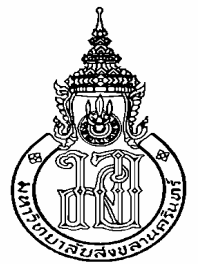


การสร้างเปลือกไข่ของกุ้งกุลาดำ

Hatching Envelope Formation in the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*

วานีตา พุฒวัจน์

Wanita Putthawat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Anatomy
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างเปลือกไข่ของกุ้งกุลาดำ
ผู้เขียน นางสาววานีตา พุฒวัจน์
สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก **คณะกรรมการสอบ**

....ประธานกรรมการ
(ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที) (ดร.อุตส่าห์ จันทร์อำไพ)

.....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)

....กรรมการ
(ศาตราจารย์ ดร.นพ.บุญเสริม วิทยชำนาญกุล) (ศาตราจารย์ ดร.นพ.บุญเสริม วิทยชำนาญกุล)

....กรรมการ
(ดร.พรสวรรค์ ดวงสุวรรณ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สถาพร ดิเรกบุษราคม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างเปลือกไข่ของกุ้งกุลาดำ
ผู้เขียน นางสาววานีตา พุฒวัจน์
สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์
ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อ ศึกษากระบวนการสร้างเปลือกไข่ (hatching envelope) ของกุ้งกุลาดำโดยใช้ lectin เป็นตัวติดตาม (probe) ในขั้นต้นได้ทดสอบความจำเพาะต่อ lectin ของ hatching envelope ที่แยกออกมาจากไข่ พบว่า hatching envelope มีความจำเพาะต่อ Concanavalin A (Con A ซึ่งมีความจำเพาะต่อน้ำตาล glucose และ mannose), *Lens culinaris* agglutinin (LCA ซึ่งมีความจำเพาะต่อน้ำตาล mannose) และ wheat germ agglutinin (WGA ซึ่งมีความจำเพาะต่อ N-acetyl glucosamine) ได้เลือกนำ Con A และ WGA มาเป็น probe ในการติดตามการสร้าง hatching envelope ที่เวลาต่างๆ หลังวางไข่โดยใช้ fluorescein-lectin labeling ในตัวอย่างไข่ที่ตัดแบบหนา (thick sections) ซึ่งศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ้นท์ (fluorescent microscope) และ gold-lectin labeling ในตัวอย่างไข่ที่ตัดแบบบาง (thin sections) ซึ่งศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) ผลการทดลองใน thick sections พบว่า fluorescein-Con A labeling ปรากฏจุดเรืองแสงประปรายทั่ว cytoplasm ของไข่ในช่วงเวลาทันทีหลังวางไข่ และต่อมาจุดเหล่านั้นกระจายตัวออกมาหนาแน่นบริเวณรอบนอก (cortex) ของไข่และออกมาที่ขอบกลายเป็นส่วนหนึ่งของ hatching envelope ที่เวลา 8 นาทีหลังวางไข่ สำหรับ fleorescein-WGA labeling พบจุดเรืองแสงประปรายทั่ว cytoplasm ของไข่ในช่วงเวลาทันทีหลังวางไข่เช่นกันแต่เวลา 1-20 นาทีหลังวางไข่ พบจุดกระจายตัวใน perivitelline space และลอยขึ้นไปรวมกับ hatching envelope ที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ จากการศึกษาด้วย TEM ที่เวลาทันทีหลังวางไข่พบ membranous structures, dense vesicles และ flocculent vesicles ใน cytoplasm ของไข่ membranous structures ถูกปล่อยออกมารวมตัวกับ granular materials ซึ่งกลายเป็นชั้นนอกของ hatching envelope ตามมาด้วยการ exocytosis ของ gold-Con A-labeled dense vesicles ซึ่งกลายเป็นชั้นในของ hatching envelope สุดท้าย gold-WGA-labeled flocculent vesicles ได้ exocytosis ออกสู่ perivitelline space พร้อมกับการยกตัวขึ้นของ hatching envelope ผลการทดลองนี้กล่าวได้ว่าชั้นในของ hatching envelope มี mannose/glucose เป็นองค์ประกอบ และ perivitelline space มี N-acetyl glucosamine เป็นองค์ประกอบ

Thesis Title	Hatching envelope formation in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*
Author	Miss Wanita Putthawat
Major Program	Anatomy
Academic Year	2010

ABSTRACT

The aim of this study is to reveal the process of hatching envelope formation in the eggs of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lectins were used as molecular probe in this study. Screening test for lectin affinity to isolated hatching envelope revealed the binding of Concanavalin A (Con A, specific binding to glucose and mannose), *Lens culinaris* agglutinin (LCA, specific binding to mannose) and wheat germ agglutinin (WGA, specific binding to N-acetyl glucosamine). Con A and WGA were chosen for labeling eggs at different period after spawning, as fluorescein-lectin labeling in thick section observed under fluorescent microscope and as gold-lectin labeling in thin section observed under transmission electron microscope. In the thick sections with fluorescein-Con A labeling, diffused fluorescent dots were distributed throughout the ooplasm at spawning, migrated to the cortical area and became part of the hatching envelope at 8-min post-spawning. With fleorescein-WGA labeling, diffused fluorescent dots were also distributed throughout the ooplasm at spawning but at 1-20 min post-spawning, they migrated into the perivitelline space, at the same time of elevation of the hatching envelope; and they associated with hatching envelope at 30-min post-spawning. Under TEM, at time of spawning, membranous structures, dense vesicles and flocculent vesicles were observed in the cytoplasm of the oocyte. Membranous structures were released and coalesced with granular materials, and became the outer layer of the hatching envelope. This was followed by exocytosis of gold-Con A-labeled dense vesicles, which became the inner layer of the hatching envelope. Finally, gold-WGA containing flocculent vesicles were released into the perivitelline space, accompanying the elevation of the hatching envelope. The results suggest that the inner layer of the hatching envelope contains mannose/glucose and the perivitelline space contains N-acetyl glucosamine.

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
คำย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
2. วิธีการทดลอง	19
3. ผลการทดลอง	23
4. บทวิจารณ์	38
5. บทสรุป	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	47
ประวัติผู้เขียน	53

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. Lectin จำนวน 11 ชนิด และหมู่น้ำตาลที่จำเพาะ ที่ใช้ในการทดลอง 17

2. แสดงความสามารถในการจับกับ hatching envelope ของ lectin แต่ละชนิด 23

3. การเปรียบเทียบองค์ประกอบของส่วนต่างๆ ใน hatching envelope ของกุ้งกุลาดำและกุ้ง *Sicyonia ingentis* 37

รายการภาพประกอบ

รูปที่ **หน้า**

บทที่ 1

1. กุ้งกุลาดำ 3
2. ภาพวาดและภาพถ่ายแสดงลักษณะรังไข่ของกุ้งกุลาดำ 5
3. ภาพถ่ายแสดงลักษณะท่อนำไข่ของกุ้งกุลาดำ 6
4. ภาพถ่ายแสดงลักษณะ thelycum ของกุ้งกุลาดำ 6
5. รูปวาดแสดงการพัฒนาของรังไข่ในระยะต่างๆ ของกุ้งกุลาดำที่สามารถสังเกตได้จากการใช้ไฟฉายส่อง 8
6. รูป light microscope แสดงลักษณะเนื้อเยื่อของรังไข่กุ้งกุลาดำในระยะต่างๆ ของ พัฒนาการ 9
7. รูป light microscope แสดงไข่กุ้งกุลาดำ 10
8. แสดงขั้นตอนการเกิด egg activation ของ *S. ingentis* 13
9. รูปภาพแสดงตัวอย่างโครงสร้างของ lectin 16
10. รูปภาพแสดงความจำเพาะเจาะจงของ lectin ต่อน้ำตาลบนผิวเซลล์ 16

บทที่ 3

11. Fluorescent micrograph แสดงความสามารถในการจับกับ hatching envelope ของ lectin Con A, LCA, และ WGA 24
12. Fluorescent micrograph แสดงไข่กุ้งกุลาดำที่เวลาต่างๆ หลังวางไข่ ที่ incubate ด้วย fluorescein-labeled Con A 26
13. Fluorescent micrograph แสดงไข่กุ้งกุลาดำที่เวลาต่างๆ หลังวางไข่ ที่ incubate ด้วย fluorescein-labeled WGA 27
14. Transmission electron micrograph แสดงไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 0 วินาทีหลังวางไข่ 28
15. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 15-45 วินาทีหลังวางไข่ 29
16. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 1 นาทีหลังวางไข่ 30

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

บทที่ 3

17. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 1-2 นาทีหลังวางไข่ 31
18. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 3 นาทีหลังวางไข่ 32
19. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ 33
20. ภาพ TEM gold-Con A ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ 35
21. ภาพ TEM gold-WGA ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ 36

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เกิดขึ้นในประเทศไทยมานานกว่า 20 ปี โดยได้ผลเป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามในระยะหลายปีที่ผ่านมาได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบหนาแน่น (intensive farming) เพื่อให้ได้ผลกำไรสูงสุด (เลี้ยงระยะเวลา 4 เดือน สามารถจับขายได้ที่ขนาดประมาณ 35-45 ตัว/กิโลกรัม) ได้ก่อให้เกิดปัญหาเช่นการติดเชื้อไวรัส ซึ่งได้แก่ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus, YHV) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีปัญหากุ้งกุลาดำเจริญเติบโตช้า (Withyachumnarnkul *et al.,* 2004) ประกอบกับการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติซึ่งการเลี้ยงกุ้งบ่อดินเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ยังไม่มีการพัฒนาเท่าที่ควร ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่หันมาเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ที่มีการเลี้ยงที่ง่ายกว่าแทน สิ่งสำคัญที่ทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวง่ายกว่ากุ้งกุลาดำคือ การที่กุ้งขาวมีการคัดเลือกสายพันธุ์ให้เป็นกุ้งที่ปลอดโรคและมีความต้านทานโรคมาเป็นเวลานานกว่า 20 ปี ขณะที่การคัดเลือกสายพันธุ์ในกุ้งกุลาดำมีการพัฒนาอย่างไม่เป็นระบบมาเป็นเวลาประมาณ 10 ปี และอย่างเป็นระบบมาประมาณ 3 ปี และกุ้งขาวก็นับว่าเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปของผู้บริโภคในตลาดโลก ซึ่งการเลี้ยงกุ้งขาวแบบหนาแน่นมาก (super intensive farming) สามารถให้ผลผลิตได้สูงถึง 3-5 ตัน/ไร่ ซึ่งใช้เวลาเพียง 3 เดือนเพื่อให้ได้ขนาดที่ต้องการแม้ว่าเป็นขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ (60-100 ตัว/กิโลกรัม) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากกุ้งกุลาดำมีอัตราการเติบโตที่สูงกว่ากุ้งขาวเกือบเท่าตัวในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เท่ากัน และกุ้งกุลาดำเป็นกุ้งพันธุ์ดั้งเดิมของไทยซึ่งไม่เหมือนกุ้งขาวที่เป็นกุ้งพันธุ์ต่างถิ่นจากอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านระบบนิเวศและความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้นการที่สามารถเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ในอัตราการเจริญเติบโตที่ปกติ เกษตรกรก็มีโอกาสกลับมาเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอีกครั้ง

การคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อให้ได้กุ้งกุลาดำที่ปลอดโรคและโตเร็วอยู่ภายใต้การดูแลของศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง (ศวพก.) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) นอกจากการพัฒนาสายพันธุ์กุ้งกุลาดำแล้ว หน่วยงาน ศวพก. ยังมีกิจกรรมงานวิจัยต่างๆ เพื่อส่งเสริมการคัดเลือกสายพันธุ์ในลักษณะอื่นอีก เช่น งานวิจัยเกี่ยวกับพันธุกรรม ระบบสืบพันธุ์ของกุ้ง การแช่แข็งตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์ อาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้ง เป็นต้น

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ สิ่งที่เป็นปัญหาของการเพาะเลี้ยงในปัจจุบันคืออัตราการฟักไข่เป็นตัว (hatching rate, HR) ซึ่งถ้าเป็นพ่อแม่พันธุ์กุ้ง

จากธรรมชาติจะมี HR ประมาณ 80-90% ในขณะที่กุ้งที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ ซึ่งเป็นกุ้งที่เพาะเลี้ยงเอง (domesticated shrimp) จะมี HR ประมาณ 50-80% สิ่งนี้แม้จะไม่ใช่เป็นปัญหาที่เร่งด่วนสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ เนื่องจากปริมาณลูกกุ้งที่แม่กุ้งหนึ่งตัวผลิตได้มีจำนวนแสนหรือล้านตัว และในการคัดเลือกต้องการลูกกุ้งในปริมาณหมื่นตัวต่อแม่กุ้งเท่านั้น แต่ในแง่ธุรกิจการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งเพื่อการนำไปเป็นกุ้งเนื้อ (harvesting size) การเพิ่ม HR จาก 50% เป็น 80% นั้น เป็นความแตกต่างที่มีความสำคัญ การวิจัยที่ทำเพื่อเพิ่ม HR ใน domesticated shrimp จึงนับเป็นงานที่ต้องทำควบคู่กันไปกับการพัฒนาสายพันธุ์ด้วย

การที่มี HR ต่ำ มักจะมีสาเหตุมาจาก 1) ไข่ หรือ oocyte ไม่สมบูรณ์ 2) อสุจิ หรือ sperm ไม่สมบูรณ์ และ/หรือ 3) สภาวะแวดล้อม ซึ่งหมายถึงน้ำทะเลที่ไข่สัมผัสหลังจากการวางไข่มีคุณภาพไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของไข่ เช่น ระดับ pH หรือระดับ alkalinity ไม่เหมาะสม หรือระดับ magnesium ในน้ำต่ำเกินไป (Pongtippatee *et al*., 2010) ซึ่งในทางปฏิบัติของโรงเพาะฟักทั่วไป มักจะไม่มีปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ เพราะผู้ประกอบการมักมีความชำนาญและทักษะสูง ดังนั้นปัญหาส่วนใหญ่น่าจะมาจากความสมบูรณ์ของไข่ และ/หรืออสุจิของกุ้ง

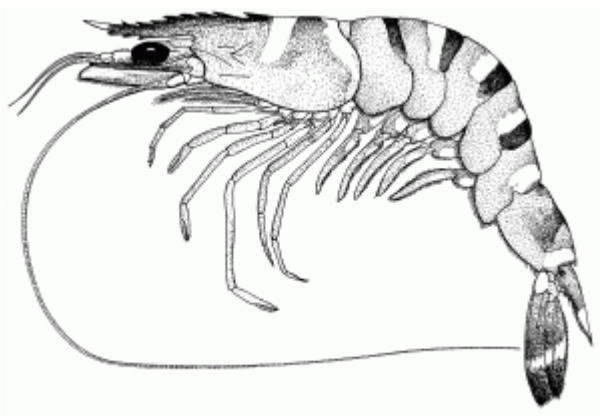
ข้อมูลที่ได้จากโรงเพาะฟักพบว่า HR ขึ้นกับอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate, FR) ซึ่งได้จากการสังเกตตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคำนวณหลังจากที่มีการปฏิสนธิไปแล้ว 4-5 ชั่วโมง โดยพบว่า HR มักจะต่ำกว่า FR ประมาณ 2-5% ดังนั้นการทำให้ HR สูงขึ้น คือการทำให้ FR สูงขึ้น ซึ่งถ้าพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันเท่านี้ทำให้คิดว่าการพัฒนาเพื่อให้ได้ HR สูงขึ้นก็ไม่น่าจะสูงได้มากกว่า 2-5% แน่นอนเพราะเป็นไปไม่ได้ที่จะสูงกว่า FR ในความเป็นจริงการดูและคำนวณค่าของ FR นั้น ควรทำที่เวลา 1-2 ชั่วโมงหลังการวางไข่ ซึ่งเป็นเวลาที่ไข่ที่ได้รับการผสมจะมีการแบ่งตัวอยู่ในช่วง 4-8 เซลล์ซึ่งเป็นระยะที่แน่ใจได้ว่าไข่ผสมติดและมีพัฒนาการ และที่เวลาหลังวางไข่ 1-2 ชั่วโมงนี้ก็เป็นเวลาน้อยที่สุดที่จะบอก FR ได้อย่างถูกต้อง การที่โรงเพาะฟักมีการตรวจสอบ FR ในตอนเช้าประมาณ 05.00 น. ก็เป็นความสะดวกในการทำงาน คงเป็นไปได้ยากที่จะตรวจสอบ FR หลังวางไข่ 1-2 ชั่วโมง เนื่องจากแม่กุ้งมีการวางไข่ในเวลาประมาณเที่ยงคืน การตรวจสอบ FR ในตอนเช้านี้ไข่จะอยู่ในช่วงกลางๆ ของการพัฒนาแล้ว และไข่ที่อยู่ในระยะนี้ก็นับว่ามีการพัฒนาที่เข้าขั้นปลอดภัย โอกาสที่จะฟักเป็นตัวสูง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า FR จริงๆ ที่เกิดขึ้นและนับได้ในช่วง 1-2 ชั่วโมงหลังวางไข่มีโอกาสสูงกว่า HR ที่ตรวจสอบกันในปัจจุบันอย่างมาก ซึ่งหมายถึงว่าการพัฒนาให้ได้ HR สูงขึ้นนั้น มีโอกาสสูงขึ้นได้มากกว่า 2-5%

กระบวนการสร้างเปลือกไข่ (hatching envelope formation) เป็นขั้นตอนหนึ่งของการเกิด egg activation ซึ่ง egg activation เป็นกระบวนการการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและชีวเคมีของไข่เพื่อการปฏิสนธิกับอสุจิ และการสร้าง hatching envelope เป็นขั้นตอนที่ป้องกันไม่ให้อสุจิตัวที่สองเข้าไปภายในไข่ที่ถูกผสมแล้ว ซึ่งการที่มีอสุจิผสมมากกว่า

หนึ่งตัว เรียกว่าการเกิด polyspermy ในไข่ เป็นความผิดปกติที่ทำให้ไข่ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนได้ กลไกการสร้าง hatching envelope ในกุ้งกุลาดำ ได้มีการรายงานบ้างแล้ว แต่ยังไม่สมบูรณ์ (Pongtippatee *et al.,* 2004) ในงานวิจัยนี้ จึงศึกษารายละเอียดด้านสันฐานวิทยาของการเกิด hatching envelope ในกุ้งกุลาดำ โดยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescent microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (transmission electron microscope, TEM) และอาศัยวิธีการทางชีวเคมีร่วมด้วย เพื่อช่วยให้เกิดความเข้าใจที่ชัดเจนขึ้น โดยคาดว่าความรู้นี้จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ FR และ HR ได้ในอนาคต

1.2. บทตรวจเอกสาร

1.2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกุ้งกุลาดำ



รูปที่ 1. กุ้งกุลาดำ

(http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_monodon/en)

ชื่อไทย : กุ้งกุลาดำ กุ้งกุลา กุ้งกะลา กุ้งเสือดำ กุ้งเสือ กุ้งลาย
ชื่อภาษาอังกฤษ : Giant tiger prawn, Black tiger shrimp
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Penaeus monodon* fabricius

