



การประยุกต์ใช้ฟอติลินในอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทาน
โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
Application of Fortilin in Diet for Immune Stimulation and Increase Resistance to White
Spot Disease in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

อรอนงค์ คงทวี
Orn-anong Kongtawee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้ฟอสฟอรัสในอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มความ
ต้านทานโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
ผู้เขียน นางสาวอรอนงค์ คงทวี
สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูติมา ตันติกิตติ)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูติมา ตันติกิตติ)

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

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

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

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์

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

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้ฟอตลินินในอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทาน โรค
ไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ผู้เขียน นางสาวอรอนงค์ คงทวี

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของการเสริม โปรตีนฟอตลินินยีสต์ในอาหารต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งขาวแวนนาไม โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดที่ 1 อาหารไม่ผสมยีสต์และโปรตีนฟอตลินินยีสต์ ชุดที่ 2 อาหารผสมยีสต์ ชุดที่ 3 อาหารผสมยีสต์พลาสติกเปล่า ชุดที่ 4 อาหารผสมโปรตีนฟอตลินินยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ 5 อาหารผสมโปรตีน ฟอตลินินยีสต์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1060 ± 2.05 กรัม ด้วยอาหารทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ 1 2 และ 3 สัปดาห์ เพื่อตรวจวัดการทำงานของภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแยกตามชนิด กิจกรรมเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และการสร้างอนุภูมิลิสรูบเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ของเซลล์เม็ดเลือด และทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยให้กุ้งขาวรับเชื้อโดยวิธีการฉีด พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างกุ้งหลังฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมงและกุ้งรอดตายหลังได้รับเชื้อ 5 วันมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ซึ่งเป็นยีนของเชื้อที่สามารถใช้บ่งชี้สถานะการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวได้และเก็บตัวอย่างกุ้งหลังฉีดเชื้อที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งแต่ละชุดการทดลอง ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีสต์ และ โปรตีนฟอตลินินยีสต์ไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว แต่ส่งผลให้กุ้งสามารถต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้เพิ่มขึ้น โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอตลินินยีสต์ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตาย 76 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอตลินินยีสต์ ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ อาหารผสมยีสต์ และอาหารผสมยีสต์พลาสติกเปล่า ซึ่งมีอัตราการรอด 66 เปอร์เซ็นต์ 38 เปอร์เซ็นต์ และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บกุ้งที่รอดตายมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 พบว่า อัตราส่วนการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin (VP28/ β actin ratio) มีค่าอยู่ในช่วง 0.18-0.26 ซึ่งต่ำกว่าค่าที่แสดงออกในกุ้งที่แสดงอาการ (หลังฉีด

เชื้อ 24 ชั่วโมง) ซึ่งมีค่าการแสดงออกของยีนอยู่ในช่วง 0.67-0.88 เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการให้อาหารพบว่าหลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมโปรตีนฟอตินิยีสต์ 2 สัปดาห์ ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดตายหลังรับเชื้อตัวแดงดวงขาวสูงสุดและเริ่มลดลงหากใช้ระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้นเป็น 3 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าระดับของโปรตีนฟอตินิยีสต์ที่เหมาะสมในการนำไปผสมอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมคือที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งที่ได้รับเชื้อตัวแดงดวงขาวรอดตายสูงสุดประมาณ 76 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการให้อาหารที่เหมาะสมคือ 2 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพยาธิสภาพของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของทุกชุดการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน

Thesis Title Application of Fortilin in Diet for Immune Stimulation and Increase
Resistance to White Spot Disease in White Shrimp (*Litopenaeus
vannamei*)
Author Miss Om-among Kongtawee
Major Program Aquatic Science
Academic Year 2011

ABSTRACT

The application of fortilin in diets for immune stimulation and disease resistance to white spot disease in Pacific white shrimp (*L. vannamei*) was conducted. Triplicate groups of shrimp with an average body weight of 10.60 ± 2.05 g were randomly fed with five experimental diets: diet 1 without yeast and fortilin-yeast, diet 2 supplemented with yeast, diet 3 supplemented with yeast-plasmid, diet 4 supplemented with 0.5% fortilin-yeast and diet 5 supplemented with 1.0% fortilin-yeast. At 1, 2 and 3 weeks after feeding the total haemocyte count (THC), differentiate haemocytes count (DHC), phenoloxidase activity (PO), phagocytic activity (PA), phagocytic index (PI) and superoxide anion (O_2^-) were analysed and the resistance to white spot syndrome virus (WSSV) was carried out by means of injection. Shrimp were examined for the expression of VP28 gene after 24 hours and 5 days post WSSV injection and histopathology were observed at 24, 48 and 72 hours post WSSV injection.

The results indicated that yeast and fortilin-yeast were unable to enhance immune response but disease resistance was increased in Pacific white shrimp. The Relative Percent Survival (RPS) of shrimp fed 0.5% fortilin-yeast supplemented diet was 76% which was higher than those supplemented with 1.0% fortilin-yeast, yeast and yeast-plasmid (66%, 38% and 33%, respectively). The expression of VP28, evaluated in survival and moribund shrimp, showed that VP28/ β -actin ratio were 0.18-0.26 in survived shrimp and 0.67-0.88 in moribund shrimp at 24 hours post injection. When taking the time course of feeding into account, the survival rate of shrimp injected with WSSV was the highest after feeding fortilin-yeast supplemented diet for 2

weeks and survival rate was declined for the 3 weeks feeding group. Histopathological examination in WSSV infected shrimps showed the same pathological changes in the cells of gills, pleopod, subcuticular epithelium of stomach, haematopoietic tissue, connective tissue, lymphoid organ and heart. We therefore concluded that fortilin-yeast enhanced disease resistance to WSSV in Pacific white shrimp and the optimal dietary supplementation level of fortilin-yeast was 0.5% with the optimal feeding period of 2 weeks.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
1. ปัญหาโรคไวรัสในการเลี้ยงกุ้ง	2
2. ระบบการทำงานของภูมิคุ้มกันกุ้ง	4
3. การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อเชื้อไวรัส	6
4. ฟอติลิน (Fortilin)	7
วัตถุประสงค์	9
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงาน	10
บทที่ 3 ผลการศึกษา	19
1. การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว	19
2. การทดสอบความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	27
3. การแสดงออกของยีน VP28 และยีน β-actin ในกุ้งขาวหลังรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	31
4. พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวภายหลังได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	33
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการศึกษา	40
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก ก	62
ภาคผนวก ข	65
	(8)

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก ค	68
ภาคผนวก ค-1	69
ภาคผนวก ค-2	73
ภาคผนวก ค-3	74
ภาคผนวก ค-4	76
ภาคผนวก ค-5	78
ภาคผนวก ค-6	80
ภาคผนวก ง	82
ภาคผนวก ง-1	83
ภาคผนวก ง-2	85
ภาคผนวก ง-3	87
ภาคผนวก จ	91
ประวัติผู้เขียน	96

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารสำหรับอาหารทดลอง 5 สูตร	14
2	องค์ประกอบทางเคมีจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง 5 สูตร	15
3	ดีเอ็นเอต้นแบบ (primer) และขนาดของผลิตภัณฑ์ (product) ของยีน VP28 และ β-actin	17
4	ส่วนผสมของสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการศึกษาการแสดงออกของยีน VP28 และ β-actin	17
5	โปรแกรมพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการศึกษาการแสดงออกของยีน VP28 และ β-actin	18
6	ค่า Relative Percent Survival (RPS) ของกุ้งขาวที่ให้อาหารแตกต่างกัน 4 สูตรในระยะเวลา 3 สัปดาห์	30
7	อัตราส่วนระดับการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β-actin (VP28/β actin ratio) ในเนื้อเยื่อกุ้งขาวหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 24 ชั่วโมง ใน 3 สัปดาห์	32
ง-1	ส่วนผสมและปริมาตรของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA	89
ง-2	โปรแกรมการสังเคราะห์ cDNA ของชุดทดสอบ iScript™ cDNA synthesis kit	89
จ-1	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) ของปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC×10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในกุ้งขาว	92
จ-2	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การแยกชนิดเม็ดเลือด (differential haemocyte count: DHC) ในกุ้งขาว	92
จ-3	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) ของความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity: PA) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว	93
จ-4	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) ของดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index: PI) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว	94
จ-5	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O₂⁻) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว	94
จ-6	ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) เม็ดเลือดกุ้ง	95

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ปริมาณเม็ดเลือดรวม($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวที่ให้อาหารทดลองต่างกัน 5 สูตร เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)	19
2	เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิดต่าง ๆ หลังการช้อมด้วยสีเบงกอลโรส และ สีมาท็อกโซลิน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x; hyaline cell: H, semi granular cell: S, large granular cell: L	20
3	เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือด hyaline cell, semi granular cell, large granular cell ของกุ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)	21
4	การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว (ช้อมด้วยสีช้อม Dip-Quick สำเร็จรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x A2 และ B คือเม็ดพลาสติก (bead) ที่ถูกเม็ดเลือดกุ้งขาวจับกินเข้าไปในเซลล์ A1 ส่วนของเม็ดเลือดกุ้งขาวที่ยื่นไปจับกินเม็ดพลาสติก C เม็ดพลาสติกที่เกาะอยู่รอบ ๆ เม็ดเลือด	22
5	เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity: PA) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตรในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)	24
6	ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index: PI) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตร ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)	25
7	การสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตร ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)	26
8	ค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO; unit/min/mg protein) ของเม็ดเลือดกุ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตร ใน 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)	27

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ให้อาหารแตกต่างกัน 5 สูตร ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ ค่าเฉลี่ยบนเส้นกราฟในเวลาเดียวกันที่ตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$)	29
10	การแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin ที่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งขาว	31
11	อัตราส่วนการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin ในกุ้งขาวหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 24 ชั่วโมงและในกุ้งขาวที่รอดตาย	33
12	ลักษณะทางพยาธิสภาพของกุ้งขาวภายหลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	34
13	พัฒนาการของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของกุ้งขาวภายหลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	36
14	ลักษณะทางพยาธิสภาพของหัวใจของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง	37
15	ลักษณะทางพยาธิสภาพของลิมโฟคัยออร์แกนของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง	38

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีการเลี้ยงอย่างกว้างขวางในพื้นที่ชายฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวสามารถทำรายได้ให้แก่ผู้ประกอบการอย่างต่อเนื่อง จึงมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด โดยเฉพาะการเพิ่มความหนาแน่น ซึ่งทำให้การจัดการและการควบคุมระบบการเลี้ยงทำได้ยาก ส่งผลให้กุ้งเกิดโรคได้ง่าย ทั้งปรสิตภายนอก แบคทีเรีย และไวรัส โดยเฉพาะโรคไวรัสที่ทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมากในเวลาอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการส่งเสริมให้สัตว์น้ำมีสุขภาพที่สมบูรณ์ แข็งแรงจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ดีของสัตว์น้ำเพื่อให้สามารถต้านทานต่อโรคชนิดต่าง ๆ ได้ การศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันหรือรักษาโรคกุ้ง นอกจากการส่งเสริมให้สัตว์น้ำมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีโดยการให้อาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วนแล้ว การเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอาหารให้สัตว์น้ำก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ส่งผลโดยตรงและรวดเร็วในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อ ปัจจุบันมีการนำสารหลายชนิดมาใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น เบต้ากลูแคน (จากผนังเซลล์ยีสต์และรา) เปปติโดไกลแคน (จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก) ไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ (จากแบคทีเรียแกรมลบ) สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากไวรัส รวมทั้งฟอสฟอไลนซึ่งเป็น โปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถต้านทานไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำได้โดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อซึ่งพบว่าสามารถทำให้กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวรอดตาย 80-100 เปอร์เซ็นต์ (Tonganunt *et al.*, 2008) หากมีการประยุกต์ใช้ ฟอสฟอไลนมาผสมในอาหารให้กุ้งกิน เพื่อให้ใกล้เคียงกับการนำไปใช้จริง โดยศึกษาในส่วนของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคในกุ้ง ก็จะเป็นประโยชน์สำหรับเกษตรกรในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. ปัญหาโรคไวรัสในการเลี้ยงกุ้ง

กุ้งขาวหรือกุ้งแวนนาไม ค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* ชื่อสามัญ ที่ FAO รับรองคือ **white leg shrimp** เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่มกุ้งขาวแปซิฟิก (**Pacific white shrimp**) มีความแข็งแรงและทนทาน อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งขาวทั่วโลกก็ยังประสบปัญหาเรื่องโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อไวรัส 5 โรคที่ถูกกำหนดโดยองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE) ได้แก่ โรคตัวแดงดวงขาว โรคหัวเหลือง โรคทอราซินโดรม โรคไอเอชเอชเอ็น และโรคไอเอ็มเอ็น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการค้ากุ้งระหว่างประเทศ จากโรคติดเชื้อในกุ้งทั้งหมดพบว่า โรคตัวแดงดวงขาวเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งมากที่สุด โรคตัวแดงดวงขาวเกิดจากเชื้อ **white spot syndrome virus (WSSV)** เป็น **Baculovirus** ที่จัดอยู่ในครอบครัว (Family) **Nimaviridae** สกุล (Genus) **Whispovirus** ซึ่งเป็นดีเอ็นเอ (DNA) ไวรัสแบบสายคู่ ขนาดประมาณ 290 กิโลเบสแพร์ (kilo base pair, kbp) รูปร่างเป็นแท่งอนุภาคไวรัสมีความยาวประมาณ 300-350 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 110-120 นาโนเมตร นิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ยาวประมาณ 200-240 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 65-70 นาโนเมตร (กรมประมง, 2550; Chou et al., 1995; Durand et al., 1997) Lio-Po และคณะ (2001) รายงานการพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ปู และโคพิพอด (copepod) หลายชนิด เช่น *Penaeus monodon*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. penicillatus*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. merguensis*, *P. semisulcatus*, *P. stylirostris*, *P. curvirostris*, *P. setiferus*, *Metapenaeus ensis*, *L. vannamei*, *Scylla serrata*, *Charybdis feriatus*, *Helice tridens*, *Calappa lophos*, *Portunus pelagicus*, *Acetes* sp., *Macrobrachium rosenbergii*, *Orconectes punctimanus*, *Artemia* sp. และ *Cambarus proclarkii* (Crawfishes) นอกจากนี้ได้มีการทดลองฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียอื่น ได้แก่ *Liocarcinus depurator*, *L. puber*, *Cancer pagurus*, *Astacus leptodactylus*, *Orconectes limosus*, *Palaemon adspersus* และ *Scyllanus arctus* ก็พบว่าสัตว์น้ำดังกล่าวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (Corbel et al., 2001)

มีรายงานการพบไวรัสตัวแดงดวงขาวครั้งแรกในประเทศจีน ระหว่างปี พ.ศ. 2534-2535 ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 มีการพบในประเทศญี่ปุ่นจากกุ้งที่นำเข้ามาจากประเทศจีน และมีรายงานการแพร่กระจายของโรคในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ อินเดีย อินโดนีเซีย เกาหลี ได้หวัน เวียดนาม มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ โคลัมเบีย กัวเตมาลา ฮอนดูรัส เม็กซิโก นิการากัว เปรู และประเทศ

ไทย (กรมประมง, 2550) ในประเทศไทยเริ่มมีการระบาดของโรคตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2537 ทั้งภาคตะวันออก และภาคใต้ ซึ่งความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับฤดูกาล พื้นที่เลี้ยง และสุขภาพของกุ้งเป็นสำคัญ โดยในช่วงอากาศหนาวเย็นหรืออุณหภูมิของน้ำในรอบวันมีการเปลี่ยนแปลงสูงจะมีการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวมากกว่าช่วงอื่น ๆ (ชะลอ, 2544) สำหรับความเสียหายที่เกิดขึ้นทางภาคใต้ถึงแม้ว่าการระบาดจะเกิดขึ้นก่อน แต่ความเสียหายที่เกิดขึ้นมีน้อยกว่าภาคตะวันออก จังหวัดที่มีการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในภาคใต้ได้แก่ นครศรีธรรมราช ตรัง สงขลา สตูล สุราษฎร์ธานี และปัตตานี จนถึงปัจจุบันปัญหาการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวยังมีอยู่ และยังคงสร้างความเสียหายกับการเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด

กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะกินอาหารลดลง ตัวมีสีชมพูจนถึงสีแดง เนื่องจากโครมาโตฟอร์มีการแผ่ขยายออก (**expansion of the cuticular chromatophores**) มีจุดสีขาวบริเวณเปลือก ขนาดประมาณ 0.5-2.0 มิลลิเมตร ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของการสะสมแคลเซียม และฟอสฟอรัส เมื่อดอกเปลือกออกจะเห็นดวงสีขาวอยู่ด้านในของเปลือก (จิราพร และคณะ, 2538; ชะลอ, 2544)

ปัจจุบันมีรายงานว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวมีโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง (**structural proteins**) ไม่น้อยกว่า 38 ตัว ในจำนวนนั้น พบว่ามีอยู่ 21 ตัว ที่อยู่ในเยื่อหุ้มแคปซิด (**envelope**) 10 ตัว อยู่ในนิวคลีโอแคปซิด และ 5 ตัว อยู่ในเยื่อหุ้ม (**tegument**) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มแคปซิดและนิวคลีโอแคปซิด (Escobedo-Bonilla *et al*, 2008) โปรตีน VP28 เป็นส่วนประกอบสำคัญพบอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มแคปซิด (Van Hulst *et al*, 2001) ที่ช่วยในการจับยึดเซลล์ (**cell attachment**) ของกุ้ง และช่วยให้เชื้อไวรัสแทรกตัวเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์กุ้งได้ (Yi *et al*, 2004) จากการศึกษาของ Xie และคณะ (2006) พบว่า VP28 เป็นโปรตีนชนิด **threonine phosphorylated** ซึ่งบ่งชี้ว่ากระบวนการสร้าง VP28 นั้นน่าจะเกิดขึ้นระหว่างที่มีการตัดแปลงของขบวนการสังเคราะห์โปรตีนช่วงสุดท้าย (**post-translational modification**) เพื่อสร้างเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (**virus maturation**) เมื่อไม่นานมานี้ มีการค้นพบ **membrane protein** ของเม็ดเลือดกุ้งขนาด 25 กิโลดาลตันที่สามารถจับกับ **recombinant VP28** หรือกับอนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งโปรตีนที่พบใหม่นี้มีความคล้ายคลึงกับ **GTP-binding protein Rab7** และยังพบอีกด้วยว่า **anti-Rab7** แอนติบอดี สามารถยับยั้งการเข้าเกาะของอนุภาคไวรัสตัวแดงดวงขาวกับเซลล์ของกุ้ง ช่วยให้การตายของกุ้งทดลองลดลงอย่างชัดเจน (Sritunyalucksana *et al*, 2006)

2 ระบบการทำงานของภูมิคุ้มกันในกุ้ง

ระบบภูมิคุ้มกัน (**immune system**) เป็นกลไกของร่างกายในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเพื่อให้ร่างกายสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยทั่วไปการตอบสนองภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตแบ่งเป็น 2 แบบ คือ การตอบสนองแบบไม่จำเพาะ (**non-specific immune response**) ซึ่งมีมาโดยกำเนิดและเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และการตอบสนองแบบจำเพาะ (**specific immune response**) ซึ่งเป็นส่วนที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นหรือได้รับการถ่ายทอดจากผู้อื่น (กฤษณา, 2548; Verhac and Kiron, 2004) กุ้งเป็นสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชีย (**crustacean**) ที่อาศัยการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในการป้องกันตัวจากเชื้อโรค (Zhang *et al.*, 2004) โดยเกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์เม็ดเลือด สารต่างๆ ในน้ำเลือด และเนื้อเยื่อ โดยเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างเซลล์เม็ดเลือดเรียกว่าอิมมูโนคอมพิเทนท์ทีสซู่ (**immunocompetent tissues**) เม็ดเลือดที่สร้างขึ้นจะถูกส่งไปยังระบบหมุนเวียนเลือดที่เป็นระบบเปิดแล้วไหลไปรวมกันที่แอ่งเลือดในส่วนของลำตัวบริเวณใต้ท้องซึ่งจุดนี้จะเป็นจุดรวมเลือดก่อนที่จะถูกหัวใจดึงไปฟอกที่เหงือกแล้วรับไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายอีกครั้งหนึ่ง กิจการและคณะ (2539) และ Martin และ Graves (1985) ได้แบ่งประเภทเม็ดเลือดกุ้งเป็น 3 แบบ คือ ไฮาลินฮีโมไซท์ (**hyaline haemocyte** หรือ **agranular cell**) เป็นเม็ดเลือดขนาดเล็กที่สุด พบประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด มีทั้งรูปร่างกลมและรี นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ ไม่มีแกรนูลอยู่ในไซโตพลาสซึม เซลล์ชนิดนี้สามารถเกาะและยึดตัวติดกระเจกลไลด์ได้ มีหน้าที่หลักในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคโดยการกลืนกินแบบฟาโกไซโตซิส (**phagocytosis**) เซมิแกรนูลาร์ฮีโมไซท์ (**semigranular haemocyte** หรือ **small granular cells**) มีขนาดใหญ่กว่าไฮาลินฮีโมไซท์ ประกอบด้วยแกรนูลขนาดเล็ก เซลล์ค่อนข้างเปราะง่าย ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยการปล่อยสารที่อยู่ในแกรนูลให้เข้าไปจับบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม ส่วนใหญ่จะมีหน้าที่เป็นตัวนำในการเกิดปฏิกิริยาเอนแคปซูลเลชัน (**encapsulation**) และระบบกระตุ้นโปรฟีนอลออกซิเดส (**prophenoloxidase activating system, proPO**) และเม็ดเลือดชนิดสุดท้ายคือลาร์จแกรนูลาร์ฮีโมไซท์ (**large granular haemocyte**) พบประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด เป็นเม็ดเลือดขนาดใหญ่ รูปร่างรี มีแกรนูลขนาดใหญ่จำนวนมากกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในไซโตพลาสซึม เกี่ยวข้องกับระบบโปรฟีนอลออกซิเดส และระบบการจดจำ (**recognisable system**) ทำให้กุ้งรู้ว่าเซลล์ใดเป็นเซลล์กุ้งหรือเซลล์ใดเป็นเซลล์ของสิ่งแปลกปลอม

กลไกการตอบสนองภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อสิ่งแปลกปลอมมีหลายกระบวนการขึ้นอยู่ กับคุณสมบัติของสิ่งแปลกปลอม กระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมหรือฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) เป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อย เช่น แบคทีเรียและ ไวรัส เป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด (haemocytes) และเซลล์จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocytes) โดยทำงานร่วมกับโปรตีนเปอร์ออกซิเนคติน (peroxinectin) ในน้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือดจะยื่น ไฮโดรพลาสม์ไปล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเกิดเป็นถุงรอบสิ่งแปลกปลอม จากนั้นไลโซโซม (lysosome) จะหลั่งเอ็นไซม์ต่าง ๆ ออกมาช่วยย่อยทำลายสิ่งแปลกปลอม การทำงานของเซลล์ใน การกำจัดสิ่งแปลกปลอมคือเมื่อเชื่อมหุ้มฟาโกไซติกเซลล์ (phagocytic cell) สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม จะเกิดการกระตุ้นให้เอ็นไซม์เอ็นเอดีพีเอออกซิเดส (NADPH oxidase enzyme) ซึ่งอยู่ที่เชื่อมหุ้ม เซลล์ทำงาน พร้อมทั้งมีการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ และออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์ (reduce) ไปเป็น ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, O_2^-) และเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) ทั้งซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเป็น ตัวทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกกลืนกินเข้าไป หลังจากนั้นจะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกนอก เซลล์ (Söderhall and Cerenius, 1992; Holmblad and Söderhall, 1999) ถึงแม้ว่ากระบวนการฟาโก ไซโตซิสโดยส่วนใหญ่จะเกิดจากการทำงานของเม็ดเลือดไฮยาไลน์ แต่ในกุ้งบางชนิด เช่น *Marsupenaeus japonicus* พบว่ากระบวนการฟาโกไซโตซิสเกิดจากการทำงานของแกรนูลาร์ ซีโม ไชท์ (Bachere et al., 1995; Itami et al., 1998) ขณะที่ในกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) กระบวนการฟาโกไซโตซิสเกิดจากการทำงานของเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด (Sung et al., 2000) การ ทำงานของฟาโกไซโตซิสในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียมีค่าตั้งแต่ 1-28 เปอร์เซ็นต์ (Smith and Söderhall, 1983; Söderhall and Cerenius, 1992) และจากการศึกษาของกิจการ และคณะ (2543ก) ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่าค่าฟาโกไซโตซิสอยู่ในช่วง 20-24 เปอร์เซ็นต์

