4755	1.77	0	2.08	48.9	3.91	0	0	0	18.1	1.78	17.9	
D3	14.2	4.38	15	9.28	5.33	0	8.47	24.8	0	3.83	0	0	4755	0	0	0	27	4.35	0	10.3	0	2.73	0	25.5	
D3	0	0	5.33	6.9	10.6	0	9.2	31.7	0	4.65	0	16.5	4755	4.58	0	2.63	18.4	4.97	0	8.59	19.8	7.89	6.81	26.5	
D3	5.22	0	0	10.9	2.53	4.35	4.69	0	3.73	2.1	0	0	4755	5.99	0	10.9	38.8	3.87	0	0	0	13.1	0	11	
D4	9.52	11.2	27.4	6.47	3.93	1.88	10	17.3	3.9	1.97	2.58	1.76	4755	3.68	1.85	6.9	32.7	5.7	3.29	2.69	5.74	18	4.49	27.2	
D4	12.6	0	0	5.56	7.16	2.03	7.24	34.2	2.55	4.62	0	0	4755	3.67	10.6	8.62	31.6	4.02	0	13	26.9	2.54	0	10.3	
D4	27.4	0	10.3	10.1	0	0	5.12	19.2	2.51	1.75	0	0	4755	0	0	8.96	14.7	6.35	5.31	0	17.7	0	9.66	20.5	
D4	22.6	0	3.07	7.37	6.23	2.45	6.47	31.1	0	1.46	16.8	11.3	4755	0	8.99	1.3	17.7	2.7	4.91	7.68	38.8	0	12.8	12.9	
A	0	11	48.3	3.41	4.49	18.8	8.96	0	1.98	2.16	0	0	4755	3.45	3.92	8.41	40.6	3.48	0	0	0	18.6	0	25	
A	3.38	4.01	65.5	5.52	13.2	0	10.4	0	3.27	3.08	0	0	4755	2.74	0	8.21	34.6	0	0	0	0	15.7	3.74	10.8	
A	6.79	3.67	28.5	6.96	7.76	0	7.88	0	2.62	3.25	0	0	4755	0	2.31	5.43	34.6	9.13	0	2.04	0	10.5	0	5.34	
A	11.5	15.1	13.8	10.2	1.88	1.9	8.56	18.1	2.35	1.48	0	0	4755	0	0	7.83	13.5	3.16	0	5.02	0	3.06	0	10.5	
B1	0	6.72	24.5	0	4.88	2.11	10.8	0	0	2.35	0	0	4755	5.99	2.62	3.33	33.6	2.01	4.02	0	1.91	0	8.72	0	14.2
B1	8.22	4.37	111	12.8	4.36	12.5	11.2	0	0	0	0	0	4755	2.75	8.83	2.9	11.6	2.52	0	6.52	0	2.71	4.68	10.2	
B1	20.2	13.9	63.5	31.6	0	2.48	71.1	0	0	0	0	0	4755	0	0	5.86	5.2	22.2	0	6.52	0	0	11.8	19	
B1	0	0	0	5.76	6.01	0	9.57	0	0	4.47	0	0	4755	0	0	13	41.5	0	0	0	0	15.3	0	6.08	
B2	0	0	25	3.4	3.13	0	0	3.33	0	0	0	0	4755	0	4.48	0	33.9	0	0	0	0	21.9	0	17.5	
B2	8.61	5.58	12	8.26	5.69	0	14.1	0	3.9	3.19	0	0	4755	0	0	7.82	31.7	3.37	0	0	0	18.8	0	19	
B2	9.48	7.51	0	7.01	9.93	0	10.9	0	2.95	2.22	0	0	4755	4.19	0	3.98	55.5	3.98	0	0	0	15.7	0	12.1	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4779	4780	4782	4783	4784	4785	4787	4788	4790	4792	4795	4797	4802	4807	4808	4810	4817	4820	4822	4823	4824	4827	4828	4832	
D0	140	532	0	6.3	44.7	4.69	8.88	13.4	0	0	9.18	13.9	6.96	111	0	0	0	0	27.6	0	7.55	8.14	43.8	0	
D0	33.9	159	0	3.43	16.3	2.39	5.87	23.7	0	0	4.88	16.5	5.64	222	16.8	0	0	0	34	0	0	0	16.7	0	
D0	138	29.5	0	9.43	56.6	3.42	31.8	0	0	0	8.94	0	11.7	127	0	0	0	0	36.1	3.68	0	0	24.9	0	
D0	15.4	7.5	0	4.2	58.7	0	5.25	0	0	0	7.67	29.1	5.84	268	0	0	0	0	17.8	0	0	8.45	29.1	0	
D1	157	13	5.22	3.58	20.7	0	4.12	3.25	0	0	5.53	28.4	8.27	193	0	0	0	0	6.99	2.7	0	11.7	53.9	0	
D1	141	12	0	4.16	21.1	4.38	6.55	8.15	0	8.41	5.9	8.09	5.97	117	6.24	0	0	0	39.8	2.26	0	4.23	10.9	0	
D1	105	33.5	0	9.73	27.6	3.09	3.97	10.1	0	0	10.7	6.57	8.64	203	0	0	0	0	24.5	3.13	0	11	15.9	0	
D2	118	7.69	0	6.85	22.8	0	7.33	0	0	0	7.51	33.1	10.5	190	0	10.7	10.8	0	0	4.38	0	0	12.1	0	
D2	221	38.7	0	0	48.5	0	10.8	0	0	0	8.73	11.2	7.78	182	13.5	0	0	0	35.5	3.34	0	0	9.38	0	
D2	11.4	7.9	5.04	9.57	22.8	4.51	1.82	33.5	0	18.4	8.73	0	6.23	238	0	0	5.64	0	21.5	16.7	6.12	10.5	11.7	7.65	
D2	3.13	10	8.66	0	17.3	0	4.01	52.7	0	0	3.71	0	5.46	292	22	4.03	0	0	31.1	0	15.9	18.1	31.4	0	
D3	220	15.5	0	0	39.9	2.14	9.02	0	0	0	11.1	0	8.75	97.6	11.1	6.65	0	0	42	0	0	4.03	6.05	0	
D3	66.3	53	0	3.95	33.2	3.32	6.75	28.2	0	0	7.28	10.4	10.7	163	12.9	0	0	0	125	27.2	5.03	0	7.87	33.9	0
D3	155	13.2	5.99	6.92	40.9	10.9	5.73	0	0	0	9.08	0	14.5	153	7.73	0	0	0	153	37.9	1.76	0	4.63	13.7	0
D3	135	15.5	0	4.78	26.5	0	5.23	10.9	0	0	8.4	32	6.39	174	0	0	0	0	53.5	5.39	6.07	0	6.15	9.24	0
D4	116	5.7	3.66	7.57	44.1	3.3	14.4	12.7	6.58	40.2	14	11.9	11.1	63.9	13.3	4.96	4.47	0	13.9	38.6	1.18	4.57	5.14	2.42	3.89
D4	99.1	2.1	2.07	10.6	51.7	0	6.58	18.9	33.4	0	9.08	19.9	11.2	154	5.29	0	0	5.93	17	1.79	0	0	8.62	9.2	
D4	29	2.57	0	9.78	82.3	5.79	5.34	0	0	119	12.1	0	12.9	192	23.5	0	8.45	0	173	13.5	1.89	0	13.6	0	
D4	20.4	1.58	0	4.4	36.9	4.74	5.24	46	23	38.1	11.6	0	11.3	186	0	0	0	5.69	48.5	3.47	0	13.6	8.56	0	
A	328	39.6	0	7.62	40.6	7.07	15.4	0	0	0	9.04	9.07	6.91	38.6	22.7	0	0	0	0	65.5	1.58	0	0	0	0
A	185	15.3	0	10.7	26.6	8.07	14.8	0	0	0	12.5	0	11.4	94.9	10.6	0	0	5.09	61.2	6.03	0	0	0	0	
A	174	23.3	2.35	11	78.4	2.79	9.21	2.71	0	0	14	16.7	8.54	90.5	0	0	0	0	24.7	0	0	0	12	0	
A	57.7	13.9	0	5.5	23.5	0	4.55	0	0	20	7.13	0	5.72	208	26.5	0	7.52	5.66	38.2	3.05	0	14.6	11.4	0	
B1	159	16.2	0	13	36.7	3.31	8.79	0	0	0	13.2	24.7	24.4	159	7.06	0	0	0	32.3	3.71	0	8.72	21.1	0	
B1	76.3	6.1	2.04	11.4	17.6	0	3.82	10.5	0	15	4.86	9.72	4.12	225	18	0	0	0	39.4	3.19	0	2.48	13.5	0	
B1	8.53	23.3	0	29.8	48.2	5.84	2.31	27.1	0	86.6	3.99	0	6.59	212	0	0	0	0	8.02	0	8.28	0	23.6	6.32	
B1	347	22.1	0	9.43	62.4	5.34	21.8	0	0	0	8.9	26.5	6.84	65.6	0	0	0	0	29.2	0	0	0	0	0	
B2	263	22.6	5.11	0	38.2	0	4.52	0	0	0	5.24	0	0	73	13.4	0	4.87	0	31	0	0	4.85	0	0	
B2	212	23.3	0	0	34.9	5.69	7.54	5.21	0	0	8.79	13	8.8	121	15.1	0	9.78	0	37.3	5.06	0	6.42	12.6	0	
B2	177	19.3	0	13	64.2	4.78	9.37	0	0	0	11.1	9.76	8.34	107	18.6	6.58	0	0	31.2	0	0	7.71	13	0	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4833	4835	4836	4837	4838	4839	4840	4841	4842	4843	4845	4848	4849	4851	4854	4855	4859	4860	4862	4863	4864	4867	4872	4876
D0	2.93	25.7	15.4	0	99.8	7.25	28.5	0	16.6	15.5	0	0	5.81	11.8	17.9	3.04	11.5	13	15.5	13.5	57.2	0	16.2	2.93
D0	0	13.3	12.6	20.7	116	24.9	17	0	17.4	5.57	18.5	0	0	34.3	10	0	9.23	10.2	0	33.4	35.5	8.45	14.6	5.59
D0	3.4	22.6	20.3	0	99.7	9.3	28	0	21.3	2.13	0	12.7	0	11.6	19.4	4.35	6.23	11.6	13.9	7.6	34.4	4.3	15.1	8.01
D0	0	15.4	37.9	14.6	167	18.5	30.5	0	0	2.58	0	0	0	0	17.1	5.4	5.91	13.7	0	54	39.7	0	24.9	2.01
D1	0	14.2	14	9.37	178	13	12.4	15.4	0	1.98	0	0	0	14.3	5.9	5.28	7.76	13	3.2	0	37.5	0	24.2	10.2
D1	4.58	11.7	7.45	0	104	6.59	21.7	0	13.9	8.79	7.2	0	0	5.45	16.4	2.91	31.6	11.7	3.51	12.6	25.7	0	10.9	17.3
D1	4.07	13.6	15.2	9.3	126	13.3	28.3	0	13.2	13.6	0	11.4	0	17	0	3.71	18.5	17.6	19.1	17	30.8	0	23.2	14.1
D2	2.19	10.3	5.55	0	125	6.69	24.5	0	15.8	2.6	12.9	22.2	0	10.7	13.4	4.04	13.9	16.6	22.2	12.1	37.3	0	25.8	21
D2	0	12.3	0	0	133	0	25.4	0	17.6	22.8	0	16	0	8.41	29.8	0	0	14.6	3.7	11.6	32.2	0	16.9	15.2
D2	0	12.4	50.6	30.6	92.7	14.9	26.1	8.05	17.6	18.5	0	0	0	15.4	18.6	0	15.9	13.5	10	56.8	22.3	9.96	7.75	13.9
D2	5.42	6.9	49.4	0	77.9	19	16.1	0	0	1.16	0	0	0	1.87	18.4	0	18	11	1.85	70.3	25.3	5.9	14.6	12.6
D3	3.84	14	5.42	8.83	108	3.02	32.5	0	20.5	20.7	11.4	0	0	7.48	13.1	2.13	8.92	15.7	6.65	2.48	30.1	5.14	10.2	3.44
D3	4.36	17.7	9.85	8.1	110	7.32	23.6	0	12.8	33.6	0	11.1	7.38	9.35	4.24	2.51	14.3	12	8.73	30.4	29	5.39	14.5	35.8
D3	8.5	12.6	4.2	0	114	3.68	4.82	0	14.5	26.1	0	8.59	39.4	6.94	5.23	3.65	9.39	7.59	14.2	20.5	30.7	9.72	11.2	38.6
D3	0	13	13.3	4.96	130	6.4	23.7	9.41	26.1	19.9	14	0	3.3	7.15	12.1	3.86	0	13.7	13.6	0	29.5	5.94	16.2	1.63
D4	5.34	5.13	9.37	6.33	77.5	9.95	21.7	3.01	17	11.5	7.86	3.98	6.23	7.19	13.5	2.59	22.4	15.7	8.8	29.3	20.4	3.01	11.8	12.8
D4	3.12	20.4	9.12	0	116	6.87	31.2	0	10.4	35.4	14.9	18	0	13.2	8.24	2.87	12.4	10.2	7.05	22.4	26.1	3.27	12.2	1.68
D4	5.91	15.6	21.3	23.4	93.6	4.34	27.2	0	11.5	24.4	0	12.6	3.9	20	4.93	11.1	12.1	10.7	13.4	57.2	25.9	9.58	8.61	2.80
D4	6.69	11.5	12.4	0	86.6	17.4	26.2	0	9.13	30.8	8.87	23.6	11.9	18.4	0	0	23.4	10.6	7.16	56.7	25.3	3.47	12.1	1.88
A	4.85	17.6	5.84	0	102	0	16.3	0	10.4	20.4	9.46	0	0	4.69	6.25	2.15	38.5	9.12	1.5	3.37	21.7	8.09	17.9	14.7
A	5.27	8.37	6.69	0	102	0	15.1	0	14.7	24.3	6.44	0	0	6.09	15.3	2.39	48.9	6.43	0.86	7.92	2.15	0	8.26	1.9
A	4.69	22.1	5.25	0	95.8	4.53	24.6	0	16.4	3.7	0	0	9.09	6.47	7.28	2.44	22.2	10.7	0.86	4.79	25.5	8.82	10.9	16.7
A	5.41	14.6	13.6	20.6	115	13	16.8	0	17.5	23.5	8.76	0	0	15.2	21.8	2	12.8	7.11	0	31.1	24.4	8.85	14.7	23.7
B1	4.25	18.1	4.96	5.17	123	5.21	18.5	0	0	21.8	0	0	0	6.93	8.9	4	14.6	10.9	0	14.7	26.9	19.2	16	16.9
B1	3.81	10.8	12.7	4.25	55.1	19.7	10.4	0	15.8	3.4	16.9	0	2.19	4.99	4.68	4.54	17.6	6.22	0	17.2	13.7	12.9	9.64	15.3
B1	8.72	98.3	49.9	13.8	162	28.3	27.1	9.58	0	26.6	2.92	0	0	6.45	15.2	3.66	12	11.8	0	75.1	20.3	25.6	12.8	5.55
B1	3.36	24	0	0	126	0	31.8	0	10.7	3.27	4.25	25	0	11.2	7.86	3.68	0	10.2	0	5.16	27.2	0	16.4	3.38
B2	3.8	18.6	0	0	161	0	10.8	0	9.32	1.3	5.8	0	5.01	3.34	0	4.41	0	0	1.9	3.55	16.8	8.22	13.4	3.05
B2	7.9	22.4	14.6	0	154	5.79	30.4	0	16.6	1.3	0	0	0	7.39	13	6.65	10.6	8.49	0	16.3	24.3	0	18.6	3.3
B2	6.69	35.2	5.42	0	117	0	36	0	12.2	20.5	0	0	0	10.6	0	3.99	6.78	12.5	0	6.38	28.8	6.07	11.8	10.2