กุ้งกุลาดำมีลักษณะคล้ายกุ้งทะเลทั่วไป มีส่วนของกรี (rostrum) ยาวจนถึงฐานของหนวด (antennule) มีฟันบน 6-8 ซี่ และฟันล่าง 2-4 ซี่ มีเปลือกคลุมหัว (carapace) มีขาเดิน (periopod) 5 คู่ และขาว่ายน้ำ (pleopod) 5 คู่ ลำตัวมีสีตั้งแต่ สีเขียว สีน้ำตาล สีแดง สีเทา สีน้ำเงิน จนถึงสีดำ บริเวณท้อง (abdomen) และ carapace มีลายตามขวางสีแดงหรือสีขาว หนวดมีสีน้ำตาลเทา ขาเดินและขาว่ายน้ำมีสีน้ำตาล (รูปที่ 1)

กุ้งกุลาดำตัวเต็มวัยจะวางไข่ในทะเลลึก เมื่อฟักเป็นตัวอ่อน (larva) จะค่อยๆ ว่ายเข้าสู่ชายฝั่ง มาอาศัยอยู่บริเวณปากอ่าว ทะเลสาบ หรือแถบป่าชายเลน กุ้งกุลาดำในธรรมชาติส่วนใหญ่จะออกหาอาหารในเวลากลางคืน ในเวลากลางวันจะซ่อนตัวบริเวณก้นทะเล โดยธรรมชาติจะเป็นผู้ล่ามากกว่าเป็นพวกกินซาก สามารถพบตัวเต็มวัยได้บริเวณใต้โคลนหรือทรายก้นทะเล ที่ความลึก 20-50 เมตร ห่างจากชายฝั่ง กุ้งกุลาดำมีการกระจายตัวตั้งแต่แถบมหาสมุทรแปซิฟิกจนถึงมหาสมุทรอินเดีย ซึ่งได้แก่ประเทศ ญี่ปุ่นตอนใต้ ไต้หวัน เกาหลี ฮ่องกง ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย สิงคโปร์ ไทย ศรีลังกา อินเดีย ปากีสถาน ทานซานเนีย แอฟริกาใต้ และออสเตรเลีย (Motoh, 1981)

สำหรับวงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ ไข่กุ้งกุลาดำจะฟักเป็นตัวอ่อนระยะนอเพลียส (nauplius) ภายใน 12 ชั่วโมง หลังได้รับการปฏิสนธิ กุ้งในระยะนี้มีขนาด 0.30-0.33 มิลลิเมตร ลักษณะคล้ายแมงมุม ยังไม่กินอาหาร แต่จะเจริญอยู่ได้ด้วย yolk ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอน ประมาณ 2 วัน ระยะนี้จะมีการลอกคราบ 6 ครั้ง สิ้นสุดระยะนอเพลียส จะมีขนาดประมาณ 0.60 มิลลิเมตร เข้าสู่ระยะโปรโตซูเอีย (protozoea) ซึ่งมีขนาด 1.00-3.30 มิลลิเมตร มีรยางค์คล้ายขนนกและมีลำตัวยาว กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร ลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลาในระยะนี้ประมาณ 3-4 วัน จะเข้าสู่ระยะไมซิส (mysis) ซึ่งมีขนาดประมาณ 3.30-5.00 มิลลิเมตร มีลำตัวเป็นข้อปล้อง เริ่มมีลักษณะของก้านตา (eyestalk) และหางของกุ้งตัวเต็มวัย ระยะนี้กินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร ผ่านการลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลา 3-4 วัน จะเริ่มเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา (postlarva, PL) ซึ่งมีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัย และเริ่มเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมมาหาเศษซากอาหารกินบริเวณก้นทะเล นอกจากนี้ยังกินหนอนทะเลและพวกสัตว์น้ำขนาดเล็ก ใช้เวลา 15 วัน จะเข้าสู่ระยะจูเวนไนล์ (juvenile) ซึ่งมีลักษณะต่างๆ สมบูรณ์เหมือนตัวเต็มวัย แต่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ จนเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ และใช้เวลา 10 เดือนจะเป็นตัวเต็มวัย (Motoh, 1981)

1.2.2 การสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ

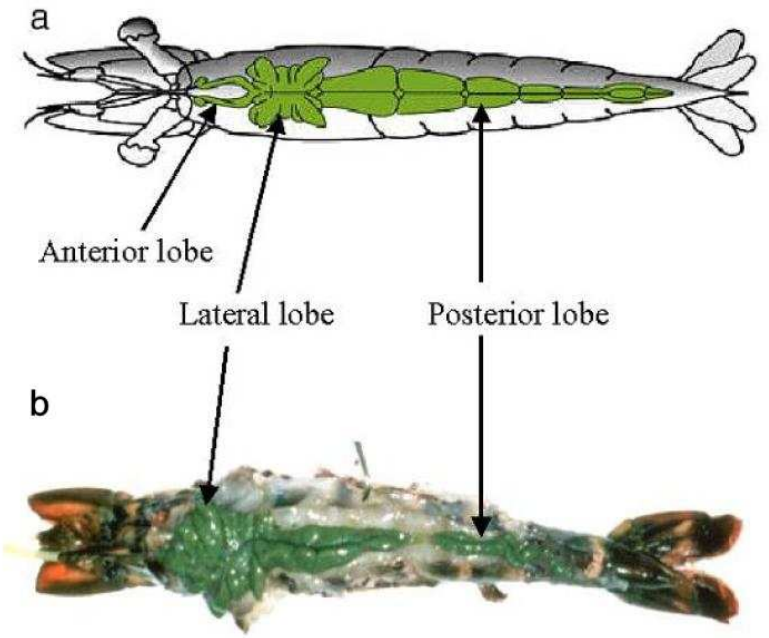
กุ้งกุลาดำมีอวัยวะเพศภายนอกมองเห็นได้ชัดเจน และสามารถใช้ลักษณะความแตกต่างของอวัยวะในการจำแนกเพศได้ อวัยวะเพศผู้เรียกว่า พีแตสม่า (petasma) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของแขนงอันใน (endopodite) ของขาว่ายน้ำคู่แรก โดย endopodite ทั้ง 2 ข้างจะเชื่อมติดกัน เพื่อทำหน้าที่เป็นอวัยวะเพศผู้ อวัยวะเพศเมีย เรียกว่า ทีไลคัม (thelycum) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงผนังด้านท้อง (sternal plate) ของรยางค์ส่วนอก ปล้องที่ 7 และ 8 หรือตรงกับขาเดินคู่ที่ 4-5 ซึ่งพัฒนามาเป็นถุงสำหรับรับน้ำเชื้อ การผสมพันธุ์เกิดขึ้นเวลากลางคืน หลังจากที่ตัวเมียลอกคราบซึ่งทำให้เปลือกนุ่ม โดยตัวผู้จะปล่อยถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ไปเก็บไว้ในทีไลคัมของตัวเมีย และฝากไว้จนกระทั่งตัวเมียวางไข่ การวางไข่เกิดขึ้นในเวลากลางคืน มีการปฏิสนธิภายนอกโดยตัวเมียเป็นผู้ปล่อยทั้งไข่และน้ำเชื้อ (Motoh, 1981)

1.2.3 ระบบสืบพันธุ์ของกุ้งเพศเมีย

1.2.3.1 อวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของกุ้งเพศเมีย

ประกอบด้วย รังไข่ (ovary) 1 คู่ ท่อนำไข่ (oviduct) 1 คู่ และ thelycum 1 อัน

รังไข่ ในกุ้งทะเลมีรังไข่ 2 ข้างซ้ายและขวา แต่ละข้างประกอบด้วย anterior lobe, lateral lobe และ posterior lobe (รูปที่ 2a) lateral lobe อยู่ที่บริเวณ cephalothorax รังไข่ทั้งสองข้างมีบางส่วนเชื่อมติดกันในแนวกลาง รังไข่ที่ยังไม่สุกมีลักษณะเรียวยาวเมื่อมองจากด้านหลังของกุ้ง เมื่อรังไข่พัฒนาขึ้นจะขยายกว้างและหนาตัว ค่อยๆ มีสีเขียวเข้มขึ้น เมื่อไข่สุกรังไข่จะมีลักษณะเหมือนพวงองุ่นรวมอัดแน่นเข้าด้วยกันมีสีเขียวเข้ม (รูปที่ 2b)

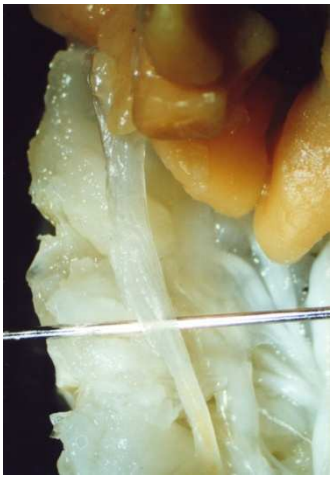


รูปที่ 2. ภาพวาดและภาพถ่ายแสดงลักษณะรังไข่ของกุ้งกุลาดำ (Hall *et al.,* 1999)

a. ภาพวาดแสดงลักษณะของรังไข่ที่ประกอบด้วย anterior lobe, lateral lobe และ posterior lobe

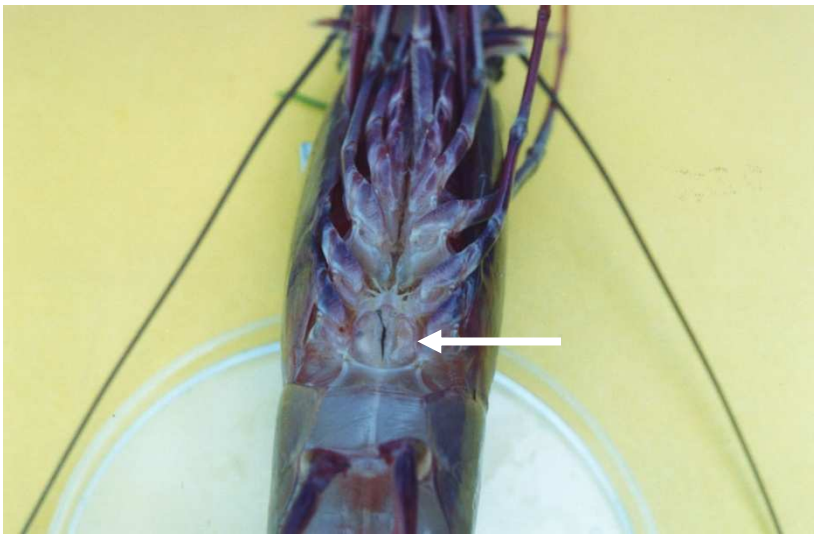
b. ภาพถ่ายแสดงลักษณะของรังไข่ในระยะไข่สุก

ท่อนำไข่ จะเริ่มจากปลาย lateral lobe ของ ovary ไปสิ้นสุดที่ gonopore ซึ่งอยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 3



รูปที่ 3. ภาพถ่ายแสดงลักษณะท่อนำไข่ของกุ้งกุลาดำ (วางอยู่บนเข็ม) (Taweepreda, 2003)

Thelycum ลักษณะเป็นสามเหลี่ยม อยู่บริเวณพื้นที่ระหว่างขาเดิน 2 คู่สุดท้าย ประกอบด้วย median plate 1 อันและ lateral plate 1 คู่ thelycum ในกุ้งกุลาดำ จะเป็นแบบปิด (closed thelycum) ดังนั้น ตัวผู้จะสามารถฝาก spermatophore ไว้กับตัวเมียขณะผสมพันธุ์ในขณะที่ตัวเมียพึ่งลอกคราบใหม่ ๆ เท่านั้น (Motoh, 1981; Taweepreda, 2003)



รูปที่ 4. ภาพถ่ายแสดงลักษณะ thelycum ของกุ้งกุลาดำ (ศรชี้) (Taweepreda, 2003)

1.2.3.2 พัฒนาการของรังไข่กุ้งกุลาดำ รังไข่มีพัฒนาการ 5 ระยะ สังเกตได้จากการใช้ไฟฉายส่องจากส่วนท้อง ทำให้เห็นเป็นเงามืดของรังไข่จากทางด้านหลัง ซึ่งเป็นวิธีที่โรงเพาะฟักใช้เพื่อตรวจสอบระยะพัฒนาการ (รูปที่ 5) แต่ละระยะจะมีลักษณะและพัฒนาการของไข่ (รูปที่ 6) ดังนี้

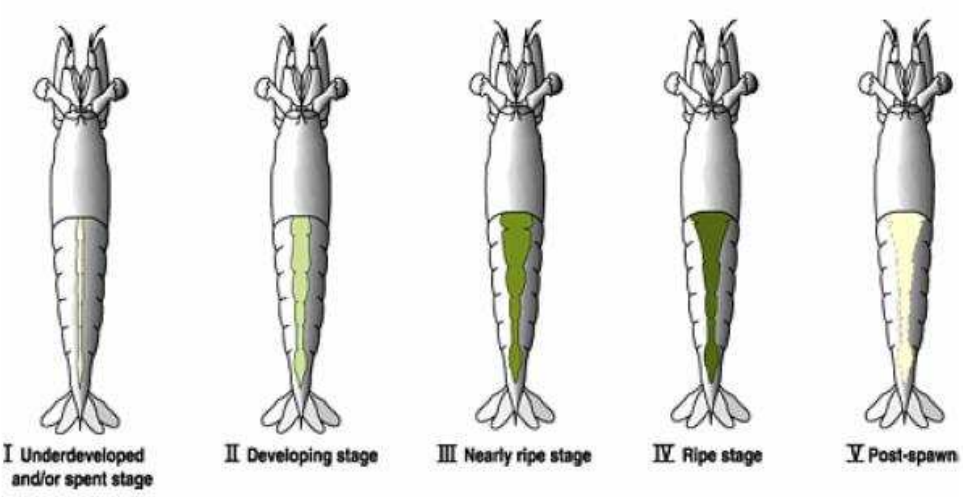
ระยะที่ 1 (I) Undeveloped and/or spent stage หรือระยะไข่อ่อน รังไข่จะมีลักษณะยาว จากบริเวณหัวถึงหาง มองเห็นเป็นเงาขนานไปกับลำไส้ ในระยะนี้รังไข่เต็มไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่หนา (connective tissue capsule) ล้อมรอบ soft vascular area ผนังด้านในของ connective tissue capsule บุด้วยเยื่อบุผิวที่เรียกว่า germinal epithelium บรรจุเซลล์ตั้งต้นของไข่ที่เรียกว่า oogonia และ accessory cells ที่เรียกว่า follicular cell หรือ nurse cell (เซลล์พี่เลี้ยง) (รูปที่ 6a)

ระยะที่ 2 (II) Developing stage ระยะเริ่มเจริญ เส้นรังไข่ขยายใหญ่ขึ้น และมีสีเข้มขึ้นจนมองเห็นได้ชัด โดยเฉพาะส่วนอกและหัวจะมีสีเทาหรือเขียวปนเทา ภายในรังไข่ oogonia มีการแบ่งเซลล์โดยวิธี mitosis ในบริเวณ germinal epithelium บริเวณที่มีการแบ่งเซลล์นี้มีขนาดใหญ่ขึ้นกลายเป็นบริเวณที่เรียกว่า zone of proliferation ซึ่ง oogonia มีขนาดใหญ่ขึ้นด้วยและเริ่มเข้าสู่ระยะ first meiotic division ลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งที่เรียกว่า haploid ในระยะนี้ยังไม่มีการผลิต yolk ทำให้เรียก oocytes ระยะนี้ว่า previtellogenic oocytes (รูปที่ 6b)

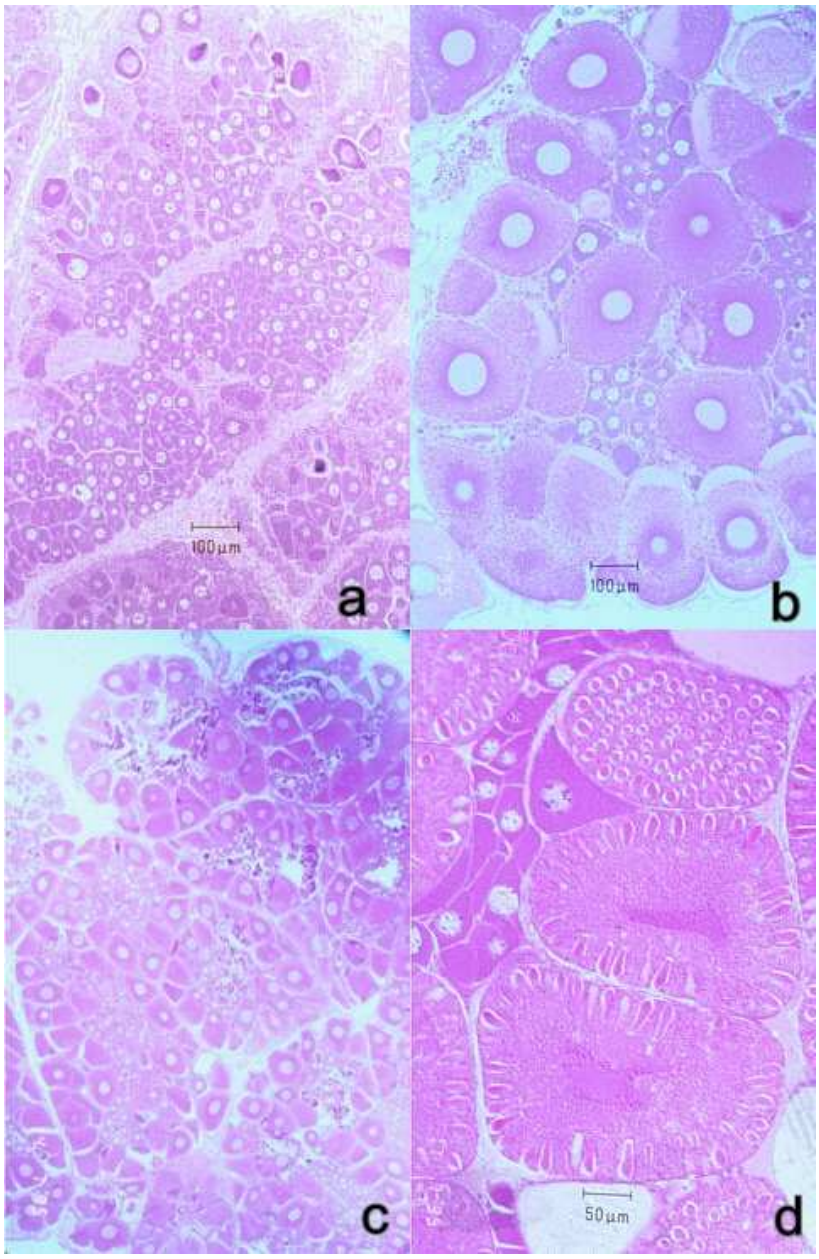
ระยะที่ 3 (III) Nearly ripe stage ระยะเจริญเต็มที่ รังไข่เป็นเส้นทึบหนาขึ้น มองเห็นได้ชัดผ่านเปลือก บริเวณหัวและลำตัวมีลักษณะคล้ายผีเสื้อกางปีกมองเห็นได้ชัดเจน แถบไข่หนาทึบยาวตลอดตัว ภายในรังไข่ oocytes พัฒนาไปเรื่อยๆ พร้อมกับเคลื่อนตัวไปยังบริเวณขอบของ ovarian lobe เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการตกไข่ (ovulation) ในระหว่างการเคลื่อนตัวมี follicular cell เกาะติดอยู่บริเวณขอบของ oocytes ทำหน้าที่สร้าง yolk ให้กับ oocytes โดยกระบวนการ vitellogenesis ในระยะนี้มีการสะสม carotenoid pigments ด้วย ทำให้ไข่มีสีเขียวเข้ม (รูปที่ 6c)