การทำงานของระบบเอ็นไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase: ProPo system) เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับกุ้งในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เป็นกลไก การทำงานของเซลล์และสารน้ำ เอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอ็นไซม์ที่เกิดจากการที่ระบบโปร ฟีนอลออกซิเดสถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม จนเกิดการสลายแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือด ทำให้ เกิดการหลั่งเอ็นไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสออกมา ต่อจากนั้นเอ็นไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสจะ เปลี่ยนเป็นเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งทำงานโดยไปออกซิไดซ์ (oxidize) สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นควิโนน (quinone) และเป็นเมลานิน (melanin) ซึ่งสารต่างๆที่สร้างขึ้นระหว่างการ ทำงานของเอ็นไซม์มีคุณสมบัติในการทำลายสิ่งแปลกปลอม (อัญชลี, 2551; Smith and Chisholm, 1992)

กระบวนการเอนแคปซูลเลชัน (**encapsulation**) เป็นกระบวนการของระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ เช่น รา ปริสิต โดยการสร้างแคปซูล สิ่งแปลกปลอมจะถูกล้อมด้วยชั้นของเม็ดเลือดหลาย ๆ ชั้น สำหรับกระบวนการโนดูลเฟอร์เมชัน (**nodule formation**) เกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมากจนฟาโกไซโตซิสกำจัดไม่หมด สิ่งแปลกปลอมจะติดอยู่ในชั้นต่าง ๆ ของเม็ดเลือด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการทำงานของเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซต์ โนดูลจะกลายเป็นสีดำเนื่องจากการสร้างเมลานิน (**melanin**) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย สำหรับกิ้งกูดาคกระบวนการโนดูลเฟอร์เมชันจะเกิดมากที่เหงือก เนื้อเยื่อตับ ต่อม น้ำเหลือง และหัวใจ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเซลล์เม็ดเลือดน้อย ส่วนเอนแคปซูลเลชันพบมากในแองเลือด (กิจการ และคณะ, 2543b)

กระบวนการแข็งตัวของเลือด (**blood clotting**) มีความสำคัญในการป้องกันการสูญเสียเลือดและสมานแผล ป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เกิดขึ้นโดยการเชื่อมกันเป็นร่างแหของคลอททิงโปรตีน (**clotting protein**) ที่พบในพลาสมา หรือถูกปล่อยออกมาจากเม็ดเลือดเมื่อเกิดบาดแผล โดยสิ่งแปลกปลอมจะปล่อยสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต (**carbohydrate**) ซึ่งจะจับกับสารคลอททิงโปรตีน ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เกิดคลอททิงแฟกเตอร์ (**clotting factors**) จนทำให้เลือดแข็งตัว และเกิดร่วมกับกระบวนการโปรฟิโนลออกซิเดส (*Destounieux et al., 2000a; 2000b*)

การทำงานของเลคติน (**lectins**) เป็นสารกลุ่มไกลโคโปรตีน (**glycoprotein**) ที่ไม่ทนร้อน สามารถเชื่อมหรือจับกับโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมและทำให้เซลล์ของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรครวมกลุ่มหรือจับกันเป็นก้อนจนไม่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนี้เลคตินจะไปจับกับเชื้อก่อโรคทำให้เชื้อก่อโรคตกตะกอนในลักษณะของออปโซนิน (**opsonin properties**) แล้วทำให้เกิดโครงสร้างของเซลล์ที่ง่ายต่อการฟาโกไซโตซิส (*Wilson et al., 1999*)

3 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของกิ้งต่อเชื้อไวรัส

จากการศึกษาของ Wang และ Zhang (2008) พบว่ากลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อเชื้อตัวแดงดวงขาวได้ก็คือกระบวนการอพอพโทซิส (**apoptosis**) และฟาโกไซโตซิส (**phagocytosis**) ในขณะที่ระบบของโปรฟิโอ (**ProPO**) มีบทบาทน้อยในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตาม Ji และคณะ (2011) พบว่ากิ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการทำงานของเอ็นไซม์ฟิโนลออกซิเดสลดลงแสดงให้เห็นว่ากลไกการตอบสนองภูมิคุ้มกันผ่านระบบฟิโนลออกซิเดสมีความเกี่ยวข้องและสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อตัวแดงดวงขาว

เช่นเดียวกัน การติดเชื้อตัวแดงดวงขาวในกุ้งส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนโดยพบว่าเม็ดเลือดชนิดเคมีแกรนูลาร์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงมากกว่าเม็ดเลือดชนิดอื่น ในกุ้ง *P. merguensis* ที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาวพบว่ามีการลดลงของเม็ดเลือดชนิดเคมีแกรนูลาร์อย่างเห็นได้ชัด (Wang *et al.*, 2002)

4 ฟอติลิน (Fortilin)

ฟอติลิน (Fortilin) เป็นโปรตีนที่พบครั้งแรกในเซลล์ของหนู (Yenofski *et al.*, 1983) และต่อมาพบว่าโปรตีนชนิดนี้พบได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั่วไปไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ โปรโตซัว และยีสต์ (Chitpatima *et al.*, 1988; Gross *et al.*, 1989; Bhisuttibhan *et al.*, 1998; Sturzenbaum *et al.*, 1998) จากการศึกษาฟอติลินในสิ่งมีชีวิตอื่นมากกว่า 500 ชนิด พบการแสดงออกของโปรตีนนี้ในเซลล์เกือบทุกชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ตับ แมคโครฟาจ เคราติน เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดง *gliomas melanomas hepatoblastomas* และ *lymphomas* ระดับการแสดงออกขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ชนิดของเนื้อเยื่อ และระยะการพัฒนามองเซลล์ โดยมีการแสดงออกที่ต่ำในสมอง การแสดงออกของโปรตีนเป็นการตอบสนองทั้งจาก *extra-cellular signal* และ *intra-cellular condition* (Bommer and Thiele, 2004)

สำหรับยีนที่ควบคุมการแสดงออกของฟอติลินจากการศึกษาครั้งแรกในเซลล์ของหนู เรียกว่ายีน P21 (Chitpatima *et al.*, 1988) และ P23 (Bohm *et al.*, 1989) ต่อมามีการศึกษาในเซลล์ของคน (Gross *et al.*, 1989) โปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่ที่หลากหลาย และยังไม่ชัดเจน แต่เนื่องจากการอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตจำนวนมากจึงน่าจะมีหน้าที่ที่สำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งรวมถึงหน้าที่ในการต่อต้านการตายของเซลล์ (*anti-apoptosis*) (Li *et al.*, 2001; Graidist *et al.*, 2004) ในกุ้งกุลาดำพบการแสดงออกของยีนฟอติลินให้ชื่อว่า *Pm-fortilin* เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 168 ตัวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19.2 กิโลดาลตัน มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ *Human-fortilin*, *Anopheles gambiae* และ *Drosophila melanogaster* เท่ากับ 63.73 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Bangrak *et al.*, 2004)

Gachet และคณะ (1999) พบว่าฟอติลินจากหนูสามารถจับกับโปรตีนทูบูลิน (*tubulin*) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไมโครทูบูล (microtubule) ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเซลล์ และมีรายงานว่าฟอติลินของหนู (Kim *et al.*, 2000) ปรสิติ *Schistosoma mansoni* (Rao *et al.*, 2002) และมนุษย์ (Arcuri *et al.*, 2004) สามารถจับกับโมเลกุลแคลเซียมได้ นอกจากนี้ Kim และคณะ (2000) และ Graidist และคณะ (2007) ได้ศึกษาดำเนินงานโปรตีนฟอติลินที่จับกับแคลเซียม และพบว่า

ฟอสโฟลิพิดจำเป็นต้องมีการจับกับแคลเซียมเพื่อป้องกันเซลล์จากกระบวนการตายของเซลล์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียม (Ca^{2+} -dependent apoptosis) (Graidist *et al.*, 2007) Xu และคณะ (1999) ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนฟอสโฟลิพิด ผ่านการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์พบว่าสามารถควบคุมการแสดงออกได้ทั้งในระดับการถอดรหัส (transcription) และหลังระดับการถอดรหัส (post-transcription) โดยปริมาณ mRNA ของยีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการลดลงของปริมาณแคลเซียมในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum ER) และการแสดงออกของยีนในช่วงหลังการแปรรหัสจะถูกควบคุมโดยความเข้มข้นของแคลเซียมในของเหลวภายในเซลล์ (cytosol)

Li และคณะ (2001) พบว่าฟอสโฟลิพิดเป็นโปรตีนที่ต่อต้านการตายของเซลล์ โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการอยู่รอดของเซลล์ และการควบคุมการตายของเซลล์ โดยเซลล์ที่รอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ด้วยสาร etoposide จะมีการแสดงออกของฟอสโฟลิพิดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Graidist และคณะ (2006) ที่พบว่าฟอสโฟลิพิดของกิ้งก่าที่แสดงออกในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian) สามารถป้องกันการตายของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสาร etoposide staurosporine cisplatin hydroxyurea และ 5-fluorouracil (5-FU) ได้ และสันนิษฐานว่าฟอสโฟลิพิดของกิ้งก่าสามารถต่อต้านการตายของเซลล์ได้เช่นเดียวกับฟอสโฟลิพิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้มีการศึกษาในกิ้งก่าดำถึงการแสดงออกของ Pm-fortilin กับโรคตัวแดงดวงขาว พบว่าการแสดงออกของฟอสโฟลิพิดจากเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งก่าดำปกติ และกิ้งก่าดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวระยะแรก (24 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ) มีความแตกต่างจากกิ้งก่าดำที่ใกล้ตาย (moribund) โดยกิ้งก่าที่ใกล้ตายจะมีการแสดงออกของฟอสโฟลิพิดที่น้อยมาก จึงคาดว่าฟอสโฟลิพิดในกิ้งก่ามีความสำคัญในการป้องกันการตายของกิ้งก่าจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Bangrak *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Graidist และคณะ (2006) ที่พบการแสดงออกของยีน Pm-fortilin ในเลือดกิ้งก่าที่เริ่มการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มมากขึ้นกว่าในกิ้งก่าปกติประมาณ 5 เท่า และกิ้งก่าที่ใกล้ตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวก็มีการแสดงออกของยีน Pm-fortilin ในระดับที่ต่ำมาก

Tonganunt และคณะ (2008) ทำการศึกษาวิจัยเพื่อนำ recombinant Pm-fortilin มาประยุกต์ใช้กับโรคตัวแดงดวงขาวในกิ้งก่าทะเล โดยผลิตโปรตีน rPm-fortilin ซึ่งเป็นโปรตีนลูกผสมจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* M15 นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (10 µg/ PBS 100 µl) หรือผสมอาหารให้กิ้งก่าดำ (300 mg/ kg of body weight/ day) เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ผลปรากฏว่าการฉีด rPm-fortilin ทำให้กิ้งก่ารอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 80-100 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสในกิ้งก่าที่รอดตายที่ระดับต่ำ ถึงแม้ว่ายังไม่ทราบถึงกลไกการทำงานของฟอสโฟลิพิดในการลดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่เป็นไปได้ว่าฟอสโฟลิพิดมี

ส่วนในการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (**replication**) ของอนุภาคไวรัสภายในเซลล์ (Tonganunt *et al*, 2008; Nupan *et al*, 2011) จะเห็นว่า **rPm-fortilin** เป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ป้องกันโรคไวรัสในกิ้งได้

การเพิ่มปริมาณโปรตีนลูกผสม (**recombinant protein**) สามารถทำได้โดยการนำโปรตีนนั้น ๆ ไปเลี้ยงในเซลล์สิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต (**eukaryote**) เช่น แบคทีเรีย และยีสต์ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว โดยการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ราคาไม่แพง และวิธีการเลี้ยงที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน (Cereghino and Cregg 1999) *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ชนิดแรกที่นำมาใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม (Peter, 1996) ซึ่งต่อมามีการศึกษาเพิ่มเติมในยีสต์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนได้ปริมาณมาก แต่เมื่อพิจารณาถึงความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้ในสิ่งมีชีวิตพบว่า *S. cerevisiae* มีความปลอดภัยมากกว่า เนื่องจากเป็นยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อยู่แล้ว (Peter, 1996) นอกจากนี้ *S. cerevisiae* ยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดีทั้งในสัตว์บกและสัตว์น้ำรวมทั้งกิ้งกูดดำ และกิ้งขาวแวนนาไม (Suphanthana *et al*, 2003; Josepj *et al*, 2004) โดยการเสริมยีสต์ในอาหารสำหรับเลี้ยงกิ้งขาวแวนนาไมที่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 สัปดาห์ ส่งผลให้กิ้งด้านทานเชื้อแบคทีเรียไวรัสที่ก่อโรคเพิ่มขึ้น (Suphanthana *et al*, 2003) การใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ในการเพิ่มปริมาณโปรตีนลูกผสมที่ต้องการศึกษาแล้วนำไปผสมอาหารเลี้ยงสัตว์ทดลองจึงน่าสนใจในมุมมองของการเพิ่มภูมิคุ้มกันที่เกิดจากคุณสมบัติของยีสต์ได้ด้วยอีกทางหนึ่ง โครงการวิจัยนี้จึงให้ความสนใจที่จะพัฒนา **rPm-fortilin** ไปใช้ประโยชน์ให้กว้างขวางขึ้น โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นตัวเพิ่มปริมาณฟอติลินแล้วนำยีสต์แห้งที่มี **rPm-fortilin** (ทำแห้งโดยการ **freeze dry**) มาใช้ผสมในอาหารกิ้ง เพื่อศึกษาผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกิ้ง หากประสิทธิภาพดีก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาระดับของฟอติลินที่เหมาะสมในอาหารในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งขาวระยะวัยรุ่น (**juvenile**)
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการให้ฟอติลินในอาหารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งขาวระยะวัยรุ่น (**juvenile**)
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกิ้งขาวระยะวัยรุ่น (**juvenile**) ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมฟอติลิน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

1. วัสดุ

1.1 สัตว์ทดลอง

กึ่งขาวแวนนาไม น้ำหนัก 10.60 ± 2.05 กรัม จำนวน 1,500 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกึ่งเอกชนในเขต อ.เมือง จ.สงขลา

1.2 วัตถุดิบอาหาร

1.21 ปลาป่น กากถั่วเหลือง เปลือกกุ้ง แป้งสาลี รำข้าว วิตามินและแร่ธาตุรวม ตับปลาหมึก เลซิทิน น้ำมันปลา และ โคเลสเตอรอล ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทห้องเย็นเอเชียนซีฟู้ดส์ (สุราษฎร์ธานี) จำกัด

1.22 ยีสต์ และ โปรตีนฟอติลินยีสต์ (rPm-fortilin) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถานวิจัยจีโนม และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิธีการผลิตในภาคผนวก ก)

1.3 สารเคมี

1.31 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ภูมิกุ่มกัน (ภาคผนวก ค-1 ถึง ค-6)

1.32 สารเคมีสำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน (ภาคผนวก ง-1)

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เลี้ยงกึ่งทดลอง

2.1.1 บ่อคอนกรีต ความจุน้ำ 600 ลิตร จำนวน 15 บ่อ

2.1.2 อุปกรณ์ให้อากาศ ได้แก่ เครื่องให้อากาศ, ท่อลม, สายยาง และหัวทราย

2.1.3 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยางดูดตะกอน และปั้มน้ำชนิดจุ่ม

2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

- 2.21 เครื่องผสมอาหารทดลอง ประกอบด้วยชุดผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร (Hobart Model A 200)
- 2.22 อุปกรณ์ซึ่งดวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องซึ่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Satorius รุ่น Basic) เครื่องซึ่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius รุ่น Research) กระจบอทดวง และบีกเกอร์
- 2.23 มีดตัดอาหาร ถาดเตรียมอาหาร และตู้อบอาหาร
- 2.24 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SR songsem รุ่น HF 201) ใช้สำหรับเก็บอาหารทดลอง

2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารและอาหารทดลอง

- 2.31 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดซึ่ง, ตู้อบ (hot air oven, Memmert), โถดูดความชื้น (desiccators) และเครื่องซึ่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius รุ่น Research)
- 2.32 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus; Gerhard รุ่น Kjeldathem), เครื่องกลั่น (distillation apparatus: Gerhardt รุ่น Vapodest I) หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระจบอทดวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่
- 2.33 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน (รุ่น Soxtec System HT6) ใส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง โถดูดความชื้น และเครื่องซึ่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius รุ่น Research)
- 2.34 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace: Gallenkamp) โถดูดความชื้น (desiccator) และเครื่องซึ่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius รุ่น Research)

2.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน (ภาคผนวก ก-2)

2.5 อุปกรณ์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน (ภาคผนวก ง-1)

3 วิธีดำเนินการ

3.1 การวางแผนการทดลอง (Experimental design)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) เพื่อศึกษาระดับและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเสริมฟอสฟอรัสในอาหารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวระยะวัยรุ่น (juvenile) โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลองดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุมไม่มีการเสริมยีสต์และฟอสฟอรัส (control) ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารผสมยีสต์ (yeast) ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงด้วยอาหารผสมยีสต์ที่มีพลาสมิดเปล่า 1 เปอร์เซ็นต์ (yeast+plasmid) ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรตีนฟอสฟอรัสยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ คืออาหารที่ผสมยีสต์ที่มีพลาสมิดฟอสฟอรัส 0.5 เปอร์เซ็นต์ (0.5% yeast+fortilin) และชุดการทดลองที่ 5 เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรตีนฟอสฟอรัสยีสต์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ คืออาหารที่ผสมยีสต์ที่มีพลาสมิดฟอสฟอรัส 1.0 เปอร์เซ็นต์ (1.0% yeast+fortilin)

3.2 การเตรียมอาหารทดลอง (Experimental diet)

นำวัตถุดิบอาหารไปวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีในวัตถุดิบอาหาร ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ข) ก่อนการเตรียมอาหารเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณสูตรอาหาร สร้างสูตรอาหารทดลอง 5 สูตร โดยดัดแปลงมาจากสูตรของ Montoya และ Molina (1995) ให้มีระดับโปรตีนประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และควบคุมสารอาหารอื่นๆ ให้เท่ากัน ยกเว้นปริมาณฟอสฟอรัสและยีสต์และใช้แป้งสาลีในการปรับสูตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 อาหารทดลองเป็นอาหารเม็ดจมน้ำ เตรียมโดยชั่งวัตถุดิบอาหารตามตารางที่ 1 มาผสมให้เข้ากันในถังผสมอาหาร เติมน้ำมัน จากนั้นเติมน้ำประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร ผสมให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันดี นำอาหารผสมมาอัดเม็ดผ่านหน้าแวนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำไปอบแห้งด้วยตู้อบอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนอาหารแห้ง (Gaxiola et al, 2005) นำอาหารที่อบแห้งแล้วไปร่อนผ่านตะแกรงอีกครั้งเพื่อเอาส่วนที่เป็นผงออก สุ่มอาหารทุกสูตรสูตรละประมาณ 100 กรัม ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ข) อาหารส่วนที่เหลือนำมาใส่ในภาชนะปิด และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

3.3 การเตรียมกึ่งทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมจากฟาร์มเลี้ยงของเกษตรกรในเขตอำเภอเมืองจังหวัดสงขลา ซึ่งปลอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) มาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดลองโดยเลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 15 ± 2 พีพีที ให้อาหารสำเร็จรูปสูตรที่ 1 วันละ 3 มื้อ เวลา 8:00 15:00 และ 21:00 นาฬิกา หลังจากนั้นคัดเลือกกุ้งที่มีน้ำหนักเริ่มต้น 10.60 ± 2.05 กรัม ความยาวเริ่มต้น 120 ± 0.8 เซนติเมตร ลงเลี้ยงในบ่อคอนกรีตซึ่ง บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที ปริมาตร 600 ลิตร จำนวน 15 บ่อ บ่อละ 100 ตัว สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การเตรียมสารละลายเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ตัดเนื้อเยื่อเหงือกและขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 1 กรัม ผสมกับน้ำเกลือฆ่าเชื้อ (sterile sodium chloride) 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (1:10) บดให้ละเอียด (แช่หลอดตัวอย่างในน้ำแข็ง) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที คัดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายผ่านหัวกรอง (syringe filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แยกส่วนใสใส่หลอดใหม่ นำสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้ไปทดสอบความรุนแรงของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการหาอัตราความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 วัน (คัดแปลงจาก Tonganunt *et al*, 2008)

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารสำหรับอาหารทดลอง 5 สูตร

วัตถุดิบอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	สูตรอาหาร ¹				
	1	2	3	4	5
ปลาป่น (fish meal)	25	25	25	25	25
กากถั่วเหลือง (soybean meal)	20	20	20	20	20
เปลือกกุ้ง (shrimp meal)	5	5	5	5	5
วิทกกลูเตน (wheat gluten)	4	4	4	4	4
แป้งสาลี (wheat flour)	21.48	20.48	20.48	20.98	20.48
รำข้าว (rice bran)	10	10	10	10	10
ตับปลาหมึก (squid liver paste)	5	5	5	5	5
เลซิทิน (lecithin)	2	2	2	2	2
น้ำมันปลา (fish oil)	2	2	2	2	2
โคเลสเตอรอล (cholesterol)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
วิตามิน-แร่ธาตุรวม (vitamin-mineral premix)	3	3	3	3	3
บีเอชที (BTH)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxy methyl cellulose: CMC)	2	2	2	2	2
ยีสต์ (yeast)	0	1	0	0	0
ยีสต์ที่มีพลาสมิดเปล่า (yeast + plasmid)	0	0	1	0	0
ยีสต์ที่มีพลาสมิดฟอติลิน (yeast + fortilin)	0	0	0	0.5	1

¹สูตรอาหาร: 1 (control) 2 (yeast) 3 (yeast+plasmid) 4 (0.5% yeast+fortilin) 5 (1.0% yeast+fortilin)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง 5 สูตร

องค์ประกอบทางเคมี	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
	control	yeast	yeast+plasmid	0.5% yeast+fortilin	1.0% yeast+fortilin
โปรตีน	40.0	39.8	40.0	39.8	40.4
ไขมัน	10.3	10.7	9.9	10.7	10.4
เถ้า	20.0	20.0	20.0	20.4	20.4

3.5 การเลี้ยงกึ่งทดลอง

สุ่มเลี้ยงกึ่งทดลองที่เตรียมไว้จำนวน 15 บ่อข้างต้น ด้วยอาหารทดลอง 5 สูตรๆ ละ 3 บ่อ โดยให้อาหารประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักตัว วันละ 3 มื้อ (เวลา 8:00, 15:00 และ 21:00 นาฬิกา) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นเลี้ยงกึ่งทุกชุดการทดลองด้วยอาหารสูตรควบคุมต่ออีก 1 สัปดาห์ ในระหว่างการเลี้ยงเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุก 3 วัน และควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมสำหรับกุ้งขาว โดยมีอุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 28±2 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 7.8-8.0 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 6-8 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นด่างของน้ำ 89-114 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนีย (NH₄) ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนไตรท์ (NO₂) ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.6 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกุ้งสัปดาห์ที่ 0 (เริ่มต้น) 1 2 และ 3 หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเพื่อตรวจวัดค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ค่าการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวจำนวน 10 ตัวต่อบ่อ (30 ตัวต่อชุดการทดลอง) มาตรวจวัดค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocyte count; THC) เปอร์เซ็นต์ชนิดเม็ดเลือด (differential haemocyte count; DHC) ตามวิธีการของ Siitunyalucksara และคณะ (2005) ในภาคผนวก ก-3 ค่าความว่องไวและค่าดัชนีในการจับกินสิ่งแปลกปลอม การสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเซลล์เม็ดเลือด (superoxide anion production; O₂) ตามวิธีการของ Muñoz และคณะ (2000) ในภาคผนวก ก-4 และ ก-5 และการทำงานของ

เอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Leonard และคณะ (1985) และ Hernandez-Lopez และคณะ (1996) ในภาคผนวก ก-6

2 ทดสอบความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยนำกุ้งขาวบ่อละ 10 ตัว (30 ตัวต่อชุดการทดลอง) มาฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้ากล้ามเนื้อท้องปล้องสุดท้ายในอัตราความเข้มข้น 1×10^6 (LD50) ของความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร (ประมาณ 10 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม) จากนั้นแยกกุ้งที่ฉีดเชื้อแล้วไปเลี้ยงในตู้กระจก ให้อากาศตลอดเวลา สังเกตอาการและบันทึกการตายสะสมของกุ้งภายในเวลา 5 วัน เปรียบเทียบอัตราการรอดของกุ้งแต่ละชุดการทดลองจากค่า **Relative Percent Survival (RPS)** โดยคำนวณจากความสัมพันธ์ดังนี้

$$RPS = \left[1 - \frac{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดทดลอง}}{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดควบคุม}} \right] \times 100\%$$