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4878	4879	4881	4882	4883	4886	4888	4889	4890	4908	4909	ID	4910	4911	4913	4916	4904	4907	4917	4920	4921	4922	4926	4927	4928
D0	7.85	62.7	0	9.31	10.7	3.34	13.3	10.5	4.99	0	0	6.24	11.1	7.11	19.6	3.2	0	11.7	17.5	50.1	0	25	2.33	13.6	
D0	0	24.6	0	0	6.92	3.65	0	3.74	4.45	0	0	4.1	28	8.17	29.8	0	0	0	11.3	38.5	0	27.7	12.4	6.38	
D0	10.2	31.3	0	6.33	4.75	2.27	11.3	4.4	4.97	4.18	0	6.87	0	10.6	20.2	3.95	0	10.3	10.2	64.8	0	31.5	5.28	8.3	
D0	0	56.9	0	0	22.7	0	0	6.33	0	0	0	9.33	22.2	6.3	26.5	14.4	0	13.3	0	39.9	0	30.9	18.2	0	
D1	0	14.8	7.66	12.3	6.54	4.25	9.23	5.38	4.91	13.9	0	8.36	29.5	9.62	0	2.35	0	9.59	16.2	53.7	0	0	3.43	11.3	
D1	1.88	53.2	0	3.46	3.64	3.75	0	3.05	3.01	0	0	7.66	0	8.08	31.2	11.4	0	0	2.89	38.5	0	28.6	7.05	7.77	
D1	0	0.91	0	11.9	5.28	4.92	7.64	0	5.09	0	0	4.75	27.1	10.2	22.4	6.6	0	10.8	6.56	51.8	0	20.7	10	14.5	
D2	0	63.3	7.08	8.7	6.78	5.38	7.05	6.1	8.66	10.7	0	0	0	13.1	51.6	0	0	13.4	6.44	72.4	0	34.9	3.22	10.6	
D2	0	65.7	0	0	6.28	7.34	0	7.99	6.75	0	0	19.9	0	5.15	35.9	0	0	9.86	6.21	82.8	0	21.4	0	6.32	
D2	9.95	59.8	0	0	4.74	3.17	19.8	10.2	0	0	0	0	36.3	3.87	16.5	44.9	0	8.43	4.78	31.3	0	39	9.88	6.49	
D2	0	19.9	7.67	0	5.58	0	0	0	7.92	0	0	5.06	34.4	5.19	21.9	37.5	0	13	0	30	0	50.3	27.2	19.7	
D3	1.91	54.9	0	4.2	0	4.94	9.45	6.68	2.79	15.7	0	2.1	8.36	0	4.89	22.4	8.86	0	9.51	11.1	67	0	21.5	0	5.2
D3	0	30.6	26.3	5.82	6.35	5	5.08	8.73	4.41	0	0	20	0	23.2	9.58	28.3	0	0	8.93	50.9	0	0	4.04	6.84	
D3	0	6.44	32.5	4.75	3.13	5.12	11.4	11.6	3.54	0	0	9.05	19.9	6.53	56.7	6.86	0	13.3	6.48	69.8	0	32.6	3.26	6.73	
D3	4.04	22.2	0	5.71	1.28	7.63	0	4.6	5.69	15.6	0	0	26.1	20	0	0	0	6.81	7.06	52.5	0	22.1	0	13.3	
D4	1.48	40.6	1.93	5.44	3.62	8.39	7.95	10.7	4.33	4.64	0	4.95	5.25	7.05	4.76	22.9	8.54	7.37	8.44	5.27	52.6	11.9	19.4	1.81	3.95
D4	13.3	52.8	0	4.41	6.38	4.84	15.3	7.57	5.03	0	0	10.5	8.38	23.6	10.9	21.7	26.4	0	12.3	9.12	58.4	0	25.3	3.58	7.42
D4	0	26.9	0	3.46	5.29	2.73	0	12.9	3.36	0	0	10.6	5.9	0	7.49	48.3	14.7	0	15.3	3.74	37.6	6.78	25	2.75	4.38
D4	0	32	6.3	8.08	4.87	2.24	0	5.75	3.8	0	0	4.53	43.4	7.5	41.6	11.7	3.29	0	9.33	6.26	42.4	0	43.7	9.08	5.13
A	0	15.9	0	9.73	28.4	4.98	11.6	11.8	5.36	0	0	33.5	4.32	0	1.7	29.9	0	0	3.92	2.42	57	0	20.7	0	6.66
A	6.79	24.1	0	3.97	3.92	3.82	8.78	0	3.91	0	0	35	6.26	0	6.17	42.7	0	0	10.2	7.83	72.8	0	42.8	0	6.38
A	0	58.3	0	3.5	5.36	8.13	26.6	16.5	3.6	0	0	17.1	0	5.52	23.6	3.3	0	0	10.3	7.27	55.2	0	33.6	0	3.7
A	0	38.2	0	9.74	6.32	4.2	0	8.2	4.53	0	0	9.63	35.7	13.8	0	0	0	0	5.88	7.94	44.1	0	0	6.42	4.9
B1	2.24	17.2	0	7.31	4.87	5.14	0	14.9	6.64	0	0	0	14.9	14.4	36.6	0	0	0	14.9	11.3	51.2	0	0	5.16	5.51
B1	0	20.8	3.73	0	0	0	6.45	5.58	2.6	0	0	0	14.2	4.05	22.1	19.6	0	0	8.25	0	18.8	0	22.2	6.6	5.39
B1	0	21.9	0	0	2.35	0	12	11.2	0	13.5	0	5.12	0	3.01	53.6	21	0	0	8.73	0	22.1	0	0	13.4	0
B1	0	53.1	0	0	12.2	6.52	0	0	7.11	0	0	9.33	0	3.78	32.9	0	0	0	14.5	11.3	59.6	0	12.1	0	0
B2	0	13.5	0	0	3.3	3.76	0	6.03	0	33.9	0	0	18.5	3.82	0	0	0	0	5.82	0	66.5	0	21.1	0	0
B2	0	12.4	0	0	9.43	4.48	5.7	7.77	2.48	22.3	0	6.48	0	8.81	27.6	7.3	0	0	8.82	25.5	79.2	0	20.3	0	5.5
B2	0	56	0	6.95	4.19	5.99	6.24	7.44	5.13	0	0	0	27.6	3.85	0	0	0	0	13.9	17.2	50	0	22.1	0	13.3