ระยะที่ 4 (IV) Ripe stage ระยะไข่สุก รังไข่จะขยายออกมากขึ้น เป็นแถบยาวตลอดลำตัว โดยเฉพาะที่ปล้องแรกขยายออกเป็นปีกและแผ่ลึกลงต่ำถึงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 มองเห็นเป็นสีเขียวเข้ม ภายในรังไข่ ช่วงนี้เป็นระยะปลายของ vitellogenesis oocytes มีการสร้าง cortical granules ที่บรรจุ jelly-like substance สำหรับการสร้างเปลือกหลังวางไข่ ในกุ้งกุลาดำมีลักษณะเป็น cortical rod (รูปที่ 6d)

ระยะที่ 5 (V) Post-spawn ระยะหลังวางไข่ เป็นระยะหลังจากการวางไข่ รังไข่จะแบนลีบ ดูภายนอกจะคล้ายกับรังไข่ระยะแรก (Hall *et al.,* 1999)



รูปที่ 5. รูปวาดแสดงการพัฒนาของรังไข่ในระยะต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำที่สามารถสังเกตได้จากการใช้ไฟฉายส่อง (Hall *et al.,* 1999)



รูปที่ 6. รูป light microscope แสดงลักษณะเนื้อเยื่อของรังไข่กุ้งกุลาดำในระยะต่างๆ ของพัฒนาการ (Hall *et al.,* 1999)

a. เนื้อเยื่อรังไข่ระยะที่ 1

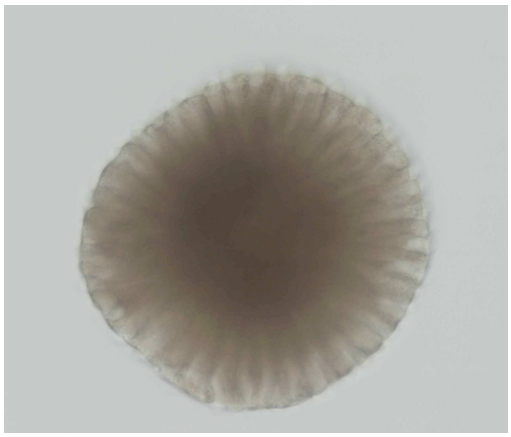
b. เนื้อเยื่อรังไข่ระยะที่ 2

c. เนื้อเยื่อรังไข่ระยะที่ 3

d. เนื้อเยื่อรังไข่ระยะที่ 4

1.2.3.3 ไข่กุ้งกุลาดำ

ไข่กุ้งกุลาดำจะมีลักษณะกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 270-280 µm บริเวณผิวไข่มีลักษณะเป็นหลุมโดยรอบ เรียกว่า cortical crypts ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-15 µm ภายในบรรจุด้วย corticoid rods ลักษณะเป็นแท่งฝังอยู่ภายใน และบริเวณผิวไข่จะถูกปกคลุมด้วยเปลือกบาง ๆ เรียกว่า investment membrane ภายในไข่ จะเต็มไปด้วย yolk granule, mitochondria และ cortical granules หลายชนิด ซึ่งต่อไปจะค่อย ๆ เคลื่อนออกมารอบ ๆ ไข่และหลั่งสารเพื่อสร้างเปลือกไข่ (hatching envelope) ไข่กุ้งจะมีการพัฒนาโดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและชีวเคมี หลังจากที่กุ้งวางไข่ เรียกว่าการเกิด egg activation โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นเมื่อไข่กุ้งสัมผัสกับน้ำทะเล (Pongtippatee *et al.,* 2004)



รูปที่ 7. รูป light microscope แสดงลักษณะไข่กุ้งกุลาดำที่ 0 วินาทีหลังการวางไข่

1.2.3.4 กระบวนการเกิด egg activation

กระบวนการ egg activation เป็นกระบวนการที่เกิดในขณะที่ไข่มีการปฏิสนธิกับอสุจิ มีหน้าที่ป้องกันการเกิด polyspermy ทั้งทางกายภาพและทางชีวเคมี และช่วยรักษาสภาวะภายในไข่ให้เหมาะสมต่อการพัฒนาของตัวอ่อนด้วย (Epel, 1975; Clark *et al.,* 1980; Pongtippatee *et al*., 2004)

กลไกป้องกันการเกิด polyspermy ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกิดขึ้นขณะที่อสุจิสัมผัสกับเซลล์ไข่ ขณะที่อสุจิเคลื่อนที่เข้าหาไข่และสัมผัสกับเยื่อหุ้มชั้นนอกของไข่ที่เรียกว่า zona pellucida จะเกิดปฏิกิริยา acrosome reaction กับอสุจิ โดยบน zona pellucida มี glycoprotein ชนิดหนึ่งเรียกว่า ZP3 ทำหน้าที่เป็น sperm receptor ซึ่งหมู่ N-acetylglucosamine บน ZP3 จะจับกับโมเลกุล galactosyltransferase (GalT) ของอสุจิ และกระตุ้นให้เกิด acrosome reaction กับอสุจิ ระยะแรกของการเกิด acrosome reaction จะมีการหลั่งเอนไซม์ protease ที่เรียกว่า acrosin จาก acrosome ซึ่งเป็นโครงสร้างคล้ายหมวกอยู่ที่

ส่วนหน้าของอสุจิ เพื่อย่อยผ่านชั้น zona pellucida ของไข่ ต่อมามีการเชื่อมติดกันของ plasma membrane ของไข่กับอสุจิ ส่งผลให้ไข่เกิดปฏิกิริยา zona reaction หรือ cortical reaction โดยการที่ cortical granule ใน cytoplasm ของไข่ ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงเล็กๆ ภายในบรรจุเอนไซม์ protease มีการเกิด exocytosis (การที่ membrane ของ cortical granules เชื่อมติดกับ cell membrane ของไข่และหลั่งสารภายใน granule ออกมาภายนอกไข่) หลั่งสารภายในซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางกายภาพและทางชีวเคมีของชั้น zona pellucida และทำลาย receptor ที่อยู่บน zona pellucida ทำให้อสุจิตัวที่สองไม่สามารถผ่านเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ได้อีก (Bleil and Wassarman, 1980; Shur and Hall, 1982a, b; Florman and Wassarman, 1985)

ในหอยเม่น (sea urchin) การปฏิสนธิเริ่มจากการที่ egg jelly ปล่อยโปรตีนที่เรียกว่า resact ออกมาในน้ำซึ่งเป็น chemotaxis ให้อสุจิเคลื่อนที่เข้าหาไข่ เมื่ออสุจิสัมผัสกับ jelly coat ของไข่ ทำให้อสุจิเกิด acrosome reaction หลั่ง hydrolytic enzyme ซึ่งอยู่ภายใน acrosome ออกมาย่อย jelly coat ในระยะต่อมามีการ polymerization ของ globular actin ที่อยู่ภายใน cytoplasm ของอสุจิให้เป็น actin filament ซึ่งเป็นโครงสร้างยาวยื่นออกมาจากส่วนหัว เรียกว่า acrosomal process ซึ่งส่วนนี้เป็นส่วนนำให้อสุจิแทรกเข้าไปใน jelly coat เข้าไปสัมผัสกับ vitelline envelope ของไข่ ที่ปลายของ acrosomal process มีโปรตีน bindin ซึ่งมีความจำเพาะต่อ bindin receptor บน vitelline envelope โปรตีน bindin มีบทบาทเกี่ยวกับ species specific และทำให้เกิดการหลอมติดกันของ cell membrane ของไข่และอสุจิ ในตอนนี้กลไกการป้องกัน polyspermy ที่เรียกว่า cortical granule reaction ได้เกิดขึ้นโดยการ exocytosis ของ cortical granules ชุดแรกที่อยู่ใน cytoplasm ของไข่ หลั่งเอนไซม์ proteases ออกมาอยู่ระหว่าง vitelline envelope และ cell membrane เอนไซม์นี้จะทำลายโครงสร้างเชื่อมยึดระหว่าง vitelline envelope และ cell membrane ทำให้เยื่อหุ้มทั้งสองเริ่มแยกจากกัน ในขณะเดียวกันทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ bindin receptor ทำให้หมดความสามารถในการจับกับอสุจิตัวที่สอง ต่อมา cortical granules ชุดที่สองได้ exocytosis หลั่ง mucopolysaccharides สร้าง osmotic gradient ทำให้น้ำเข้าสู่ช่องระหว่าง vitelline envelope และ cell membrane เป็นผลให้ vitelline envelope ขยายตัวออกและกลายเป็น fertilization envelope สำหรับ cortical granules ชุดที่สามมีการ exocytosis หลั่งเอนไซม์ peroxidase ทำให้มีการแข็งตัว (hardening) ของ fertilization envelope โดยการ crosslink ระหว่าง tyrosine residues และโปรตีนที่อยู่ติดกัน สุดท้าย cortical granules ชุดที่สี่หลั่งโปรตีน hyalin ออกมาเคลือบไข่ซึ่งมีหน้าที่พยุงเซลล์ตัวอ่อน (blastomeres) ด้านในในระหว่างการแบ่งตัว (Vacquier *et al*., 1973; Foerder and Shapiro, 1977; Hylander and Summers, 1982; Crossley *et al.,* 1988; Terasaki, 1995)

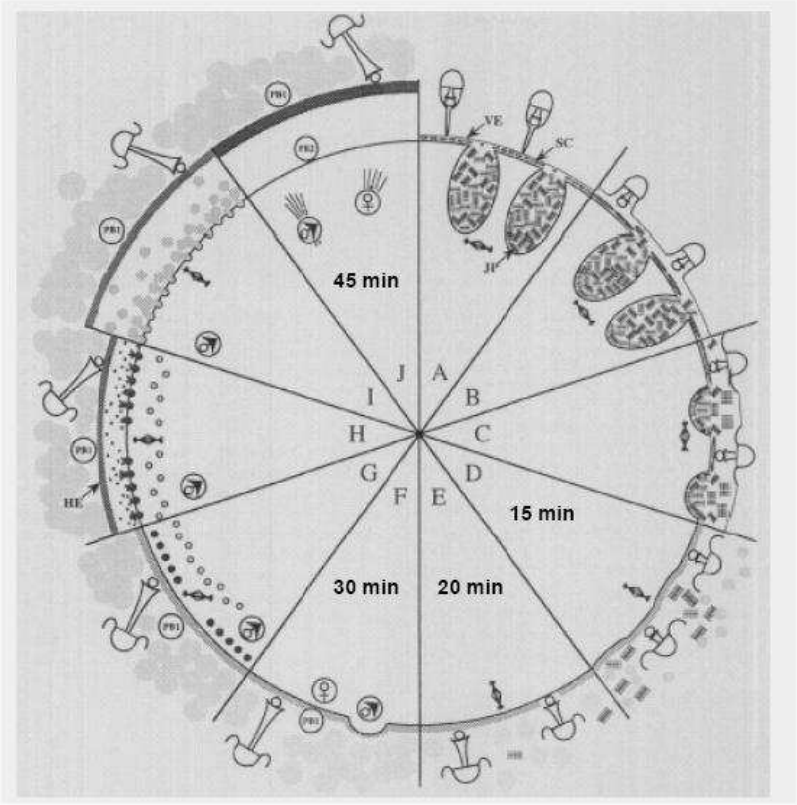
ในปู Goudeau และ Becker (1982) ได้ทำการศึกษาไข่ของ *Carcinus maenas* โดยศึกษากระบวนการ cortical reaction ซึ่งพบว่าเกิดขึ้นเมื่อมีการสัมผัสระหว่างอสุจิตัวแรกกับ cell membrane ของไข่ และพบว่าไข่ของ *C. maenas* มี cortical vesicles 2 ชนิด ซึ่งบรรจุสารภายในต่างกันคือ คือ granule ขนาดเล็กละเอียด (fine granular material) และ granule ขนาดใหญ่รูปทรงวงแหวน (ring-shaped granules) โดยในระยะแรก vitelline envelope 2 ชั้น ที่ซ้อนทับกันอยู่จะค่อยๆ แยกออกจากผิวไข่ และ envelope ชั้นในจะค่อยๆ เปลี่ยนไป โดยจะมีการสร้างเป็นชั้น fertilization envelope จากการรวมกันของ ring-shaped granule ภายใต้ชั้น vitelline envelope กระบวนการนี้จะเสร็จสิ้นภายในเวลา 7-8 ชั่วโมง สำหรับระยะเวลาในการฟักไข่ของปู หลังจากที่ได้มีการผสมพันธุ์กันระหว่างตัวผู้และตัวเมีย ตัวเมียจะเก็บไข่ไว้กับตัวเป็นระยะเวลาหลายเดือนจึงฟักไข่ออกมา (Little and Kitching, 1996)

ได้มีการศึกษาการสร้าง fertilization envelope ใน lobster พบว่าเปลือกไข่ประกอบด้วย envelope 2 ชั้น คือ ชั้นนอกซึ่งถูกสร้างตั้งแต่อยู่ภายใน ovary และชั้นในซึ่งเกิดจากกระบวนการ cortical reaction ในภายหลัง กล่าวคือในส่วน cortex ของ oocytes มี vesicles (granules) 4 ชนิด ได้แก่ high-density vesicles (HDV), low-density vesicles (LDV), moderately dense vesicles (MDV) และ ring vesicles (RV) โดย HDV และ LDV จะ exocytosis หลั่งสารออกมายังบริเวณ perivitelline space จากนั้น MDV และ RV ก็จะ exocytosis หลั่งสารอีกชนิดหนึ่งออกมาเพื่อสร้างเป็น envelope ชั้นใน (Talbot and Goudeau, 1988)

ในกุ้งทะเล egg activation เกิดขึ้นหลังจากที่ไข่สัมผัสกับน้ำทะเล ใน *Penaeus japonicus, Penaeus setiferus, Penaeus aztecus และ Sicyonia ingentis* พบว่ามีการหลั่ง jelly precursor ออกมาจากช่องรอบๆ ไข่ jelly precursor เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น jelly layer หุ้มรอบไข่ และมีการสร้างและยกตัวของ hatching envelope ซึ่งเกิดจากการ exocytosis ของ vesicle อย่างน้อย 2 ชนิด (Duronslet *et al.,* 1975; Chandler and Heuser, 1979; Clark *et al.,* 1980, 1984, 1990; Yano, 1988; Pillai and Clark, 1990; Lynn *et al*., 1992)

ในกุ้ง *S. ingentis* ขณะที่ตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์กัน ตัวผู้จะปล่อยอสุจิซึ่งไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ไว้ใน seminal receptacle ที่เรียกว่า thelycum ของตัวเมีย ซึ่งเป็นแบบปิด (closed thelycum) โดยอสุจิจะค่อยๆ เจริญและพัฒนาความสามารถภายในนั้น เมื่อตัวเมียวางไข่ จะปล่อยไข่พร้อมๆ กับอสุจิที่ถูกเก็บไว้มาผสมกันภายนอก Pillai และ คณะ (1990) ได้ทำการศึกษา ใน *S. ingentis* (รูปที่ 8) พบว่าขณะที่กุ้งตัวเมียวางไข่และปล่อยอสุจิออกมา อสุจิจะสัมผัสกับ vitelline envelope (VE) ของไข่โดยใช้ส่วนปลายของ anterior spike ของอสุจิ ซึ่งไข่มี jelly precursor (JP) บรรจุอยู่ใน extracellular crypt เมื่อเข้าสู่กระบวนการเกิด egg activation จะมีการปล่อย jelly precursor ออกมาจาก cortical crypt ใต้ vitelline envelope กลายเป็นชั้น jelly อยู่รอบไข่ ซึ่งทำให้มีการยกตัวของ vitelline envelope ขึ้นจากผิวไข่ ระยะนี้

ใช้เวลาประมาณ 20 นาที ในขณะเดียวกันอสุจิที่เข้าไปอยู่ภายใน jelly layer จะเข้าสู่ระยะ acrosomal filament formation ของ acrosome reaction จากนั้นจะมีการสร้าง hatching envelope ขึ้นรอบๆ ไข่ จากการ exocytosis ของ cortical vesicle 2 ชนิด คือ dense vesicle และ ring vesicle ซึ่งจะสร้างชั้น outer และ inner layer ของ hatching envelope ตามลำดับ ที่เวลา 40-45 นาที และไข่จะใช้ระยะเวลาในการฟักนาน 24 ชั่วโมงหลังจากที่กุ้งตัวเมียวางไข่ (Hertzler and Clark, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่า hatching envelope ใน *S. ingentis* มีส่วนประกอบของ glycoprotein ซึ่งส่วนประกอบหลักของโมเลกุล คือ threonine รองลงมาคือ และพบ glutamine, lysine และ asparagine และจากการทำ SDS-PAGE carbohydrate staining พบว่าใน hatching envelope ของ *S. ingentis* ประกอบด้วย mannose, sialic acid, N-acetyl glucosamine และ glucose (Pillai *et al*., 1990)



รูปที่ 8. แสดงขั้นตอนการเกิด egg activation ของ *S. ingentis* (Clark *et al*., 1994)

A. อสุจิสัมผัสกับ vitelline envelope (VE) ของไข่โดยส่วนปลายของ anterior spike โดยที่ไข่จะมี jelly precursor (JP) บรรจุอยู่ใน extracellular crypts

B, C. อสุจิเกิด acrosome reaction แทรกตัวผ่าน VE ของไข่ และไข่ปล่อย jelly precursor ออกมาอยู่ใต้ VE ทำให้ VE ยกตัวสูงขึ้น

D. เวลา 15 นาทีหลังวางไข่ jelly precursor เปลี่ยนเป็นชั้น jelly layer และ VEเริ่มหายไป

E. เวลา 20 นาที อสุจิเข้าสู่ระยะ acrosomal filament formation ของ acrosome reaction

F. อสุจิผ่านเข้าไปใน cytoplasm ของไข่ที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ polar body อันแรก ของไข่ (PB I) ถูกขับออกมาที่เวลา 35-45 นาที

G. เริ่มเห็น cortical granule (CG) 2 ชนิดใน cytoplasm ของไข่

H. CG ชนิดแรกมีการ exocytosis และเริ่มสร้าง hatching envelope (HE) ชั้นนอก

I. CG ชนิดที่สอง exocytosis เพื่อเสริมความแข็งแรงให้กับ HE และยก HE ให้สูงขึ้นเป็นกระบวนการ hatching envelope elevation

J. เวลา 45 นาที มีการสร้าง HE เสร็จสมบูรณ์ มีการขับ polar body อันที่ 2 (PB II) ของเซลล์ไข่ pronucleus ของไข่และอสุจิปรากฏชัดเพื่อรวมตัวกัน