3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ด้วยเทคนิค **Semi-quantitative PCR** โดยสุ่มกุ้งหลังฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และกุ้งที่รอดตาย มาตัดเนื้อเยื่อเหงือกและขว่ายน้ำนำไปสกัดอาร์เอ็นเอรวม (**total RNA**) ด้วยน้ำยาสกัดสำเร็จรูป **Trizol® reagent (Invitrogen)** ตามวิธีการในภาคผนวก ง-2 เปลี่ยนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็น **cDNA** ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป **iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad)** ตามวิธีการในภาคผนวก ง-2 หลังจากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (**primer**) ของยีน **VP28** และใช้ยีนเบต้าแอกติน (**β -actin**) เป็นยีนควบคุม (**internal control**) (ตารางที่ 3) โดยใช้ส่วนผสมของสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาและโปรแกรมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังแสดงในตารางที่ 4 และตารางที่ 5 นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณไปตรวจสอบบนอะกาโรสเจล (**agarose gel**) โดยอาศัยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (**gel electrophoresis**) ตามวิธีการในภาคผนวก ง-2 ถ่ายรูปเจลซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนที่ศึกษา นำไปตรวจสอบความเข้มของแถบดีเอ็นเอและนำความเข้มของแถบมาคำนวณค่าการแสดงออกของยีน **VP28** เทียบกับยีนเบต้าแอกติน (**VP28/ β -actin ratio**) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป **free quantity one v450 PC**

ตารางที่ 3 ดีเอ็นเอต้นแบบ (primer) และขนาดของผลิตภัณฑ์ (product) ของยีน VP28 และ β -actin

Gene	Primer	Product
VP28	Forward: 5-GGATCTTTCTTTCACCTCTTTC-3 Reward: 5-TCTGCCCCACAGTCACTTCGA-3	332 bp
β -actin	Forward: 5-GACGAYATGGAGAAGATCTGG-3 Reward: 5-AAGGCGTGGGGCAGGGCRTA-3	288 bp

ตารางที่ 4 ส่วนผสมของสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการศึกษาการแสดงออกของยีน VP28 และ β -actin

No.	Reagents (μ l)	1X (μ l)
1	distilled water	17.9
2	10x HIFI buffer	2.5
3	10 mM dNTP mixture	0.5
4	50 mM MgSO ₄	1
5	Platinum [®] Taq HIFI	0.1
6	forward primer	1
7	reward primer	1
8	cDNA template	1
	Total	25

ตารางที่ 5 โปรแกรมพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการศึกษาการแสดงออกของยีน VP28 และ β -actin

Program	Cycles	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time
Denaturation	1	95	5 min
Denaturation		95	30 sec
Annealing	28	55	30 sec
Elongation		72	1 min
Elongation	1	72	10 min
Resting	1	4	α

4 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของกึ่งขาวแต่ละชุดการทดลองภายหลังได้รับการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 2448 และ 72 ชั่วโมง ชุดการทดลองละ 5 ตัว โดยดองตัวอย่างกึ่งทั้งตัวในน้ำยารักษาสภาพตัวอย่างเควิดสัน (Davidson's fixative) และผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อเตรียมสไลด์ถาวรโดยย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (H&E) (Humason, 1979) ตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อเปรียบเทียบและศึกษาลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ชั่วโมงต่าง ๆ

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างพารามิเตอร์โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

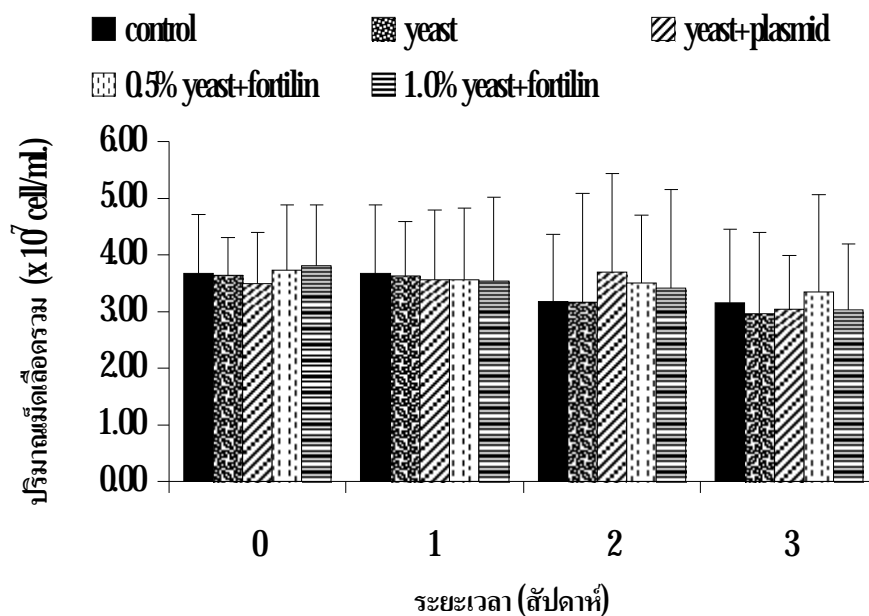
บทที่ 3

ผลการศึกษา

1. การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

1.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count: THC)

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ให้อาหารทดลองต่างกัน 5 สูตร ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง $2.96-3.81 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมในกุ้งที่ให้อาหารสูตรต่างกันทั้ง 5 สูตร ในแต่ละสัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งเมื่อเริ่มทดลอง (สัปดาห์ที่ 0) ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมของทั้ง 5 กลุ่มอยู่ในช่วง $3.50-3.81 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 1 มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง $3.53-3.67 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 2 มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง $3.17-3.70 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสัปดาห์ที่ 3 มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง $2.96-3.35 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

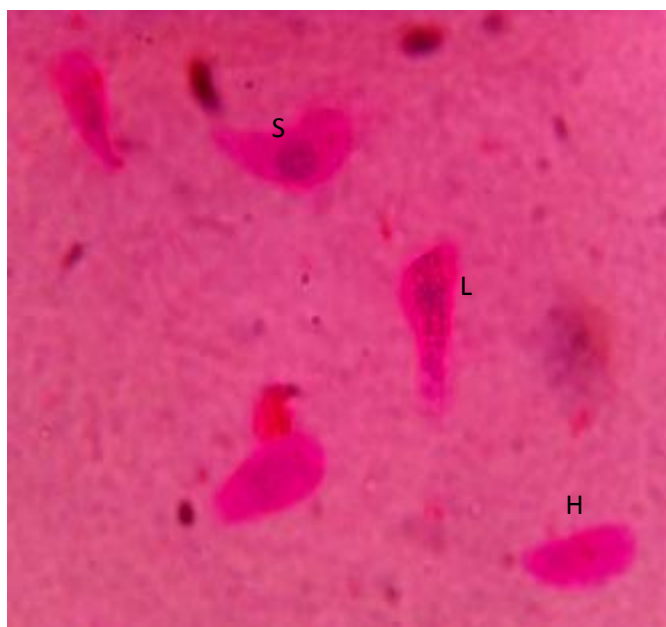


ภาพที่ 1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวที่ให้อาหารทดลองต่างกัน 5 สูตร เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

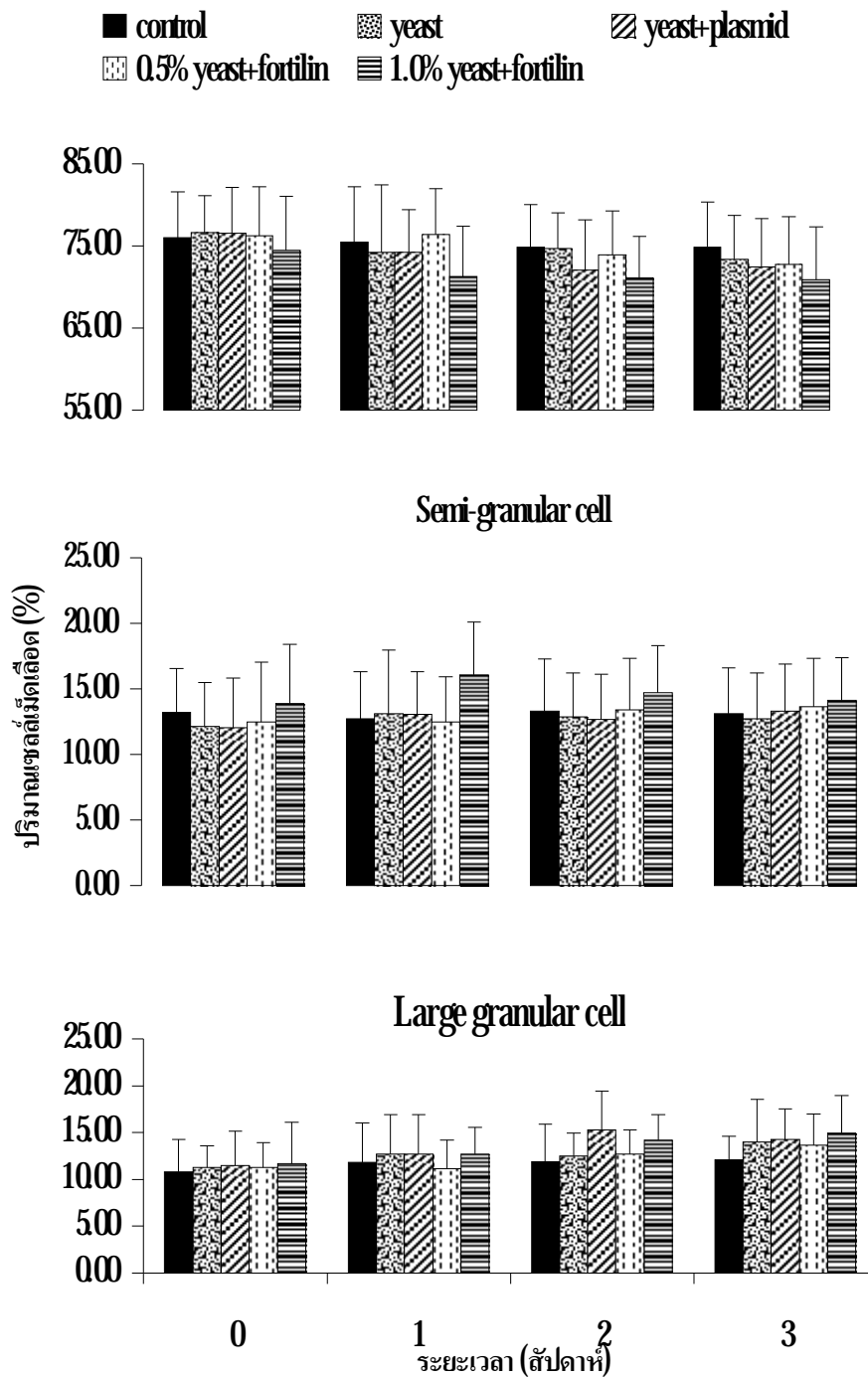
เช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่ได้รับอาหารสูตรเดียวกันในระยะเวลาที่แตกต่างกันใน 3 สัปดาห์นั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งให้อาหารสูตรควบคุมมีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ในช่วง $315-368 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร กุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งให้อาหารที่ผสมยีสต์เปล่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ในช่วง $296-364 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร กุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งให้อาหารที่ผสมยีสต์ที่มีพลาสติกเปล่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ในช่วง $304-370 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร กุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งให้อาหารที่ผสมยีสต์และฟอติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ในช่วง $335-373 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกุ้งในชุดการทดลองที่ 5 ซึ่งให้อาหารที่ผสมยีสต์และฟอติน 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ในช่วง $303-381 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

1.2 การแยกชนิดเม็ดเลือด (differential haemocyte count: DHC)

การแยกชนิดของเม็ดเลือดกุ้ง 3 ชนิด ได้แก่ **hyaline cell: H, semi-granular cell: S, large granular cell: L** (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิดต่าง ๆ หลังการย้อมด้วยสีเบงกอลโรส และ สีมาที่อกไซลิน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x; **hyaline cell: H, semi-granular cell: S, large granular cell: L**



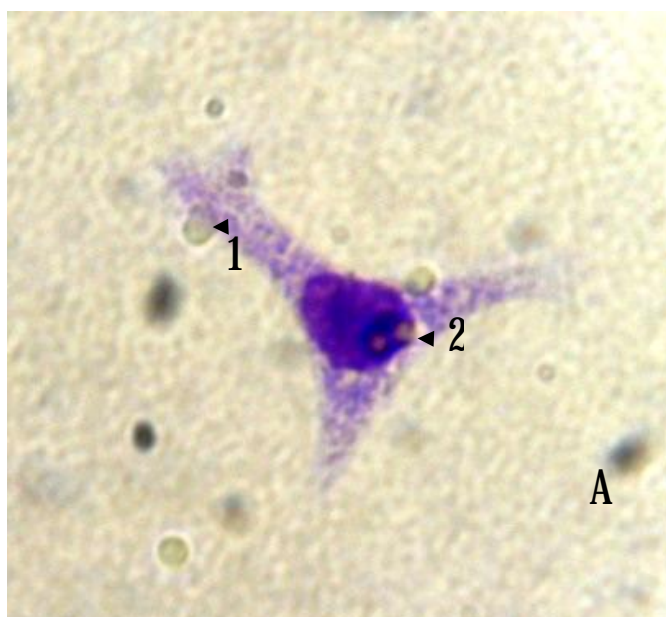
ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือด hyaline cell, semi-granular cell, large granular cell ของกิ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

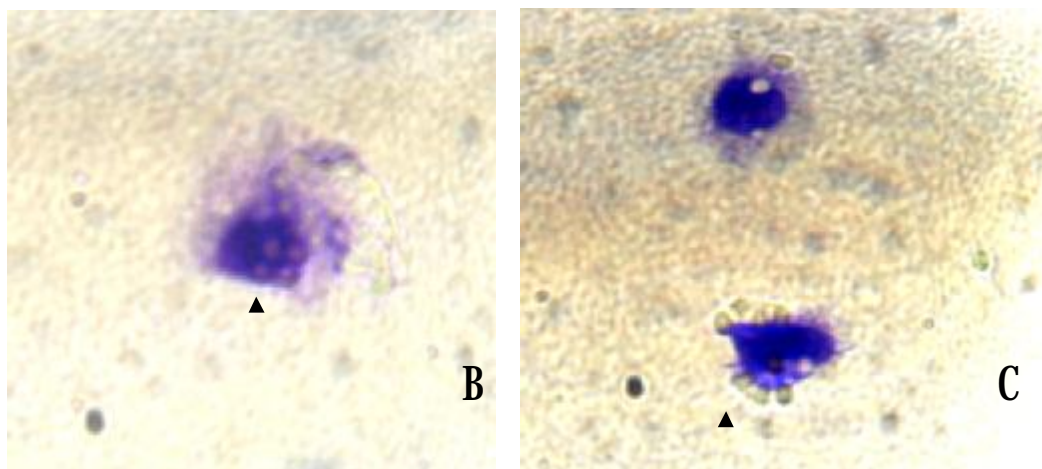
จากการทดลองให้อาหารที่แตกต่างกัน 5 ชุดการทดลอง พบว่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแต่ละชนิดได้แก่ ไฮยาลิน เซมิแกรนูลาร์ และลาจแกรนูลาร์ ของกึ่งในชุดการทดลองทั้ง 5 ชุดในแต่ละสัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ ($P \geq 0.05$) โดยเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ของกึ่งทั้ง 5 ชุดในระยะเวลา 3 สัปดาห์อยู่ในช่วง 70.90-76.62 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์อยู่ในช่วง 12.06-16.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเม็ดเลือดชนิดลาจแกรนูลาร์เซลล์อยู่ในช่วง 10.80-15.30 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดแต่ละชนิดในชุดการทดลองเดียวกันแต่ระยะเวลาต่างกันในช่วง 3 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยปริมาณเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ในระยะ 3 สัปดาห์ ของกึ่งในชุดการทดลองที่ 1 2 3 4 และ 5 อยู่ในช่วง 74.82-75.98 73.31-76.62 72.04-76.50 72.74-76.39 และ 70.90-74.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์อยู่ในช่วง 12.75-13.29 12.15-13.10 12.06-13.30 12.49-13.64 และ 13.88-16.09 เปอร์เซ็นต์ ในชุดการทดลองที่ 1 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดชนิดลาจแกรนูลาร์เซลล์อยู่ในช่วง 10.81-12.10 11.23-13.96 11.44-15.30 11.13-13.63 และ 11.68-14.95 เปอร์เซ็นต์ ในชุดการทดลองที่ 1 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ (ภาพที่ 3)

1.3 การวิเคราะห์ความสามารถและดัชนีในการจับกินสิ่งแปลกปลอม

ผลการศึกษากการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาว ดังภาพที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity: PA) ของเม็ดเลือดกึ่งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตรในระยะเวลา 3 สัปดาห์ อยู่ในช่วง 21.79-26.49 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) และค่าเฉลี่ยของดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index: PI) อยู่ในช่วง 1.42-1.65 (ภาพที่ 6)





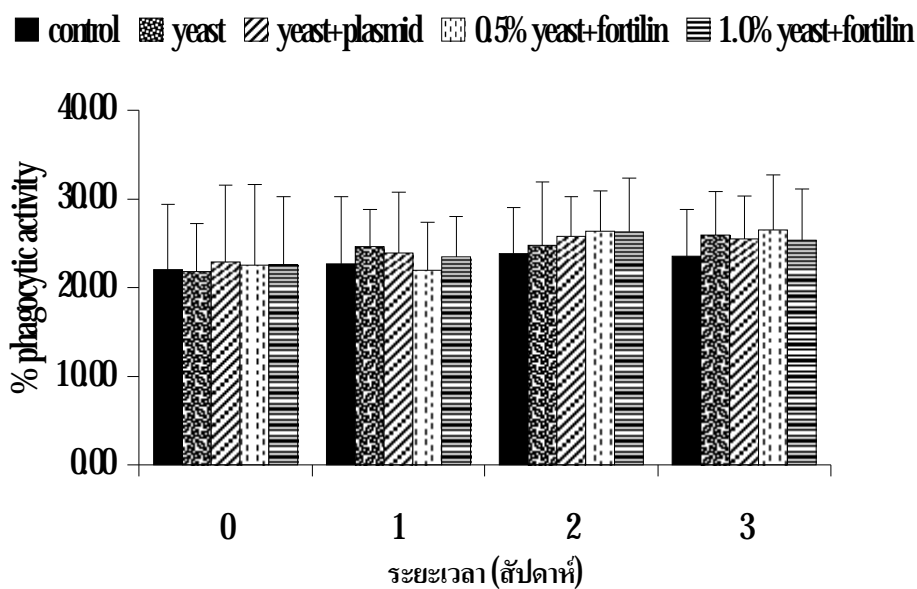
ภาพที่ 4 การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาว (ย้อมด้วยสีย้อม Dip-Quick สำเร็จรูป ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์กำลังขยาย 100x A2 และ B คือเม็ดพลาสติก (bead) ที่ถูกเม็ดเลือดกึ่งขาวจับกินเข้าไปในเซลล์ A1 ส่วนของเม็ดเลือดกึ่งขาวที่ยื่นไปจับกินเม็ดพลาสติก C เม็ดพลาสติกที่เกาะอยู่รอบ ๆ เม็ดเลือด

ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) ของกึ่งที่ให้อาหารต่างกัน 5 ชุดการทดลองในแต่ละสัปดาห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกึ่งทั้ง 5 ชุด เมื่อเริ่มทดลอง (สัปดาห์ที่ 0) อยู่ในช่วง 21.79-22.87 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 1 อยู่ในช่วง 21.91- 24.60 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 2 อยู่ในช่วง 23.79-26.37 เปอร์เซ็นต์ และสัปดาห์ที่ 3 อยู่ในช่วง 23.53-26.49 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกึ่งในชุดการทดลองที่ 234 และ 5 ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 มีแนวโน้มสูงกว่ากึ่งชุดการทดลองที่ 1 ที่ให้อาหารสูตรควบคุม โดยสัปดาห์ที่ 2 ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกึ่งในชุดการทดลองที่ 1 234 และ 5 มีค่า 23.79 24.77 25.74 26.37 และ 26.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสัปดาห์ที่ 3 มีค่า 23.53 25.93 25.50 26.49 และ 25.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

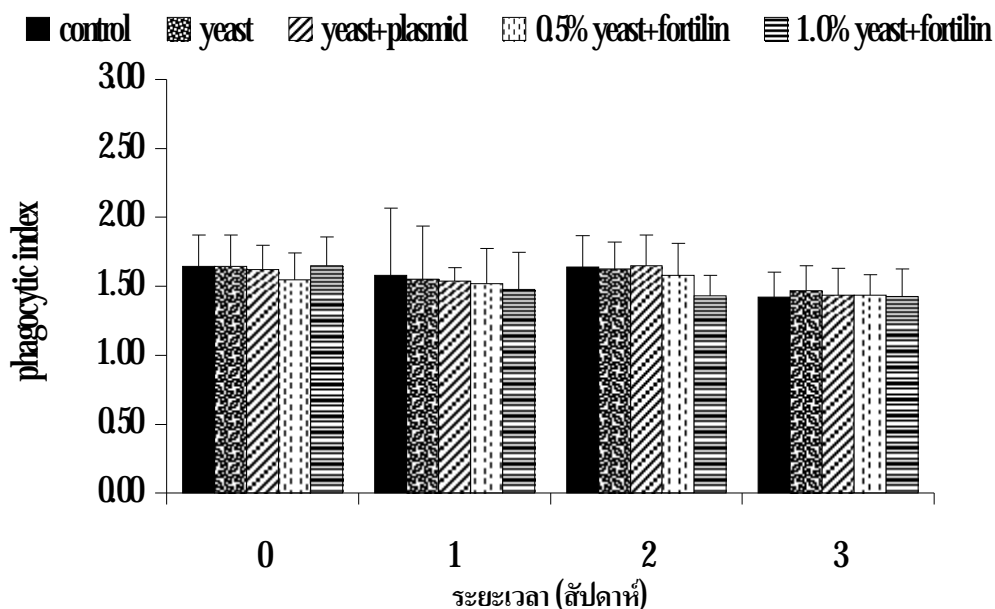
เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมในชุดการทดลองเดียวกันในระยะเวลา 3 สัปดาห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แต่ในชุดการทดลองที่ 234 และ 5 ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 มีแนวโน้มสูงกว่าสัปดาห์ที่ 1 โดยชุดการทดลองที่ 2 มีค่าเฉลี่ยในระยะเวลา 3 สัปดาห์ในช่วง 21.79-25.93 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ 3 มีค่าเฉลี่ยในช่วง 22.87-25.74 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ 4 มีค่าเฉลี่ยในช่วง 21.91-26.49

เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ 5 มีค่าเฉลี่ยในช่วง 22.59-26.25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดที่ 1 มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ในช่วง 22.02-23.79 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยของดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index: PI) ของกุ้งที่ให้อาหารต่างกัน 5 ชุดการทดลองในแต่ละสัปดาห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งทั้ง 5 ชุด เมื่อเริ่มทดลองอยู่ในช่วง 1.55-1.65 สัปดาห์ที่ 1 อยู่ในช่วง 1.48-1.58 สัปดาห์ที่ 2 อยู่ในช่วง 1.43-1.64 และสัปดาห์ที่ 3 อยู่ในช่วง 1.42-1.47 ส่วนค่าเฉลี่ยดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมในชุดการทดลองเดียวกันในระยะเวลา 3 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เช่นเดียวกัน โดยค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองที่ 1 อยู่ในช่วง 1.42-1.64 ชุดการทดลองที่ 2 อยู่ในช่วง 1.47-1.64 ชุดการทดลองที่ 3 อยู่ในช่วง 1.43-1.65 ชุดการทดลองที่ 4 อยู่ในช่วง 1.44-1.58 และชุดการทดลองที่ 5 อยู่ในช่วง 1.43-1.65 (ภาพที่ 6)



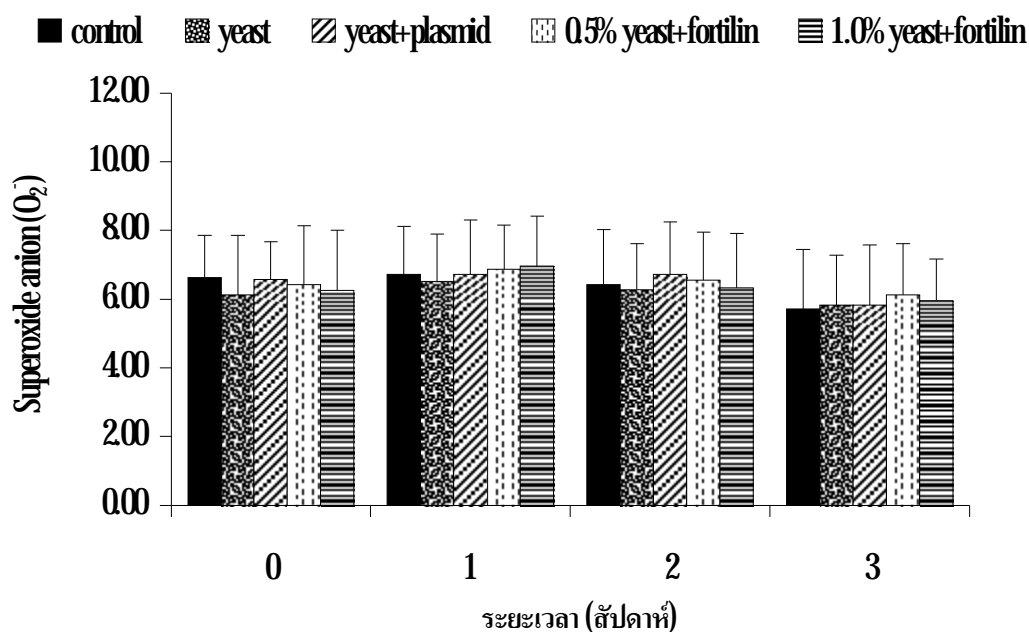
ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity: PA) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตรในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)