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																							
	4929	4932	4935	4939	4941	4943	4946	4947	4948	4949	4950	4952	4953	4954	4959	4960	4962	4969	4971	4972	4973	4974	4975	4963
D0	69.8	7.85	0	13.3	190	0.06	40	0	3.89	5.6	5.7	0	6.89	23	15.8	19.1	15.7	13.5	0	16.1	33.7	26.8	0	58.9
D0	21.4	20.4	18.7	0	9.48	5.1	22	0	0	0	3.6	0	0	15	23.5	10.3	17.2	15.2	0	10.4	43.1	47.2	10.5	10.7
D0	142	8.12	0	32	185	3.86	32.5	0	5.64	6.16	3.2	0	0	12.3	10.4	12.4	12.2	14.6	0	11.2	69.1	10.7	0	0
D0	27.5	35.8	16.9	0	153	13.3	30.1	0	0	0	3.5	0	0	23	45.7	15.7	16	0	0	0	30.6	86	9.2	26.3
D1	224	17.1	0	50	90.7	3.78	52.1	0	5.77	4.04	6.5	0	11.8	15.5	12.9	16.9	1.78	11	0	11.3	72.6	25.1	0	0
D1	0	3.56	0	201	157	5.43	33.6	0	4.02	5.44	6.7	5.1	0	11.9	4.7	15.1	12.2	14.2	0	0	27.6	12.8	0	9.3
D1	38.3	16.5	7.92	23.6	172	4.75	27.6	7.47	5.11	4.08	5.3	0	0	0	14.6	12.7	15.4	13.7	0	17	24	32.8	11.2	15.5
D2	199	12.3	0	20.3	77	5.52	35.8	0	5.16	4.71	5.5	0	0	21.6	13.7	15.1	20.1	13.1	0	8.7	36.1	28.9	0	0
D2	300	0	0	28.9	94.7	3.81	38.8	0	5.12	0	4.1	0	0	12.5	4.45	9.73	11.5	11.4	0	0	35.9	17.3	0	0
D2	101	50.4	17.1	0	125	2.4	12.4	0	3.7	0	6.0	1.77	0	28	30.5	18.7	13.4	9.64	0	0	31.3	82.3	20.6	0
D2	115	38.8	20.3	0	70.7	6.95	11.1	0	4.71	5.59	5.7	0	0	12.3	100	12	13.9	7.51	0	0	18.7	117	18.3	0
D3	128	5.84	0	0	99.3	6.85	33.5	0	4.22	0	2.3	4.72	0	3.6	6.03	8.56	7.97	13.3	0	6.73	72.9	8.46	0	8.39
D3	169	13	0	15.8	88.3	5.33	37.3	0	3.29	3.38	0	0	0	5.9	18.1	10.8	14.5	8.9	0	0	44.6	36.1	4.25	0
D3	106	6.93	0	12.8	39.5	4.16	27.2	0	4.1	5.41	6.3	0	23.7	7.6	12.1	25.2	9.61	17.5	0	0	34.4	26.2	4.54	11.4
D3	174	16.1	0	19	97.5	3.83	55.2	0	6.28	4.74	3.4	0	0	12.3	24.2	7.5	0	10.7	0	0	85.4	13.5	0	0
D4	105	8.26	4.85	14	78.4	7.6	36.8	4.41	5.5	4.45	7.0	3.5	6.08	22	8.58	7.67	7.72	8	2.59	5.26	48.1	21.6	4.43	8.96
D4	76.5	8.87	0	20.5	150	5.48	38.1	0	5.44	3.96	12	0	0	17.1	18.1	14.9	17.4	14.4	0	5.03	26.7	26	5.13	8.42
D4	133	14.1	12.9	28.3	111	6.84	25.1	0	3.5	2.98	3	0	0	7.3	21.1	15	16.4	11.9	0	9.14	27.4	57.4	4.05	16.3
D4	107	15.7	11	17.3	189	6.75	17.5	0	3.98	0	2.5	3.1	0	15.1	20.6	20.3	14.7	10.5	4.72	10.7	17.9	50.5	2.46	0
A	136	3.44	8.58	53.6	71.3	7.37	34.4	0	4.5	4.28	7.0	0	0	15.7	1.96	15.1	7.72	9.18	0	0	47.9	1.56	4.32	6.28
A	202	5.74	0	26.8	85.3	8.76	29.8	0	7.84	5.86	7.7	0	0	27	2.42	21.7	11.9	10.3	0	0	44.2	9.34	0	0
A	0	3.11	0	9.54	112	7.71	34.4	0	5.06	4.88	5.5	0	0	52.5	14.1	10.1	15	11.2	0	6.67	51.8	8.27	3.39	10.9
A	182	12.3	9.67	24.8	111	4.86	33.7	4.21	3.63	3.23	2.7	0	9.64	100	13.6	21.5	13.6	8.36	0	10.6	32.5	35.4	5.78	12.8
B1	200	16.2	0	25.4	84.1	5.7	36.1	0	3.96	5.61	3.7	20.9	12.9	0	6.78	7.71	16.4	14.6	0	4.35	62.6	16.4	0	3.75
B1	133	13.6	10.8	0	68.2	4.03	12.5	0	1.82	1.66	5.3	0	0	5.93	9.79	7.96	5.23	8.64	0	0	37.8	21.7	3.16	0
B1	74.9	47.5	0	0	139	10.9	12.4	9.83	0	0	0	0	10.4	0	60.9	0	6.52	4.73	0	0	36.8	31.5	34.2	24.2
B1	13.4	0	0	21.6	122	4.25	37	0	0	0	2	0	0	0	0	13.6	16.2	18	28.7	0	60.1	0	0	11.7
B2	141	0	0	257	58.1	0	63.1	19	0	6.84	2	0	0	0	6.61	11.4	6.17	9.29	0	0	112	0	0	0
B2	195	3.97	0	246	51.4	0	61.8	0	3.95	6.57	5	0	0	0	16.4	16.4	14.9	17.1	0	0	69.2	16.4	0	7.7
B2	91.5	5.52	0	17.8	117	4.1	33.9	0	5.4	4.12	0	0	12.2	0	2.7	13.7	6.41	12.2	0	7.37	58.6	6.58	0	9.63