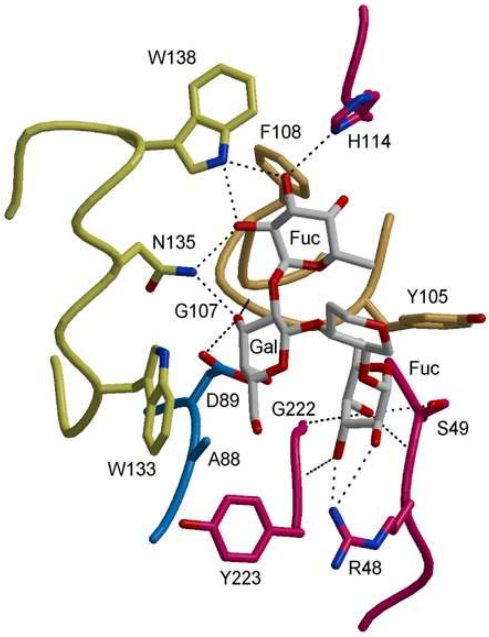
Clark และคณะ (1980) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของ cortical reaction ของไข่ใน *P. aztecus* ปรากฏว่ามีการสร้าง hatching envelope เสร็จสมบูรณ์ภายในเวลา 45 นาที โดยเมื่อไข่สัมผัสกับน้ำทะเล cortical rod จะค่อยๆ โผล่ออกมาจากรอบช่องว่างรอบไข่ ทำให้ investment coat ยกตัวขึ้น เมื่อ cortical rod ออกมามากขึ้น จะมีลักษณะเป็นทรงกลดรอบไข่ และสลายไปภายในเวลา 5-7 นาทีหลังวางไข่ และหลังจาก cortical rod หายไป จะเริ่มมีการสร้าง hatching envelope ขึ้นซึ่งปรากฏชัดที่เวลา 15 นาทีหลังวางไข่

ใน *P. monodon* กระบวนการ egg activation เกิดขึ้นเมื่อไข่สัมผัสกับน้ำทะเล โดย cortical rods ออกมาจาก cortical crypts รอบ ๆ ไข่ และสลายไปที่เวลา 45 วินาทีหลังวางไข่ กลายเป็นชั้น jelly layer รอบไข่ ซึ่งจากการศึกษาของ Kruevaisayawan และคณะ (2007) พบว่า cortical rod มีองค์ประกอบหลักเป็นโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ในเวลานี้จะมีการเกิด acrosome reaction ระยะ acrosomal mass formation ของอสุจิที่ฝังตัวอยู่ใน jelly layer จากนั้นจะมีการสร้าง hatching envelope ของไข่โดยเริ่มสร้างที่เวลา 1 นาทีหลังวางไข่ และเสร็จสมบูรณ์ที่เวลา 13-15 นาทีหลังวางไข่ polar bodies อันแรกและอันที่สองจะถูกขับออกมาที่เวลา 3-5 และ 10-15 นาทีหลังวางไข่ตามลำดับ (Pongtippatee *et al.,* 2004)

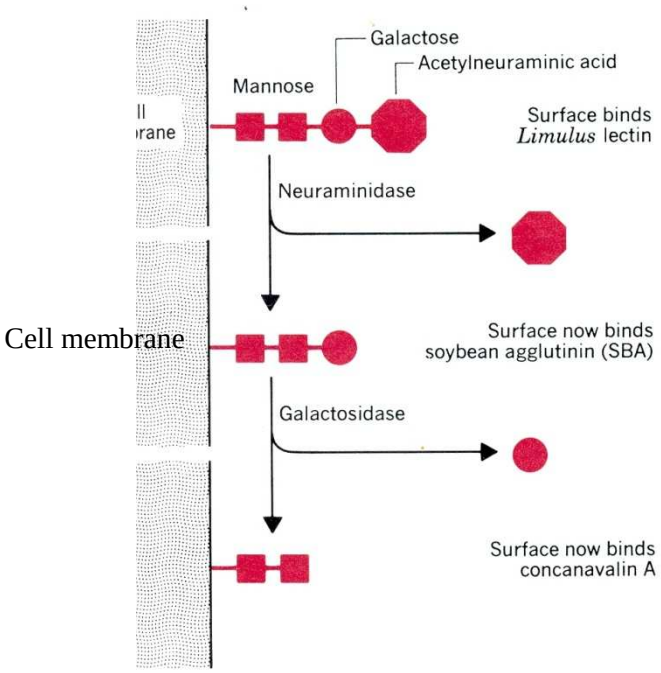
1.2.4 Lectin และการนำ ไปใช้เป็น probe เพื่อติดตามการสร้าง hatching envelope

Lectin เป็นสารประเภทโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate-binding protein) ส่วนใหญ่พบในเมล็ดพืช และยังพบในแบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย ฟองน้ำ หอยทาก ปู และปลาด้วย นอกจากนี้ในปัจจุบันยังพบใน cell membrane ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม lectin ประกอบด้วยอย่างน้อย 2 sugar binding site มีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับหมู่น้ำตาล monosaccharide และ oligosaccharide ชนิดต่างๆ (รูปที่ 9) โดยความสามารถในการจับที่จำเพาะเจาะจงของ lectin กับน้ำตาลบน membrane glycoprotein ของเซลล์ ทำให้มีการใช้ lectin ในการบ่งบอกชนิดของน้ำตาลบนผิวเซลล์ (Sheeler and Bianchi, 1987) (รูปที่ 10) lectin และหมู่น้ำตาลจำเพาะต่อ lectin แต่ละชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 1 (Clark *et al*., 1990)

cell membrane ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ จะมีองค์ประกอบเป็น carbohydrate หรือ glycoprotein โดยพบว่า cell membrane ของ oocyte ใน mouse หรือในกุ้งทะเล เช่น *S. ingentis* มี glycoprotein ชนิด chitin เป็นองค์ประกอบของ hatching envelope โดยมีการทดลองนำ chitin hydrolytic enzyme คือ chitinase และ *N*-acetylglucosaminidase มา incubate กับไข่กุ้งที่เวลา 10 นาทีหลังวางไข่ พบความผิดปกติในการสร้างและการยกตัวของ hatching envelope (Glas *et al.,* 1996) และจากการศึกษาการเกิด cortical reaction ของ *S. ingentis* ของ Clark และคณะ (1990) ก็ได้ใช้ lectin เป็น probe เช่นเดียวกัน โดยพบว่า lectin สามารถจำแนก cortical vesicle ได้ 2 ชนิด โดย lectin ชนิด WGA (Wheat germ agglutinin) มีความจำเพาะกับ D-GlcNac และ sialic acid จะจับกับ dense vesicle และส่วนนอกของ hatching envelope และ lectin ชนิด LCA (*Lens culinaris*) มีความจำเพาะเจาะจง น้ำตาล mannose จะจับกับ ring vesicle และส่วนในของ hatching envelope นอกจากนี้การศึกษา cortical granules ใน oocyte ของ mouse ก็มีการทดลองโดยใช้ LCA เป็น probe พบว่า ใน mature oocytes มี cortical granule อย่างน้อย 2 ชนิด โดยมีชนิดหนึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม LCA-binding cortical granule (Liu *et al.,* 2003)



รูปที่ 9. รูปภาพแสดงตัวอย่างโครงสร้างของ lectin (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gs4_sugar_all.png)



รูปที่ 10. รูปภาพแสดงความจำเพาะเจาะจงของ lectin ต่อน้ำตาลบนผิวเซลล์ (Sheeler and Bianchi, 1987)

ตารางที่ 1. Lectin จำนวน 11 ชนิด และหมู่น้ำตาลที่จำเพาะ ที่ใช้ในการทดลอง

Lectin	**Sugar specificity**
Lens culinaris (LCA)	Mannose
Concanavalin A (CON A)	Mannose/glucose
Wheat germ agglutinin (WGA)	D-GlcNac/sialic acid
Griffonia simplicifolia (GS-11)	D-GlcNac
Ulex europaeus (UEA-1)	L-fucose
Maclura pomifera (MPL)	D-galactose
Soybean agglutinin (SA)	D-galactose
Griffonia simplicifolia (GS-1)	D-galactose
Arachis hypogaea (PNA)	D-GalNac
Dolichos biflorus (DBA)	D-GalNac
Bauhinia purpurea (BPA)	D-GalNac

1.3 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษากลไกการสร้าง hatching envelope ของไข่กุ้งกุลาดำที่สัมพันธ์กับการเกิด exocytosis ของ cortical vesicles โดยใช้ lectin เป็น probe ผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นท์ (epifluorescent microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM)

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างไข่กุ้ง

พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตลอดการทดลองนี้ได้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี โดยเลี้ยงในบ่อคอนกรีตสำหรับเพาะฟัก (maturation tank) ซึ่งบรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt. ให้อาหารพ่อแม่พันธุ์ด้วยหอยแมลงภู่ ปลาหมึกสด และแม่เพรียง วันละ 3 เวลา หลังจากแม่กุ้งลอกคราบใหม่ๆ ทำการผสมเทียม (artificial insemination, AI) โดยสอดถุงอสุจิ (spermatophore) ของพ่อพันธุ์เข้าไปใน thelycum ของแม่พันธุ์ และตรวจสอบพัฒนาการของรังไข่ทุกวันโดยใช้ไฟฉายส่องใต้ลำตัวของแม่กุ้ง เมื่อไข่สุกเต็มที่ซึ่งอยู่ในระยะที่ 4 ทำการแยกแม่กุ้งมาไว้ในถังวางไข่ขนาด 500 ลิตร ปล่อยให้แม่กุ้งวางไข่ซึ่งเกิดขึ้นในเวลากลางคืน เมื่อแม่กุ้งว่ายวนบนผิวน้ำอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นอาการที่กำลังเริ่มวางไข่ ใช้สวิงช้อนตัวแม่กุ้งอย่างนุ่มนวลยกมาวางในกรงตาข่ายขนาดเท่าลำตัวแม่กุ้งที่แขวนอยู่ในกะละมังขนาด 50 ลิตร เมื่อแม่กุ้งปล่อยไข่ ใช้หลอดหยด (dropper) ดูดน้ำทะเลที่มีไข่กุ้งมาใส่ใน 8% paraformaldehyde (โดยที่น้ำทะเลจะต้องมีปริมาตรเท่ากับ 8% paraformaldehyde เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4% paraformaldehyde) อย่างรวดเร็ว ซึ่งไข่ชุดนี้นับเป็นไข่ที่ 0 วินาทีหลังการวางไข่ และหลังจากนั้นใช้กะละมังใบเล็กความจุประมาณ 3 ลิตร รองไข่ที่แม่กุ้งกำลังปล่อยออกมาอีกนานประมาณ 15 วินาที นำกะละมังออกมาและเริ่มจับเวลา ใช้หลอดหยดดูดน้ำทะเลที่มีไข่ใส่ใน 8% paraformaldehyde โดยเก็บไข่กุ้ง ที่เวลา 15, 30 และ 45 วินาที และ 1, 2, 3, 5, 8, 15, 20, 30, 45, 60, 90 แล 120 นาที หลังวางไข่ เพื่อศึกษาการเกิด hatching envelope ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังการวางไข่ โดยแต่ละระยะเวลาจะต้องพบไข่ที่มีพัฒนาการอยู่ในระยะเวลานั้นอย่างน้อย 80-90% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C และสำหรับไข่กุ้งที่เวลา 30 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่มีการสร้าง hatching envelope เสร็จแล้ว แยกส่วนหนึ่งเก็บไว้ในน้ำทะเลที่ผสม 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ และนำมาแยก hatching envelope

2. ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของ cortical vesicles และ hatching envelope ของไข่กุ้งกุลาดำ

ได้มีการตรวจสอบชนิดและลักษณะของ cortical vesicles และลักษณะของ hatching envelope ในระดับ TEM โดยไม่ใช้ lectin probe ในเบื้องต้นก่อน เนื่องจากข้อจำกัดของการ embed ตัวอย่างด้วยพลาสติก LR white resin ที่ใช้สำหรับการศึกษาด้วย lectin จะทำให้ลักษณะทาง morphology โดยละเอียดสูญเสียไปจึงจำเป็นต้องศึกษาชนิดและลักษณะของ vesicles และ hatching envelope ด้วยการ embed ตัวอย่างด้วย epoxy resin ซึ่งจะให้รายละเอียดทางด้าน morphology ได้อย่างครบถ้วนก่อน

นำไข่กุ้งที่เวลาต่างๆ กันหลังวางไข่ที่ fix แล้วด้วย 4% paraformaldehyde นาน 2 ชั่วโมง มาผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (tissue processing) ดังต่อไปนี้ ล้างไข่กุ้งด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที post-fix ด้วย 1% OsO_4 นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ย้อมด้วย 2% uranyl acetate นาน 20 นาทีทำการ dehydration ด้วย 50% ethanol นาน 10 นาที ด้วย 70% ethanol นาน 10 นาที ด้วย 95% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และ absolute ethanol จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ต่อมาทำการ infiltration ด้วย propylene oxide จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ด้วย propylene oxide : epoxy resin ในอัตราส่วน 1:1 นาน 1 ชั่วโมง ด้วย propylene oxide : epoxy resin ในอัตราส่วน 1:2 นาน 2 ชั่วโมง และด้วย epoxy resin บริสุทธิ์ นาน 2 ชั่วโมง ทำการ embedding โดยการนำไข่กุ้งมาฝังใน epoxy resin ที่บรรจุอยู่ใน capsule beam และ polymerization โดยการนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 80 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นในขั้นตอน sectioning ได้ตัดเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่อง ultramicrotome (MT-XL RMC) โดย thick section หนา 400 nm (วางบนสไลด์แก้ว) และ thin section หนา 90 nm (ใช้ copper grid ซึ่งล้างด้วย acetone และ mesh cement แล้ว ตักชิ้นเนื้อเยื่อ และทิ้งไว้ให้แห้ง) นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วเข้าสู่ขั้นตอน staining โดย thick section ย้อมด้วย 0.5% toludine blue เพื่อหาบริเวณที่ต้องการศึกษา และ thin section ย้อมด้วย 5% uranyl acetate และ lead citrate อย่างละ 10 นาที ส่องด้วยกล้อง TEM (JEOL, JEM-100 CXII, Tokyo, Japan)

3. การแยก hatching envelope ของไข่กุ้ง

นำไข่กุ้งที่เก็บที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ มาล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS; 0.14 M NaCl, 0.008 M KCl, 0.006 M Na_2HPO_4, 0.001 M KH_2PO_4, 0.001 M $CaCl_2$ และ 0.0004 M $MgCl_2$, pH 7.4) อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นใช้ autopipette ดูดตัวอย่างปริมาตร 300 µl (มีไข่ประมาณ 300 ฟอง) ใส่ใน 1 ml microcentrifuge tube (Appendolf tube) เติม lysis buffer ปริมาตร 300 µl (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.4 M NaCl และ 0.01% Nonidet P-40, pH 8 เติม 1 mM PMSF) นำมาบดเบาๆ ด้วย grinder และนำไป shake ที่อัตราเร็ว 72 rpm ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C และตรวจสอบการแยกตัวของ hatching envelope ทุกๆ 10 นาที โดยการดูดตัวอย่างปริมาตร 10 µl ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) เมื่อพบว่ามีการแยกของตัวของ hatching envelope มากกว่า 80% ของจำนวนไข่ทั้งหมด แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำออกมาจากไข่กุ้งที่รวมตัวอยู่ด้านล่าง เติมน้ำทะเลเทียม (artificial sea water, ASW; 460 mM NaCl, 55 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl และ 10 mM $CaCl_2$) อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C ปริมาตร 10 เท่าของส่วนน้ำที่แยกมาได้ ปั่นตกที่ความเร็ว 200x g นาน 5 นาที ได้ตะกอนใสของ hatching envelope ที่แยกแล้ว นำมาล้างอีก 2 ครั้งและเก็บส่วนตะกอน resuspend ด้วย ASW ปริมาตร 200 µl ที่เติม 1 mM PMSF เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C จนกระทั่งใช้

4. การทดสอบหาชนิดของ lectin ที่มีความจำเพาะต่อ hatching envelope

เพื่อตรวจสอบชนิดของ lectin ที่มีความจำเพาะต่อหมู่น้ำตาลบน hatching envelope โดยปรับปรุงจากวิธีของ Pillai and Clark (1990) ดังนี้ ได้ใช้ lectin จำนวน 11 ชนิด มาทดสอบกับ hatching envelope ซึ่ง lectin ที่พบว่ามีความจำเพาะจะนำมาเป็น probe ในขั้นตอนต่อไป โดยการนำ hatching envelope ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 µl มาล้างด้วย PBS และเติม PBS ปริมาตร 100 µl ที่ใส่ 20 mg/ml Bovine serum albumin (BSA) เพื่อป้องกันการเกิด non-specific reaction ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 200x g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างตะกอนด้วย PBS 1 ครั้ง นำมาแยก incubate กับ fluorescein-labeled lectin (F-lectin) 11 ชนิด (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (ตารางที่ 1) ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างตัวอย่างด้วย PBS และตรวจสอบภายใต้กล้อง epifluorescent microscope (DP 50, Olympus, Tokyo, Japan) โดย กลุ่มควบคุมใช้การ incubate กับหมู่น้ำตาลจำเพาะต่อ lectin ชนิดนั้น (ตารางที่ 1) ก่อนนำมา incubate กับ lectin ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 200 mM ยกเว้นน้ำตาลที่จำเพาะต่อ WGA และ MPL ใช้ 500 mM lectin ที่ให้ผล positive ต่อ hatching envelope นำมาใช้เป็น probe ในการทดลองต่อไป

5. ตรวจสอบการเกิด cortical vesicles exocytosis และ hatching envelope formation ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลาต่าง ๆ หลังวางไข่ โดยใช้ lectin probe

นำไข่กุ้งที่เวลาต่างๆ กันหลังวางไข่ที่ fix แล้วด้วย 4% paraformaldehyde นาน 2 ชั่วโมง มาผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา ดังต่อไปนี้ ล้างไข่กุ้งด้วย 0.1 M PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และล้างอีกครั้งด้วย 0.05 M PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ขั้นตอนต่อมาทำการ dehydration ด้วยการแช่ไข่กุ้งใน 50%, 70%, 80% และ 90% ethanol นานความเข้มข้นละ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และใน 95% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ต่อมาขั้นตอนการ infiltration ได้แช่ไข่กุ้งใน 95% ethanol : LR white resin (London Resin Company, Ltd., England, UK) อัตราส่วน 2:1 นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C และใน 95% ethanol : LR white resin อัตราส่วน 1:2 นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C และต่อมาแช่ใน LR white resin นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C สุดท้ายแช่ใน LR white resin ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง ทำการ embedding โดยการนำไข่กุ้งมาฝังใน LR white resin ที่บรรจุอยู่ใน capsule beam โดย polymerization ด้วยการนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขั้นตอนการ sectioning ได้ตัดเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่อง ultramicrotome โดย thick section หนา 400 nm และ thin section หนา 90 nm (ใช้ nickel grid) ในขั้นตอน staining ทำดังนี้