ภาพที่ 6 ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index: PI) ของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตร ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

1.4 การสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเซลล์เม็ดเลือด

ค่าเฉลี่ยของการสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 ชุดการทดลองในแต่ละสัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของการสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของกึ่งทั้ง 5 ชุด เมื่อเริ่มทดลองอยู่ในช่วง 6.13-6.62 สัปดาห์ที่ 1 อยู่ในช่วง 6.52-6.96 สัปดาห์ที่ 2 อยู่ในช่วง 6.28-6.33 และสัปดาห์ที่ 3 อยู่ในช่วง 5.71-6.12 ส่วนค่าเฉลี่ยของการสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนในชุดการทดลองเดียวกันในระยะเวลา 3 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เช่นเดียวกัน โดยค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 5.71-6.72 5.83-6.52 5.83-6.72 6.12-6.87 และ 5.96-6.96 ในชุดการทดลองที่ 1 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

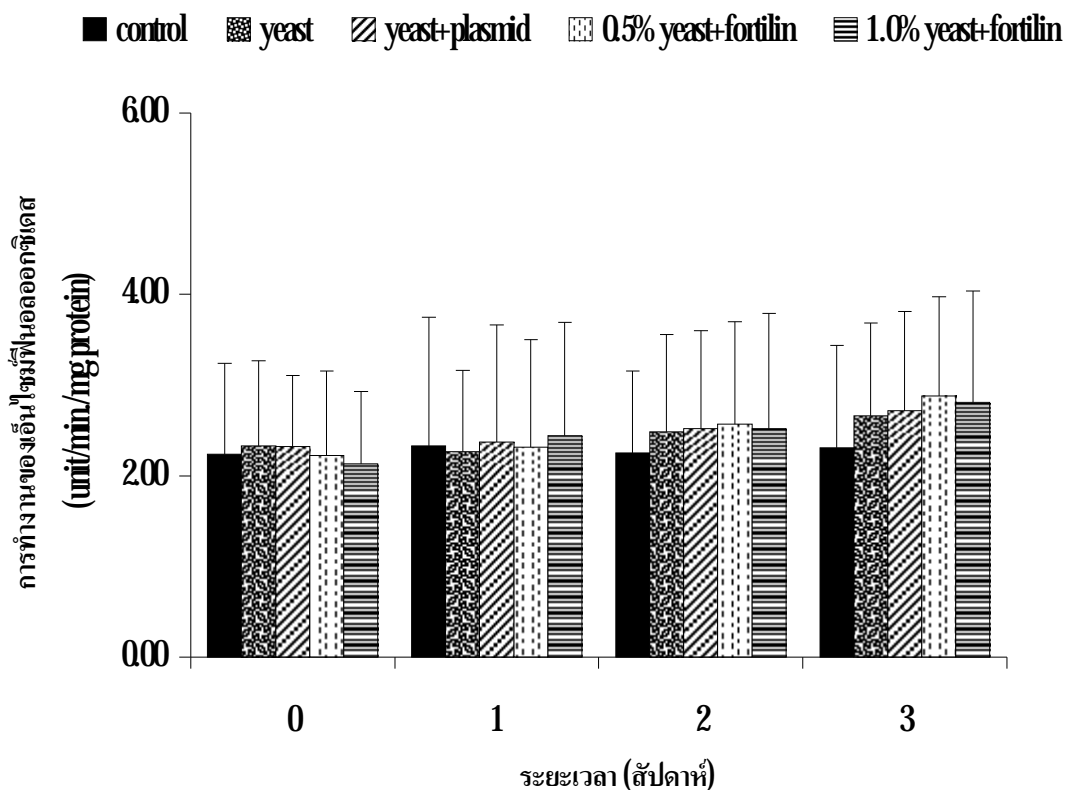


ภาพที่ 7 การสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับอาหารต่างกัน 5 สูตร ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

1.5 การทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส

ค่าเฉลี่ยของการทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับอาหารต่างกัน 5 ชุดการทดลอง ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ อยู่ในช่วง 213-288 หน่วยต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีน ($unit/min/mg\ protein$) โดยเมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสของทั้ง 5 ชุดการทดลองในแต่ละสัปดาห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ใน สัปดาห์ที่ 2 และ 3 การทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกลุ่มที่ 234 และ 5 อยู่ในช่วง 248-288 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีค่าค่อนข้างคงที่ ในช่วง 224-233 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 8)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสของเซลล์เม็ดเลือดขาวในชุดการทดลองเดียวกันในระยะเวลาต่างกัน 3 สัปดาห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ในชุดการทดลองที่ 2, 3, 4 และ 5 การทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสมี แนวโน้มสูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 โดยในระยะเวลา 3 สัปดาห์มีค่าอยู่ในช่วง 233-266 232-272 223-288 213-281 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในกลุ่มที่ 234 และ 5 ตามลำดับ



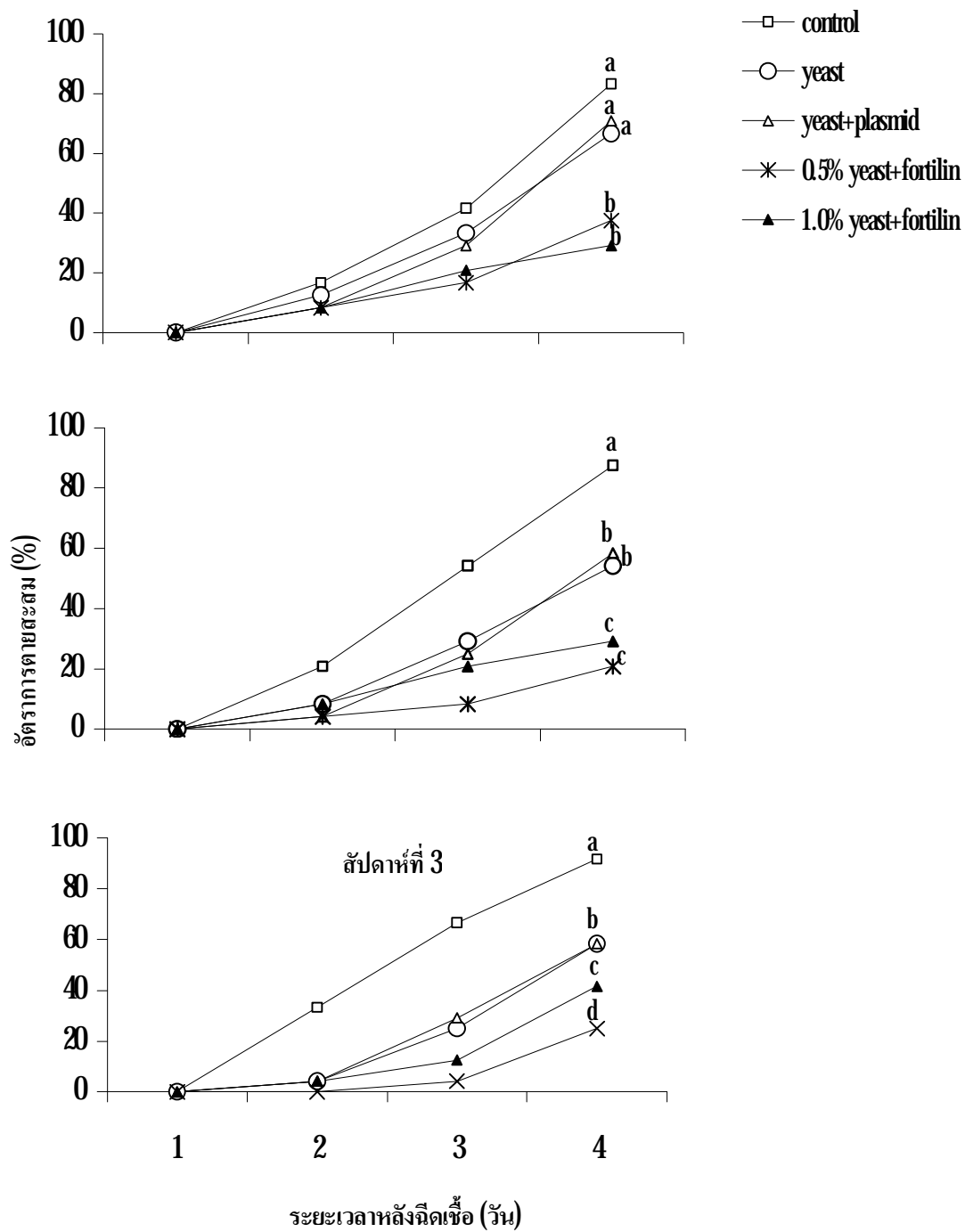
ภาพที่ 8 ค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO; unit/min/mg protein) ของเมล็ดเลือดกุ้งขาวที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตรใน 3 สัปดาห์ แสดงค่าเฉลี่ย+ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

2 การทดสอบความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

กุ้งที่ให้อาหารต่างกัน 5 สูตร เมื่อได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าในทุกชุด การทดลองกุ้งจะเริ่มตายในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 ยกเว้นกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งหลังได้รับ อาหารผสมฟอดีลิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่ากุ้งตายช้าลงโดยเริ่มตายในวันที่ 3 หลังฉีดเชื้อ นอกจากนั้นพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งให้อาหารผสมฟอดีลิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ 5 ซึ่งให้อาหารผสมฟอดีลิน 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 ดีที่สุด ซึ่งต่ำกว่าอัตราการตายสะสมของกุ้งในชุดการทดลองอีก 3 กลุ่ม คือ ชุดควบคุม ชุดที่ให้อาหารผสมยีสต์ และชุดที่ให้อาหารผสมยีสต์และพลาสมิดเปล่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนั้นอัตราการตายสะสมของกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ในสัปดาห์ที่ 3 ยังต่ำกว่าชุดการทดลอง

ที่ 5 อีกด้วย โดยกึ่งในชุดการทดลองที่ 4 มีอัตราการตายสะสมเฉลี่ย 37.50 ± 12.50 20.83 ± 0.00 และ 25.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ และกึ่งในชุดการทดลองที่ 5 มีอัตราการตายสะสม 29.17 ± 7.22 29.17 ± 7.22 และ 41.17 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ที่ให้อาหารผสมยีสต์ และอาหารผสมยีสต์และพลาสมีดเปลา นั้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 มีอัตราการตายสะสมต่ำกว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยชุดที่ให้อาหารผสมยีสต์มีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสม 66.67 ± 7.22 54.17 ± 50.00 และ 58.33 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ให้อาหารผสมยีสต์และพลาสมีดเปลา 70.83 ± 7.22 58.33 ± 37.50 และ 58.33 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดที่ให้อาหารควบคุมมีอัตราการตายสะสมสูงที่สุดตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ โดยอยู่ในช่วง $83.33-91.67$ เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)

หลังจากให้อาหาร 1 สัปดาห์ พบว่ากึ่งทั้ง 5 ชุดทดลองมีอัตราการตายใกล้เคียงกัน ใน 3 วันแรก แต่ในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อพบว่ากึ่งในชุดการทดลองที่ 4 และ 5 ที่ให้อาหารผสมโปรตีนฟอตลินยีสต์มีอัตราการตายสะสมต่ำกว่าอีก 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังจากนั้นเมื่อให้อาหารทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ากึ่งในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมยีสต์และอาหารผสมโปรตีนฟอตลินยีสต์ทั้ง 4 ชุดเริ่มตายช้าลงและมีอัตราการตายสะสมต่ำกว่ากึ่งชุดที่ให้อาหารควบคุมตลอดตั้งแต่วันที่ 2-4 นอกจากนี้กึ่งในชุดการทดลองที่ 4 และ 5 ที่ให้อาหารผสมโปรตีนฟอตลินยีสต์ยังมีอัตราการตายสะสม 20.83 ± 7.22 และ 29.17 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากึ่งชุดที่ 2 และ 3 ที่ให้อาหารผสมยีสต์ที่มีอัตราการตายสะสม 54.17 ± 7.22 และ 58.33 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับอีกด้วย ($P < 0.05$) เมื่อให้อาหารครบ 3 สัปดาห์พบว่าหลังจากฉีดเชื้อแล้วกึ่งในชุดที่ 1, 2, 3 และ 4 มีการตายช้าลงในวันที่ 2 และ 3 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 1 และ 2 และในวันที่ 4 ปรากฏว่ากึ่งชุดการทดลองที่ 4 มีอัตราการตายสะสมต่ำสุดที่ 25 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชุดการทดลองที่ 5 ที่ 41.67 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์ ถัดไปคือชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งมีอัตราการตายสะสม 58.33 ± 7.22 และ 58.33 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชุดการทดลองที่ 1 อัตราการตายสะสมสูงที่สุด 91.67 ± 7.22 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 9 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ให้อาหารแตกต่างกัน 5 สูตรในระยะเวลา 3 สัปดาห์
ค่าเฉลี่ยบนเส้นกราฟในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อที่ตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่าง
กันทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ตารางที่ 6 ค่า **Relative Percent Survival (RPS)** ของกุ้งขาวที่ให้อาหารแตกต่างกัน 4 สูตรในระยะเวลา 3 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ชุดการทดลอง			
	2 yeast	3 yeast+plasmid	4 0.5% yeast+fortilin	5 1.0% yeast+fortilin
1	20.00±8.66 ^{al}	15.00±8.66 ^{al}	55.00±15.00 ^{bl}	65.00±8.66 ^{bl}
2	38.09±8.25 ^{a2}	33.33±8.24 ^{a2}	76.19±8.24 ^{b2}	66.67±8.25 ^{bl}
3	36.37±7.87 ^{a2}	36.37±7.87 ^{a2}	72.73±0.00 ^{l2}	54.55±7.87 ^{bl}

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

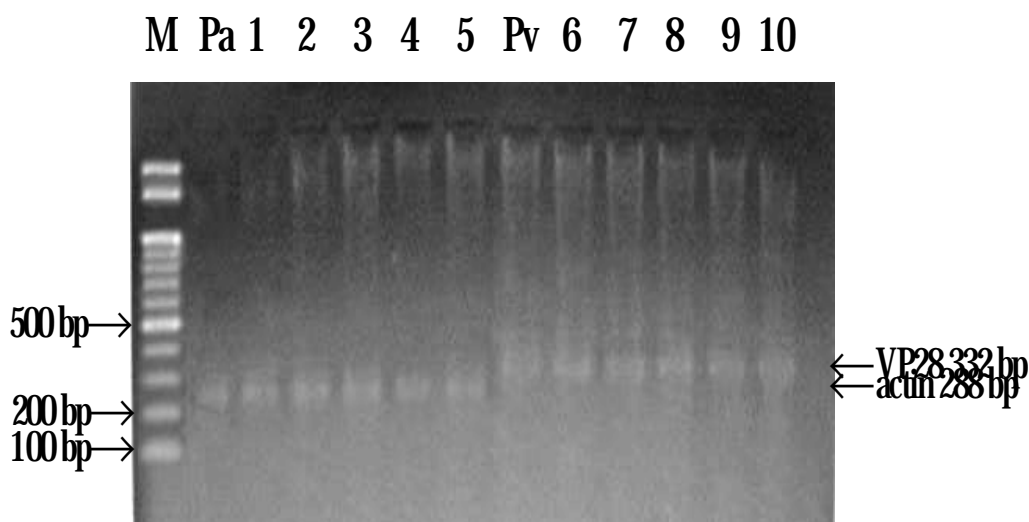
ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในสัปดาห์เดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตโดยคำนวณค่า **Relative Percent Survival (RPS)** โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งจะมีค่าเป็น 0 พบว่าค่า **RPS** ระหว่างชุดการทดลองในแต่ละสัปดาห์ ในชุดการทดลองที่ 4 และ 5 ซึ่งให้อาหารผสมฟอติลินอีสต์ 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ค่า **RPS** สูงกว่าชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ที่ให้อาหารผสมอีสต์ และอาหารผสมอีสต์และพลาสมิดเปล่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และชุดการทดลองที่ 4 มีค่า **RPS** ดีที่สุดและสูงกว่าชุดการทดลองที่ 5 ในสัปดาห์ที่ 3 ด้วย โดยชุดการทดลองที่ 4 มีค่า **RPS** 55.00±15.00 76.19±8.24 และ 72.73±0.00 และชุดการทดลองที่ 5 มีค่า **RPS** ที่ 65.00±8.66 66.67±8.25 และ 54.55±7.87 ในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 และ 3 มีค่า **RPS** อยู่ในช่วง 15.00-38.09 (ตารางที่ 6)

ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า **RPS** ภายในชุดการทดลองเดียวกันแต่ระยะเวลาต่างกันในช่วง 3 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ค่า **RPS** ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 สูงขึ้นกว่าสัปดาห์ที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่ 4 ในสัปดาห์ที่ 2 มีค่า **RPS** สูงที่สุด 76.19±8.24 ซึ่งสูงกว่าสัปดาห์ที่ 1 และ 3 ($P < 0.05$) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 5 ค่า **RPS** ในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 อยู่ในช่วง 54.55-66.67 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

3 การแสดงออกของยีน VP28 และยีน β -actin ในกึ่งขาวหลังรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ระดับการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin (VP28/ β -actin ratio) ในกึ่งขาว หลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 24 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 0.67-0.90 สำหรับในกึ่งรอดตายมีค่า อยู่ในช่วง 0.18-0.26



ภาพที่ 10 การแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin ที่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อกึ่งขาว ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณไปตรวจสอบบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยอาศัยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ย้อมด้วย ethidium bromide แถบผลผลิตของพีซีอาร์ (PCR product) ที่ 288 bp คือ ยีน β -actin และ แถบผลผลิตของพีซีอาร์ (PCR product) ที่ 332 bp คือ ชิ้นส่วนของยีน VP28 M = marker (100 bp DNA ladder Pa = positive actin เลน 1-5 = β -actin ของชุดการทดลอง 1-5 Pv = positive VP28 เลน 6-10 = VP28 ของชุดการทดลอง 1-5

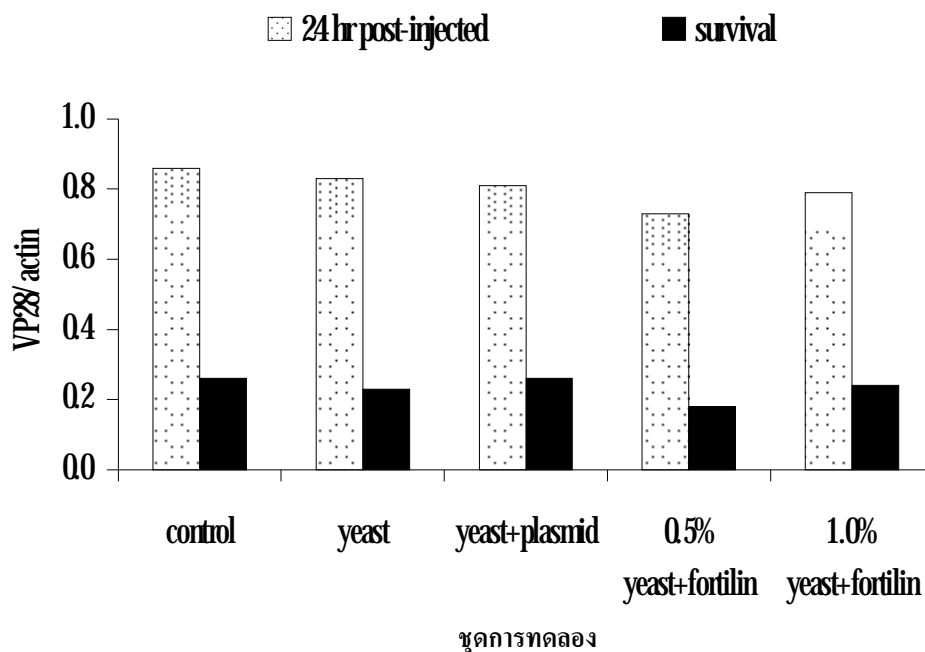
ตารางที่ 7 อัตราส่วนระดับการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin (VP28/ β -actin ratio) ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 24 ชั่วโมง ใน 3 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ชุดการทดลอง				
	1 control	2 yeast	3 yeast+plasmid	4 0.5% yeast+fortilin	5 1.0% yeast+fortilin
1	0.84±0.04 ^{al}	0.86±0.03 ^{al}	0.82±0.03 ^{al}	0.78±0.02 ^{al}	0.88±0.02 ^{al}
2	0.87±0.03 ^{al}	0.79±0.03 ^{al}	0.80±0.01 ^{al}	0.67±0.02 ^{al}	0.73±0.02 ^{al}
3	0.84±0.06 ^{al}	0.81±0.03 ^{al}	0.81±0.04 ^{al}	0.71±0.02 ^{al}	0.73±0.02 ^{al}

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในสัปดาห์เดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

อัตราส่วนของระดับการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin (VP28/ β -actin ratio) ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 24 ชั่วโมง ใน 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ VP28/ β -actin ratio ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจหลังการฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง ทั้งการเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองในสัปดาห์เดียวกัน (แถว) และในชุดการทดลองเดียวกัน ใน 3 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \geq 0.05$)



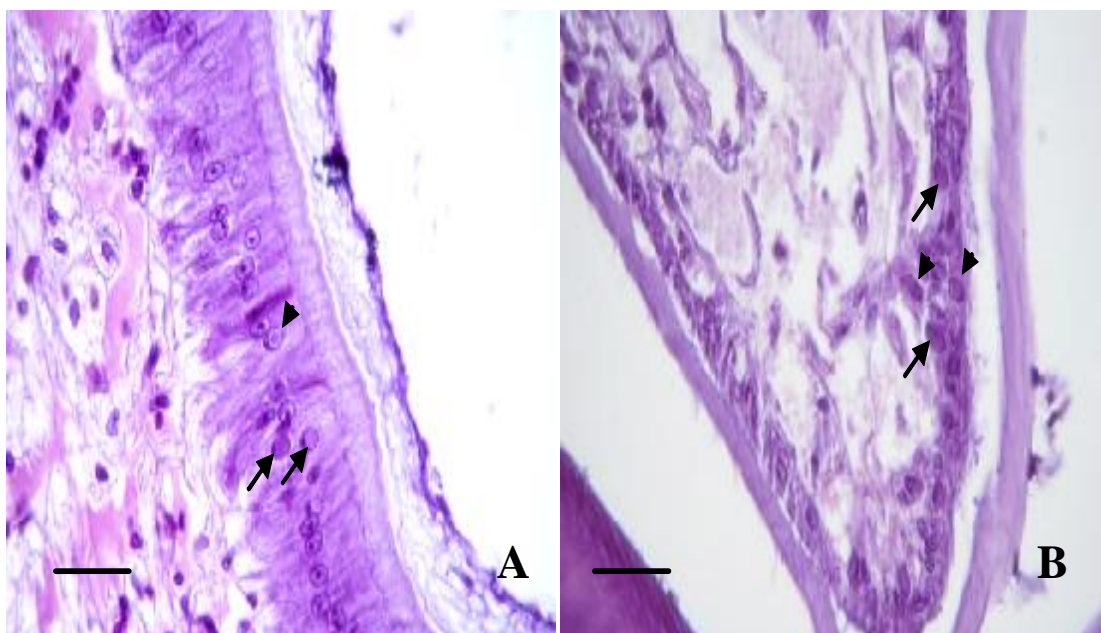
ภาพที่ 11 อัตราส่วนการแสดงผลของยีน VP28 ต่อยีน β -actin ในกึ่งขาวหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 24 ชั่วโมง และในกึ่งขาวที่รอดตาย

จากภาพที่ 11 VP28 ต่อยีน β -actin ratio ที่แสดงออกในกึ่งขาวหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 24 ชั่วโมง และในกึ่งขาวที่รอดตายมีความแตกต่างกัน โดยกึ่งขาวที่รอดตายทุกชุดการทดลองมี VP28 ต่อยีน β -actin ratio ต่ำกว่ากึ่งขาวหลังการฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง

4 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งขาวแวนนาไมภายหลังได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