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	4967	4980	4983	4988	4995	4999	5000	5003	5004	5005	ID										5033	5035
											5006	5011	5012	5013	5014	5016	5019	5022	5026	5029	5033	5035
D0	10.9	11.6	27.4	6.99	0	25.2	14.4	7.22	32.8	11.7	16.7	29.3	21.9	12.9	7.15	0	0	41.6	25.2	9.94	68.8	87.9
D0	6.22	16.8	0	21.7	0	13.3	18.1	0	28.5	19.4	2.9	31.9	44.3	6.1	11.1	0	0	35.3	15.8	0	31.9	63
D0	15.4	4.21	13.9	12.5	0	18.5	12	4.74	23	15.1	17.7	22.3	14.3	4.82	6.96	4.21	0	46.3	18.1	8.15	42.2	93.9
D0	45.9	16.5	19	19.6	11.3	0	14.1	0	3.9	24.6	5.4	0	127	15.7	10.2	0	0	45.9	26.3	0	26	68.6
D1	0	27.3	23.5	29.8	14.5	17.8	17.8	5.96	27	21.5	3.3	27	19.7	6.42	8.11	0	14.9	37.7	0	16.4	37.4	75.7
D1	8.14	8.64	12.8	13.7	8.01	10.1	14	3.6	26.2	8.55	20	12.4	10	8.04	5.02	0	0	31.7	16.9	8.68	24.2	50
D1	22.6	18.9	15	18.7	0	13.2	12.3	8.77	21.4	13.3	16.5	13	31.7	7.41	6.44	5.67	16.2	44.7	16.4	6.34	25.3	67.5
D2	13.2	20.1	13.2	22.1	0	33.6	15.5	7.15	30.7	13.6	30.6	25.2	25.5	9.43	9.13	0	16.5	30.6	24.4	9.75	72.8	85.3
D2	15.1	15.1	9.55	12.2	19.8	0	16.7	0	0	25.4	19.3	6.66	19.8	13	8.52	0	0	38.7	21.9	0	50.3	86.7
D2	16.5	8.55	23.4	8.98	9.17	0	22.8	0	34.6	11.5	21.4	0	125	8.76	11.1	19.6	23.4	64.5	8.01	0	25.5	40.5
D2	5.45	8.99	17.7	18.2	0	11.7	18.8	0	9.22	9.16	22.6	15.8	167	9.81	2.42	0	15.2	43.1	0	10.7	27.3	55.9
D3	7.64	6.49	17.2	8.41	0	12.6	12.7	6.3	0	18.9	33.5	23.6	8.54	4.98	5.71	1.76	0	72.7	28	8.54	36.1	65.6
D3	12.7	16.8	21.3	17.1	0	19.1	14.7	9.71	24.6	12.6	10.2	11.6	48.7	10.2	14.1	4.8	15.3	50.5	17.2	5.07	38	56.6
D3	23.2	10.8	19.6	11.9	0	19	26.7	0	12.7	15.5	26.6	12.7	28	12.2	12.6	2.38	0	38.7	16.6	8.15	49.7	41.2
D3	6.2	13.5	15.7	23.2	0	13.3	11.4	0	34.3	14.5	16	10.5	20.9	0	7.45	0	0	48.5	15.5	12.2	34.6	82.3
D4	26.2	4.99	10.6	5.68	5.49	12.2	12.1	5.45	10.5	12.7	25.7	22.9	24.7	7.37	9.52	2.78	3.3	47.5	18.7	5.5	53.7	49.1
D4	10.7	19.7	15.9	14.1	0	22.4	12.8	4.43	27.3	11.9	30	32.1	28.1	5.68	11.8	2.86	12.8	43.6	17.6	0	55.3	55
D4	15.7	16.8	14.2	10.5	0	13.2	14.1	0	21.6	13.6	28.1	43.4	78	3.43	13.4	6.86	8.07	53.6	14.5	0	33.5	49.5
D4	11.6	17.6	16.8	11.3	16.6	0	22	13.7	28.4	0	35	0	54.3	17	11.1	4.77	10.9	40	19.4	8.01	34.6	43.2
A	14.3	4.17	16.9	4.33	0	0	20	5.99	0	16.9	17.3	32.8	6.85	4.26	5.44	0	0	51.6	0	7.92	49.9	37.6
A	15.4	11	4.71	7.09	0	20.1	18.5	0	6.07	12.5	3	14.9	14.2	9.76	9.49	4.66	9.92	42.7	14.7	0	40.3	42
A	17.6	14.1	16.3	8.63	0	23.8	17.5	12.6	2.98	15	54.2	8.86	14.8	7.9	7.33	0	0	57.1	17	5.1	52	45
A	69.8	19.3	17.6	22.5	0	18.8	14.4	2.81	18.3	12.7	2.9	23.5	47	12.5	11.4	0	19.5	27.1	22.2	6.52	30.4	48.9
B1	7.62	21.3	26.7	22.2	0	22.3	16.9	18.2	0	24.2	6.4	12.3	18.5	5.02	9.2	4.55	5.94	49.6	13.5	9.35	52.6	64.7
B1	10.4	8.16	10.1	9.85	5.45	0	12.1	3.07	16.2	13.5	9.76	9.57	23	7.09	6.99	8.09	0	29.7	0	3.44	23.5	24.6
B1	12	5.54	39.1	14	0	2.98	18.7	14.3	0	7.45	6.2	18.6	52.1	6.42	4.01	0	11.3	41.1	18.6	8.39	20	37.2
B1	6.29	12.6	13.9	8.87	18.3	0	22.8	0	18.1	15.1	8.85	8.74	5.85	3.01	2.3	2.92	0	52	17	0	61.5	56.2
B2	9.29	4.15	21.7	6.8	0	10.9	13.6	0	17.8	13.4	7.5	0	0	0	0	0	0	39.7	0	0	49.7	43.4
B2	11.8	4.24	18	13.1	8.63	12.7	17.1	5.49	5.86	20.3	3	14.1	28.3	0	6.5	0	0	0	23.4	4.89	59.7	78.3
B2	5.08	9.63	29.9	7.98	0	10.4	15.8	7.3	6.37	23.1	6.8	21	11.1	2.34	6.86	0	0	42.9	22	4.78	43.7	85.8