- **Thick section** ได้ป้องกันการเกิด non-specific reaction ด้วย 20 mg/ml BSA เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วย 0.1 M PBS และย้อมด้วย fluorescein-labeled lectin ที่ให้ผล positive (จากการทดลอง ตรวจสอบชนิดของ lectin ที่มีความจำเพาะต่อหมู่น้ำตาลบน hatching envelope) ความเข้มข้น 5 µg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งและ mount ด้วย 75% glycerol นำไปส่องดูภายใต้กล้อง epifluorescent microscope สำหรับ negative control ใช้การ pre-incubation lectin ด้วยน้ำตาลที่มีความจำเพาะต่อ lectin แต่ละตัว ก่อนที่จะนำมา incubate กับ thick section
- **Thin section** ได้ป้องกันการเกิด non-specific reaction ด้วย 20 mg/ml BSA เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วย 0.1 M PBS และย้อมด้วย fluorescein labeled lectin ที่ให้ผล positive เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 0.1 M PBS จากนั้นนำมา incubate กับ mouse monoclonal anti FITC conjugated gold เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBS แล้วนำมาย้อมด้วย 5% uranyl acetate และ lead citrate อย่างละ 10 นาที ส่องด้วยกล้อง TEM

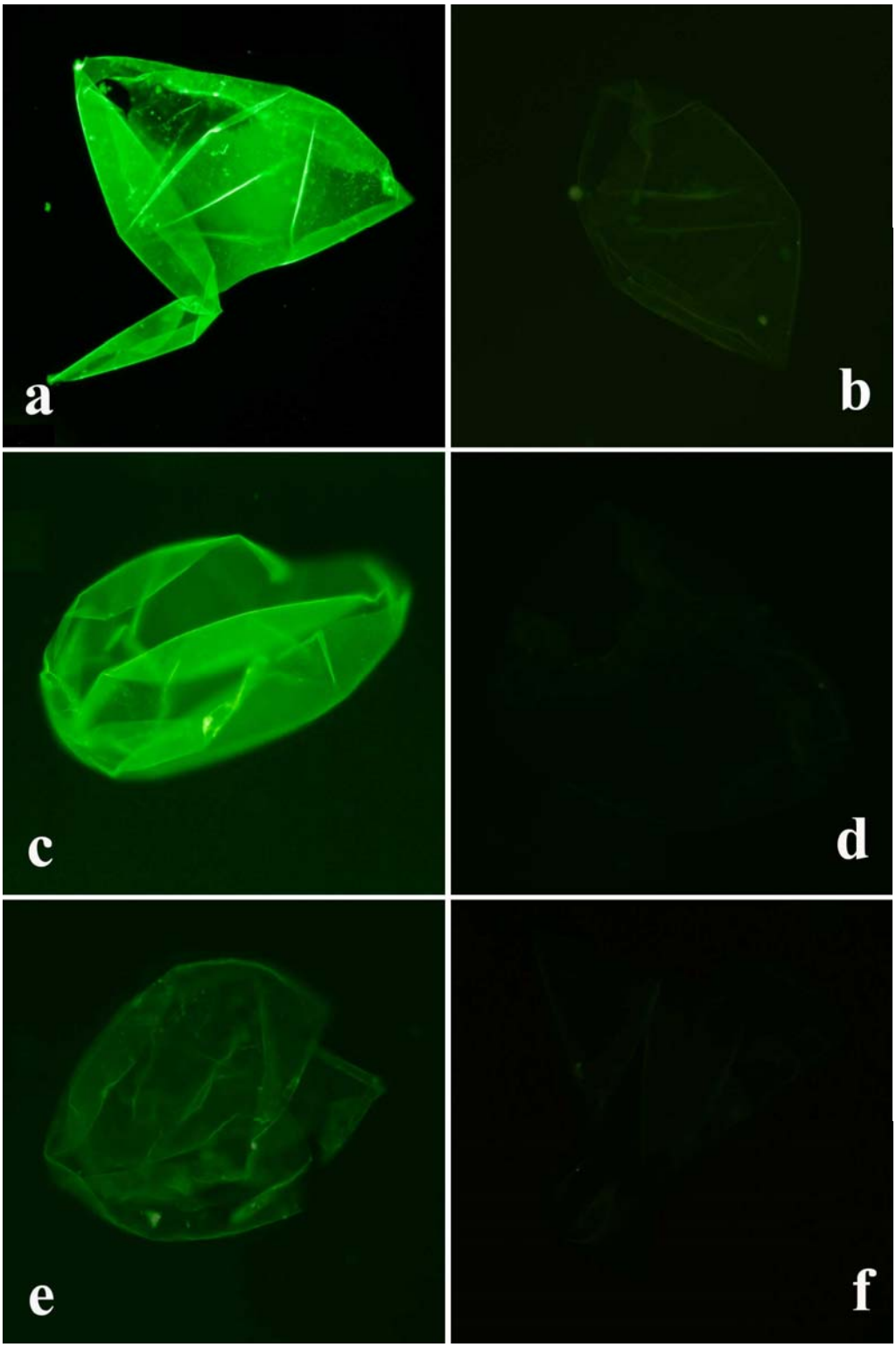
บทที่ 3
ผลการทดลอง

การทดสอบชนิดของ lectin ที่จำเพาะ ต่อ hatching envelope

Hatching envelope ที่แยกแล้วมีความสามารถในการจับกับ Con-A รูปที่ 11a) และ LCA รูปที่ 11c) มากที่สุด สำหรับ WGA มีความสามารถในการจับกับ hatching envelope เพียงเล็กน้อย รูปที่ 11e) และ GSL II, MPL, GSL I, DBA, SA, UEA, PA และ BPL ไม่มีความสามารถจับกับ hatching envelope ซึ่งความจำเพาะต่อ Con-A และ LCA ถูกยับยั้งด้วยน้ำตาล mannose ที่เติมลงไปใน lectin ก่อนนำไป incubate กับ hatching envelope รูปที่ 11b และ d) และความจำเพาะต่อ WGA ถูกยับยั้งด้วย N-acetyl glucosamine รูปที่ 11f) ตารางที่ 2) จากผลการทดลองนี้ได้ใช้ Con A และ WGA เป็น probe ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2. แสดงความสามารถในการจับกับ hatching envelope ของ lectin แต่ละชนิด

ชนิดของ lectin	ความสามารถในการจับกับ lectin
Con-A	Strong
LCA	Strong
WGA	Weak
GSL-II	None
MPL	None
GSL-I	None
DBA	None
SA	None
UEA	None
PA	None
BPL	None

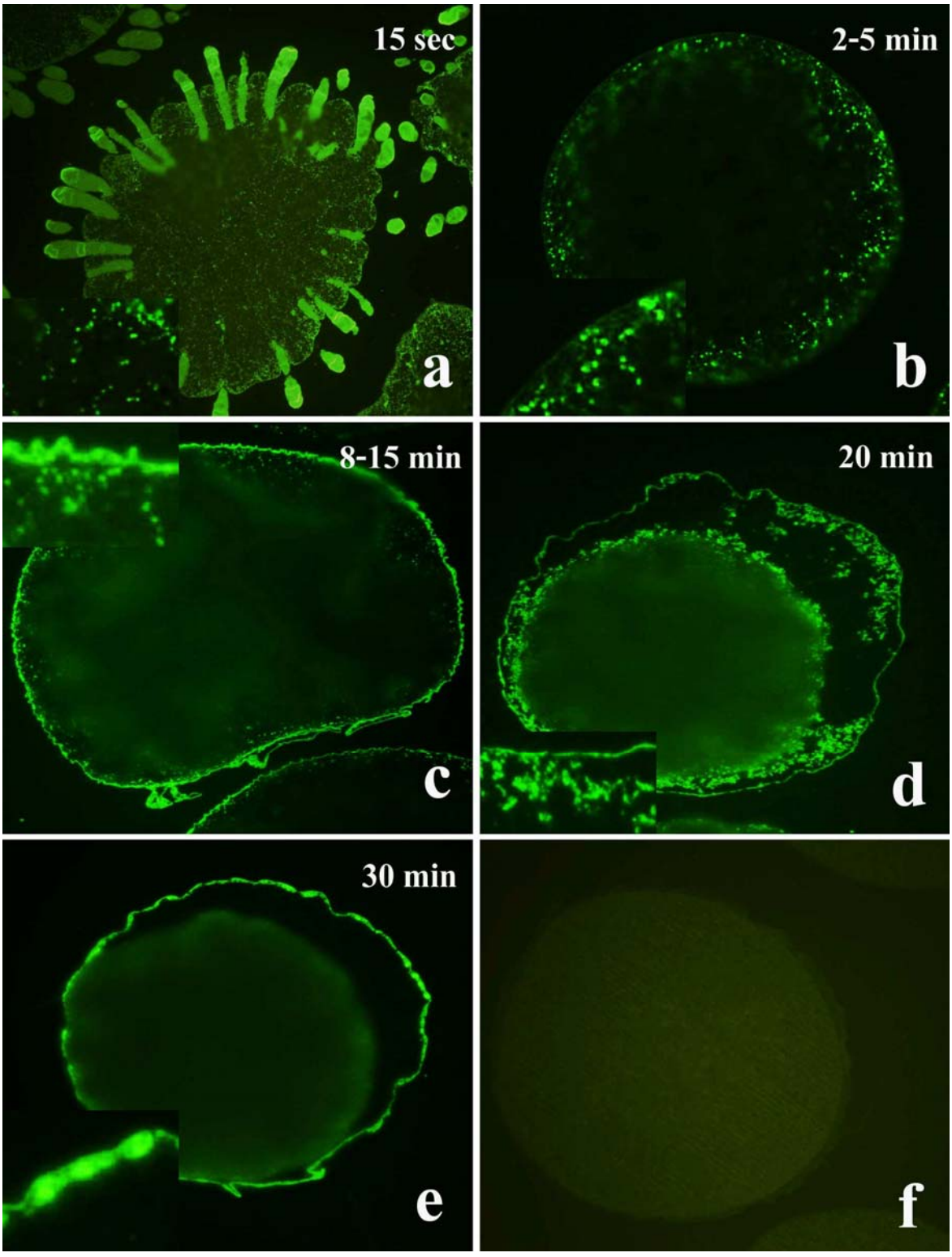


รูปที่ 11. Fluorescent micrograph แสดงความสามารถในการจับกับ hatching envelope ที่แยกแล้ว ของ fluorescein-labeled ConA (a), LCA (c) และ WGA (e) สำหรับ การ pre-incubation ด้วยน้ำตาลจำเพาะของ lectin ทั้งสามชนิดแสดงในรูป b, d และ f ตามลำดับ

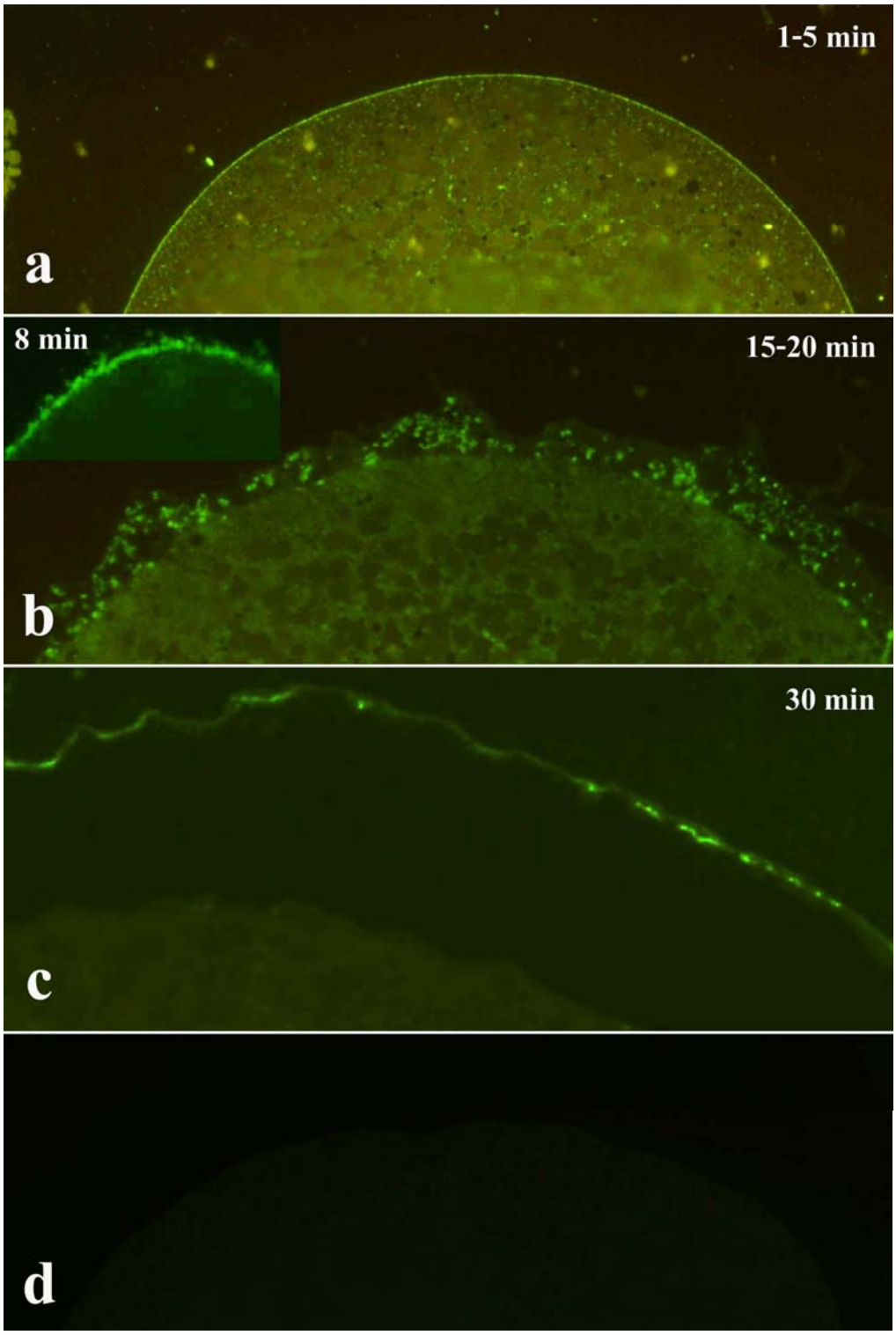
การจับของ lectin บน thick sections ของไข่

พบ Con A (มีความจำเพาะต่อ mannose/glucose) จับกับ cortical vesicles กระจายตัวเป็นจุดเรืองแสงประปรายทั่ว cytoplasm ของไข่ตั้งแต่เวลา 0 วินาทีหลังวางไข่ รูปแบบนี้ปรากฏอยู่จนถึงเวลา 1 นาทีหลังวางไข่ (รูปที่ 12a) Con A ยังสามารถจับกับ cortical rod โดยเห็นลักษณะเรืองแสงซึ่งได้มีรายงานไว้โดย Kruevaisayawan และคณะ (2007) จากนั้นที่เวลา 2-5 นาทีหลังวางไข่ จุดเรืองแสงไปรวมตัวอยู่บริเวณใกล้ขอบไข่ (periphery) (รูปที่ 12b) ในนาทีที่ 8 หลังวางไข่ ปรากฏแถบเรืองแสงบาง ๆ อยู่รอบผิวไข่ และนาทีที่ 15 หลังวางไข่แถบเรืองแสงของ hatching envelope รอบไข่มีความหนาและชัดเจนมากขึ้น ปรากฏรอยหยักที่แถบ (รูปที่ 12c) ที่ 20 นาทีหลังวางไข่แถบเรืองแสงของ hatching envelope แยกตัวออกจากผิวไข่ยกสูงขึ้นปรากฏ perivitelline space อยู่ข้างใต้ และปรากฏจุดเรืองแสงเป็นกลุ่มๆ กระจายตัวอยู่ใน perivitelline space และบางกลุ่มลอยขึ้นไปติดกับ hatching envelope (รูปที่ 12d) ที่ 30 นาทีหลังวางไข่ การสร้าง hatching envelope เสร็จสมบูรณ์ ปรากฏกลุ่มเรืองแสงติดอยู่ด้านในของ hatching envelope ไม่ปรากฏใน perivitelline space และใน cytoplasm ของไข่ (รูปที่ 12e) ในกลุ่มควบคุมได้ที่เติม mannose ลงไปใน lectin ก่อนการ incubate กับ thick section ของไข่ ไม่พบลักษณะเรืองแสง (รูปที่ 12f)

สำหรับการจับของ WGA (มีความจำเพาะต่อ N-acetyl glucosamine) พบลักษณะเรืองแสงกระจายตัวใน cytoplasm ของไข่ตั้งแต่ทันทีที่วางไข่และต่อมาปรากฏเป็นแถบเรืองแสงเป็นเส้นอยู่ที่ขอบไข่โดยรอบจนถึงเวลา 5 นาทีหลังวางไข่ (รูปที่ 13a) และที่เวลา 8 นาทีหลังวางไข่สังเกตเห็นจุดเรืองแสงกระจายตัวขึ้นจากแถบเรืองแสง (รูปเล็กในรูปที่ 13b) และจุดเหล่านั้นกระจายตัวเข้าสู่ perivitelline space ที่เวลา 15-20 นาทีหลังวางไข่ (รูปที่ 13b) ต่อมาที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ซึ่งเป็นเวลาที่การสร้าง hatching envelope เสร็จสมบูรณ์ พบแถบเรืองแสงเกาะติดอยู่กับ hatching envelope เป็นระยะๆ โดยไม่พบจุดเรืองแสงใน perivitelline space (รูปที่ 13c) ในกลุ่มควบคุมที่เติม N-acetyl glucosamine ลงไปใน lectin ก่อนการ incubate กับ thick section ของไข่ ไม่พบลักษณะเรืองแสง (รูปที่ 12d)



รูปที่ 12. Fluorescent micrograph แสดงไข่กุ้งกุลาดำที่เวลาต่างๆ (a-e) หลังวางไข่ ที่ incubate ด้วย fluorescein-labeled Con A กลุ่มควบคุมมีการเติมน้ำตาล mannose ก่อนนำมา incubate กับไข่ (f) รูปเล็กด้านในแสดงภาพขยายของลักษณะเรืองแสง

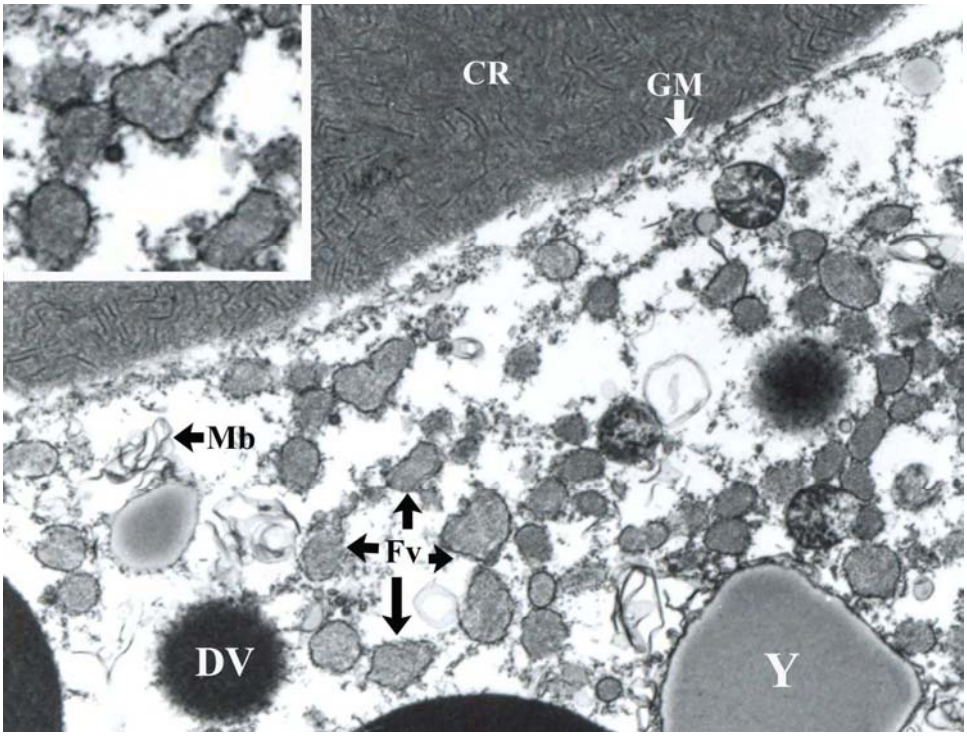


รูปที่ 13. Fluorescent micrograph แสดงไข่กุ้งกุลาดำที่เวลาต่างๆ (a-c) หลังวางไข่ ที่ incubate ด้วย fluorescein-labeled WGA กลุ่มควบคุมมีการเติม N-acetyl glucosamine ก่อนนำมา incubate กับไข่ (d)