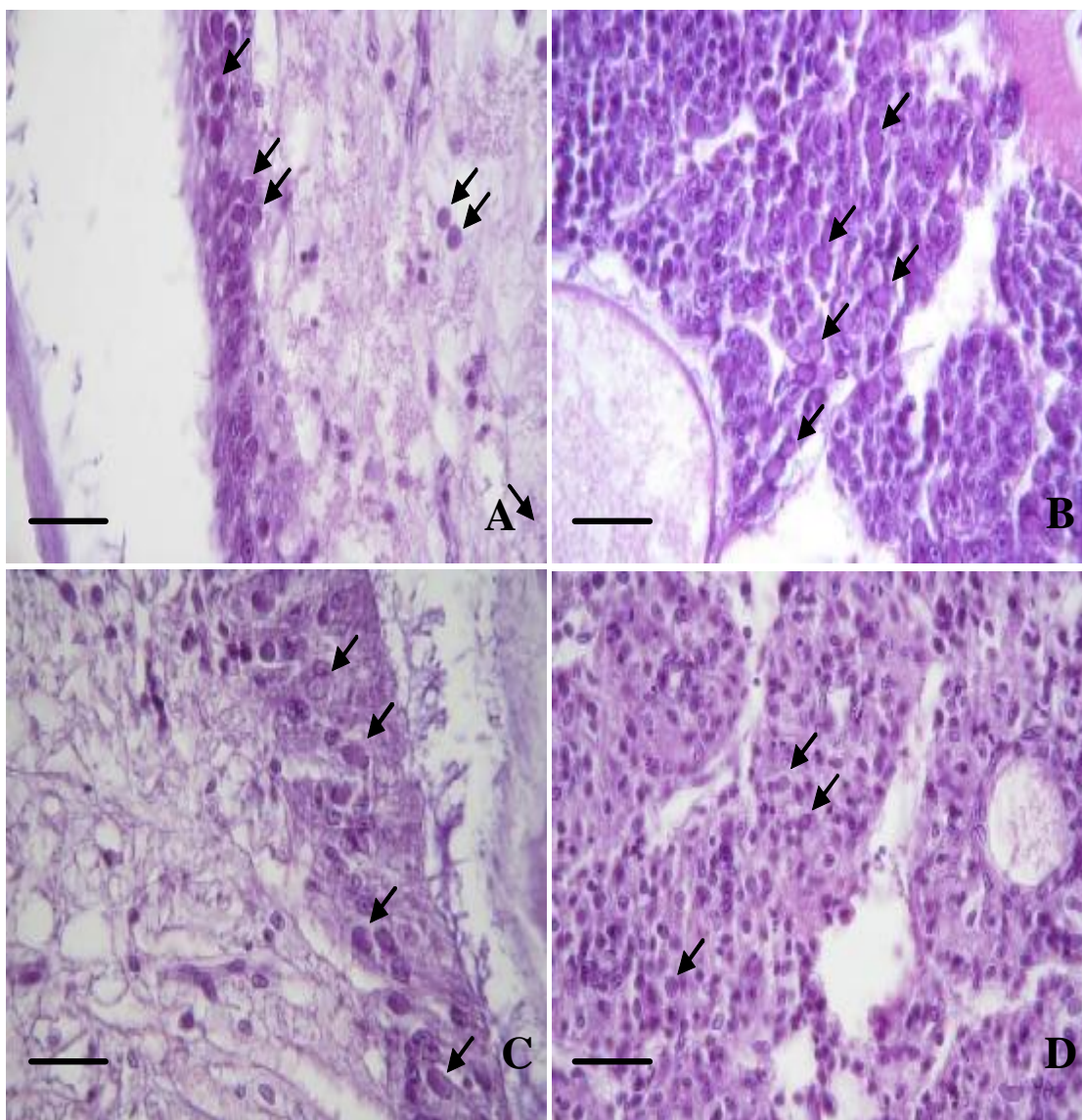
ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของกึ่งขาวทดลองภายหลังได้รับการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวครบ 24 48 72 ชั่วโมง และกึ่งที่รอดตายในวันที่ 5 หลังการฉีดเชื้อไวรัสชุดที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม พบว่ากึ่งเริ่มมีการตายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส 2 วัน และทยอยตายไปเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 4 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ด้วยการย้อมสี ฮีมาท็อกไซลิน และอีโอซิน (H&E) ในชั่วโมงที่ 24 พบการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่าง ๆ เช่น กลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เชื่อมทางเดินอาหาร เหงือกและ pleopod นิวเคลียสของเซลล์ขยายใหญ่ (hypertrophied nuclei) และย้อมติดสีชมพู (eosinophilic intranuclear inclusion bodies) ส่วนเส้นโครมาตินย้อมติดสีน้ำเงินเข้มจะถูกดันไปชิดขอบของนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้น เรียกว่า Cowdry-A type inclusions บางเซลล์จะพัฒนาต่อไปโดยที่นิวเคลียสจะขยายมากขึ้นจนเห็นเป็นช่องว่างใสระหว่าง virogenic stroma และขอบของเส้นโครมาตินที่ติดสีเข้มขึ้น จน

เป็นรูปมนทั้ง 2 ด้าน (ภาพที่ 12) เมื่อครบ 48 ชั่วโมงพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอวัยวะต่างๆ เพิ่มมากขึ้น ได้แก่ เซลล์เยื่อชั้นใต้ผิวหนัง (*subcuticular epithelium*) เหงือก ลิมฟอยด์ ออร์แกน เซลล์เยื่อชั้นใต้ผิวของกระเพาะอาหาร (*subcuticular epithelium of the stomach*), *haematopoietic tissue* เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับและตับอ่อน และรังไข่ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วไป จากนิวเคลียสที่ ข้อมติคสีชมพูจะเปลี่ยนเป็นคิตสีน้ำเงิน (*basophilic intranuclear inclusion bodies*) ขยายใหญ่จน เต็มพื้นที่ (ภาพที่ 13) กุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อผ่าน 72 ชั่วโมงขึ้นไปจะทยอยตาย เซลล์ที่ติดเชื้อจะถูกทำลาย (*disintegrated cells*) นิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อบางเซลล์จะอัดตัวแน่น (*condensation*) และจะแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (*fragmentation*) ในเวลาต่อมา (ภาพที่ 14 และ 15) เนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ จะเสียหายซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของกุ้ง

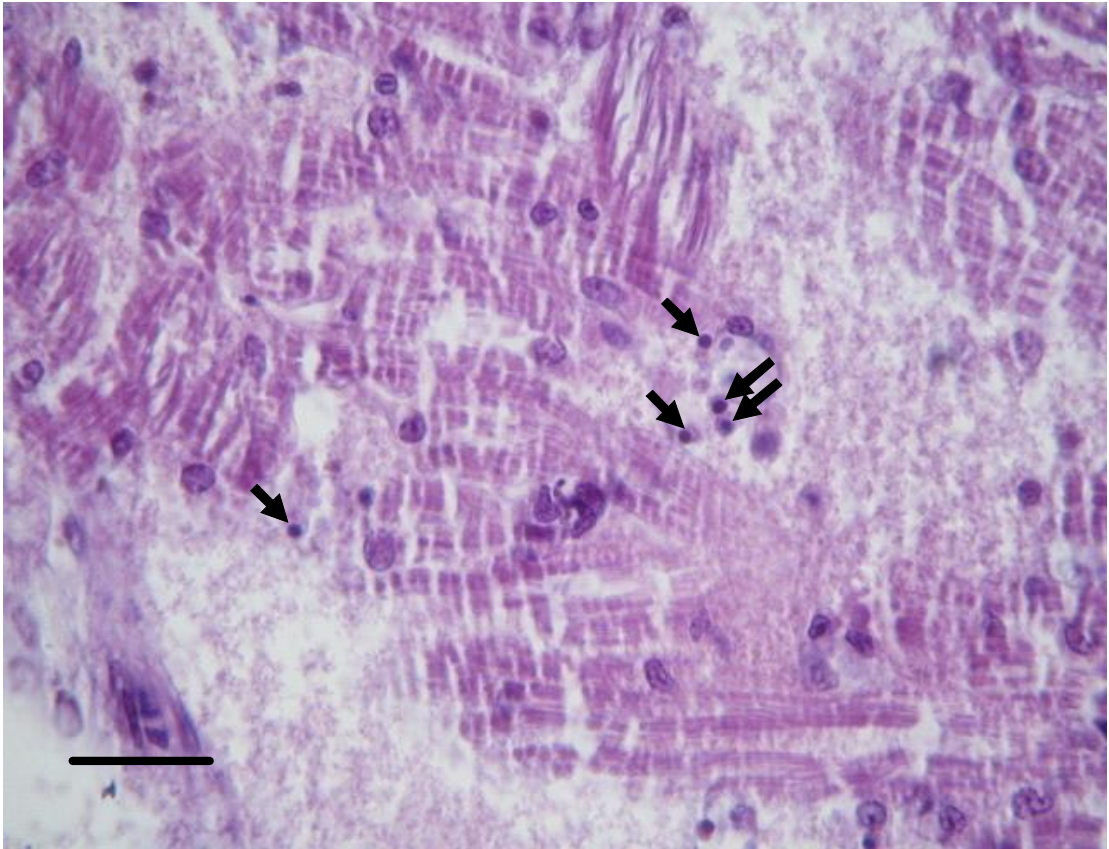


ภาพที่ 12 ลักษณะทางพยาธิสภาพของกุ้งขาวภายหลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เชื้อไวรัส เรียกว่า *Cowdry A-type inclusions* โดยที่นิวเคลียสของเซลล์จะขยายใหญ่ (*hypertrophied nuclei*) ข้อมติคสีชมพู (*eosinophilic intranuclear inclusion bodies*) ส่วน โครมาตินคิตสีน้ำเงินเข้มจะถูกดันไปยังขอบของนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ (หัวลูกศร) บาง เซลล์มีการพัฒนาต่อไปโดยนิวเคลียสจะขยายมากขึ้นจนเห็นเป็นช่องว่างระหว่าง *virogenic stroma* และโครมาตินถูกดันไปชิดขอบเซลล์ จนทำให้มีลักษณะมนทั้ง 2 ด้าน (ลูกศร) ซึ่งเป็นลักษณะของการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระยะแรก ๆ A เซลล์เยื่อ ชั้นใต้ผิวของกระเพาะอาหาร (*subcuticular epithelium of the stomach*) B pleopod ข้อม ด้วยสี H&E Scale bars = 10 μ m

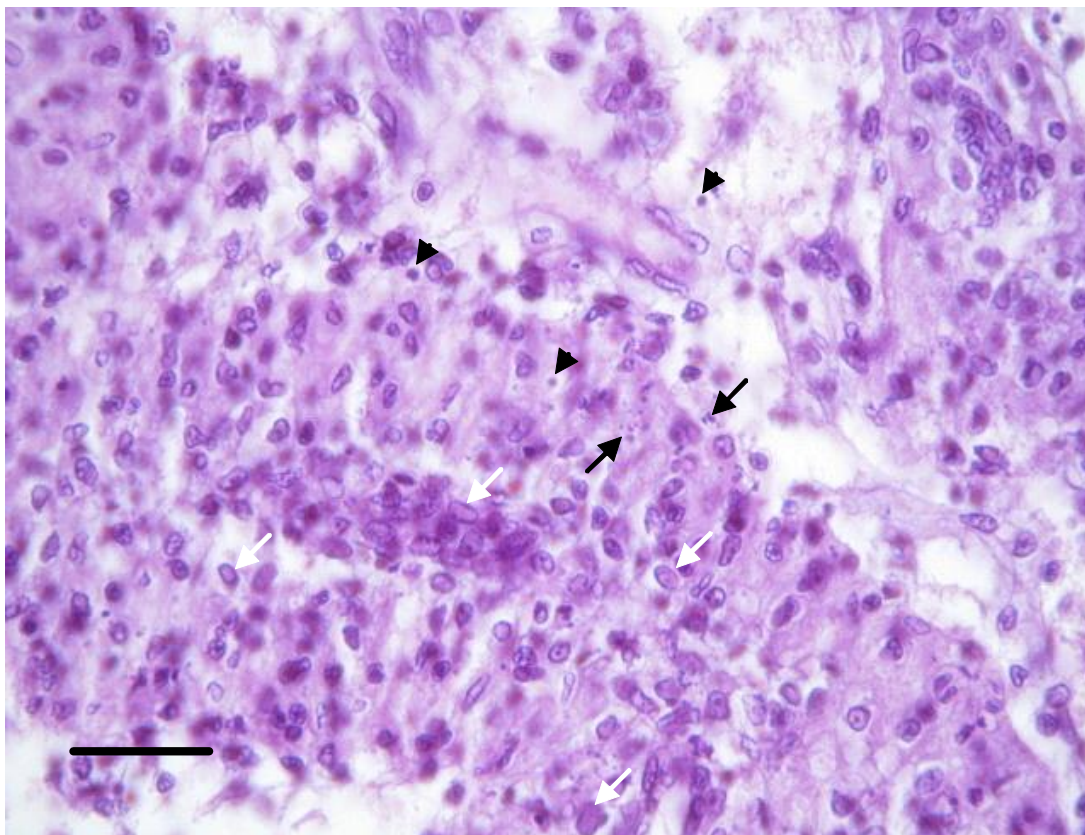
กึ่งชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมยีสต์อย่างเดียว และกึ่งชุดการทดลองที่ 3 ที่ได้รับอาหารผสมยีสต์และพลาสมิดเปล่าพบว่ากึ่งเริ่มตายในวันที่ 2 หลังการติดเชื้อไวรัส เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพด้วยการย้อมสี ฮีมาท็อกไซลิน และอีโอซิน ในชั่วโมงที่ 24 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อของกึ่ง แต่จะเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่าง ๆ นิวเคลียสของเซลล์ที่เรียกว่า **Cowdry-A type inclusions** โดยนิวเคลียสจะขยายใหญ่ (**hypertrophied nuclei**) ขึ้นและย้อมติดสีชมพู (**eosinophilic intranuclear inclusion bodies**) ส่วนเส้นโครมาตินจะถูกดันไปชิดขอบของนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้นย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม เมื่อครบ 72 ชั่วโมงพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอวัยวะต่างๆ เพิ่มมากขึ้น จากนิวเคลียสที่ย้อมติดสีชมพูจะเปลี่ยนเป็นติดสีน้ำเงิน (**basophilic intranuclear inclusion bodies**) ขยายใหญ่จนเต็มพื้นที่ จากนั้นกึ่งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะทยอยตาย เซลล์จะที่ติดเชื้อจะถูกทำลาย (**disintegrated cells**) พบการอัดตัวแน่นของนิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม (**pyknotic nuclei**) และแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (**karyomethic nuclei**) เมื่อทำการทดลองครบ 5 วัน พบว่ายังมีกึ่งเหลือรอดอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งกึ่งที่รอดอยู่นั้นบางตัวพบการเปลี่ยนแปลงเซลล์ในระยะเริ่มการติดเชื้อไวรัสคือ นิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อยและติดสีชมพูเข้ม ขณะที่โครมาตินติดสีน้ำเงินเข้ม ขณะที่กึ่งที่รอดตายบางตัวไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเลย



ภาพที่ 13 พัฒนาการของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของกึ่งขาวภายหลังที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว นิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้นจนเต็มไซโตพลาสซึม (**hypertrophied nuclei**) ติดสีน้ำเงินอมม่วง (**basophilic inclusions**) (ลูกศร) A เซลล์เยื่อบุชั้นใต้ผิวหนังของกระเพาะอาหาร (**subcuticular epithelium of the stomach**) B Haematopoietic tissue C เซลล์เยื่อบุชั้นใต้ผิวหนัง (**subcuticular epithelium**) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (**connective tissue**) D ลิมโฟออร์แกน (**lymphoid organ**) ย้อมด้วยสี H&E Scale bars = 10 μ m



ภาพที่ 14 ลักษณะทางพยาธิสภาพของหัวใจของกึ่งขาวที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง หลังจากเริ่มเห็น Cowdry-A type inclusions เซลล์ที่ติดเชื้อจะถูกทำลายพบการอัดตัวแน่นของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) (ลูกศร) ย้อมด้วยสี H&E Scale bars = 20 μ m



ภาพที่ 15 ลักษณะทางพยาธิสภาพของลิมโฟออร์แกนของกึ่งขาวที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมงหลังเริ่มเห็น Cowdry-A type inclusions พบ basophilic nucleation bodies เพิ่มมากขึ้น (ลูกศรสีขาว) เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะถูกทำลาย มีการอัดตัวแน่นของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) (หัวลูกศร) และแตกเป็นชิ้นเล็กๆ (karyonthetic nuclei) (ลูกศร) ย้อมด้วยสี H&E Scale bars = 20 μ m

ชุดการทดลองที่ 4 เป็นชุดที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอตินีสต์ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 สัปดาห์ พบว่ากึ่งเริ่มตายในวันที่ 2 เช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่นๆ แต่หลังการให้อาหาร 3 สัปดาห์ กึ่งเริ่มตายในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัส จะเห็นว่ากึ่งมีการตายช้าลง และชุดการทดลองที่ 5 ซึ่งได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอตินีสต์ที่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเริ่มมีการตายหลังจากฉีดเชื้อไวรัส 2 วัน เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 โดยมีอัตราการตายสะสมที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการตายในกลุ่มการทดลองที่ 5 นี้สูงกว่ากลุ่มการทดลองที่ 4 ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพจะใกล้เคียงกับกึ่งในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ที่กึ่งจะตายช้ากว่าชุดการทดลองที่ 1 กล่าวคือ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อของกึ่งในชั่วโมงที่ 24 และ 48 แต่จะเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของ

เนื้อเยื่อในอวัยวะต่าง ๆ นิวเคลียสของเซลล์ที่เรียกว่า **Cowdry-A type inclusions** โดยนิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้นและล้อมติดสีชมพู (**eosinophilic intranuclear inclusion bodies**) ส่วนเส้นโครมาตินจะถูกดันไปชิดขอบของนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้นล้อมติดสีน้ำเงินเข้ม มีการพัฒนาการของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสในอวัยวะต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น จากนิวเคลียสที่ล้อมติดสีชมพูจะเปลี่ยนเป็นติดสีน้ำเงิน (**basophilic intranuclear inclusion bodies**) และขยายใหญ่จนเต็มพื้นที่ จากนั้นกึ่งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะทยอยตาย เซลล์จะที่ติดเชื้อจะถูกทำลาย นิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อบางเซลล์จะอัดตัวแน่นและแตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เมื่อครบ 5 วัน พบว่ายังมีกึ่งที่ทดลองเหลือรอดอยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ 4 ที่ได้รับอาหารผสม โปรตีนฟอตลินีซิสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดในแต่ละสัปดาห์เป็น 55.00 ± 15.00 76.19 ± 8.24 และ 72.73 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งกึ่งที่รอดตายนั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

1. การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกึ่งขาว

จากการศึกษาองค์ประกอบในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม เฮอร์เซ็นต์ชนิดเม็ดเลือด เฮอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอม ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม การสร้างอนุโมลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเซลล์เม็ดเลือด และการทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในกึ่งทุกชุดการทดลอง แสดงว่าการเสริมยีสต์และฟอตลินยีสต์ในอาหารในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ถึงแม้ว่ายีสต์จะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการศึกษาวิจัยจำนวนมาก (Scholz *et al*, 1999; Suphantharika *et al*, 2003; Chang *et al*, 2001) แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่ายีสต์ไม่ได้มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Scholz และคณะ (1999) ที่เสริมยีสต์ *S. cerevisiae*1 เฮอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไม เป็นเวลา 7 สัปดาห์ การทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสไม่แตกต่างกับการให้อาหารที่ไม่เสริมยีสต์ นอกจากนั้น Li และคณะ (2009) ให้อาหารที่เสริมบริเวอร์ยีสต์ (Brewer's yeast) ที่ระดับ 2 เฮอร์เซ็นต์ และ 5 เฮอร์เซ็นต์ แก่กึ่งขาวแวนนาไม พบว่าไม่มีความแตกต่างทางภูมิคุ้มกัน ทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณโปรตีนในเลือด ฟีนอลออกซิเดส และการสร้างอนุโมลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ในขณะที่ Chotikachinda และคณะ (2008) ให้อาหารที่เสริมผนังเซลล์ของยีสต์ Q1 และ Q2 เฮอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไม 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้ยีสต์ทั้งเซลล์โดยไม่ผ่านการสกัดแยก ดังนั้นการที่ยีสต์ไม่มีผลต่อภูมิคุ้มกันในครั้งนี้อาจเนื่องมาจากรูปแบบและปริมาณของยีสต์ที่ใช้ยังไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันอย่างชัดเจน

เป็นที่ทราบกันดีว่ายีสต์มีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพราะผนังเซลล์ของยีสต์มีองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ เบต้ากลูแคน (β -glucan) และแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ (mannan oligosaccharide) ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งในคนและสัตว์ และเพิ่มความต้านทานโรคจากเชื้อแบคทีเรีย ราและไวรัส (Raa *et al*, 1992; Suphantharika *et al*, 2003;

Josepi *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงมีการนำสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดนี้มาศึกษาวิจัยเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความต้านทานโรคในสัตว์น้ำกันอย่างกว้างขวาง (จารุวรรณ, 2550; Song *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2001; Suphanthana *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2004; Genc *et al.*, 2007) สำหรับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ นั้นมีรายงานการใช้เป็นสารเสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์บก ได้แก่ ไก่ และสุกร ซึ่งส่งผลดีต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร ช่วยทำให้การเจริญเติบโต อัตราแลกเนื้อ และอัตราการรอดของสัตว์ที่เลี้ยงดีขึ้น รวมทั้งยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย (Davis *et al.*, 2004) สำหรับในสัตว์น้ำ Genc และคณะ (2007) พบว่าการเสริมสารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ลูกกุ้ง *P. semisulcatus* ระยะโพสลาเวร์ 20 มีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดสูงขึ้นกว่าการไม่เสริม นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารนี้ในปลาแซลมอนโดย Refstie และคณะ (2010) เสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารในอัตราส่วน 1 และ 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงปลาแซลมอนในกระชังเป็นเวลากว่า 70 วัน เปรียบเทียบกับการเสริมเบต้า-1-3/1-6-กลูแคนที่ผสมอาหารในระดับ 0.5 และ 1 กรัม พบว่าการเสริมเบต้ากลูแคนทำให้จำนวนปรสิต (lice) ในปลาลดลง 28 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเสริม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ไม่มีผลต่อการลดจำนวนปรสิตแต่ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตดีขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ และอัตราแลกเนื้อ (FCR) ลดลง 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบต้ากลูแคนจะมีความโดดเด่นเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งส่วนใหญ่การใช้ยีสต์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำจะใช้ในรูปแบบของสารสกัดคือเบต้ากลูแคน (Suphanthana *et al.*, 2003) Chang และคณะ (2003) ผสมสารเบต้า 1-3-กลูแคนที่ได้จากยีสต์ *Schizophyllum commune* ในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ที่ระดับ 0.01 0.21 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 วัน พบว่าระดับที่เหมาะสมคือ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม การจับกินสิ่งแปลกปลอม ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และอัตราการรอดจากการติดเชื้อสูงขึ้น Chang และคณะ (2011) ทดลองผสมเบต้ากลูแคนในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้กุ้งขาวกินเป็นเวลา 18 วัน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างกับชุดที่ให้อาหารไม่เสริมเบต้ากลูแคน แต่การทำงานของฟีนอลออกซิเดส และการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนสูงขึ้น จากรายงานการวิจัยเหล่านี้จะเห็นได้ว่าปริมาณการเสริมเบต้ากลูแคนที่สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.2-2 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับปริมาณยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะพบว่า มีปริมาณเบต้ากลูแคนต่ำมาก โดย Lyons (1994) พบว่าการนำเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มาทำให้แตกตัวและแยกผนังเซลล์ออกมาจะประกอบด้วยกลูแคน 30 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน (mannan) 30 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนไคติน (chitin) 12.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Lipke และ Ovalle (1998) รายงานว่า เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ประกอบด้วยส่วนของผนังเซลล์ 15-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และ

ผนังเซลล์นี้ประกอบด้วยเบต้ากลูแคนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ โดย Kwiatkowski และคณะ (2009) กล่าวว่าปริมาณกลูแคนนี้จะแตกต่างกันในช่วงกว้างขึ้นอยู่กับ ชนิดของยีสต์ โภชนาการของเซลล์ ยีสต์ วิธีการแยกหรือสกัดสาร ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เลี้ยงและเวลาที่เก็บเกี่ยวยีสต์ จากรายงาน การศึกษาของ มลฤดี (2541) ศึกษาการสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงด้วย อาหาร YEPD โดยแยกผนังเซลล์ได้ 13.65 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักยีสต์แห้ง และสกัดเบต้ากลูแคน จากผนังเซลล์ยีสต์ได้ปริมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อคำนวณแล้วพบว่ายีสต์แห้งมีปริมาณเบต้า กลูแคนเพียงประมาณ 273-410 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อนำมาคำนวณปริมาณเบต้ากลูแคนใน การศึกษาครั้งนี้ซึ่งผสมยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหารนั้นจะมีปริมาณเบต้ากลูแคนเพียง 0.02-0.04 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่งานวิจัยที่มีการรายงานส่วนใหญ่อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.2-2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะ เห็นว่าปริมาณเบต้ากลูแคนที่เสริมในอาหารในการศึกษาครั้งนี้้น้อยกว่ามาก นอกจากนั้นการใช้ เซลล์ยีสต์แห้งที่ไม่ได้ผ่านการสกัดหรือทำให้ได้สารเบต้ากลูแคนที่บริสุทธิ์ขึ้นนั้น ประสิทธิภาพจะ ต่ำกว่าการใช้สารบริสุทธิ์ ดังที่ มลฤดี (2541) ทดลองใช้สารสกัดเบต้ากลูแคน 3 แบบ คือ ผนัง เซลล์ยีสต์ สารสกัดเบต้ากลูแคนก่อนทำให้บริสุทธิ์ และสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ผสมในอาหาร โดยคำนวณให้มีสารสกัดเบต้ากลูแคนอยู่ในอาหาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากึ่งกลูตาที่m เลี้ยงด้วยสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ให้ผลปริมาณเม็ดเลือดรวม ค่าความสามารถใน การกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ดีที่สุด