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																								
	5036	5039	5040	5042	5047	5049	5052	5037	5038	5053	5054	5057	5058	5059	5062	5063	5064	5065	5067	5068	5071	5072	5075	5076	
D0	12.9	18.7	47.3	13.9	18.6	33	13.3	22.9	17.1	31.1	10.8	13.3	0	48.9	14.7	1.61	67.3	0	63.9	15.1	0	8.47	5.9	0	0
D0	14.8	28.3	0	0	23.5	21.2	17.8	17.8	7.38	16.2	14.6	12.3	11.5	33.9	25	0	27.3	0	42.8	30.4	16.2	47.5	18.5	0	0
D0	10.6	14.1	6.1	7.65	14.9	36.9	7.5	15.6	34.7	14.8	14.8	13.3	12.8	32.1	12.8	7.23	69.8	14.8	53.4	16.1	6.82	15.4	4.91	1.76	0
D0	10.9	11.4	0	0	31.9	14.3	0	17.8	73.4	4.36	29.3	23.1	27.3	27.3	14.2	17.8	13.5	0	0	34.1	0	8.26	25	0	0
D1	10.8	12.7	0	6.85	19.7	32	0	0	28.8	5.49	0	0	48.2	11	3.09	0	0	12.9	41.2	19.7	0	25.3	8.52	0	0
D1	9.33	6.81	5.74	0	11.4	20.5	0	4.48	16	20.3	10.1	29.5	34.9	48.1	7.04	5.02	0	7.71	27	10.9	8.9	24.2	4.47	0	0
D1	0	4.72	0	0	14.1	26.3	0	0	0	30.5	6.7	12.7	11	50.7	12.4	4.24	0	0	30.9	27.2	22.5	15.9	5.23	0.39	0
D2	23.3	0	8.94	13.7	20.3	24.7	0	0	10.4	23.7	11.2	19.1	21	41.6	17.3	6.26	0	9.96	95.1	11.7	25.3	40	0	0	0
D2	0	15.2	0	0	4.12	40.4	0	33.4	9.22	13.4	6.69	53.3	20	32.6	25.4	5.81	0	0	54.4	22	0	6.13	0	0	0
D2	12.7	22	2.08	15.2	31.3	0	0	17.4	35.9	17.9	23.7	25.9	12.7	42.8	2.1	29.7	0	3.83	42.2	32.8	0	28.8	21.5	0	0
D2	17.7	31.1	0	15.9	25.8	0	0	19.9	0	10.3	19.6	33.5	29.3	34.8	0	0	0	0	30.9	46.2	9.42	2.45	0	0	0
D3	12.2	15.4	0	0	9.01	22.1	0	0	15.4	24.3	8.54	14.5	0	32.4	11.9	5.29	0	11.9	61.4	15.1	6.47	16.7	4.8	0	0
D3	11.7	8.52	0	0	11.3	15.7	0	56.2	13.5	15.2	10	35.6	24	81.8	7.27	4.72	0	6.86	63.9	21.5	11.4	38.1	4.21	0	0
D3	17.2	15.2	0	35.9	14.6	23.9	0	27.4	19.4	15	12	70.9	0	82.9	10.6	6.5	0	8.84	40.4	12.5	19.6	43.9	6.09	0	0
D3	11.6	10.5	9.47	0	11.8	24.2	0	13.8	14.6	18.3	6.05	0	18.3	0	13.9	5.52	0	0	48.6	18.8	0	12	0	0	0
D4	14.6	9.65	4.9	6.48	14.1	20.6	0	11.7	9.22	19.5	9.84	31.3	16.5	10.2	8.51	8.04	0	7.1	69.5	14.7	16.5	34.7	4.79	0	0
D4	11.4	5.87	0	11.8	14.1	14.3	0	0	9.5	16.6	8.82	8.92	0	18.3	9.25	6	0	5.16	71.2	9.69	7.26	8.1	7.28	0	0
D4	18.6	16	19.6	9.8	14.6	10.6	0	0	9.29	18.7	12.9	7.01	0	22.9	0	6.49	0	0	77.6	30.1	6.41	12	0	0	0
D4	28.1	12	13.8	16.5	8.11	16.6	0	0	9.58	18.2	14.8	16.7	0	150	7.63	4.96	0	0	54.6	12.9	26.8	8.66	8.31	0	0
A	9.47	6.89	2.51	8.16	11.4	14.2	0	0	20.8	27.7	13.4	17.1	35.9	49.2	7.04	6.03	0	6.85	49.9	13.9	32.9	14.6	2.56	0	0
A	0	9.1	0	15.8	10.1	19.3	0	0	0	19.2	9.09	20.1	9.35	33.3	13.8	6.11	0	9.54	35.2	23.3	14.1	14.6	0	0	0
A	15.5	12	0	12.8	16.2	14.3	0	9.85	13.8	0	10.8	50.4	0	31.3	10.4	6.96	0	0	63.2	12	16.8	10.4	4.82	0	0
A	11.5	9.38	0	6.03	6.93	20.1	0	10.9	9.76	24.8	15.8	25.5	0	46.8	5.1	2.73	0	7.28	42.9	13	18	39.5	6.14	0	0
B1	7.87	5.93	0	0	12.2	14.5	0	10.1	13.7	23.6	9.3	10.9	15.4	39.6	8.99	11.2	0	6.35	55	17.3	15.1	11.2	7.51	0	0
B1	7.66	4.73	0	0	7.46	12.3	0	59.5	8.87	9.71	9.72	12	8.76	26.9	0	2.7	0	5.3	23.7	7.3	15.7	51.3	0	0	0
B1	9.05	0	0	0	38.7	0	0	0	0	20.2	11.5	7.86	1.89	54.1	0	0	0	29.7	46.1	5.49	21.7	28.4	0	0	0
B1	0	0	0	0	14.2	16.6	0	28.4	0	14.4	11.5	12.6	18.8	46	20	0	0	0	48.4	9.99	9.52	10.3	0	0	0
B2	0	6.82	0	0	13.7	12	0	0	14.4	14.2	9.15	7.68	0	44.6	0	0	0	11.6	38.9	5.04	0	13.4	0	0	0
B2	5.39	10.5	32.1	3.87	13.9	16.5	0	98.3	12.5	20.8	11.1	12.4	21.7	45.4	16.2	5.15	0	0	26.7	11.6	0	14.7	4.46	0	0
B2	8.73	14.1	0	0	9.39	27	0	3.54	14.4	36	8.35	8.56	21.6	49.6	11.4	5.82	0	13.1	66.9	16.2	7.75	19.1	5.11	0	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	5079	5084	5087	5092	5095	5096	5097	5098	5101	5104	5106	5107	5109	5111	5113	5102	5103	5116	5117	5122	5124	5125	5128	5129
D0	8.04	3.29	19	0	0	16.2	24.4	10.5	0	43.2	21.7	52.5	0	9.18	34.2	40.2	42.5	8.14	8.93	103	59.6	0	27.9	0
D0	22.4	27.6	161	0	16	15.8	13.4	9.12	0	44.7	28.7	90.3	7.74	21.3	88.4	17.8	17.1	20.5	7.77	136	116	0	44.1	0
D0	9.15	34.2	127	0	12.7	20	6.95	7.17	0	27.3	20.9	63.7	0	12.1	54.2	45.9	15.3	9.74	10.9	110	62	0	37.9	0
D0	28.6	11.5	183	0	0	13.1	10.7	0	0	0	14.2	77.2	4.86	25.1	71	0	27.9	4.47	15.5	142	74.7	0	37.9	0
D1	14.2	29.7	153	0	0	20.6	12.7	33.2	0	0	11.9	76	0	7.63	62.9	0	27.1	10.4	6.4	60.1	119	0	30	0
D1	8.13	7.22	143	0	0	12.2	23.5	0	0	9.44	26.4	120	0	7.38	77.6	25.3	25.1	22.2	8.99	138	122	0	59.2	6.89
D1	11.9	4.47	154	0	5.79	10.4	0	10.4	0	26.4	16.2	101	0	6.52	70.3	31.5	24.4	6.91	14.5	119	50.7	0	24.5	0
D2	16.2	0	160	0	7.25	10.4	0	0	10.5	34.8	18.4	81.6	0	9.08	63.5	29.3	18.6	12.2	9.37	86	138	0	39	0
D2	9.81	0	233	0	0	10.5	11.1	0	0	13.4	12.8	37.3	0	0	32	14.8	18.3	0	0	61.3	37.3	0	21.4	0
D2	18.9	27.7	156	0	19.9	20.2	0	7.64	0	16.6	19.1	94.8	0	0	69.6	36.4	13.7	10.9	17.4	179	52.9	5.49	34.7	16.6
D2	20.6	18.4	151	0	12.6	7.22	14.7	6.01	0	39.8	0	108	14.9	21	40.8	16.7	19.3	10.8	8.16	102	86.9	0	48.6	0
D3	5.77	38.9	160	0	13.6	19	15.9	4.45	0	13.8	10	93.4	0	6.15	70.5	16.1	22.5	0	14.2	78.5	88.8	0	28.6	0
D3	16.4	22	116	0	0	18.5	10.9	11.2	0	13.5	0	63.7	5.94	6.11	53.7	14.2	23.1	19.5	0	75.7	106	0	47.9	40.6