ลักษณะ cortical vesicles และการเกิด hatching envelope จากการศึกษาด้วย TEM

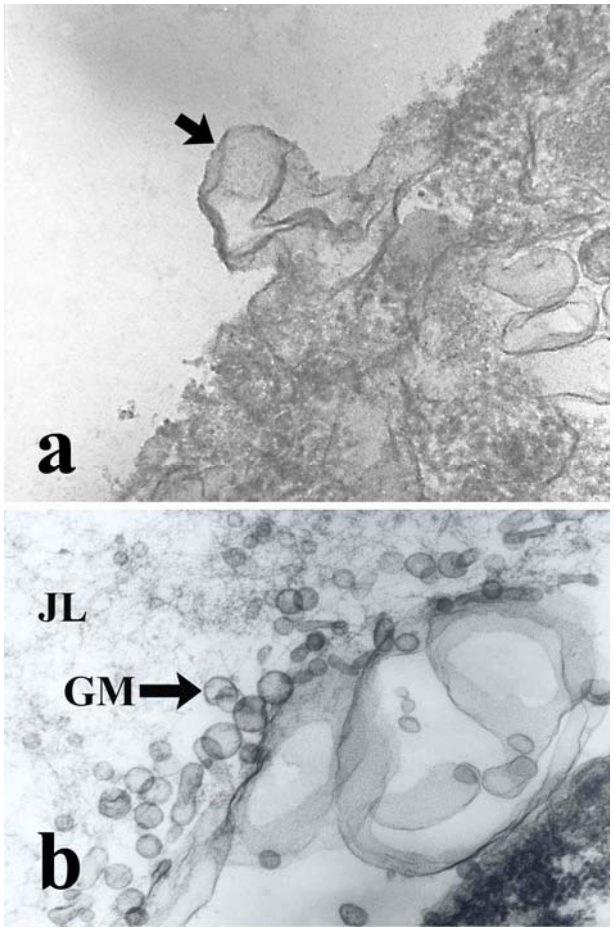
ทันทีที่วางไข่ ภายใน cytoplasm ของไข่พบ yolk granules 2 μm), dense vesicles 500 nm), flocculent vesicles 200-1,000 nm) และ membranous materials รูปที่ 14) เมื่อใช้กำลังขยายสูงขึ้น ใน flocculent vesicles พบโครงสร้างรูปวงแหวนหรือโดนัทอยู่ภายในคล้ายกับ ring vesicles ที่รายงานใน Pillai and Clark 1988) บาง vesicles มีการรวมตัวกันกลายเป็น vesicles ที่ใหญ่ขึ้นและมีรูปร่างไม่แน่นอน รูปเล็กในรูปที่ 14)

พบ Cortical rods อยู่ภายใน cortical crypts และภายในของ cortical rods มีโครงสร้าง bottle brushes คล้ายแปรงล้างขวด) บรรจุอยู่ ซึ่งในช่องว่างแคบๆ ระหว่าง cortical rod และเยื่อหุ้มเซลล์ไข่พบ vesicles เล็กๆ กระจายตัวอยู่ vesicles เหล่านี้เรียกว่า granular materials ซึ่งพบในกุ้ง *S. ingentis* โดย Pillai and Clark 1988) อย่างไรก็ดีในกุ้ง *S. ingentis* มีการพบ granular materials เฉพาะที่บริเวณช่องว่างระหว่าง vitelline envelope และเยื่อหุ้มเซลล์ไข่เท่านั้นซึ่งเป็นบริเวณอื่นที่อยู่บนผิวของ cortical rod ไม่ใช่เป็นบริเวณที่อยู่ใน cortical crypt

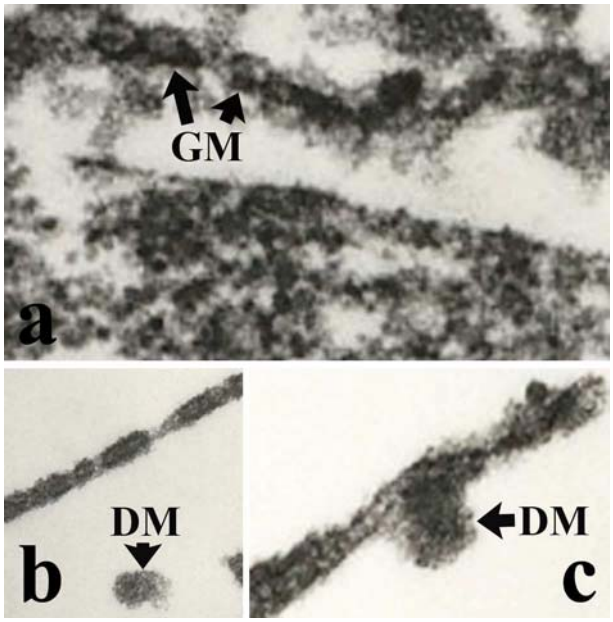


รูปที่ 14. Transmission electron micrograph แสดงไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 0 วินาทีหลังวางไข่ ภาพเล็กแสดงกำลังขยายสูงของ flocculent vesicles: CR, corical rod; DV, dense vesicle; GM, granular materials; Mb, membranous structures; FV, flocculent vesicles; Y, yolk

ที่เวลา 15-45 วินาทีหลังวางไข่ เมื่อ cortical rods โผล่พ้น cortical crypts โดยสมบูรณ์จะมีการปล่อยสารจาก cortical rods กลายเป็นชั้น jelly layer อยู่รอบไข่ สังเกตเห็น membranous structure ที่อยู่ใน cytoplasm ของไข่โผล่ออกมาจากผิวไข่ (รูปที่ 15a) และที่ฐานของ jelly layer พบ membranous structure อยู่ใกล้กับ granular materials ซึ่งกำลังเรียงตัวเป็นแถวและ (รูปที่ 15b) ที่เวลา 1 นาทีหลังวางไข่ granular materials เรียงตัวเป็นแถวเดี่ยวเชื่อมติดกัน (รูปที่ 16a) เยื่อหุ้ม granular materials ที่ติดกันกลายเป็นโครงสร้างเส้นทึบยาวสองชั้นที่สลับด้วยแถบจางอยู่ตรงกลาง โครงสร้างนี้ได้กลายเป็นชั้นนอกของ hatching envelope (รูปที่ 16b, c)

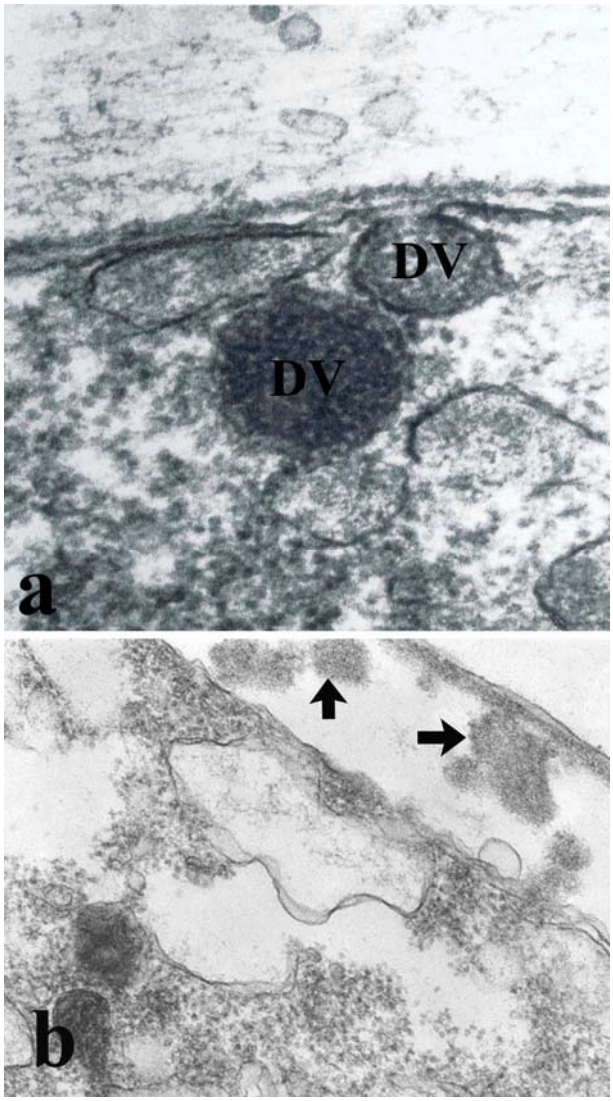


รูปที่ 15. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 15-45 วินาทีหลังวางไข่ แสดงการออกมาของ membranous structure ที่ผิวไข่ (a, ลูกศร) และการรวมตัวกับ granular materials นอกไข่: GM, granular materials; JL, jelly layer



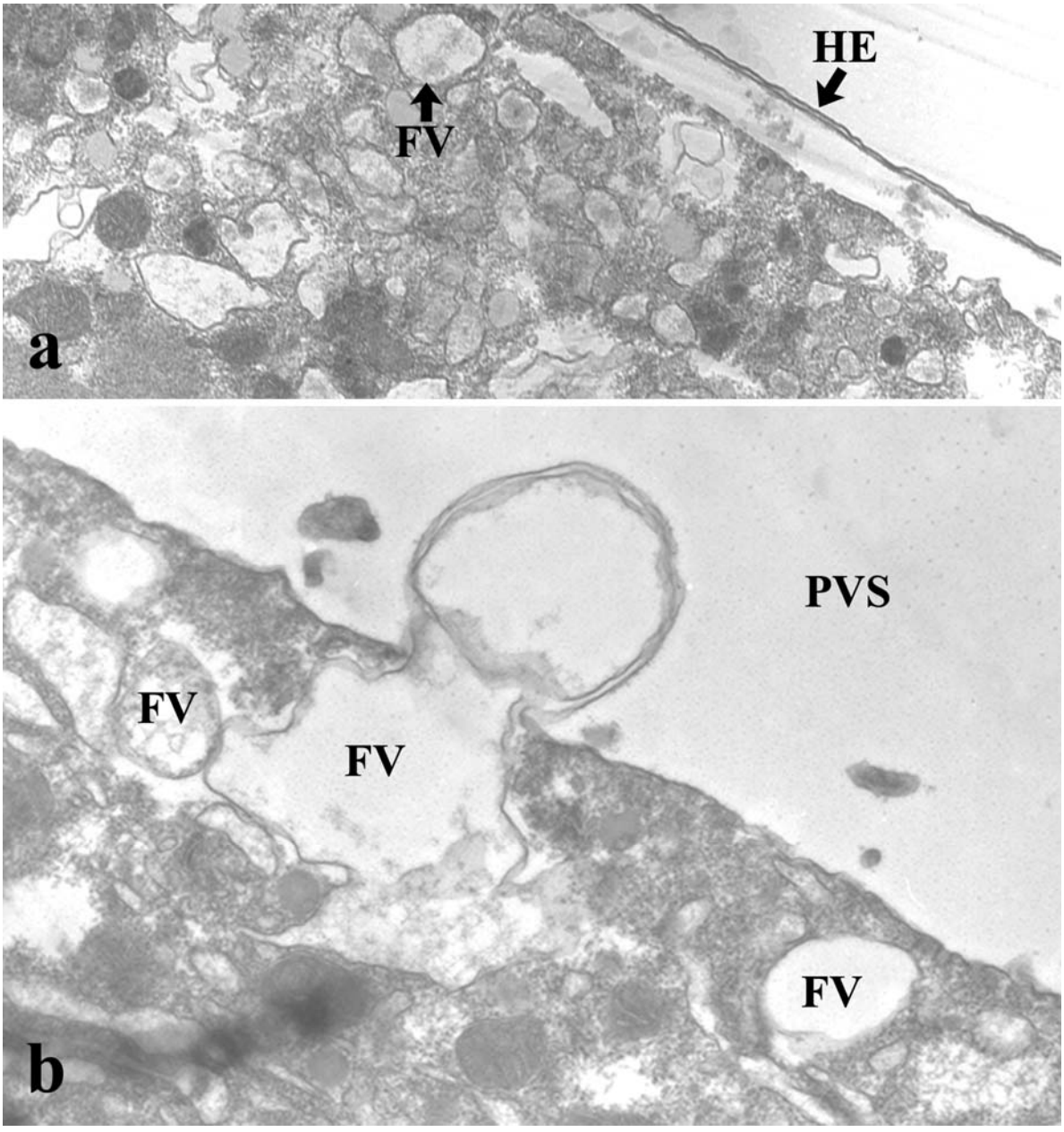
รูปที่ 16. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 1 นาทีหลังวางไข่ แสดงการสร้างชั้นนอกของ hatching envelope โดย granular materials เชื่อมติดกันเป็นแถวเดียว (a) ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีความหนาเป็นแถบทึบสองชั้นสลับกับแถบจางที่อยู่ตรงกลาง และปรากฏ dense materials เกาะอยู่ด้านในของ hatching envelope (b, c): DM, dense materials; GM, granular materials

ที่เวลา 1-2 นาทีหลังวางไข่ พบการ e□ocytosis ของ dense vesicles (รูปที่ 17a) และปล่อย dense materials ที่อยู่ภายในออกสู่ perivitelline space ซึ่งค่อยๆ ขึ้นไปเกาะติดกับด้านในของ hatching envelope ชั้นนอกที่ปรากฏก่อนหน้านี้ (รูปที่ 17b) และกลายเป็นชั้นในของ hatching envelope



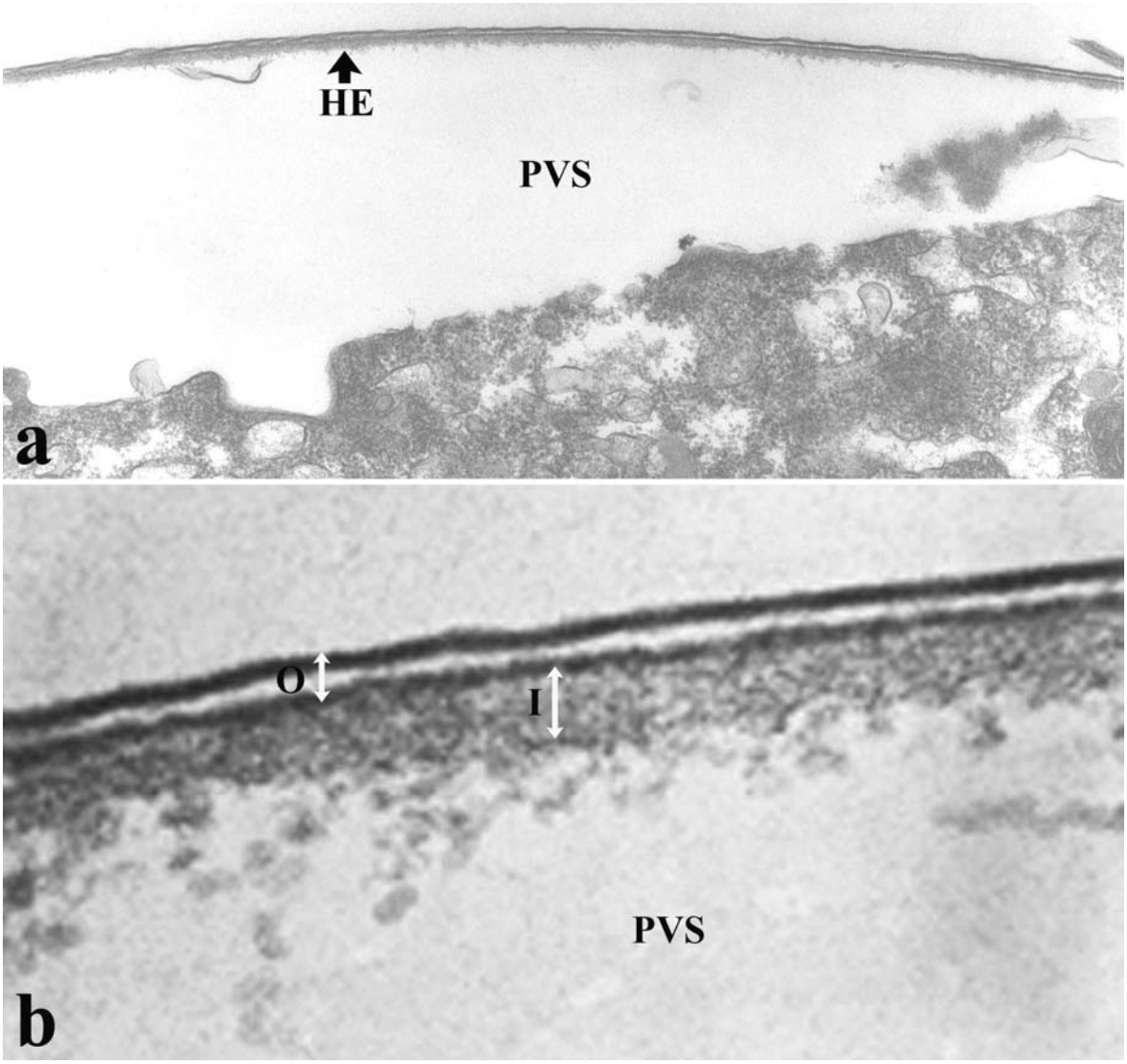
รูปที่ 17. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 1-2 นาทีหลังวางไข่ แสดงการ e□ocytosis ของ dense vesicles (a) dense materials ที่ถูกปล่อยออกมาเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ใน perivitelline space และลอยขึ้นไปติดกับด้านในของ hatching envelope ชั้นนอก (b): DV, dense vesicles

ที่เวลา 3 นาทีหลังวางไข่ flocculent vesicles เคลื่อนที่ไปยังขอบไข่เข้าใกล้เยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 18a) สารที่อยู่ภายในเปลี่ยนไปเป็นลักษณะโปร่งแสงและถูก exocytose ปล่อยออกไปใน perivitelline space ด้านบน (รูปที่ 18b)



รูปที่ 18. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 3 นาทีหลังวางไข่ แสดง flocculent vesicles ที่เคลื่อนที่เข้าใกล้เยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (a) และมีการ exocytosis ให้ปล่อยสารลักษณะโปร่งแสงเข้าสู่ perivitelline space (b): FV, flocculent vesicles; HE, hatching envelope; PVS, perivitelline space