ดังนั้น การที่ผลการศึกษาค้นคว้าไม่พบความแตกต่างของภูมิคุ้มกัน ในกุ้งที่ให้ อาหารทั้ง 5 กลุ่ม น่าจะเป็นเพราะปริมาณยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้น้อยเกินไปที่จะแสดงผลการ ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามก็แสดงให้เห็นว่าภูมิคุ้มกันบางชนิด คือ เปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอม และการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในชุดการ ทดลองที่เสริมยีสต์และฟอตลินยีสต์นั้นมีแนวโน้มสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เสริมสารใด ซึ่งหากเพิ่ม ปริมาณยีสต์ที่ผสมในอาหารให้สูงขึ้นก็อาจจะทำให้เห็นผลการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ ทำนอง เดียวกับฟอตลินนั้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในกลุ่มที่เสริมฟอตลินยีสต์มีค่าใกล้เคียงกับชุดการ ทดลองที่เสริมยีสต์มาก แสดงว่าฟอตลินไม่ได้ส่งผลให้ภูมิคุ้มกันสูงขึ้น นอกจากนั้นยังไม่มีรายงาน การศึกษาผลของฟอตลินต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเลย และจากผลการศึกษาค้นคว้าที่พบว่า ฟอตลินทำให้ความต้านทานไวรัสตัวแดงดวงขาวสูงขึ้นมากกว่าการเสริมยีสต์นั้น แสดงว่าฟอตลิน ไม่น่าจะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่น่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดเชื้อไวรัสผ่าน กระบวนการต่อต้านการตายของเซลล์ หรือแอนโทอพอพโทซิส (anti-apoptosis) (Li et al., 2001) มากกว่า หรืออาจมีภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานเชื้อไวรัสแต่ไม่ได้ศึกษาในครั้งนี้

ได้แก่ สารในกลุ่มไซโตไคน์ TLK (toll like receptors), ALF (anti-lipopolysaccharide factor) (Arts *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009) ทั้งนี้เนื่องจากระบบกลไกการต้านทานเชื้อไวรัสยังไม่ทราบแน่ชัด

การทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของฟอตลิน โดยผสมโปรตีนฟอตลินยีสต์ในอาหารกึ่งในระดับที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับกึ่งที่ไม่ได้รับโปรตีนฟอตลินยีสต์ นำไปเลี้ยงกึ่งขาวติดต่อกันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากการสังเกตอาการและอัตราการตายพบว่า กึ่งชุดการทดลองที่ 1 (control) เริ่มมีการตายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส 2 วัน และทยอยตายไปเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 5 ส่วนกึ่งชุดการทดลองที่ 2 (yeast) ซึ่งได้รับอาหารผสมยีสต์อย่างเดียว และกึ่งชุดการทดลองที่ 3 (yeast+plasmid) ที่ได้รับอาหารผสมยีสต์และพลาสมิดเปล่า กึ่งเริ่มมีการตายในวันที่ 2 หลังได้รับเชื้อไวรัส ในอัตราที่ต่ำกว่ากึ่งทดลองชุดที่ 1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผนังเซลล์ของยีสต์มีเบต้ากลูแคนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารเบต้ากลูแคนนี้สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกึ่งจากการศึกษาของจากรูรณ (2550) พบว่าการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารสำหรับเลี้ยงกึ่งกุลาค่าที่ระดับ 1 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารไม่มีผลในการเพิ่มความต้านทานเชื้อตัวแดงดวงขาว ในขณะที่ Song และคณะ (1997) พบว่ากึ่งกุลาค่าที่ได้รับสารสกัดเบต้ากลูแคนผ่านทางอาหาร 51 วัน ร่วมกับการแช่สามารถต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Burgents และคณะ (2004) พบว่าการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 สัปดาห์ ทำให้กึ่งต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้น โดยรอดตาย 72 เปอร์เซ็นต์ หลังได้รับเชื้อ ซึ่งสูงกว่ากึ่งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่ไม่ผสมยีสต์ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 54 เปอร์เซ็นต์ และ 42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเป็นไปได้ว่า ยีสต์ที่ผสมในอาหารให้กึ่งขาวทดลองในครั้งนี้มีแนวโน้มที่จะช่วยเพิ่มความต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่ายีสต์มีผลต่อความต้านทานเชื้อที่จำกัด แม้จะให้ยีสต์ในระยะเวลาที่นานขึ้นก็ไม่ทำให้ความต้านทานต่อเชื้อเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้ยีสต์ในรูปแบบของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulator) นั้น จะขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดสัตว์น้ำและระยะเวลาที่ให้ (Suphanthana *et al.*, 2003) สำหรับชุดการทดลองที่ 4 (0.5 เปอร์เซ็นต์ yeast+fortilin) เป็นกึ่งที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอตลินยีสต์ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 สัปดาห์ พบว่ากึ่งเริ่มตายในวันที่ 2 เช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่นๆ แต่หลังการให้อาหาร 3 สัปดาห์ กึ่งเริ่มตายในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัส ซึ่งจะเห็นว่ากึ่งมีการตายช้าลง แสดงว่าการผสมโปรตีนฟอตลินยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารมีผลต่อความต้านทานต่อเชื้อไวรัส ชุดการทดลองที่ 5 (1.0 เปอร์เซ็นต์ yeast+fortilin) ซึ่งได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอตลินยีสต์ที่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เริ่มมีการตายหลังจากฉีดเชื้อไวรัส 2 วัน ในอัตราที่ต่ำกว่ากึ่งทดลองในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 อย่างไรก็ตาม พบว่า

อัตราการตายของกุ้งในชุดการทดลองที่ 5 นี้สูงกว่าชุดการทดลองที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ระดับของโปรตีนฟอติลินยีสต์ที่เหมาะสมในการผสมอาหารเลี้ยงกุ้งขาวคือระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการให้อาหาร พบว่าหลังจากกุ้งได้รับอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอติลินยีสต์ทั้ง 2 ความเข้มข้นคือ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้ผสมโปรตีนฟอติลินยีสต์โดยมีค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรคตัวแดงดวงขาวคิดเป็น 76.19 ± 8.24 และ 66.67 ± 8.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลการทดลองในกุ้งหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 3 สัปดาห์ พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ได้รับโปรตีนฟอติลินยีสต์ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดที่ไม่ได้ผสมโปรตีนฟอติลินยีสต์ แต่ค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรคต่ำกว่าหลังการให้อาหาร 2 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่า อาหารที่ผสมโปรตีนฟอติลินยีสต์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านทานโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ **Tonganunt และคณะ (2008)** ที่ทดลองฉีด **rPm-fortilin** ให้กุ้งกุลาดำหลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า **rPm-fortilin** ช่วยให้กุ้งกุลาดำชุดดังกล่าวรอดตาย 80-100 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสในระดับที่ต่ำมาก ขณะที่ในกุ้งที่ใกล้ตายตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นจำนวนมาก เช่นเดียวกับการศึกษาของ **Nupan และคณะ (2011)** ซึ่งศึกษาผลของ **Pm-fortilin** ต่อการแสดงออกของยีนไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ได้แก่ ยีน **VP28** โดยการ **inoculated** เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวบนเซลล์ **sf9_{empty}** (ไม่มีฟอติลิน) เปรียบเทียบกับเซลล์ **sf9_{Pm-fortilin}** (มีฟอติลิน) พบว่าหลังจากเซลล์ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 1 2 และ 3 วัน การแสดงออกของยีน **VP28** บนเซลล์ **sf9_{Pm-fortilin}** ลดลงอย่างต่อเนื่องและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างชัดเจนในวันที่ 3 หลังการได้รับเชื้อ แสดงให้เห็นว่า **Pm-fortilin** สามารถลดการแสดงออกของยีนบางชนิดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยการยับยั้งการ **replication** ของไวรัส ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานการตายของเซลล์ด้วย **Graidist และคณะ (2006)** ศึกษาบทบาทของ **Pm-fortilin** ในการต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ พบว่า **Pm-fortilin** มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับโปรแกรมการตายของเซลล์ (**apoptosis**) คือสามารถป้องกันเซลล์จากการตายได้ และยังตรวจพบปริมาณของโปรตีน **Pm-fortilin** ในระดับสูงในกุ้งกุลาดำขณะที่มีการติดเชื้อไวรัส เป็นไปได้ว่า ฟอติลินที่ผลิตจากยีสต์ในการศึกษารั้งนี้สามารถต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว โดยป้องกันไม่ให้เซลล์ที่ได้รับเชื้อไวรัสเข้าสู่โปรแกรมการตายเช่นเดียวกับผลการศึกษาของ **Graidist และคณะ (2006)** ดังได้กล่าวมาแล้ว

ขณะที่ Flegel และ Pasharawipas (1998) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า โพรแกมการตายของเซลล์หรือ apoptosis นั้นอาจเป็นสาเหตุการตายของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสระยะสุดท้าย และโพรแกมการตายของเซลล์นี้อาจเป็นส่วนหนึ่งของขบวนการ adaptive tolerance ของกลุ่มกุ้งและปู (crustaceans) ที่มีต่อเชื้อไวรัส แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ของการทดลอง กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอสฟอรีลีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าประสิทธิภาพการต้านทานโรคดีที่สุด เมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง รวมทั้งกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารโปรตีนลูกผสมยีสต์ฟอสฟอรีลีสต์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าปริมาณฟอสฟอรีลีสต์ในอาหารมีผลต่อกิจกรรมการต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการให้ฟอสฟอรีลีสต์และปริมาณฟอสฟอรีลีสต์ที่ผสมลงไปในการอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพการต้านทานโรคตัวแดงดวงขาว

2. การแสดงออกของยีน VP28 และยีน β -actin ในกุ้งขาวหลังได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอสฟอรีลีสต์ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านทานโรคตัวแดงดวงขาวดังกล่าวมาแล้วก่อนหน้านี้ จากการศึกษาการแสดงออกของยีน VP28 ในเบื้องต้นนั้น ไม่พบการแสดงออกของยีน VP28 ในชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่เริ่มพบการแสดงออกของยีน VP28 ในชั่วโมงที่ 24 หลังการฉีดเชื้อไวรัส ซึ่งการตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน VP28 ในชั่วโมงที่ 12 นั้น อาจเนื่องจากโปรตีน VP28 เป็นโปรตีนชนิด threonine phosphorylated ซึ่งบ่งชี้ว่าการสร้างโปรตีน VP28 นั้น น่าจะเกิดขึ้นระหว่างที่มีการตัดแปลงของขบวนการสังเคราะห์โปรตีนช่วงสุดท้าย (posttranslational modification) เพื่อสร้างเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (virus maturation) (Xie et al., 2006) ดังนั้นในชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีดเชื้อไวรัสอาจยังเป็นช่วงเริ่มต้นของการสร้างอนุภาคไวรัส จึงทำให้ตรวจไม่พบการแสดงออกของ VP28 นอกจากนี้โปรตีน VP28 เป็นส่วนประกอบสำคัญอยู่ในเยื่อหุ้มแคปซิด (envelope) (Van Hulst et al., 2001) ช่วยในการจับยึดเซลล์ (cell attachment) กุ้งหรือเจ้าบ้าน และช่วยให้เชื้อไวรัสแทรกตัวเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์กุ้งได้ (Yi et al., 2004) ดังนั้น การตรวจพบการแสดงออกของยีน VP28 ย่อมแสดงถึงการมีอยู่ของอนุภาคไวรัสในเซลล์ของเจ้าบ้าน จากผลการทดลอง ตรวจพบการแสดงออกของยีน VP28 ในกุ้งทุกชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสครบ 24 ชั่วโมง และการแสดงออกของยีนในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่าในเวลา 24

ชั่วโมง ไวรัสมักมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคภายในเซลล์ หรือบางส่วนอยู่ในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสร้างอนุภาคไวรัส เมื่อนำกึ่งทดลองที่รอดตายทุกชุดการทดลองจากการฉีดเชื้อไวรัส และกึ่งทดลองหลังจากฉีดเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมง มาหาอัตราส่วนระดับการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin พบการแสดงออกของยีน VP28 ในกึ่งทุกชุดการทดลองที่ 24 ชั่วโมง ที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามกึ่งขบวนการที่รอดตายมีอัตราส่วนระดับการแสดงออกของยีน VP28 ต่อยีน β -actin น้อยกว่ากึ่งทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมง โดยเฉพาะกึ่งทดลองชุดที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนลูกผสมยีสต์ฟอติลิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่รอดตาย จะมีการแสดงออกของยีน VP28 น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น รวมทั้งกลุ่มที่ได้รับโปรตีนฟอติลินยีสต์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าฟอติลินสามารถต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ และปริมาณ ฟอติลินที่ผสมในอาหารนั้น ส่งผลต่อความสามารถในการต้านทานการเกิดโรคตัวแดงดวงขาวเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมาข้างต้น ดังนั้น การศึกษาการแสดงออกของยีน VP28 ช่วยยืนยันผลการทดสอบที่ว่า ฟอติลินสามารถต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งขบวนการ

3. พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งขบวนการภายหลังได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของกึ่งทุกชุดการทดลองแสดงให้เห็นถึงสภาวะการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระยะต่าง ๆ รวมถึงพัฒนาการของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนอนุภาคภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nash และ Akarajamom (1995); Chang และคณะ (1996); Kasomchandra และคณะ (1998) โดยเฉพาะพัฒนาการของนิวเคลียสที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าในระยะเริ่มแรกมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่าง ๆ เช่น กลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เชื่อมทางเดินอาหาร เหงือกและ pleopod โดยนิวเคลียสของเซลล์จะขยายใหญ่ (hypertrophied nuclei) ขึ้นและล้อมติดสีชมพู (eosinophilic intranuclear inclusion bodies) ส่วนเส้นโครมาตินล้อมติดสีน้ำเงินเข้มจะถูกดันไปชิดขอบของนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้น เรียกว่า Cowdry-A type inclusions บางเซลล์จะพัฒนาต่อไปโดยที่นิวเคลียสจะขยายมากขึ้นจนเห็นเป็นช่องว่างใสระหว่าง virogenic stroma และขอบของเส้นโครมาตินที่ติดสีเข้มขึ้น จนเป็นรูปมนทั้ง 2 ด้าน Cowdry-A type inclusion ของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะคล้ายคลึงกับ Cowdry-A type inclusion ของเชื้อไวรัสไอเอชเอ็นวี (Infection Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV) แต่จะแตกต่างกันตรงที่อินคลูชัน (inclusion) ของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นจะมีการพัฒนาต่อไปโดยที่นิวเคลียสจะขยายใหญ่จนเต็มพื้นที่ของไซโตพลาสซึมและล้อมติดสีน้ำเงินอ่อน (weakly basophilic colour)

ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไอเอสเอชเอ็นวี (Lightner, 1966) ขณะที่ Rajendran และคณะ (2005) รายงานการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์เยื่อชั้นใต้ผิวหนังนอกของก้านตาและ pleopod ของกุ้งกุลาดำได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 หลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว อย่างไรก็ตาม จะพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอวัยวะต่างๆ เพิ่มมากขึ้นเมื่อครบ 48 ชั่วโมง เช่น เซลล์เยื่อชั้นใต้ผิวหนัง (subcuticular epithelium) เหงือก ลิมฟอยด์ ออร์แกน เซลล์เยื่อชั้นใต้ผิวหนังนอกของกระเพาะอาหาร (subcuticular epithelium of the stomach) haematopoietic tissue เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับและตับอ่อน และรังไข่ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วไป และหัวใจ เป็นต้น จากนิวเคลียสที่ย้อมติดสีชมพูในระยะแรกจะเปลี่ยนเป็นย้อมติดสีน้ำเงิน (basophilic intranuclear inclusion bodies) และขยายใหญ่จนเต็มพื้นที่ จะเห็นได้ว่าอวัยวะที่ยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ศึกษาในครั้งนี้มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ในชั้น ectoderm และ mesoderm ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Momoyama และคณะ (1995) และ Lightner (1996) ที่รายงานว่าอวัยวะที่ยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ในชั้น ectoderm และ mesoderm แต่จะไม่พบในชั้น endoderm ซึ่งได้แก่ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เป็นต้น นอกจากนี้ Rajendran และคณะ (2005) ยังรายงานว่า ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่นิวเคลียสขยายตัวและนิวเคลียสย้อมติดสีไอโอสิน (eosin) จะพบได้ในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระยะแรก (early stage of infection) ซึ่งจะตรวจพบได้ในชั่วโมงที่ 24-36 หลังการติดเชื้อไวรัสก่อนการแสดงออกของอาการโรคตัวแดงดวงขาว (clinical signs) ซึ่งคณะผู้วิจัยชุดดังกล่าวได้เสนอให้ใช้วิธีการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณก้านตาและ pleopod ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเมื่อไม่สามารถใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการตรวจหาเชื้อไวรัส

สำหรับกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อผ่าน 72 ชั่วโมงขึ้นไปโดยนับจากหลังเริ่มตรวจพบ Cowdry-A type inclusions จะพบว่ามีเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเกิดขึ้น จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อจะถูกทำลาย (necrosis) โดยที่นิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อบางเซลล์จะอัดตัวแน่นติดสีน้ำเงินเข้ม (pyknotic nuclei) และแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (karyonhectic nuclei) ในเวลาต่อมา ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการติดเชื้อไวรัสก่อนที่กุ้งจะตาย ลักษณะการแตกสลายของนิวเคลียสที่พบในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Mohan และคณะ (1998) และ Pantoja และ Lightner (2003) ที่ตรวจพบลักษณะ necrosis ที่ลิมฟอยด์ออร์แกน โดยมีนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสอัดตัวแน่น (pyknotic nuclei) และแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (karyonhectic nuclei) ในที่สุด นอกจากจะพบว่า การตายของเซลล์ที่เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นการตายแบบ necrosis แล้ว Wongprasert และคณะ (2003) ได้ศึกษากระบวนการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแสงผ่าน (transmission electron) เทคนิคการย้อม

4,6-dimidine-2-phenyl indole dihydrochloride and TdT-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) และการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ **caspase-3** ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าในชั่วโมงที่ **6** หลังได้รับเชื้อไวรัสนิวเคลียสของเซลล์มีการเคลื่อนย้ายโครมาตินไปที่ขอบของนิวเคลียส และภายใน **24** ชั่วโมง ตรวจพบอนุภาคไวรัสทั้งที่มีผนังหุ้ม และยังไม่ผนังหุ้มอยู่ในนิวเคลียส ในระยะสุดท้ายอนุภาคไวรัสจะหลุดออกจากนิวเคลียส นอกจากนั้นยังพบการแยกตัวของโครมาตินในชั่วโมงที่ **6** ขณะที่นิวเคลียสเกิดการอัดตัวแน่น (**nuclear condensation**) และแตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ (**fragmentation**) การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของนิวเคลียสในลักษณะดังกล่าวคล้ายกับการเกิด **apoptosis** ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ยืนยันว่าลักษณะที่พบนั้นเป็นโปรแกรมเซลล์ตาย หรือ **apoptosis** จริงโดยตรวจสอบยืนยันผลด้วยเทคนิค **TUNEL** และ การตรวจสอบกิจกรรมของ **caspase-3** นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยชุดดังกล่าวยังพบอีกด้วยว่า **apoptosis** ที่เกิดขึ้นนั้น จะพบในเซลล์ที่ไม่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แสดงว่าขบวนการ **apoptosis** นั้นเกิดขึ้นภายหลังจากที่กึ่งได้รับเชื้อไวรัสแล้ว จากนั้น กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสในระยะสุดท้ายจะทยอยตายไปเรื่อยๆ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากเซลล์และเนื้อเยื่อในอวัยวะต่าง ๆ ถูกทำลายจากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

สำหรับกึ่งทดลองในชุดการทดลองที่ **4** ซึ่งเป็นชุดที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอดีลินีสต์ที่ระดับ **0.5** เปอร์เซ็นต์ นาน **1-2** สัปดาห์ พบว่ากึ่งเริ่มตายในวันที่ **2** หลังการฉีดเชื้อไวรัส เช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่น ๆ แต่หลังการให้อาหาร **3** สัปดาห์ กึ่งเริ่มตายในวันที่ **3** หลังการฉีดเชื้อไวรัสตามลำดับ จะเห็นได้ว่ากึ่งมีการตายช้าลง ขณะที่ชุดการทดลองที่ **5** ซึ่งได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอดีลินีสต์ที่ระดับ **1.0** เปอร์เซ็นต์ กึ่งเริ่มตายในวันที่ **2** หลังการฉีดเชื้อไวรัสเช่นเดียวกับกึ่งทดลองกลุ่มอื่นในอัตราการตายที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม อัตราการตายของกึ่งในชุดการทดลองที่ **5** นี้สูงกว่าชุดการทดลองที่ **4** เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของกึ่งในชุดการทดลองที่ **4** และ **5** ซึ่งตายช้ากว่าชุดการทดลองที่ **1** พบว่ามีความใกล้เคียงกันกล่าวคือ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อของกึ่งในชั่วโมงที่ **24** และ **48** แต่จะเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงในชั่วโมงที่ **72** ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่างๆ นิวเคลียสของเซลล์ที่เรียกว่า **Cowdry-A type inclusions** โดยนิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้นและย้อมติดสีชมพู (**eosinophilic intranuclear inclusion bodies**) ส่วนเส้นโครมาตินจะถูกดันไปชิดขอบของนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้นย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม มีการพัฒนาการของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสในอวัยวะต่างๆ เพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป จากนิวเคลียสที่ย้อมติดสีชมพูจะเปลี่ยนเป็นติดสีน้ำเงิน (**basophilic intranuclear inclusion bodies**) และขยายใหญ่จนเต็มพื้นที่ จากนั้นกึ่งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะทยอยตาย เซลล์จะที่ติดเชื้อจะถูกทำลาย นิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อบางเซลล์จะอัดตัวแน่นและแตก

ออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แต่เมื่อทดลองครบ 5 วัน พบว่ายังมีกึ่งเหล็อรอดอยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ 4 ที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอดีลินอีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดในแต่ละสัปดาห์เป็น 55.00 ± 15.00 76.19 ± 8.24 และ 72.73 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งกึ่งที่รอดนั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ การที่พบว่ากึ่งที่กินอาหารผสมโปรตีนฟอดีลินอีสต์ทั้ง 2 สูตร (0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1.0 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดที่ 1 2 และ 3 นั้น เป็นไปได้ว่าฟอดีลินที่ผสมในอาหารมีคุณสมบัติในการต้านการตายของเซลล์ Li และคณะ (2001) พบว่าฟอดีลินเป็นโปรตีนที่ต่อต้านการตายของเซลล์ และเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์และการควบคุมการตายของเซลล์ โดยเซลล์ที่รอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ด้วยสาร **etoposide** จะมีการแสดงออกของฟอดีลินที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ **Graidist** และคณะ (2006) ที่พบว่าฟอดีลินของกึ่งที่แสดงออกในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (**mammalian**) สามารถป้องกันการตายของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสาร **etoposide staurosporine cisplatin hydroxyurea** และ **5-fluorouracil (5-FU)** ได้ และสันนิษฐานว่าฟอดีลินของกึ่ง สามารถต่อต้านการตายของเซลล์ได้ เช่นเดียวกับฟอดีลินของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม **Bangrak** และคณะ (2004) ศึกษาการแสดงออกของ **Pm-fortilin** ในกึ่งกุลาดำกับโรคตัวแดงดวงขาว พบว่าการแสดงออกของฟอดีลินจากเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกุลาดำปกติและกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวระยะแรก (24 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ) มีความแตกต่างจากกึ่งกุลาดำที่ใกล้ตาย (**moribund**) โดยกึ่งที่ใกล้ตายจะมีการแสดงออกของฟอดีลิน ที่น้อยมาก จึงคาดว่าฟอดีลินในกึ่งมีความสำคัญในการป้องกันการตายของกึ่งจากติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ **Graidist** และคณะ (2006) ที่พบการแสดงออกของยีน **Pm-fortilin** ในเลือดกึ่งที่เริ่มติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการแสดงออกของยีน **Pm-fortilin** เพิ่มขึ้นกว่าในกึ่งปกติประมาณ 5 เท่า และกึ่งใกล้ตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวก็มีการแสดงออกของยีน **Pm-fortilin** ในระดับที่ต่ำมาก ขณะที่ **Tonganunt** และคณะ (2008) ทดลองนำโปรตีนฟอดีลินมาประยุกต์ใช้กับโรคตัวแดงดวงขาวในกึ่งทะเล โดยผลิตโปรตีน **rPm-fortilin** ซึ่งเป็นโปรตีนลูกผสมจากแบคทีเรีย **E. coli M15** ทดลองฉีดเข้ากล้ามเนื้อกึ่ง (10 μ g/PBS 100 μ l) หรือผสมอาหารให้กึ่งกุลาดำ (300 mg/kg of body weight/ day) เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ผลปรากฏว่ากึ่งที่ได้รับการฉีด **rPm-fortilin** กึ่งรอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในกึ่งรอดตายจะมีระดับต่ำ ถึงแม้ว่ายังไม่ทราบถึงกลไกการทำงานของฟอดีลินในการลดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่เป็นไปได้ว่า ฟอดีลินมีส่วนในการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (**replication**) ของอนุภาคไวรัสภายในเซลล์ (**Tonganunt et al., 2008**) คณะผู้วิจัยสรุปว่า **rPm-fortilin** เป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ป้องกันโรคไวรัสในกึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่ากึ่งในชุดการ