D3	10.7	11.7	93	10.1	10.7	14.9	8.22	7.89	10.7	29	9.19	74.4	2.58	6.23	53.7	46.8	17.1	18.8	9.64	63.3	81.8	0	40.3	24.6
D3	9.84	41	134	9.56	0	15.7	17.6	6.8	0	0	23.2	77.9	0	5.13	82.2	14.3	21.7	12.7	0	80	10.4	0	38	0
D4	7.42	19.6	123	10.6	5.84	14.5	12.8	4.91	8.08	27.3	11.3	67.3	4.52	8.04	46.9	16.1	16.6	13.5	11.3	68.8	83.7	10.9	31.3	27.2
D4	14.5	0	118	0	0	13.1	0	6.59	0	22.2	15.5	60.5	0	4.48	49.4	24.8	17.2	8.98	9.93	96.6	59.2	0	26.6	33.9
D4	13	26.7	140	0	6.97	35	0	13.9	0	5.74	14.2	55.7	5.93	21.2	32.6	22.4	18.4	14.3	8.48	110	59.6	0	29.7	84.7
D4	12.6	0	128	4.46	0	0	21.6	9.01	0	33.2	11.2	45.4	9.89	6.41	36.5	22.2	13.1	4.54	13.5	92.4	43	0	23	22.7
A	5.36	23	15.9	0	7.95	14.7	25.6	9.05	0	0	9.98	76.9	0	5.72	48.9	27	14	21.6	10.5	73.9	72.8	0	41.9	17.7
A	5.57	18	95.1	0	15.3	0	22.2	0	0	62	12.4	98.8	0	0	47.8	26	5.78	14.4	11.8	112	73.3	0	41.9	0
A	8.59	28.6	172	0	8.3	18.9	20.1	5.5	13.3	44.9	17.8	41	0	7.58	43.1	28.4	16.6	15.1	10.9	98.4	86.7	0	39.8	21.7
A	15.2	10.4	125	0	0	15.4	0	11.2	0	39.4	12.1	39.8	0	5.7	41.6	44.9	17.4	6.89	5.94	72.7	53.9	0	14.3	0
B1	20	28	129	0	0	20.5	22.7	10.2	8.89	26.4	76.3	91	0	8.76	72.4	22.5	24	28.9	0	31.6	153	0	55.8	8.72
B1	6.58	31.8	91.4	0	64.4	13.1	11	11.2	0	29.6	26	131	3.28	2.82	82.9	10.5	11.1	44.9	10.1	119	167	0	67.6	9.92
B1	22.3	33.6	186	0	0	20.8	18.8	20.7	0	40.5	11.7	43.2	0	8.85	33.9	7.61	19.1	9.04	2.97	62.4	34.5	0	8.01	6.35
B1	6.07	14.4	305	0	0	12.4	0	10.3	0	29.1	24.7	6.51	0	8.56	12.3	59.6	13.2	17.8	0	36.1	45.9	0	0.6	0
B2	4.98	33.2	254	0	15.4	15.7	18	7.98	0	41.4	14.1	32.1	0	6.16	36.1	17.7	11.1	11.4	0	55.8	55.5	0	12.9	0
B2	10.2	14.6	148	0	0	14.9	20	9.76	0	47	7.29	36.1	0	4.55	31.2	20.9	21.6	4.84	0	38.9	50.9	0	14.4	0
B2	5.2	24.8	152	0	0	30	0	14.3	0	24.1	60.9	0	0	7.92	26.6	40.5	28.5	11.8	7.34	106	43.9	0	23.5	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																										
	5132	5133	5134	5135	5136	5137	5138	5140	5142	5145	5146	5158	5159	5160	5161	5162	5163	5164	5165	5166	5167	5168	5172	5173	5176	5177	5178
D0	29.8	4.81	0	122	20	16.4	0	18.4	2.54	13.6	8.06	0	10.3	0	15.3	0	7.92	0	34.1	0	34.1	0	34.1	34	5.45	0	10.9
D0	0	25.4	99.2	150	0	7.29	39.7	27.8	0	12.5	30.9	24.3	35.5	0	19	0	222	0	0	0	0	0	19	0	0	0	25.2
D0	0	0	75.7	123	12	4.95	10.1	23.5	17.3	7.99	0	0	6.56	1.49	15.9	0	6.1	0	0	0	0	0	25.8	0	0	0	0
D0	20.5	0	23.4	182	0	0	11.7	0	0	11.8	0	0	61	0	11.9	0	0	0	0	0	0	15.4	0	0	0	0	0
D1	25	22.7	73.1	105	9.79	12.8	0	14.9	23.7	9.44	7.28	3.96	16.5	6.26	0	0	0	0	0	0	0	5.07	33.9	4.57	0	0	0
D1	0	0	44	178	1.19	17.2	25.2	43.5	9.32	14	8.82	6.67	9.11	4.11	14.6	0	0	0	0	0	0	0	22.2	8.91	0	0	0
D1	0	0	14.6	157	0	0	17.3	17	9.94	8.87	0	0	10.7	0	12.1	0	0	0	0	0	0	0	22.8	0	0	0	5.33
D2	0	18	14.5	133	17.8	27.1	14.6	20.6	0	16.6	0	16.5	10.8	0	22.6	0	0	0	0	0	0	0	36.4	24.4	0	0	0
D2	0	0	5.5	109	0	2.26	0	0	0	13.1	0	0	9.47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29.4	0	0	0	0
D2	0	0	160	183	26.6	38.7	29.2	0	0	12.8	13.3	5.82	44.2	0	12.7	0	0	0	0	0	0	0	20.4	0	0	0	0
D2	0	0	99.5	185	0	0	11.3	19.5	16.4	11	0	11.8	82.7	0	10.9	0	0	0	0	0	0	0	8.09	27.9	0	0	0
D3	17.8	106	0	137	17.5	36	25.5	22.1	0	6.57	0	12.1	0	3.56	20	0	0	0	0	0	0	0	39.4	0	0	0	0
D3	0	13.2	51.6	121	0	35.1	25.8	15.6	16.3	12.5	13.9	20	22.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.4	0	7.5	0	0
D3	0	0	37.9	149	0	0	29.8	0	11.6	13.2	0	7.52	11.8	0.95	25.4	0	0	0	0	0	0	7.91	27.2	0	0	0	9.45
D3	0	40.3	83.4	63.5	0	23.9	0	23	23.3	0	0	31.6	3.18	4.17	16.8	0	0	0	0	0	0	0	22.3	0	0	0	0
D4	17.9	11.1	55.1	109	25.8	35.9	25.2	19.2	8.08	7.74	10.4	8.73	4.39	5.59	14.8	0	0	0	0	0	0	3.09	40.5	11.6	5.65	5.88	0
D4	0	0	0	123	0	6.37	19.6	12.5	31.6	7.97	15.1	7.21	15.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.3	0	0	0	8.57
D4	0	14	42.1	118	0	0	18.8	18.8	30.8	9.2	0	15.5	33.8	0	9.99	0	0	0	0	0	0	0	24.5	0	0	0	24.3
D4	0	0	0	111	3.17	28.8	9.65	14.3	0	10.8	0	3.05	41.9	0	18	0	0	0	0	0	0	0	25.9	0	0	0	0
A	0	0	138	145	0	0	12.8	20.9	9.24	12.7	0	5.88	3.84	0	10.4	0	0	0	0	0	0	0	38	7.1	0	0	7.2
A	0	12	116	192	17.4	0	12.2	0	14.8	11.5	0	3.33	5.82	0	6.88	0	0	0	0	0	0	0	31.3	0	0	0	4.55
A	0	0	99.8	129	0	0	56.9	25.9	12.2	8.3	0	23.3	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	43	13.8	0	0	0
A	0	0	18.6	75.6	0	27.7	11.5	8.26	10.6	7.98	0	3.35	24.9	0	12.1	0	0	0	0	0	0	8.34	24.1	0	0	0	5.97
B1	0	0	123	61.9	0	0	61.5	37.3	30.6	13.6	0	14.8	13.7	0	24	0	0	0	0	0	0	0	29.6	0	0	0	0
B1	0	0	282	247	0	34.3	38.8	46.7	19.6	12.1	11.8	0	11.7	0	12.9	0	0	0	0	0	0	0	10.6	0	0	0	0
B1	0	0	0	51.1	0	18.1	0	0	15.1	15	0	3.45	82.4	12.3	20.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	35.9	45.2	5.37	0	9.7	46.8	4.13	11.8	15.7	0	33.1	0	0	19.3	0	0	0	0	0	0	0	24.7	0	0	0	0
B2	0	0	160	49.6	0	243	10.5	0	11.1	8.78	0	0	0	0	15.8	0	0	0	0	0	0	0	18.5	0	0	0	0
B2	0	0	52.4	68	0	10.7	11	0	20.2	14.7	0	0	11.1	0	14.8	0	0	0	0	0	0	0	21.6	0	0	0	0
B2	0	0	58.6	119	0	0	14.7	0	8.82	8.88	0	0	6.87	3.66	16.3	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	18