ที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ การสร้าง hatching envelope เสร็จสมบูรณ์ซึ่งประกอบด้วยสองชั้นได้แก่ ชั้นนอกและชั้นใน (รูปที่ 19a) ชั้นนอกมีความหนาประมาณ 25-30 nm ประกอบด้วยแถบสีเข้มของ electron dense สองแถบ แยกจากกันด้วยแถบช่องว่างของ electron lucent ชั้นในประกอบด้วยชั้นสีจางของ electron dense หนาประมาณ 50 nm (รูปที่ 19b)

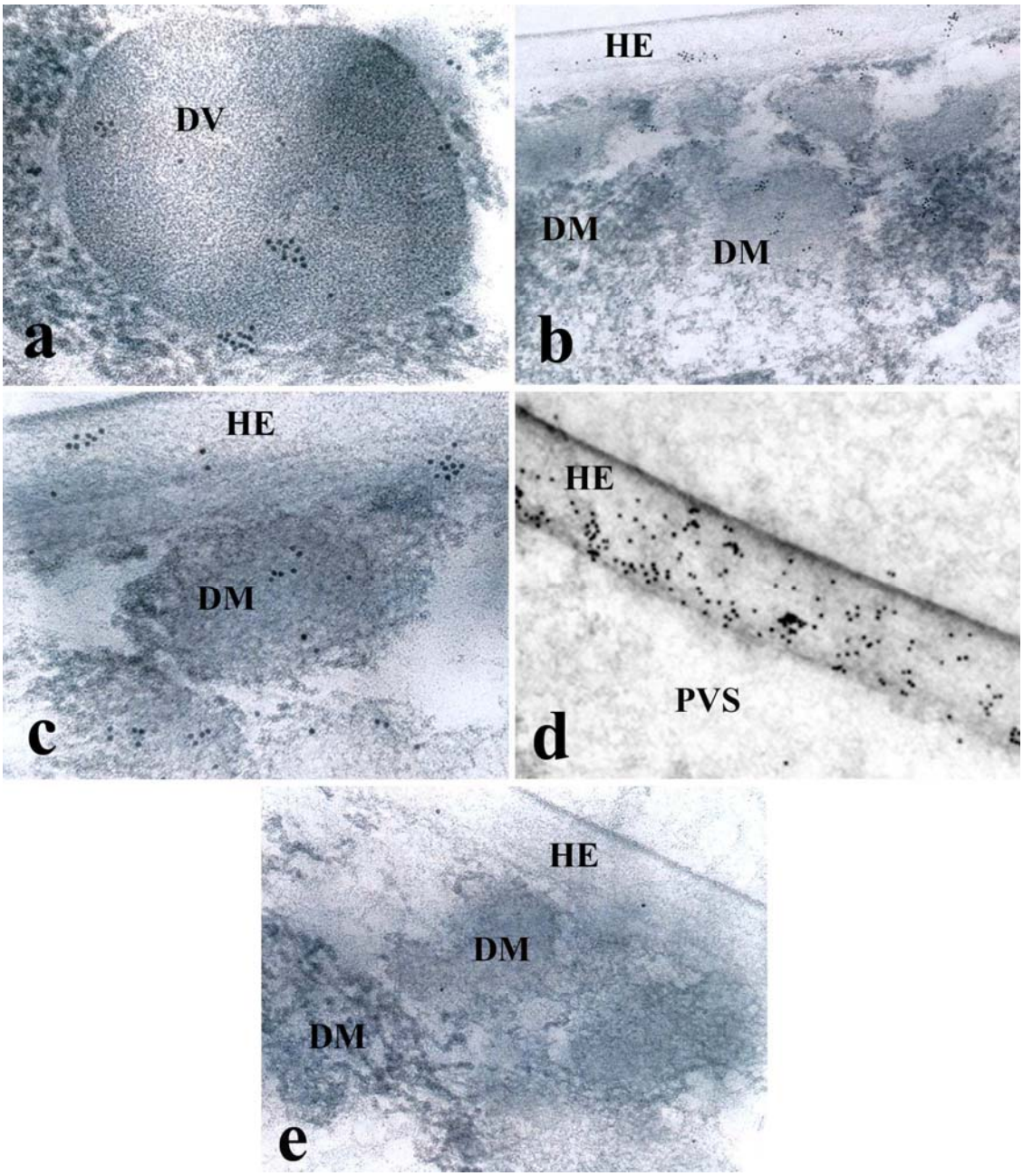


รูปที่ 19. Transmission electron micrograph ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ แสดง hatching envelope ที่สร้างเสร็จสมบูรณ์ (a) ประกอบด้วยชั้นนอก (O) และชั้นใน (I) (b): HE, hatching envelope; PVS, perivitelline space

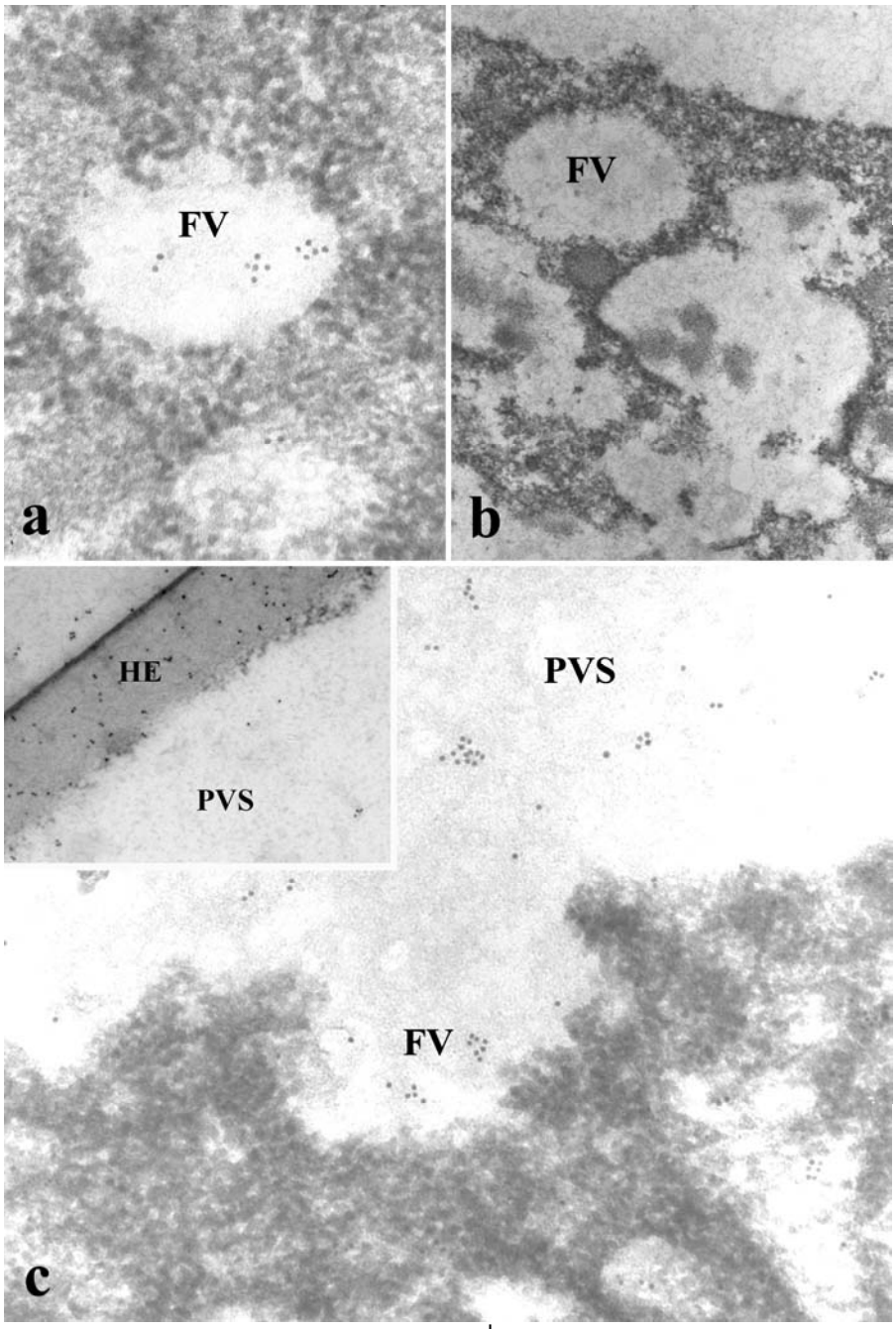
การเกิด hatching envelope จากการศึกษาด้วย gold-lectin labeling TEM

เมื่อ incubate ตัวอย่างที่เป็น thin section ด้วย gold-Con A พบการเกาะติดของ gold particles ที่ dense vesicles (รูปที่ 20a) ที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่พบ gold particles เกาะติดกับกลุ่มของ dense materials ซึ่ง exocytose ออกมาจาก dense vesicles กระจายอยู่ใน perivitelline space และในขณะเดียวกันพบ gold particles เกาะติดกับชั้นในของ hatching envelope (รูปที่ 20b, c) ชั้นนอกของ hatching envelope และที่ว่างระหว่าง dense materials ไม่พบ gold particles และที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังวางไข่พบ gold particles ขึ้นไปเกาะติดอยู่ที่ชั้นในของ hatching envelope (รูปที่ 20d) สำหรับกลุ่มควบคุมที่เติม mannose ลงไปใน gold-Con A ก่อนการ incubation พบการยับยั้งการเกาะติดของ gold particles (รูปที่ 20e) แสดงให้เห็นว่า dense vesicles มีการ exocytosis ให้เป็น dense materials เข้าสู่ perivitelline space ซึ่งต่อมาได้ขึ้นไปรวมกับ hatching envelope และกลายเป็นชั้นในของ hatching envelope

สำหรับ gold-WGA พบการเกาะติดของ gold particles ที่ flocculent vesicles (รูปที่ 21a) ซึ่ง exocytose ปล่อยสารที่อยู่ภายในเข้าสู่ perivitelline space (รูปที่ 21c) และที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังวางไข่พบ gold particles ขึ้นไปเกาะติดอยู่ที่ชั้นในและชั้นนอกของ hatching envelope (รูปเล็กในรูปที่ 21c) สำหรับกลุ่มควบคุมที่เติม N-acetyl glucosamine ลงไปใน gold-WGA ก่อนการ incubation ไม่พบการเกาะติดของ gold particles (รูปที่ 21b) การ incubate ตัวอย่าง thin section ด้วย gold particles ที่ไม่ได้ใส่ lectin ไม่พบการเกาะติดของ gold particles ที่โครงสร้างใดๆ



รูปที่ 20. ภาพ TEM gold-Con A ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ พบ gold particles เกาะติดกับ dense vesicles (a) และกลุ่มของ dense materials ที่อยู่ใน perivitelline space และชั้นในของ hatching envelope (b, c) ต่อมาเมื่อเวลา 1 ชั่วโมงหลังวางไข่พบ gold particles ขึ้นไปเกาะติดเฉพาะชั้นในของ hatching envelope เท่านั้น (d) สำหรับกลุ่มควบคุมที่เติม mannose ลงไปใน gold-Con A ก่อนการ incubation พบการยับยั้งการเกาะติดของ gold particles (e); DM, dense material; DV, dense vesicle; HE, hatching envelope; PVS, perivitelline space



รูปที่ 21. ภาพ TEM gold-WGA ของไข่กุ้งกุลาดำที่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ พบ gold particles เกาะติดกับ flocculent vesicles (a) ต่อมาพบ gold particles ที่ flocculent vesicles ที่กำลัง endocytosis ปล่อยสารเข้าสู่ perivitelline space (c) และเมื่อเวลา 1 ชั่วโมงหลังวางไข่พบ gold particles ขึ้นไปเกาะติดที่ชั้นในและชั้นนอกของ hatching envelope (รูปเล็กใน c) สำหรับกลุ่มควบคุมที่เติม N-acetyl glucosamine ลงไปใน gold-WGA ก่อนการ incubation ไม่พบการเกาะติดของ gold particles (b): FV, flocculent vesicle; HE, hatching envelope; PVS, perivitelline space

ตารางที่ 3. การเปรียบเทียบองค์ประกอบของส่วนต่างๆ ใน hatching envelope ของกุ้งกุลาดำ และกุ้ง *Sicyonia ingentis*

ชั้นของ hatching envelope	***Sicyonia ingentis*** **(Pillai and Clark, 1988 & 1990)**	**กุ้งกุลาดำ (การทดลองนี้)**
ชั้นนอก	N-acetyl glucosamine plus granular materials)	? from granular materials)
ชั้นใน	mannose	glucose/mannose
Perivitelline space	?	N-acetyl glucosamine

บทที่ 4
อภิปรายผล

Cortical vesicles ของไข่กุ้งกุลาดำมีความแตกต่างจากของกุ้งทะเล *S. ingentis* ตรงที่ในกุ้งกุลาดำ พบ cortical vesicles ใน cytoplasm ตั้งแต่ทันทีที่วางไข่ ในขณะที่ในกุ้ง *S. ingentis* เริ่มพบ cortical vesicles ที่เวลาประมาณ 30 นาทีหลังวางไข่ไปแล้ว (Pillai and Clark, 1988) cortical vesicles ของกุ้งกุลาดำมีรายงานว่าปรากฏแล้วตั้งแต่ใน mature oocyte ซึ่งอยู่ในรังไข่ดังที่มีรายงานใน Kruevaisayawan และคณะ (2010) ที่พบ cortical vesicles สองชนิดใน mature oocyte ได้แก่ vesicles ที่ติดสีจาง (lightly stained vesicles) และติดสีเข้ม (densely stained vesicles) ในการทดลองครั้งนี้ไข่ของกุ้งกุลาดำมี cortical vesicles สองชนิดตั้งแต่ทันทีที่วางไข่คือ flocculent vesicles และ dense vesicles ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา flocculent vesicles มีลักษณะคล้าย large lightly stained vesicles ใน mature oocyte และ dense vesicles มีลักษณะคล้าย small densely stained vesicles ใน mature oocyte (Kruevaisayawan *et al*., 2010) ดังนั้นความแตกต่างกับ *S. ingentis* คือการที่ cortical vesicles ทั้งสองชนิดปรากฏตั้งแต่ในไข่ก่อนที่จะมีการวางไข่ ซึ่งการปรากฏ cortical vesicles ในไข่ตั้งแต่ก่อนวางไข่นี้ได้พบในสัตว์หลายชนิดอย่างเช่นในกุ้ง lobster (Talbot and Goudeau, 1988) การเกิด egg activation ในกุ้งกุลาดำปรากฏทันทีที่มีการวางไข่หรือทันทีที่ไข่สัมผัสกับน้ำทะเลและใช้เวลารวดเร็วมาก (Pongtippatee *et al*., 2004) ในขณะที่ใน *S. ingentis* เริ่มต้นเกิด egg activation ที่เวลา 30-45 นาทีหลังวางไข่ (Pillai and Clark, 1988) เป็นไปได้ว่าการเริ่มต้นสร้าง hatching envelope ที่รวดเร็วในกุ้งกุลาดำคือที่เวลา 1 นาทีหลังวางไข่นี้ (Pongtippatee *et al*., 2004) ทำให้มีความจำเป็นที่ต้องสร้าง cortical vesicles รอไว้ในไข่ตั้งแต่ระยะ mature oocyte ในรังไข่ นอกจากนี้ระยะในการฟักไข่ของกุ้งกุลาดำยังใช้เวลาน้อยกว่าในกุ้ง *S. ingentis* ถึง 2 เท่าโดยในกุ้งกุลาดำจะใช้เวลาในการฟักไข่เป็นตัว 12-13 ชั่วโมงหลังจากแม่กุ้งวางไข่ (Hall *et al.,* 1999) ในขณะที่กุ้ง *S. ingentis* ใช้เวลา 24 ชั่วโมงในการฟักไข่ (Hertzler and Clark, 1992) ดังนั้น ความแตกต่างทั้งในเรื่องของระยะเวลาในการฟักไข่ และระยะเวลาในการเกิด egg activation ของกุ้งกุลาดำที่ใช้เวลาสั้นกว่าและเกิดขึ้นเร็วกว่าในกุ้ง *S. ingentis* จึงเป็นสาเหตุให้มีความแตกต่างของการสร้าง cortical vesicles และระยะเวลาในการสร้าง hatching envelope

เกี่ยวกับ membranous structures และ granular materials แม้ว่ายังไม่ทราบองค์ประกอบและหน้าที่จากการศึกษาด้วย TEM ในการทดลองนี้ แต่โดยลักษณะที่ถูกปล่อยออกจากไข่ในระยะแรกและพบว่า granular materials มีการเรียงแถวอยู่บน membranous structures ซึ่งต่อมา membrane ของ granular materials ที่เรียงแถวอยู่มีการเชื่อมติดกันและ

ปรากฏลักษณะเป็นเยื่อหุ้มสองชั้นซึ่งเป็นส่วนชั้นนอกของ hatching envelope ทำให้กล่าวได้ว่าโครงสร้างทั้งสองนี้เป็นองค์ประกอบของ hatching envelope ชั้นนอก

การศึกษานี้พบว่าชั้นนอกของ hatching envelope ของไข่กุ้งกุลาดำถูกสร้างโดย granular materials แต่ในไข่ของกุ้ง *S. ingentis* มี granular materials เป็นตัวสร้าง surface coat ซึ่งเป็น template ของ hatching envelope (Pillai and Clark, 1988) แหล่งที่มาของ granular materials ในกุ้ง *S. ingentis* ยังไม่ทราบเช่นเดียวกับในกุ้งกุลาดำ แต่มีรายงานว่า granular materials ในหอยเม่น *Strongylocentrotus purpuratus* พัฒนามาจาก vitelline envelope (Cheng *et al*., 1991) สำหรับ *S. ingentis* มีรายงานว่าส่วนของ surface coat (template ของ hatching envelope) รวมตัวกับสารที่ exocytosis ออกมาจาก dense vesicles ซึ่งได้แก่ N-acetyl glucosamine หรือ sialic acid กลายเป็น hatching envelope ชั้นนอก แต่ในการทดลองนี้ผลจากการศึกษาด้วย TEM ทั้งที่ใช้และไม่ใช้ gold-Con A labeling และการศึกษาด้วย fluorescent ที่พบความเฉพาะเจาะจงสูงใน hatching envelope ชั้นใน เป็นสิ่งยืนยันได้ว่าสารเหล่านั้นเป็นชั้นในของ hatching envelope

แม้ว่า Pillai and Clark (1988) กล่าวว่าชั้นนอกของ hatching envelope ใน *S. ingentis* สร้างโดยการรวมตัวกันของ surface coat และสารที่หลั่งออกมาจาก dense vesicles ซึ่งเป็นสารประเภท N-acetyl glucosamine แต่การศึกษาของ Pillai and Clark (1990) ก็ไม่ประสบผลสำเร็จในการใช้ gold-WGA (N-acetyl glucosamine binding) labeling ที่ชั้นนอกของ hatching envelope ดังนั้นยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนว่าชั้นนอกของ hatching envelope ใน *S. ingentis* มีองค์ประกอบของ N-acetyl glucosamine หรือไม่

อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าชั้นในของ hatching envelope ในกุ้งกุลาดำสร้างขึ้นโดยสารที่ exocytosis ออกมาจาก dense vesicles ซึ่งเป็น glucose/mannose (ด้วยความจำเพาะต่อ Con A) (สำหรับ LCA ซึ่งมีความจำเพาะต่อ mannose เพียงชนิดเดียวก็ให้ผลเหมือนกัน แต่ไม่ได้นำมาแสดงในผลการทดลอง) ผลการทดลองนี้แตกต่างใน *S. ingentis* ที่ศึกษาโดย Pillai and Clark (1990) ที่พบว่าความจำเพาะต่อ LCA (mannose) ได้ปรากฏใน ring vesicles (หรือ flocculent vesicles ในการทดลองนี้) แต่อย่างไรก็ดี ring vesicles ได้สร้างชั้นในของ hatching envelope ใน *S. ingentis* ฉะนั้นลักษณะทางเคมีของชั้นในของ hatching envelope ที่เป็นองค์ประกอบของน้ำตาลน่าจะเป็น glucose/mannose ทั้งในกุ้งกุลาดำและใน *S. ingentis* แม้ว่า vesicles ที่เกิดการ exocytosis ให้สารดังกล่าวออกมาจะมีความแตกต่างกันในกุ้งต่างชนิด

จากการทดลองนี้พบว่า flocculent vesicles มีบทบาทในการปล่อยสารเข้าสู่ perivitelline space ซึ่งทำให้เกิดการยกตัวของ hatching envelope (hatching envelope elevation) เห็นได้จากภาพ fluorescent และ TEM ที่เป็น gold-WGA labeling สามารถกล่าวได้ว่าองค์ประกอบ N-acetyl glucosamine มีส่วนในการยกชั้น hatching envelope โดยการ

exocytosis ของ flocculent vesicle ผ่านทาง perivitelline space และจากการศึกษาด้วย fluorescent พบจุดเรืองแสงหายไปจาก perivitelline space ตั้งแต่เวลา 30 นาทีหลังวางไข่ และไปปรากฏเป็นแถบอยู่ที่ hatching envelope เป็นไปได้ว่ามีการเคลื่อนที่ของ N-acetyl glucosamine ขึ้นไปรวมตัวกับ hatching envelope ที่ถูกสร้างอยู่ก่อนหน้านี้แล้ว การเกิดขึ้นและองค์ประกอบภายใน perivitelline space ไม่ได้มีการกล่าวถึงจากการศึกษาใน *S. ingentis* โดย Pillai and Clark (1988 & 1990) เพื่อความชัดเจนเกี่ยวกับผลการทดลองจากการทดลองนี้ ได้มีการสรุปลำดับเหตุการณ์ต่างๆ เกี่ยวกับการสร้าง hatching envelope ในกุ้งกุลาดำเปรียบเทียบกับในกุ้ง *S. ingentis* (Pillai and Clark, 1988 & 1990) ไว้ในตารางที่ 3

ใน cortical vesicles ของไข่หอยเม่น *S. purpuratus* มีองค์ประกอบเป็น β-1, 3- glucanase และ ovoperoxidase ซึ่งช่วยในการ cross-link โครงสร้างที่ใช้ในการสร้าง hatching envelope (Cheng *et al*., 1991) มีการพบว่า ovoperoxidase เป็นสารประเภท glycoprotein ที่มี mannose และ N-acetyl glucosamine เป็นองค์ประกอบ (Deits *et al*., 1984) การที่มีกลุ่มคาร์โบไฮเดรททั้งสองใน flocculent vesicles และ dense vesicles ของไข่กุ้งกุลาดำนี้ อาจกล่าวได้ว่า vesicles ทั้งสองชนิดนี้มีเอนไซม์ดังกล่าวอยู่

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การสร้าง hatching envelope ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของ egg activation ในกุ้งกุลาดำมีการเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาพบว่าไข่กุ้งกุลาดำเริ่มมีการสร้าง hatching envelope จาก membranous structures และ granular materials ซึ่งโครงสร้างทั้ง 2 จะร่วมกันสร้างเป็น hatching envelope ชั้นนอก ซึ่งจะเกิดขึ้นทันทีที่กุ้งวางไข่และเสร็จสมบูรณ์ภายใน 1 นาที จากนั้น cortical vesicle อีก 2 ชนิดคือ flocculent vesicle และ dense vesicle จะเริ่ม exocytosis โดย dense vesicles ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นน้ำตาล mannose/glucose จะ exocytosis ก่อน โดยจะปล่อย dense materials เข้าไปเสริมชั้นนอกของ hatching envelope เพื่อให้ hatching envelope ชั้นนอกแข็งแรงมากขึ้นและสร้าง hatching envelope ชั้นใน สำหรับ flocculent vesicles ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น N-acetyl glucosamine จะทำหน้าที่ในการยกชั้น hatching envelope ขึ้น ซึ่งกระบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นภายใน 30 นาทีหลังวางไข่

เอกสารอ้างอิง

Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. 1980a. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse zona pellucidae processing receptor activity for sperm. Cell. 20: 873-882

Chandler, D.E. and Heuser, J. 1979. Membrane fusion during secretion: cortical granule exocytosis in sea urchin eggs as studied by quick-freezing and freeze fracture. J. Cell Biol. 83: 91-108.

Cheng, S., Glas, P.S. and Green, J.D. 1991. Abnormal sea urchin fertilization envelope assembly in low sodium seawater. Biol Bull. 180: 346-354.

Clark, Jr. W.H., Griffin, F.J. and Wikramanayake, A.H. 1994. Pre-fusion events of sperm-oocyte interaction in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. Semin Dev Biol. 5(4): 225-231.

Clark, Jr. W.H., Lynn, J.W., Persyo, H.O. 1980. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus.* Biol Bull. 158: 175-186.

Clark, Jr. W.H., Yudin, A.I., Griffin, F.J., and Shigekawa, K. 1984. The control of gamete activation and fertilization in the marine penaeideae *Sicyonia ingentis.* In: Advances in Invertebrate Reproduction 3, Egels, W., *et al*. Eds. Elsevier Science Publishers, pp 459-472.

Clark, Jr. W.H., Yudin A.I., Lynn, J.W., Griffin, F.J. and Pillai, M.C. 1990. Jelly layer formation in penaeoidean shrimp eggs. Biol Bull. 178: 295-299.

Crossley, I., Swann, K., Chambers, E. and Whitaker, M. 1988. Activation of sea urchin eggs by inositol phosphates is independent of external calcium. Biochem J. 252(1): 257–262.

Deits, T., Farrance, M., Kay, E.S., Medill, L., Turner, E.E., Weidman, P.J. and Shapiro, B.M. 1984. Purification and properties of ovoperoxidase the enzyme, responsible for hardening the fertilization membrane of the sea urchin egg. J Biol Chem. 259(11): 13525-13533.

Duronslet, M.J., Yudin, A.I., Wheeler, R.S. and Clark, W.H. 1975. Light and fine structural studies of natural and artificially induced egg grwoth of penaeid shrimp. Proc. World Maricult. Soc. 6: 105–122

Epel, D. 1975. The Program of and Mechanisms of Fertilization in the Echinoderm Egg. American Zoologist. 15(3): 507-522.

Florman, H.M. and Wassarman, P.M. 1985. *O*-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell. 41: 313-324.

Foerder, C.A. and Shapiro, B.M. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. Proc Natl Acad Sci USA. 74(10): 4214-4218

Food and agriculture organization of the United Nations. http://www.fao.org/fishery /culturedspecies/Penaeus_monodon/en (accessed 18/09/10)

Glas, P.S., Green, J.D. and Lynn, J.W. 1996. Morphological evidence for a chitin-like glycoprotein in Panaeid hatching envelopes. Bio Bull. 374-384.

Goudeau, M. and Becker, J. 1982. Fertilization in a crab. II. Cytological aspects of the cortical reaction and fertilization envelope elaboration. Tissue and Cell. 14(2): 273-282.

Hall, M., Neil, Y. and Matt, K. 1999. Manual for the Determination of Egg Fertility in *Penaeus monodon*. AIMS Research. Australia, Available: http://www.aims.gov.au.

Hertzler, P.L. and Clark, Jr. W.H. 1992. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis*: invagination is accompanied by oriented cell division. Development. 116: 127-140

Hylander, B.L. and Summers, R.G. 1982. Observations on the role of the cortical reaction in surface changes at fertilization. Cell Differentiation. 11(8): 267-270.

Kruevaisayawan, H., Vanichviriyaki, R., Weerachatyanukul, W., Magerd, S., Withyachumnarnkul, B., and Sobhon, P. 2007. Biochemical characterization and physiological role of cortical rods in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture. 270: 289-298.

Kruevaisayawan, H., Vanichviriyakit, R., Weerachatyanukul, W., Withyachumnarnkul, B., Chavadej, J. and Sobhon, P. 2010. Oogenesis and formation of cortical rods in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture. 301: 91-98.

Little, C. and Kitching, J.A. 1996. The biology of rocky shores. Oxford University Press: Oxford.

Liu, M., Sims, D., Calarco, P., and Talbot, P. 2003. Biochemical heterogeneity, migration, and pre-fertilization release of mouse oocyte cortical granules. Reprod Biol Endocrinol. 7:1-11.

Lynn, J.W., Glass, P.S. and Green, J.D. 1992. Assembly of hatching envelope around the eggs of *Trachypanaeussimilis* and *Sicyonia ingentis* in a low sodium environment. Bio Bull. 183: 84-93.

Motoh, H. 1981.Studies on the fisheries biology of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* in the Philippines.

Pillai, M.C. and Clark, Jr. W.H. 1988. Hatching envelope formation in shrimp (*Sicyonia ingentis*) ova: origin and sequential exocytosis of cortical vesicles. Tissue & Cell. 20: 941-952.

Pillai, M.C., and Clark, Jr. W.H. 1990. Development of cortical vesicles in *Sicyonia ingentis* ova: their heterogeneity and role in elaboration of the hatching envelope. Mol Reprod Dev. 26: 78-89.

Pongtippatee-Taweepreda, P., Chavadej, J., Plodpai, P., Pratoomchart, B., Sobhon, P., Weerachatyanukul, W. and Withyachumnarnkul, B. 2004. Egg activation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. 234: 183-198.

Pongtippatee, P., Luppanakane, R., Thaweethamsewee, P., Kirirat, P., Weerachatyanukul, W. And Withyachumnarnkul, B. 2010. Delay of the egg activation process in the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* by manipulation of magnesium levels in spawning water. Aquaculture. 41(1): 227-232.

Sheeler, P. and Bianchi, D. 1987. Cell and molecular biology. 3rd Ed. John Wiley & Sons Inc: USA.

Shur, B.D. and Hall, N.G. 1982a. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. J Cell Biol. 95(2): 574-579

Shur, B.D. and Hall, N.G. 1982b. Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. J Cell Biol. 95(2): 567-573

Talbot, P. and Goudeau, M.A. 1988. A complex cortical reaction leads to formation of the fertilization envelope in the lobster, *Homarus*. Gamete Res. 19: 1-18

Taweepreda, P. 2003. Natural fertilization of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon.* Ph.D. Thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Terasaki, M. 1995. Visualization of exocytosis during sea urchin egg fertilization using confocal micreoscopy. Jornal of cell science. 108: 2293-2300.

Vacquier, V.D. and Moy, G.W. 1977. Isolation of bindin: The protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. Proc Natl Acad Sci USA. 74: 2456-2460.

Vacquier, V.D., Tegner, M.J. and Epel, D. 1973. protease released from sea urchin eggs at fertilization alters the vitelline layer and aids in preventing polyspermy. Exp Cell Res. 80(7): 111-119.

Wikipedia. 2009. lectin. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gs4_sugar_all.png (accessed 18/09/10)

Withyachumnarnkul, B., Flegel, T. 2004. Research seek cause of retarded growth in Thai black tiger shrimp. Global aquaculture advocate. 7(2): 88-89.

Yano, I. 1988. Oocyte development in the Kuruma prawn *Penaeus japonicus.* Mar. Biol. 99: 547-553.

ภาคผนวก

การเตรียมสาร

1. 5% uranyl acetate

สารเคมีที่ใช้

Uranyl acetate 5.0 g

70% methanol 100 mL

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง uranyl acetate จำนวน 5.0 g ใส่ในบีกเกอร์
2. เติม 70% methanol ลงไปเพื่อช่วยในการละลาย โดยใช้เครื่องช่วยผสมเมื่อละลายดีแล้ว นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 100mL
3. นำสารละลายที่เตรียมได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ขวดเก็บสารสีชา วางเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ˚C พร้อมที่จะนำมาใช้

2. 2% uranyl acetate

สารเคมีที่ใช้

Uranyl acetate 2.0 g

70% methanol 100 mL

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง uranyl acetate จำนวน 2.0 g ใส่ในบีกเกอร์
2. เติม 70% methanol ลงไปเพื่อช่วยในการละลาย โดยใช้เครื่องช่วยผสมเมื่อละลายดีแล้ว นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 100mL
3. นำสารละลายที่เตรียมได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ขวดเก็บสารสีชา วางเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ˚C พร้อมที่จะนำมาใช้

3. 50% ethyl alcohol

สารเคมีที่ใช้

95% ethyl alcohol 500 ml

Distilled water 450 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง 95% ethyl alcohol ปริมาตร 500 ml ใส่ในขวดเก็บสาร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 450 ml เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 950 ml เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง พร้อมที่จะนำมาใช้ต่อไป

4. 70% ethyl alcohol

สารเคมีที่ใช้

95% ethyl alcohol 700 ml

Distilled water 250 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง 95% ethyl alcohol ปริมาตร 700 ml ใส่ในขวดเก็บสาร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 ml เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 950 ml เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง พร้อมที่จะนำมาใช้ต่อไป

5. embedding mixture

สารเคมีที่ใช้

Mixture 1

- EMBed-812(EMS, PA) 5 ml
- DDSA (EMS, PA) 8 ml

Mixture 2

- EMBed-812 8 ml
- NMA (EMS, PA) 7 ml

Final embedding mixtures:

- mixture 1 13 ml
- mixture 2 15 ml
- DMB 30 (EMS, PA) 0.56 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง EMBed-812 ปริมาตร 5 ml ผสมกับ DDSA ปริมาตร 8 ml ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องช่วยผสม
2. ตวง EMBed-812 ปริมาตร 8 ml ผสมกับ NMA ปริมาตร 7 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม
3. นำส่วนผสมข้อ 1 และ ข้อ 2 มาผสมให้เข้ากันดี โดยใช้เครื่องช่วยผสม
4. เติม DMB 30 ปริมาตร 0.56 ml ลงไป ผสมให้เข้ากันดีอีกครั้ง พร้อมที่จะนำมาใช้

6. lead citrate

สารเคมีที่ใช้

Lead nitrate (AnalaR, England) 1.33 g

Sodium citrate (Electron Microscopy Science, PA) 1.76 g

Distilled water 30 mL

วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 30 mL ใส่ขวดรูปชมพู่ (flask)
2. ค่อยๆ เติม lead nitrate จำนวน 1.33 g ลงไป ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องผสม
3. เติม sodium citrate จำนวน 1.76 g ผสมสารให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว (เขย่าอย่างแรง 4 ประมาณ 5-10 นาที) จะได้สารละลายสีขาวคล้ายน้ำนม วางทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ระหว่างนี้เขย่าสารละลายเป็นครั้งคราว
4. ค่อยๆ เติม 1 N NaOH ลงไปในสารละลายที่เตรียมได้ ประมาณ 8 mL จนได้สารละลายมีสีใส
5. นำสารละลายที่เตรียมได้ มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 mL กรองด้วกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บใส่ขวดเก็บสาร วางเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 0-4 °C พร้อมที่จะนำมาใช้ต่อไป

7. mesh cement

สารเคมีที่ใช้

50% ethanol (J.T.Baker, Malaysia) 95 mL

Acetic acid (J.T.Baker, USA) 5 mL

วิธีการเตรียม

1. ตวง 50% ethanol ปริมาตร 95 mL ใส่ขวดเก็บสาร
2. เติม acetic acid ปริมาตร 5 mL ลงไปผสมเข้าด้วยกัน ปิดฝาให้สนิทพร้อมที่จะนำมาใช้

8. 4% osmium tetroxide

สารเคมีที่ใช้

Osmium teroxide (OsO_4) 1.0 g

Distilled water 25 mL

วิธีการเตรียม

1. ล้างหลอดแก้ว (ampule) หรือภาชนะบรรจุ OsO_4 ให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างจานและนำมาล้างน้ำกลั่นให้สะอาดอีกครั้ง แล้วเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดเลนส์
2. ห่อหลอดแก้วด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ให้หนาพอสมควร
3. ตีหลอดแก้วที่เตรียมได้ในข้อ 2 ให้แตกละเอียด เทใส่ขวดเก็บสารสีชา (reagent bottle for OsO_4)
4. เติมน้ำกลั่น (ที่ผ่านการต้มสุกและการกรองแล้ว) ปริมาตร 25 mL เขย่าเบา ๆ เพื่อให้ OsO_4 ละลายจนหมดจะได้ 4% OsO_4
5. เมื่อต้องการใช้ 1% OsO_4 ให้เจือจางจาก 4% OsO_4 ด้วย 0.1 M PBS ในอัตราส่วน 1:3 เก็บ 1% OsO_4 วในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ส่วน 4% OsO_4 ให้เก็บไว้ในที่มืดพร้อมที่จะนำมาใช้ต่อไป

9. 8% paraformaldehyde

สารเคมีที่ใช้

Paraformaldehyde (EMS, PA) 10.0 g

Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) 5.3 g

50% sodium hydroxide (NaOH) 1.8 mL

Distilled water 125 mL

วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL ใส่บีกเกอร์
2. ค่อยๆ เติม paraformaldehyde จำนวน 10.0 g และ NaH_2PO_4 จำนวน 5.3 g ลงไปตามลำดับ 3. ผสมให้เข้ากันโดยใช่เครื่องช่วยผสมและค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นประมาณ 60° C
4. ค่อยๆ เติมสารละลาย 50% NaOH จนได้สารละลายใส
5. นำสารละลายที่ได้มาปรับ pH ให้ได้ 7.2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 125 mL
6. นำสารละลายที่เตรียมได้มากรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และวางเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 0-4 ° C พร้อมที่จะนำมาใช้

10. 0.1 M Phosphate buffer saline pH 7.2

สารเคมีที่ใช้

Solution A : sodium phosphate monobasic	27.6 g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้	1000.0 ml
Solution B : sodium phosphate dibasic	28.4 g
น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้	1000.0 ml

วิธีการเตรียม

1. ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน solution A : solution B = 23 : 77
2. ปรับ pH ให้ได้ 7.2 นำสารละลายที่ได้มาผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล นางสาววานีดา พุฒวัจน์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220119

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเป็นผู้ช่วยนักวิจัย RA บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.- อุตสาหกรรม สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.)สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Putthawat, W., Pongtippatee, P., Doungsuwan, P., Weerachatyanukul, W. and Withyachumnarnkul, B. 2010. Hatching Envelope Formation in the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon.* Proceeding of the Anatomy Association of Thailand. Greenery Resort, April 28-30, 2010. pp. 1