ทดลองที่ 4 และ 5 ที่กินอาหารผสมโปรตีนฟอตินีสต์ทั้ง 2 สูตร (0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1.0 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดที่ 1 2 และ 3 โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ 4 ที่ได้รับอาหารผสมโปรตีนฟอตินีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดในแต่ละสัปดาห์เป็น 55.00 ± 15.00 76.19 ± 8.24 และ 72.73 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในกึ่งรอดตายจะมีระดับต่ำ และกึ่งที่รอดตายนั้นตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อในอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาการใช้ฟอสฟอรัสในอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทานโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การเสริมโปรตีนลูกผสมฟอสฟอรัสจากยีสต์ที่ระดับ **0.5** และ **1.0** เปอร์เซ็นต์ในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา **3** สัปดาห์ไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวในส่วนของ ปริมาณเม็ดเลือดรวม เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแยกตามชนิด เปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอม ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม กิจกรรมเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส และการสร้างอนุภาคอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ของเซลล์เม็ดเลือด อย่างไรก็ตามการเสริมโปรตีนฟอสฟอรัสมีผลต่อความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

2. กุ้งที่ได้รับโปรตีนฟอสฟอรัสสามารถต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้มากขึ้น โดยกุ้งที่ได้รับโปรตีนฟอสฟอรัสที่ **0.5** เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายจากการได้รับเชื้อตัวแดงดวงขาว **72.73±0.00** เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ **3** ซึ่งสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงว่าปริมาณฟอสฟอรัสลูกผสมจากยีสต์ที่เหมาะสมในการนำไปผสมอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจากการศึกษาครั้งนี้คือ **0.5** เปอร์เซ็นต์

3. การให้อาหารที่มีฟอสฟอรัสลูกผสมจากยีสต์ต่อเนื่องเป็นเวลามากกว่า **1** สัปดาห์สามารถเพิ่มความต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งได้ และการให้อาหารที่มีฟอสฟอรัสลูกผสมจากยีสต์เป็นเวลา **2** และ **3** สัปดาห์ส่งผลให้กุ้งต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยมีอัตราการรอดตายสัมพัทธ์สูงกว่า **70** เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการให้อาหารที่มีโปรตีนฟอสฟอรัสต่อเนื่องเป็นเวลา **3** สัปดาห์ ส่งผลให้ความต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ที่ **2** แสดงว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหารที่มีฟอสฟอรัสลูกผสมจากยีสต์คือ **2** สัปดาห์

4. กุ้งที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนฟอสฟอรัส เมื่อนัดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อของกุ้งในช่วงเวลาที่ **24** และ **48** หลังการติดเชื้อไวรัส แต่จะเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาที่ **72** ซึ่งต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารควบคุม กุ้งที่ได้รับอาหาร

ผสมยีสต์เปล่าและกึ่งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์และพลาสติกเปล่า ที่พบลักษณะพยาธิสภาพของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในชั่วโมงที่ 24 48 และ 72 หลังการฉีดเชื้อไวรัสตามลำดับ แสดงว่าโปรตีนฟอตินยีสต์สามารถลดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยที่กึ่งที่รอดตายนั้น ตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อในอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลของโปรตีนฟอตินยังไม่เด่นชัด ทั้งนี้อาจได้รับผลจากสารอื่นที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น เบต้ากลูแคนและแมนแนน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของโปรตีนฟอตินเพียงอย่างเดียว โดยทำการสกัดโปรตีนฟอตินลูกผสมก่อนนำมาผสมกับอาหาร

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2550. โรคและการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง (กุ้งทะเล/ปลาทะเล). สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- กฤษณา จรรยาพูน. 2548. พื้นฐานการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน. สาขาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต. ขอนแก่น:โรงพิมพ์แอนนาออฟเซต.
- กิจการ สุภมาตย์, สวัสดิ์ ศีลาเกษ และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2539. เอกสารคำสอนวิชา 530-331: โรคและพยาธิปลา (Fish disease and parasites). ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กิจการ สุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา ศิริรัฐนิคม และนรินทร์ สงสีจันทร์. 2543ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ IV: การศึกษาค่าปกติของระบบภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 597-603.
- กิจการ สุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุตินา ดันติกิตติ และ Hoffmam, R.W. 2543ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ II: เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 582-588.
- จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุญยรัตผลิน, เรวัต คงประดิษฐ์ และอุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์. 2538. ไวรัสรูปแท่ง สาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ 3 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา.
- จารุวรรณ ชินกร. 2550. ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชะลอ ลิมสุวรรณ. 2544. กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์.
- มฤดี สิทธิพันธ์ .2541. การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- อัญชลี ทศนาขจร. 2551. สถานภาพงานวิจัยด้านระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง. เอกสารประกอบการบรรยายหน่วยวิจัยอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemistry* (15thed). Washington D.C. 1298
- Arcunil, F., Papal, S., Carducci, A., Romagnoli, R., Liberatori, S., Riparbelli, M.G., Sanchez, J.C., Tosi, P. and Vecchio, M.T. 2004. Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: Expression, distribution, and calcium binding activity. *The Prostate* 60: 130-140.
- Arts, J.A., Comelissen, F.H., Cijssouw, T., Hemsen, T., Savelkoul, H.F. and Stet, R.J. 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 504-13.
- Bachere, E., Miahle, E. and Rodriguez, J. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate), prospects and applications. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 597-612.
- Bangrak, P., Graidist, P., Chotigeat, W. and Phongdara, A. 2004. Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from *Penaeus monodon* shrimp. *Journal of Biotechnology* 108: 219-226.
- Bhisutthibhan, J., Pan, X.Q., Hossler, P.A., Walker, D.J., Yowell, C.A., Carlton, J., Dame, J.B. and Meshnick, S.R. 1998. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J. Biol. Chem* 273: 16192-16198.
- Bohm, H., Berndorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Numberg, P., Kraft, R., Otto, A. and Bielka, H. 1989. The growth related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 19: 277-286.
- Bommer, U.A. and Thiele, B.J. 2004. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem Cell Biol.* 36: 379-85.
- Burgents, J.E., Burnett, K.G. and Burnett, L.E. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture* 231: 1-8.

- Cereghino, G.P.L. and Cregg J.M. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 422-427.
- Chang C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. and Liao, I.C. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 15: 297-310.
- Chang J., Zhang W., Mai, K., Ma, H., Liufu, Z., Wang X., Ai, Q. and Xu, W. 2011. Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*. *Aquacult. Res.* 42: 1101-1109.
- Chang P.S., Lo, C.F., Wang Y.C. and Kou, G.H. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 27: 131-139.
- Chitpatima, S.T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R. and Brawerman, G. 1988. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton peptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 2350.
- Chotikachinda, R., Lapjatupon, W., Chaisilapasung S., Sangsue, D. and Tantikitti, C. 2008. Effect of inactive yeast cell wall on growth performance, survival rate and immune parameters in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30: 687-692.
- Chou, H.Y., Huang C.Y., Wang C.H., Chiang H.C. and Lo, C.F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 27: 131-139.
- Corbel, V., Zuprizal, Z., Shi, C., Huang R., Sumartono, Arcier, J-M and Bonami, J.R. 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Diseases* 24: 377-382.
- Davis, M.E., Maxwell, C.V., Erf, G.F., Brown, D.C., and Wistuba, T.J. 2004. Dietary supplementation with phosphorylated **mamans** improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82:1882-1891.

- Destounieux, D., Muñoz, M., Bulet, P. and Bachere, E. 2000a. Penaeidins: a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp: crustacea decapoda. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1260-1271.
- Destounieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M. and Bachere, E. 2000b. Penaeidins: antimicrobial peptides with binding activity are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113: 461-469.
- Durand, S., Lightner, D.V., Redman, R.M. and Bonami, J-R. 1997. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 29: 205-211.
- Escobedo-Bonilla C.M. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Diseases* 31: 1-18.
- Flegel, T.W. and Pasharawipas, T. 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. *In Advances in Shrimp Biotechnology.* (ed. Flegel, T.W.) 245-253.
- Gaxiola, G., Cuzon, G., Garcia, T., Taboada, G., Brito, R., Chimal, M.E., Paredes, A., Soto, L., Rosas, C. and Wormhoudt, A.V. 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comp. Biochem Physiol.* 140: 29-39.
- Genc, M.A., Aktas, M., Genc, E. and Yilmaz, E. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). *Aquacult. Nutr.* 13: 156-161.
- Graidist, P., Fujise, K., Wanna, W., Sritunyalucksana, K. and Phongdara, A. 2006. Establishing a role for shrimp fortilin in preventing cell death. *Aquaculture* 255: 157-164.
- Graidist, P., Yazawa, M., Tonganunt, M., Nakatomi, A., Lin, C.C.J., Chang, J.Y., Phongdara, A. and Fujise, K. 2007. Fortilin binds Ca^{2+} and block Ca^{2+} -dependent apoptosis *in vivo*. *Biochem J* 408: 181-191.
- Graidist, P., Phongdara, A. and Fujise, K. 2004. Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-FU-induced cytotoxicity: fortilin-MCL1 interaction in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279: 40868-40875.

- Gross, B., Gaestel, M., Bohm, H. and Bielka, H. 1989. cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucleic Acids Res.* 17: 8367.
- Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T. and Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem Physiol.* 113: 61-66.
- Holmblad, T. and Söderhall, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172: 111-123.
- Humason, G.L. 1979. *Animal tissue techniques*, 4th ed. W.H. Freeman & Co., 118.
- Itani, T., Asano, M., Tolushige, K., Kubodo, K., Nakagawa, A. and Takeno N. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164: 277-288.
- Ji, P.F., Yao, C.L. and Wang Z.Y. 2011. Reactive oxygen system plays as an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defenses against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. *Dis. Aquat. Org.* 96: 9-20.
- Joseph, E.B., Karen, G.B. and Louis, E.B. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture* 231: 1-8.
- Kasomchandra, J., Boonyaratpalin, S. and Itani, T. 1998. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164: 243-251.
- Kim, M., Jung, Y., Lee, K. and Kim, C. 2000. Identification of calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch. Pharmacol. Res.* 23: 633-636.
- Kwiatkowski, S., Hien, T., Glenney, P. and Moran, C. 2009. A study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucans. *J. Inst. Brew.* 115: 151-158.
- Leonard, C., Söderhall, K. and Ratcliffe, N.A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem Mol. Biol.* 15: 803-810.

- Li, P., Wang X., Murthy, S., Gatlin, D.M., Castillec, F.L. and Lawrence, A. L. 2009. Effect of dietary supplementation of Brewer's yeast and GroBiotic®-A on growth, immune responses, and low-salinity tolerance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured in recirculating systems. *J. Appl. Aquacult.* 21: 110-119.
- Li, F., Zhang D. and Fujise, K. 2001. Characterization of fortillin: a novel antiapoptotic protein. *J. Biol. Chem.* 276: 47542-47549.
- Lightner, D.V. 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana: USA. 256.
- Lio-Po, G.D., Lavilla, C.R. and Cruz-Lacierda, E.R. 2001. *Health Management in Aquaculture. Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.*
- Lipke, P.N. and Ovalle, R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180: 3735-3740.
- Lyons, T.P. 1994. *Biotechnology in the feed industry*. Proc. Alltech's 10th Am Symp. Nottingham University Press. 344.
- Martin, G.G. and Graves, B.L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J. Morphol.* 185: 339-348.
- Mohan, C.V., Shankar, K.M., Kulkarni, S. and Sudha, P.M. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis. Aquat. Org.* 34: 9-12.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Kimura, T. and Nakano, H. 1995. Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.* 30: 263-269.
- Montoya, N. and Molina, C. 1995. Optimum supplemental level of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg to diet for white shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Fisheries Science and Technology* 61: 1045-1046.
- Muñoz, M., Cedeno, R., Rodriguez, J., Kraap, W. P. W., Mialhe, E. and Bachere, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191: 89-107.

- Nash, G. and Akarajamom, A. 1995. Sequential histopathology of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus infection in *Penaeus monodon* Fabricius. Asian Shrimp News 3: 2
- Nupan, B., Phongdara, A., Saengsakda, M., Leu, J. H. and Lo, C. F. 2011. Shrimp *Pm-fortilin* inhibits the expression of early and late genes of white spot syndrome virus (WSSV) in an insect cell model. Dev. Comp. Immunol. 35: 469-475.
- Pantoja, C.R. and Lightner, D.V. 2003. Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. Aquaculture 218: 47-54
- Peter, E. S. 1996. The expression of recombinant proteins in yeasts. Curr. Opin. Biotechnol. 7: 517-524
- Raa, J., Roerstad, G., Engstad, R., Robertsen, B. 1992. The use of immunostimulants to increase the resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Shariff IM, Subasinghe RP, Arthur JR, editors. Diseases in Asian Aquaculture II. Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society 1992:39-50
- Rajendran, K.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C. and Rajan, J.J.S. 2005. White spot syndrome virus (WSSV) infection in tiger shrimp *Penaeus monodon*. A non-lethal histopathological rapid diagnostic method using paraffin and frozen sections. Aquaculture International 13: 341-349
- Rao, K.V., Chen, L., Gramasekar, M. and Ramaswamy, K. 2002. Cloning and characterization of calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem 277: 31207-31213
- Refstie, S., Bæverfjord, G., Seim, R.R., Elvebak, O. 2010. Effects of dietary yeast cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. Aquaculture 305: 109-116
- Scholz U., Diaz, G.G., Ricque, D., Suarez, L.E.C., Albores, F.V., Latchford, J.W. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture 176: 271- 283
- Smith, V.J. and Chisholm, J.R.S. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. Fish Shellfish Immunol. 2: 1-31.

- Smith, V.J. and Söderhall, K. 1983. β -1,3 glucan activation of crustacean haemocytes in vitro and in vivo. Biol. Bull. Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole 164: 299-314
- Söderhall, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Fish Diseases 2: 3-23
- Song, Y.L., J.J. Liu, L.C. Chan and Sung, H.H. 1997. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Dev. Biol. Stand. 90: 413-421.
- Sritunyalucksana, K., Gangnomngiw, W., Archakumakom, S., Fegan, D. and Flegel, T. M. 2005. Bacterial clearance and a new differential hemocyte staining method to access immunostimulant activity in shrimp. Dis. Aquat. Org. 63: 89-94
- Sritunyalucksana, K., Wannapapho, W., Lo, C.F. and Flegel, T.W. 2006. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. J. Virol. 80:10734-10742.
- Sturzenbaum, S.R., Kille, P. and Morgan, A.J. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumor protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Biochim Biophys. Acta 1398: 294-304
- Supphanthana, M., Khunrae, P., Thanardkit, P. and Verduyn, C. 2003. Preparation of spent brewer's yeast β -glucan with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Bioresource Technol. 88: 55-60.
- Tonganunt, M., Nupan, B., Saengsakda, M., Suklour, S., Wanra, W., Serapin, S., Chotigeat, W. and Phongdara, A. 2008. The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. Fish Shellfish Immunol. 25: 633-637.
- Van Hulst, M.C. W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Klein Lankhorst, R., and Vlak, J.M. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. J. Virol. 286: 7-22.
- Verlhac, V. and Kiron, V. 2004. Nutrition and immune modulation in aquatic animals. Aqua Feeds: Formulation and Beyond 1: 5-9
- Wang, W. and Zhang, X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune response in shrimp. Fish Shellfish Immunol. 25: 522-527.

- Wang Y.T., Liu, W., Seah, J.N., Lam, C.S., Xiang, J.H. and Korzh, V. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Dis. Aquat. Org.* 52: 249-259.
- Wilson, R., Chen, C. and Ratcliffe, N. A. 1999. Innate immunity in insect: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J. Immunol. Methods* 162: 1590-1596.
- Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukam, S.S., Meeratana, P. and Withyachummankul, B. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.* 55: 3-10.
- Xie, X., Xu, L. and Yang, F. 2006. Proteomic Analysis of the Major Envelope and Nucleocapsid Proteins of White Spot Syndrome Virus. *J. Virol.* 80: 10615-10623.
- Xu, A., Bellamy, A. and Taylor, J.A. 1999. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem J.* 342: 683-689.
- Yenofski, R., Cereghini, S., Krowczyńska, A. and Brawerman, G. 1983. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1197-1203.
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J. and Hu, L. 2004. Vp28 of shrimp White Spot Syndrome Virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37: 726-734.
- Zhang, X., Huang, C. and Qin, Q. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from *Penaeus monodon*. *Antiviral Res.* 61: 93-99.

ภาคผนวก ก

การเตรียมฟอติลินยีสต์

1. การย้าย (transform) โปรตีนฟอติลินลูกผสม (recombinant fortilin protein) เข้าสู่ยีสต์

นำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ YK9 มา streak บนอาหารแข็ง YPD (yeast extract peptone dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD (YPD broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน นำมาถ่ายลงอาหารเหลว YPD ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อไปที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.4-0.6 หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ยีสต์อีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนด้วย 100 mM LiOAC ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แบ่งเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลอดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติม PEG 3350 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 240 ไมโครลิตร, 1 โมล LiOAC ปริมาตร 36 ไมโครลิตร, SS-DNA (carrier DNA) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และพลาสมิดดีเอ็นเอ pEG(KT)-fortilin ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ซึ่งมีตำแหน่งการโคลนฟอติลินเข้าตรงเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ BamHI ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 360 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยน้ำเกลือ (NaCl) 0.9 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไป spread ลงบนอาหารแข็งเอสดีที่ไม่มียูราซิล (SD-Uracil selective media) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 วัน

2 การผลิตโปรตีนฟอติลินจากยีสต์

นำยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YK9 ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pEG(KT)-fortilin มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีกลูโคส (glucose) 2เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เขย่าตลอดเวลาจนเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.3-1.5 นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที ที่ส่วนใส และล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ 2 ครั้ง ด้วยอาหารเหลว YPD ที่ไม่มีกลูโคส ละลายตะกอนเซลล์กลับด้วยอาหารเหลว YPD ที่มีกาแลคโตส (galactose) 2เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลา จนการเพิ่มจำนวนเซลล์ถึงที่ หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่ส่วนใส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1xPBS พีเอช 7.4 นำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dry) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเป็นส่วนผสมในอาหาร

* ทำแห้งด้วยความเย็นที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหารโดยประมาณ (AOAC, 1990)

1. การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์โปรตีนรวม

ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ไม่มีไนโตรเจนให้ได้น้ำหนัก **0.3 - 0.5** กรัม บันทึกน้ำหนักจนถึงทศนิยม **4** ตำแหน่ง ใส่ตัวอย่างลงในขวดวิเคราะห์โปรตีน เติมสารเร่งรวม (catalyst mixture: CuSO_4 7 กรัม, K_2SO_4 100 กรัม) **3** กรัม เติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร **10** มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ **375** องศาเซลเซียส จนสารละลายในขวดเปลี่ยนจากสีดำเป็นสีเขียวใส วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำหลอดโปรตีนมาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร **20** มิลลิลิตร เพื่อละลายตัวอย่าง ต่อหลอดโปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่น โดยให้ปลายท่อข้างที่ต่อกับกระบอกแก้วควมแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริกปริมาตร **40** มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ หยดอินดิเคเตอร์รวมสีม่วงลงไปในกรดบอริก **2 - 3** หยด เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ **45** เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดโปรตีนอย่างช้า ๆ จนมีปริมาตรรวมในหลอด **50** มิลลิลิตร จะเห็นสารละลายในหลอดเป็นสีดำ กลั่นโปรตีนจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริกเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียวแล้วให้กลั่นต่อไปอีก **10** นาที นำหลอดโปรตีนออกจากเครื่องกลั่น นำขวดรูปชมพู่ที่มีกรดบอริกไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน (HCl 0.1 นอร์มอล: ละลาย HCl 9 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปริมาตรใน volumetric flask จนปริมาตรครบ **1** ลิตร) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันรวม

อบด้วยสกัดไขมัน และตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ในตู้อบที่อุณหภูมิ **100** องศาเซลเซียส จนแห้ง วางไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักด้วยสกัดไขมันให้ได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างใส่กระดาษกรองให้มีน้ำหนักอยู่ในช่วง **0.3 - 0.5** กรัม ห่อให้มิดชิด ใส่ท่อตัวอย่างลงในไส้กรองสารที่เตรียมไว้ นำไปใส่ลงในเครื่องสกัดไขมัน เติมสารละลายไตรคลอโรเอทิลีน (trichloroethylene) ปริมาตร **25** มิลลิลิตร ลงในสกัดไขมัน แล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่องสกัดไขมัน เปิดเครื่องสกัดไขมัน ตั้งอุณหภูมิที่ **180** องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง ต้มให้เดือดนาน **30** นาที ล้างตัวอย่าง **20** นาที ทิ้งให้สารระเหยออก **5** นาที ปิดเครื่อง นำด้วยสกัดไขมันออกจาก

เครื่อง นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปใส่ในโถดูดความชื้นจนเย็น ชั่งน้ำหนักด้วยสก็ดไขมัน

3 การวิเคราะห์ความชื้น

อบด้วยครุชชีเบิล (crucible) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส วางไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักด้วยครุชชีเบิล บันทึกน้ำหนักจนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ซึ่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ด้วยครุชชีเบิล ประมาณ 3 กรัม บันทึกน้ำหนักจนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง นำด้วยครุชชีเบิลซึ่งมีตัวอย่างไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อบตัวอย่างข้ามคืน นำด้วยครุชชีเบิลซึ่งมีตัวอย่างที่อบแล้วใส่ในโถดูดความชื้นจนเย็น บันทึกน้ำหนักจนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนกว่าน้ำหนักที่ชั่งได้คงที่หรือลดลงต่ำสุด น้ำหนักของความชื้นคือน้ำหนักที่หายไป

4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

อบด้วยกระเบื้องเคลือบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส วางไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักด้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนัก ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ใส่ในด้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนัก นำไปเผาในเตาเผา (muffle) ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว นำไปใส่ในโถดูดความชื้นจนเย็น นำออกมาชั่งน้ำหนัก

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ก-1

การเตรียมสารเคมีสำหรับงานภูมิคุ้มกัน

1. ฟอรัมาลีน (formaldehyde) 10เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.45 โมล (M)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 1.314 กรัม ไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เติม ฟอรัมาลีน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. โรส เบงกอล (rose bengal) 1.2เปอร์เซ็นต์ใน เอทานอล (ethanol) 50เปอร์เซ็นต์

ชั่ง เบงกอล โรส 1.2 กรัม นำไปละลายใน เอทานอล 50เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแอล-15 (L-15 medium (2x L-15)) (เตรียม ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 350 มิลลิลิตร ให้ความร้อนพออุ่น เทผงแอล-15 จำนวน 1 ชอง/137 กรัม ลงไป ปั่นให้ละลายในน้ำอุ่น หยดกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (N) 1-2 หยด (เพื่อช่วยการละลาย) ปั่นให้ละลายจนหมด วางทิ้งไว้ให้เย็น เติมกลูโคส 5.0 กรัม ปั่นให้ละลาย เติมโซเดียมคลอไรด์ 2.5 กรัม (0.5 เปอร์เซ็นต์) ปั่นให้ละลาย ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้มีพีเอชอยู่ในช่วง 7.4-7.6 หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมี ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำสารละลายมากรองผ่านหัวกรอง (membrane filter) 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารผสมตามตารางเมื่อใช้งาน