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	5164	5181	5182	5184	5184	5184	5188	5188	5189	5190	5191	5193	5195	5195	5197	5199	5200	5203	5204	5205	5206	5208	5209	5211	5213
D0	0	0	0	0	0	2.36	26	26	5.6	0	0	62.5	1.83	0	0	0	0	96	87.4	0	16.1	0	36.4	67.6	0
D0	0	7.47	6.66	15.9	203	0	452	452	236	0	0	92.8	0	0	31.2	0	8.42	40	0	0	20.9	0	60.6	67.4	10.2
D0	9.31	0	0	0	235	0	333	333	229	0	6.17	88.6	0	0	0	0	0	47.3	0	10.4	15.6	0	30.3	56	5.49
D0	0	0	27.6	0	133	0	201	201	69.3	0	0	81.7	0	0	45.2	0	66.9	0	0	0	0	0	0	0	0
D1	6.95	4.71	19.1	5.6	155	0	360	360	386	0	21.7	91.8	0	0	0	0	65.4	0	0	8.94	74.9	0	35.1	0	0
D1	7.66	2.37	0	0	102	0	207	207	286	0	0	72.3	0	0	0	0	39.1	30.9	0	11.1	18.1	0	14.8	32.5	0
D1	5.48	0	5.61	13.8	723	0	96.7	96.7	12	0	38.2	63.7	0	0	0	3.27	0	0	0	0	16.4	0	16.7	29.3	0
D2	0	11.7	0	15.1	73	0	49.4	96.6	130	0	0	87.6	0	0	10.7	6.28	39.5	42.7	0	13.2	27.8	19.7	18.4	33.8	0
D2	9.51	12.7	0	0	236	0	0	0	63.7	28	0	89.9	0	0	0	0	0	0	0	12.9	70	0	15.7	42.8	0
D2	0	0	27.7	4.78	655	8.88	454	454	208	0	0	71.1	0	0	0	0	20.6	13.9	29.1	0	44.6	81	55.5	28.4	0
D2	0	0	39.2	4.86	700	0	366	366	268	0	0	50.2	0	0	45.5	0	11.2	37.1	14.9	0	41.4	0	67	37.4	0
D3	17.8	15.8	0	24.8	359	39.72	512	512	129	11.7	89.5	0	0	5.09	0	8.6	34.3	0	32.2	14	16.3	0	44.8	56.4	0
D3	0	6.13	10.5	0	157	0	296	296	33	0	20.1	13.3	16.4	8.51	0	0	27	47	22.8	0	3.27	12	19.9	0	0
D3	0	0	0	32.5	137	0	171	171	335	0	5.14	134	0	0	0	0	39.3	53.3	0	4.38	0	13.8	0	39.8	4.04
D3	6.88	11.9	3.7	0	337	0	566	566	242	2.39	123	3.96	0	0	5.52	11	32	77.9	7.04	5.87	16	4.13	35.4	32.4	2.66
D4	3.49	2.5	3.4	12.2	697	81.7	19.5	18.8	21	0	2.99	123	3.96	0	0	0	0	63.2	39.9	0	17.4	0	27.4	32.7	6.26
D4	0	0	0	19.5	65	0	11.6	11.6	92	0	0	88.5	13.7	0	17.5	0	0	0	0	0	0	0	22.3	0	5.18
D4	0	0	13.3	6.84	209	25.3	260	260	111	0	65.3	0	0	0	33.5	12.3	11.7	38.9	0	0	0	0	18.7	0	0
D4	0	0	12.6	33.9	205	0	21.1	21.1	163	0	70.9	15.1	0	0	32.2	0	51.7	67.9	0	0	24.4	0	25.8	0	0
A	0	0	0	17.9	116	25	549	549	10	24.2	0	74.5	0	0	0	0	32.8	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	13.2	119	35	252	252	187	0	69.7	0	0	0	0	12.2	5.73	32.7	0	5.67	21.1	0	35	6.81	0
A	0	0	0	8.66	12	13	419	419	14	19	105	0	0	0	8.71	66.4	0	0	0	0	13.9	0	29.6	25.7	0
A	0	0	10.1	22.5	153	0	306	306	352	5.47	89.8	0	0	0	0	0	56.6	74.7	0	6.41	9.45	26.8	9.98	0	6.82
B1	0	9.93	15.9	13.6	357	35.5	287	287	105	21.5	115	7.1	0	0	0	0	11.1	0	0	0	0	0	29.2	26.7	6.83
B1	18.7	0	10.7	21.5	637	312	710	710	306	120	37.6	10.6	0	0	0	0	7.9	0	0	0	16.8	0	37.6	0	0
B1	0	0	20.5	0	391	0	625	625	135	32.4	54.7	8.55	0	0	54.7	0	64.4	0	0	0	0	0	12.8	80	0
B1	0	5.8	0	0	239	0	455	455	0	0	71.4	0	0	0	0	0	43.2	80.2	0	0	126	0	28.6	41.4	0
B2	10.2	0	0	0	162	0	686	686	0	0	112	0	0	0	0	0	59.8	35.4	0	0	0	0	25.8	0	0
B2	22.3	0	0	12	367	0.6	348	348	22	39.2	94.9	10.4	0	0	0	0	69.5	0	0	38.6	0	16.3	17	48.4	0
B2	0	0	0	0	45	2.8	483	483	357	22.7	110	0	0	0	0	0	0	0	95.1	8.26	0	0	39.6	60.8	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID																							
	5217	5223	5226	5230	5231	5232	5235	5218	5220	5236	5237	5238	5239	5243	5244	5246	5247	5252	5253	5254	5255	5256	5258	5259
D0	11.9	0	44.5	65.7	0	0	0	23	43	8.25	19.3	37.7	0	0	0	13.7	0	0	27.5	0	4.52	0	0	11
D0	11.6	25.5	32.9	17.5	11.5	0	0	0	7.7	35.4	0	20.8	0	0	0	0	0	0	10.4	0	0	0	0	0
D0	0	37	29.6	8.35	0	0	0	0	21	49.6	0	37.8	0	0	0	0	0	1.89	0	0	0	0	0	5.04
D0	0	0	0	7.06	0	0	0	28.1	20.1	12.4	0	22.8	0	0	0	16.2	0	0	0	0	0	0	0	0
D1	18.1	0	13.3	23.9	0	12.5	1.25	38.6	1.5	15	0	16.8	0	64.3	0	8.84	0	0.77	4.62	4.63	0	0	0	0
D1	13.9	0	27.9	30.5	19	19.9	2.15	0	26.3	0	0	20.2	0	0	0	23.9	25.8	5.03	19.5	5.96	0	0	0	6.71
D1	6.8	0	25.2	0	15.6	0	0	0	18.1	13	0	32.5	0	0	0	17.9	0	0	8.79	0	0	0	0	0
D2	0	20	44.3	24.7	0	0	0	4.48	0	26	0	21.7	0	0	0	0	0	13.4	0	0	0	0	0	0
D2	34.8	21.6	0	10.3	0	0	6.45	2.69	0	25.8	0	19.8	0	116	0	10.6	0	19.4	0	0.98	0	0	0	0
D2	29.1	42.1	3.61	4.3	0	0	0	5.77	23.3	17.3	0	12.3	0	31.6	0	12.6	0	0	10.8	0	0	0	0	15.8
D2	0	71.6	41.3	0	0	33.8	0	0	24.2	17.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12.9
D3	0	32.3	23.4	0	5.09	0	2.97	0	29.4	6.76	0	22.7	0	36.1	41.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D3	0	25.9	30.1	9.39	0	0	3	20.3	33.1	14.5	0	14.4	0	0	0	6.27	0	0	4.96	0	0	0	0	0
D3	8.98	32.7	32.8	0	0	16.8	0	11.5	30.3	0	0	17.6	0	0	0	0	0	1.43	0	4.77	0	0	0	0
D3	0	17	0	16.4	14	8.46	0	0	12.9	0	0	18.4	0	0	0	0	0	1.34	0	0	0	0	0	10.4
D4	6.32	43.9	24.5	8.02	10.2	9.94	2.31	12.5	15.3	9.89	22.8	12	13.7	30.8	23.3	18.6	12.7	2.74	13.2	4.88	1.75	2.03	1.86	3.83
D4	0	22.8	6.68	10.4	0	17.2	0	0	3.75	15.2	0	18.5	0	0	0	12.5	0	0	0	0	0	0	0	7.97
D4	0	18.6	20.4	0	0	6.13	0	0	11.5	24.5	0	20.8	0	0	0	3.81	0	0	24.4	0	0	0	0	0
D4	11.2	22	28.5	0	0	0	0	0	23.8	27.9	0	16.5	0	0	0	5.31	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	41	0	4.94	0	0	4.76	0	35.6	50.5	0	37.4	10.4	117	70.3	18.1	0	2.75	0	0	0	0	0	6.18
A	12.2	33.2	28.1	5.44	0	0	3.17	9.76	30.2	36.5	22.5	0	0	34.5	0	0	0	2.15	0	0	0	0	0	0
A	25.6	37.1	0	0	0	7.52	0	17.8	17.6	31.1	0	24.5	0	0	0	8.53	38.3	0	0	0	0	0	0	0
A	14.3	0	0	16.6	6.8	0	0	26	26.8	4.39	0	17	0	0	0	0	13.1	0	18	0	0	0	0	0
B1	2.52	33.2	18	4.28	3.66	13.8	5.22	0	13.6	22.2	0	26.2	0	58.2	0	0	0	1.77	0	7.84	0	0	0	0
B1	9.25	0	22.1	4.31	0	3.56	0	0	13.8	0	0	10.4	4.1	0	0	0	0	1.49	2.86	0	0	0	0	2.72
B1	10.5	29.2	20.2	0	14.7	0	4.04	0	28.4	0	0	20.2	0	0	0	12.6	0	0	0	10.2	0	0	0	0
B1	0	18.8	32.8	0	0	0	0	0	12	9.48	0	21.3	0	43.6	40.3	17.1	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	17.2	16.9	19.8	10.9	0	0	0	4.44	23.8	0	0	22.6	5.13	0	0	12.9	26.1	1.56	0	0	0	0	0	0
B2	11.3	19.2	33.1	12.9	0	0	6.51	0	25.7	36.1	0	19.4	21.2	27.4	0	9.25	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	0	45.2	36	11.6	0	0	0	0	33.7	0	20.3	33.8	0	19.1	47.1	15.8	0	1.99	0	0	0	0	0	8.87

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.).

Stages	ID			
	5260	5261	5262	5263
D0	0	0	0	0
D0	0	0	35	5.69
D0	0	0	0	0.96
D0	6.6	0	27.2	0.95
D1	0	0	0	3.76
D1	4.46	0	9.43	1.57
D1	13.7	0	23	2.72
D2	0	0	6.41	2.50
D2	0	0	0	0
D2	0	12.8	23.5	2.21
D2	11.4	0	0	3.55
D3	0	0	0	0
D3	0	0	0	0.85
D3	8.57	0	0	0.85
D3	0	0	0	0
D4	2.89	3.96	3.96	0
D4	0	0	0	0
D4	0	0	0	6.67
D4	14.5	0	0	0.54
A	10.7	0	5.22	0
A	0	0	0	0
A	0	0	0	0
A	4.42	0	8.54	3.16
B1	0	0	0	0
B1	7.21	0	6.49	0
B1	0	45.4	30.8	1.95
B1	0	0	0	0
B2	0	0	0	0
B2	0	11.1	0	0
B2	0	0	0	0

ภาคผนวก ก

Mascot Search Results: Protein View

Page 1

{MATRIX} {SCIENCE} Mascot Search Results

Protein View

Match to: gi|27463265 Score: 78
 allergen Pen m 2 [Penaeus monodon]
 Found in search of F:\New Folder\PSU_Nee-4699_20_12_07-876R1.0200314.dta

Nominal mass (M_r): 40087; Calculated pI value: 6.05
 NCBI BLAST search of gi|27463265 against nr
 Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Penaeus monodon

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 4%

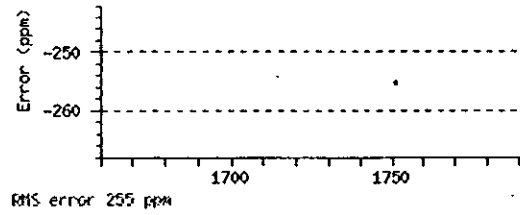
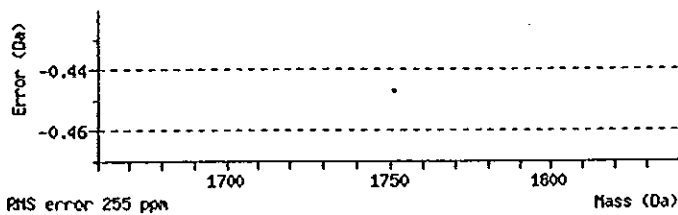
Matched peptides shown in Bold Red

1 MADAIVIEKL EAGFKLEAA TDCKSLLKKY LSKAVFDQLK EKKTSLGATI.
 51 LDVIQSGVEN LDSGVIYAP DAEAYTLFSP LFDPIEDYH VGFKQTDKHP
 101 NKDFGDVNTF VNVDPGEKYV ISTRVRCGRS MEGYPFNPCL TEAOYKEMEA
 151 KVSSTLSSLE GELKGTYYPL TGMSKEVQQK LIDDRFLFKE GDRFLQAANA
 201 CRYWPAGRGI YHNDNKTFV WVNEEDHLRI ISMQMGDDLQ QVFRRLTSAV
 251 NEIEKRIPFS HHDRLGFLTF CPTNLGTTAR ASVHIKLPKL AANREKLEEV
 301 AGKYNLQVRG TRGEHTEAEG GIYDISNKRK MGLTEFOAVK EMQDGILELI
 351 KMEKEM

Show predicted peptides also

Sort Peptides By Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
103 - 118	876.6839	1751.3533	1751.8003	-0.4470	0	K.DFGDVNTFVNVDPGEK.Y (Ions sco)



LOCUS AAO15713 356 aa linear INV 02-JAN-2003
 DEFINITION allergen Pen m 2 [Penaeus monodon].
 ACCESSION AAO15713
 VERSION AAO15713.1 GI:27463265
 DBSOURCE accession AF479772.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Penaeus monodon (black tiger shrimp)
 ORGANISM Penaeus monodon
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;
 Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata; Penaeoidea;
 Penaeidae; Penaeus.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 356)
 AUTHORS Yu,C.J., Lin,Y.F., Chiang,B.L. and Chow,L.P.

http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=../data/20080422/FtgmmbTme.dat&hit=gi%7c27...

Mascot Search Results: Protein View

Page 1

{MATRIX}
{SCIENCE} Mascot Search Results

Protein View

Match to: gi|15988270 Score: 34
 Chain A, The C1 Subunit Of Alpha-Crustacyanin
 Found in search of F:\New Folder\PSU_Nee-5131_10_1_08-486R1.0200267.dta

Nominal mass (M_r): 20655; Calculated pI value: 5.69
 NCBI BLAST search of gi|15988270 against nr
 Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: synthetic construct
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
 gi|15988271 from synthetic construct
 gi|33357650 from Homarus gammarus
 gi|33357651 from Homarus gammarus
 gi|33357652 from Homarus gammarus
 gi|33357653 from Homarus gammarus

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 4%

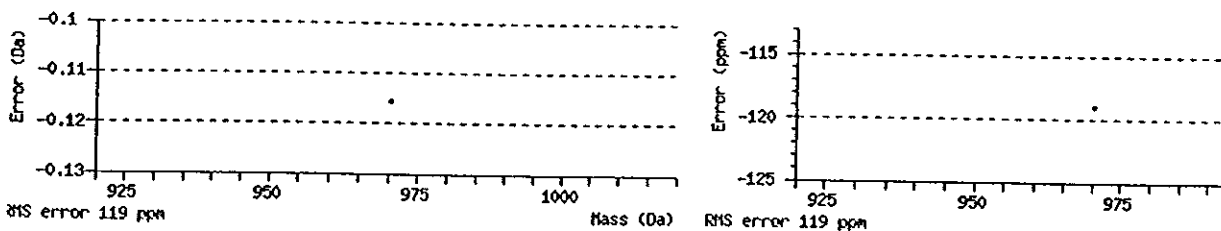
Matched peptides shown in Bold Red

1 DKIPDFVVPK KCASVDRNKL WAEQTPNRNS YAGVWYQFAL TNHPYQLIEK
 51 CVRNEYSEFDG KQFVIESTGI AYDGNLLKRN GKLYPNPFGE PHLSDIYENS
 101 FAAPLVILET DYSNYACLYS CIDYNFGYHS DFSFIFRSA NLADQYVKKC
 151 EAAEFKNINVD TTRFVKTVQG SSCPYDTQKT L

Show predicted peptides also

Sort Peptides By Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
3 - 11	486.2239	970.4333	970.5486	-0.1155	0	K.IPDFVVPK.C (Ions score 34)



LOCUS 1I4U_A 181 aa linear SYN 29-OCT-2007
 DEFINITION Chain A, The C1 Subunit Of Alpha-Crustacyanin.
 ACCESSION 1I4U_A
 VERSION 1I4U_A GI:15988270
 SOURCE pdb: molecule 1I4U, chain 65, release Aug 27, 2007;
 deposition: Aug 27, 2007;
 class: Transport Protein;
 source: Mol_id: 1; Synthetic: Yes; Other_details: This Peptide Was
 Chemically Synthesized. The Sequence Of This Peptide Occurs
 Naturally In Homarus Gammarus (European Lobster).;
 Exp. method: X-Ray Diffraction.

http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=./data/20080424/FtgmiaSES.dat&hit=gi%7c1598...

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวสุวรรณี ขุนทองปาน	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4882036	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ (ประเภท ก) คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Khunthongpan, S., Makatan, A., Sobhon, V. and Promwikorn, W. 2008. Epidermal Protein Expression Profilings during the Molting Cycle of the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, Studied by two dimension gel electrophoresis (2-DE). Proceedings of the 31st Annual Conference of the Anatomy Association of Thailand. The Cha-Am Methavalai Hotel. Phetchaburi. Thailand. 30 April-2 May 2008. p. 102-105.