Working solution	2xL-15 Free	2xL-15 I (1% P/S)	2xL-15 II (5% FCS + 1% P/S)
2xL-15	-	99ml	94ml
FCS	-	-	5ml
P/S	-	1 ml	1 ml

4. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดแอล-ซิสเตอีน (L-cysteine) 3เปอร์เซ็นต์ ใน อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด 2x L-15 (II) (เตรียมแล้วควรใช้งานทันที)

ซังแอล-ซีสเทอีน 0.3 กรัม นำมาละลายใน 2x L-15 II ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสม และเขย่า (vortex) ให้ละลาย ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีพีเอชอยู่ในช่วง 7.4-7.6 เก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมเม็ดลาเทกบีดส์ (latex bead)

นับจำนวนเม็ดบีดส์ในขวด โดยเจือจางบีดส์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline) 100 เท่า (บีดส์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ซาลิน ปริมาตร 990 ไมโครลิตร) จากนั้นนำมาเขย่าเพื่อให้เซลล์แยกกระจายออกจากกัน นำไปหยอดในฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) คำนวณปริมาณบีดส์ ปรับจำนวนบีดส์ตามที่ต้องการนำไปใช้ โดยเตรียมใน 2xL-15 free

6 แอล-กลูตาราลดีไฮด์ 0.125 เปอร์เซ็นต์ (L-glutaraldehyde)

ดูดแอล-กลูตาราลดีไฮด์สต็อก (50 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมกับ 2xL-15 I ปริมาตร 99.75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เก็บใส่ขวดที่นิ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลิน (phosphate buffer saline: PBS)

ประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl: FW 58.44)	450 มิลลิโมล (26.298 กรัม ต่อ ลิตร)
Na ₂ HPO ₄ (FW 141.96)	10 มิลลิโมล (1.4196 กรัม ต่อ ลิตร)
KH ₂ PO ₄ (FW 136.1)	10 มิลลิโมล (1.361 กรัม ต่อ ลิตร)
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำพีบีเอส 1 เม็ด ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยหัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร นำไปเก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8 ไนโตรบลู เตตรา โซเลียม (nitroblue tetra zolium: NBT)

ซังเอ็นบีทีปริมาณ 4 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อเอ็นบีทีละลายดีแล้ว เติม L-15 II ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

9. ไซโมซาน (zymosan) ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร

ชั่ง ไซโมซาน 2 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเอ็นบีทีสต็อกปริมาตร 1 มิลลิลิตร

10. คาโคไดเลท บัฟเฟอร์ (cacodylate buffer: CAC)

ส่วนประกอบ

โซเดียมคาโคไดเลท (Na cacodylate: FW. 160)	1.07 กรัม (10 มิลลิโมล)
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2 : FW. 111)	0.37 กรัม (6.6 มิลลิโมล) หรือ
แคลเซียมคลอไรด์ 2 น้ำ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: FW. 147)	0.4851 กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2 : FW. 95.2)	5.08 กรัม (100 มิลลิโมล)

หรือ

แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: FW. 203.3) 10.165 กรัม

น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 500 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมคาโคไดเลท 1.07 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.37 กรัม คนหรือปั่นให้ละลาย เติม แมกนีเซียมคลอไรด์ 5.08 กรัม คนหรือปั่นให้ละลาย ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 หลังจากนั้นปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ไม่ต้องกรอง นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ก่อนใช้งานนำ ออกมาวางไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง)

11. ทริปซิน (trypsin) 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งทริปซิน 0.001 กรัม นำไปละลายในคาโคไดเลท บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เมื่อ ละลายดีแล้วนำสารละลายไปกรองด้วยหัวกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร นำไปเก็บใน ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมเสร็จควรใช้งานทันที)

12. แอล-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน (L-dihydroxyphenylalanine: L-DOPA) 0.3 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแอล-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน 0.003 กรัม นำไปละลายในคาโคไดเลท บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เมื่อละลายดีแล้วนำสารละลายไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร (ละลายยากควรละลายทีละน้อย และเตรียมเสร็จควรใช้งานทันที เนื่องจากเป็นสารที่ไวต่อแสงมาก)

13. สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution)

ส่วนประกอบ:

สารละลาย **1:** คอปเปอร์ซัลเฟต 5 น้ำ ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ส่วน

- ชั่ง คอปเปอร์ซัลเฟต **0.015** กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาตร **3** มิลลิลิตร

สารละลาย **2:** โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรท **1** เปอร์เซ็นต์ 1 ส่วน

- ชั่งโซเดียมโพแทสเซียมทาทเรท **0.03** กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาตร **3** มิลลิลิตร

สารละลาย **3:** โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) **1** เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) **0.5** นอร์มอล **50** ส่วน

- ตวงน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาตร **100** มิลลิลิตร นำไปต้ม หลังจากนั้นวางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ **20** กรัม ปั่นให้ละลาย เติมโซเดียมคาร์บอเนต **1.0** กรัม ปั่นให้ละลาย

นำสารละลายทั้งสามมาผสมให้เข้ากันตามสัดส่วน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ **4** องศา

เซลเซียส

14. ฟอลิน รีเอเจนท์ (folin reagent)

เจือจางฟอลิน รีเอเจนท์ **1** ส่วน ต่อน้ำกลั่นมาเชื้อ **9** ส่วน (อัตราส่วน **1:10**) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ **4** องศาเซลเซียส

15. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 2 โมล

ละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ **56.11** กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร **500** มิลลิลิตร

ภาคผนวก ก-2

อุปกรณ์สำหรับงานภูมิคุ้มกัน

1. หลอดฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร (Terumo) พร้อมหัวเข็ม 26G ยาว 1/2 นิ้ว (Terumo)
2. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. ไมโครปิเปต (micropipette) สำหรับดูดจ่ายสาร ขนาด 10-100, 20-200, 100-1000 ไมโครลิตร พร้อมทิป (Tip)
4. สไลด์ริ่มฝ้า (frosted slide) และ แผ่นปิดสไลด์ขนาด 22 x 22 และ 24 x 60 มิลลิเมตร
5. ชุดเครื่องแก้วย้อมสไลด์ (โถแก้ว, แร็กใส่สไลด์)
6. สไลด์นับเม็ดเลือด ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) และเคาเตอร์ (counter)
7. กล้องจุลทรรศน์ (Zeiss รุ่น Exioskop 2plus)
8. แท่งแก้ววัดตัวอย่าง (glass probe)
9. เครื่องผสมสารเคมี (mixer) ของ Vortex รุ่น Genie
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ของ sigma รุ่น 2K 15
11. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V
12. เครื่องอ่านไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม (microplate reader) ของ Biotech รุ่น ELX 800

ภาคผนวก ก-3

การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดและการแยกชนิดเม็ดเลือด (total haemocyte count (THC) and differential haemocyte count (DHC))

1. สารเคมี (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

1. ฟอर्मาลิน (formalin) 10เปอร์เซ็นต์ ใน โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.45 โมล (M)
2. โรส เบงกอล 1.2เปอร์เซ็นต์ ใน เอทานอล 50เปอร์เซ็นต์
3. สีมาท็อกไซลิน (พร้อมใช้งาน)
4. เอทานอล 95 และ 100เปอร์เซ็นต์
5. ไซลีน (xylene) (พร้อมใช้งาน)
6. เพอร์เมาท์ (permount) (พร้อมใช้งาน)

2. อุปกรณ์

1. หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมหัวเข็ม (Needle) 26G ½”
2. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. กระจกน้ำแข็ง (ice box)
4. สไลด์และ แผ่นปิดสไลด์แบบยาว (slide & cover glass)
5. ไมโครปิเปต (micropipette), blue tip, yellow tip
6. กล้องจุลทรรศน์
7. ตั้วนับเซลล์

3. วิธีการ

1. เจาะเลือดกึ่งด้วยหลอดฉีดยา ใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น
2. ใช้ไมโครปิเปต ดูดเลือดกึ่งจากข้อ 1. ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มีฟอर्मาลิน 10เปอร์เซ็นต์ อยู่ 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที (สามารถปรับเปลี่ยนปริมาณได้ตามปริมาณเลือดที่เจาะได้ สัดส่วนเลือด ต่อ ฟอर्मาลิน 10เปอร์เซ็นต์ = 1:1)

- 3 หากต้องการนับในวันที่เก็บตัวอย่างให้วางตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในกรณีไม่สามารถนับได้ในวันที่เก็บตัวอย่างให้เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเก็บเกิน 2 วัน
- 4 ใช้ ไมโครปิเปต ดูดเลือดที่ผสมฟอร์มาลิน โพลคบนสไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)
- 5 นับปริมาณเม็ดเลือด และคำนวณผล รายงานปริมาณเม็ดเลือดเป็น จำนวนเซลล์/ มิลลิลิตร เลือด
- 6 ใช้ ไมโครปิเปต ดูดเลือดกึ่งจากข้อ 2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี โรสเบงกอล 1.2 เปอร์เซ็นต์ อยู่ 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที (สามารถปรับเปลี่ยนปริมาณได้ตามปริมาณเลือดที่เจาะได้ สัดส่วนเลือด ต่อ โรสเบงกอล 1.2 เปอร์เซ็นต์ = 1:1)
- 7 วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
- 8 ใช้ ไมโครปิเปต ดูดเลือดผสมโรสเบงกอล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดบนแผ่นสไลด์เพื่อทำแผ่นฟิล์มเม็ดเลือด
- 9 วางสไลด์ให้แห้งและนำไปย้อมสี ฮีมาท็อกไซลิน ตามขั้นตอนดังนี้
แช่ใน ฮีมาท็อกไซลิน 7-10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่น 10 นาที ต่อมาจุ่มใน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 10 จุ่ม จุ่มใน เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 10 จุ่ม จากนั้นแช่ในไซลีน 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (mount)
- 10 แยกชนิดเม็ดเลือดโดยนับใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย $\times 100$

ภาคผนวก ก-4

การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis)

1. สารเคมี (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

1. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด (L-15 reagent)
2. สารกันการแข็งตัวของเลือด (L-cysteine)
3. แอล-กลูตาาราลดีไฮด์ (L-glutaraldehyde) 0.125 เปอร์เซ็นต์ ใน L-15 I
4. ดิพควิก (Dip-Quick)
5. ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลิน (phosphate buffer saline; PBS), pH 7.4-7.6
6. ไซลีน (พร้อมใช้งาน)
7. เปอร์เมาท (พร้อมใช้งาน)

2. อุปกรณ์

1. หลอดชนิดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมหัวเข็ม 26G ½”
2. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. กระตักน้ำแข็ง
4. สไลด์และ แผ่นปิดสไลด์
5. ไมโครปิเปต, blue tip, yellow tip
6. เม็ดพลาสติก (latex bead)
7. กล้องจุลทรรศน์
8. ตั้วนับเซลล์

3. วิธีการ

1. เจาะเลือดกึ่งด้วยหลอดชนิดยา ใส่เลือดลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น
2. ใช้ไมโครปิเปต ดูดเลือดกึ่งจากข้อ 1. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือด (5% L-cysteine) อยู่ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 II ปริมาตร 1,460 ไมโครลิตร (730 ไมโครลิตร x 2 ครั้ง) ผสมให้เข้า

3. ใช้ไมโครปิเปต คูดตัวอย่างเลือดจากข้อ 2 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีเม็ดพลาสติกอยู่ 100 ไมโครลิตร (1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วย ไมโครปิเปต
4. ใช้ไมโครปิเปต คูดตัวอย่างจากข้อ 3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ซึ่งมีแผ่นปิดสไลด์ติดอยู่ ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ
5. บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
6. เมื่อครบ 60 นาที ใช้ไมโครปิเปตคูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และตรึงเซลล์ด้วย แอล-กลูตาราลดีไฮด์ 0.125 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที
7. ใช้ไมโครปิเปตคูดแอล-กลูตาราลดีไฮด์ 0.125 เปอร์เซ็นต์ ทิ้ง และนำสไลด์ไปล้างในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS) หลาย ๆ ครั้งเพื่อล้างเม็ดพลาสติกออก
8. ย้อมสไลด์ด้วยสี Dip Quick (eosin, methylene blue) โดยจุ่มใน เมทานอล (methanol) 5 ครั้ง จากนั้นจุ่มใน Sol. A 8 ครั้ง ต่อมาจุ่มใน น้ำกลั่น 5 ครั้ง จุ่มใน Sol. B 5 ครั้ง และจุ่มในน้ำกลั่น 5 ครั้ง ชบน้ำออกให้หมด
9. ทิ้งให้แห้ง และนำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4 การคำนวณ

$$\text{Phagocytic Activity (PA, \%)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่กิน bead}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Phagocytic Index (PI, bead/cell)} = \frac{\text{จำนวน bead ทั้งหมดที่เม็ดเลือดกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่กิน bead}}$$

ภาคผนวก ก-5

การสร้างซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^- production)

1. สารเคมี (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข)

1. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด (L-15 free and L-15 II)
2. ไนโตรบลูเตตราโซเลียม (nitroblue Tetrazolium; NBT)
3. ซัยโมซาน (zymosan)
4. เมทานอล (methanol)
5. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2 โมล (2M potassium hydroxide; 2MKOH)
6. ไดเมทิลซัลไฟด์ฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO)

2. อุปกรณ์

1. หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมหัวเข็ม (Needle) 26G ½”
2. หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. กระติกน้ำแข็ง (ice box)
4. ไมโครปิเปต, blue tip, yellow tip
5. multichannel pipette
6. ไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader)
7. sterile 96 well plate flat bottom

3. วิธีการ

1. เจาะเลือดกึ่งด้วยหลอดฉีดยา ใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น
2. ใช้ไมโครปิเปตดูดเลือดกึ่งจากข้อ 1. ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี 5% L-cysteine อยู่ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 II ปริมาณ 1,460 ไมโครลิตร (730 ไมโครลิตร x 2 ครั้ง) ผสมให้เข้า
3. ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างเลือดจากข้อ 2 ใส่ใน 96 well plate จำนวน 9 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร
4. บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที

5. เมื่อครบ 60 นาที ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะออก 3 ครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ **multichannel pipette**
6. เติมสาร **2xL-15 II/DW (1/1 v/v)**, **NBT**, และ โซโมซาน+NBT ปริมาณ **100 ไมโครลิตร** สารละ **3** หลุม
7. บ่มในกล่องความชื้นในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง **60** นาที
8. ใช้ ไมโครปิเปตดูดสารในแต่ละหลุมทิ้ง **100** ไมโครลิตร และเติม เมทานอล **100** เปอร์เซ็นต์ หลุมละ **100** ไมโครลิตร ทิ้งไว้ **3** นาที
9. ล้างเพลท ด้วยเมทานอล **70** เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร **100** ไมโครลิตร **3** ครั้ง และทิ้งให้แห้ง
10. เติม **120** โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ **2** โมล ปริมาตร **120** ไมโครลิตร + **DMSO** ปริมาตร **140** ไมโครลิตร ทิ้งไว้ **5** นาที
11. อ่านค่า **OD** ด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ ที่ **620** นาโนเมตร

4 การคำนวณ

$$O_2 \text{ production ratio} = \text{Zymosan}/2xL-15 \text{ II/DW}$$

ภาคผนวก ก-6

ฟีนอลออกซิเดสแอกติวิตี (phenoloxidase activity)

1. สารเคมี (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก 1)

1. คาโคไดเลท บัฟเฟอร์ (cacodylate buffer; CAC buffer)
2. ทริปซิน (trypsin 1 มิลลิกรัม/CAC buffer 1 มิลลิลิตร)
3. แอล-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน (L-dihydroxyphenylalanine; L-DOPA)
4. alkaline copper solution
5. folin reagent
6. bovine serum albumin (BSA)

2. อุปกรณ์

1. หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมหัวเข็ม (Needle) 26G ½”
2. หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. กระจกก้นน้ำแข็ง (ice box)
4. ไมโครปิเปต, blue tip, yellow tip
5. multichannel pipette
6. ไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader)
7. sterile 96 well plate flat bottom

3. วิธีการ

3.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

1. เจาะเลือดกึ่งด้วยหลอดฉีดยา ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น
2. ใช้ไมโครปิเปตดูดเลือดกึ่งจากข้อ 1. ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี CAC buffer อยู่ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ผสมให้เข้า แช่ในน้ำแข็งแห้ง (สามารถปรับเปลี่ยนปริมาณได้ตามปริมาณเลือดที่เจาะได้ สัดส่วนเลือด ต่อ CAC buffer = 1:1)
3. นำตัวอย่างออกจากน้ำแข็งแห้งหรือ -80 องศาเซลเซียส บดตัวอย่างด้วยหัวบด (ตัวอย่างต้องเย็นตลอดเวลา)

- 4 นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว **16,000xg** เป็นเวลา **10** นาที **4** องศาเซลเซียส
- 5 เก็บส่วนใส (**supernatant**) สำหรับวัดค่า **PO** และโปรตีน

3.2 การวัดค่าพีโอ (PO)

1. การวัดค่า **PO** นำตัวอย่างมาเจือจางใน **CAC buffer**
2. ใช้ ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่ใน **96 well plate** ตัวอย่างละ **3** หลุม ๆ ละ **50** ไมโครลิตร โดยใช้ **CAC buffer** เป็น **Blank**
3. ใช้ **multichannel pipette** ดูดสารละลายทริฟซินใส่ทุกหลุม ๆ ละ **50** ไมโครลิตร
4. บ่มที่อุณหภูมิห้อง **10** นาที
5. ใช้ **multichannel pipette** ดูดสารละลาย **L-DOPA** ใส่ทุกหลุม ๆ ละ **50** ไมโครลิตร
6. บ่มที่อุณหภูมิห้อง **5** นาที
7. นำไปวัดค่า **OD** ทุก **2** นาที ด้วยเครื่อง **microplate reader** เป็นเวลา **20** นาที

3.3 การวัดค่าโปรตีน

1. ทำกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยเตรียม **stock** ของ **standard albumin (BSA)** ความเข้มข้น **1000** ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ผสม **albumin 0.01** กรัม ในน้ำกลั่น **10** มิลลิลิตร) และปรับความเข้มข้นให้ได้ **0, 20, 80, 100, 200, 400, 700, 1000** (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
2. นำ **standard** แต่ละหลอดมาหาปริมาณโปรตีนโดยเติม **alkaline copper solution** ปริมาตร **2** มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง **10** นาที
3. เติม **folin reagent** ปริมาตร **3** มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที และบ่มที่อุณหภูมิห้อง **10** นาที
4. นำไปวัดค่า **OD** ที่ **640** นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น **blank**
5. วัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยเจือจางตัวอย่างด้วย **CAC buffer 500** เท่า และวัดค่าโปรตีนเช่นเดียวกับ **standard**

3.4 การคำนวณผล

1. หาค่า **unit** ของ **PO** จากค่าการเปลี่ยนแปลง **OD (ΔOD)**

จากเครื่องอ่านจะได้ค่า การเปลี่ยนแปลง **OD/min (ΔOD)**

$$\Delta OD = A$$

$$0.001 \Delta OD = 1 \text{ unit}$$

$$\text{ดังนั้น } A \Delta OD = (1 \times A \Delta OD) / 0.001 \Delta OD$$

$$= C \text{ unit/min}$$

2. **PO activity** = $(C \text{ unit/min}) / \text{mg protein}$

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง-1

สารเคมี และอุปกรณ์ศึกษาการแสดงออกของยีน

1. สารเคมีสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน

1. ไตรซอล รีเอเจนท์ (Trizol reagent; Invitrogen)
2. คลอโรฟอร์ม (chloroform)
3. ไอโซโพรพานอล (isopropanol)
4. เอทานอล 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 75%, 100%)
5. DEPC ddH₂O
6. iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad)
7. Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)
8. agarose
9. TBE buffer
10. ethidium bromide
11. VP28 primer
12. β-actin primer

2. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน

1. แท่งแก้วบดตัวอย่าง (glass probe)
2. หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 0.2, 0.5, 1.5 มิลลิลิตร
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Sigma 2-16 KC, Sartorius)
4. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Genie
5. ไมโครปิเปตดูดจ่ายสาร พร้อม ทิป
6. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction: PTC-100 programable thermal controller version 6.0, MJ Research)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบนาโนครอปพร้อมโปรแกรมสำเร็จรูป Gen5 (Epoch, BioTex)

- 8 เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Mini horizontal electrophoresis system Minis-150, MS major science)
- 9 ชุดอุปกรณ์บันทึกแผ่นภาพดีเอ็นเอ (DP-CF-011C, Vilber Lourmat)

ภาคผนวก ง-2

การเตรียมสารในงานพีซีอาร์ (PCR)

1. สารละลาย 10x TBE buffer พีเอช 8.0

ชั่งทริสมาเบส (tris base 99.9 เปอร์เซ็นต์: $C_4H_{11}NO_3$; FW 121.14) 108 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นมาเชื่อปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมกรดบอริก (boric acid 99.5%: H_3BO_3 ; FW 61.83) 55 กรัม ผสมให้ละลายจนหมด เติมอีดีทีเอ (sodium EDTA: $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$; FW 372.2) 0.5 โมล (พีเอช 8.0) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร นึ่งมาเชื่อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 1x TBE buffer พีเอช 8.0

เจือจางสารละลาย 10x TBE buffer 1 ส่วน ต่อ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที 9 ส่วน ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 0.5x TBE buffer พีเอช 8.0

เจือจางสารละลาย 10x TBE buffer 0.5 ส่วน ต่อ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที 9.5 ส่วน ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. อีดีทีเอ (EDTA) 0.5 โมล พีเอช 8.0

ชั่งอีดีทีเอ 186.1 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นึ่งมาเชื่อด้วยไอน้ำอีกครั้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. สารละลายเอทีเคียมโบรไมด์ (เจือจาง 20,000 เท่า)

คูเคทีเคียมโบรไมด์ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายสต็อก) 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งมาเชื่อแล้ว 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เก็บในขวดสีชา (ป้องกันแสง) ที่อุณหภูมิห้อง

6 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH: FW 40) 8 มิลลิโมล (mM) พีเอช 9.0

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ **0.32** กรัม นำไปละลายในน้ำปริมาตร **900** มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ **9.0** จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำให้มีปริมาตร **1000** มิลลิลิตร นำสารละลายกรองผ่านหัวกรองขนาด \varnothing **0.45** ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ **4** องศาเซลเซียส

7. สารละลายโซเดียมซิเตรท (sodium citrate: Na₃C₆H₅O₇·2H₂O: FW 2941) 0.1 โมล ใน เอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมซิเตรท **29.41** กรัม นำไปละลายในเอทานอล **10** เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร **1** ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ **4** องศาเซลเซียส

8 อะกาโรส เจล (agarose gel) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1x TBE buffer พีเอช 8.0

ชั่งอะกาโรส **1.5** กรัม นำไปละลายใน **1x TBE buffer** ปริมาตร **100** มิลลิลิตร ต้มจนกว่าอะกาโรสจะละลายหมด วางไว้จนอุณหภูมิของสารละลายลดลงอยู่ระหว่าง **50-70** องศาเซลเซียส เทสารละลายใส่บล็อกเจล ทิ้งไว้ให้เย็น

ภาคผนวก ง-3

การศึกษาการแสดงออกของยีน

1. การสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างกุ้ง (total RNA extraction)

1. ใช้กรรไกรที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วตัดเหงือกและขาว่ายน้ำใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และใช้กรรไกรตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปชั่งน้ำหนักให้อยู่ระหว่าง 50-100 มิลลิกรัม
2. เติมไตรโซลรีเอเจนต์ (Trizol[®] reagent) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ในหลอดตัวอย่าง บดตัวอย่างให้ละเอียด (homogenization) ด้วยแท่งแก้วบดตัวอย่าง จากนั้นเติมไตรโซลรีเอเจนต์เพิ่ม 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำหลอดที่บดแล้วไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทั้งหมดใส่หลอดใหม่ (ทิ้งตะกอน) วางหลอดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
4. เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือแรง ๆ 15 วินาที (ประมาณ 20 ครั้ง) วางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที
5. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตัวอย่างในหลอดจะแยกออก (phase separation) เป็น 3 ชั้น คือ ชั้นบนสุดมีสีใสเหมือนน้ำคืออาร์เอ็นเอ ชั้นกลางเป็นคราบขาว คือดีเอ็นเอ และชั้นล่างสุดมีสีชมพูคือโปรตีน ดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่
6. เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ (RNA precipitation) เขย่าหลอดเบา ๆ ให้ผสมกัน วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
7. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส เหลืออาร์เอ็นเอตกตะกอนที่ก้นหลอด
8. เติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ (RNA wash) นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง วางหลอดคว่ำลง และตากไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที โดยเปิดฝาหลอดไว้

9. ละลายตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้ง (RNA re-dissolving) ด้วย DEPC ddH₂O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
10. นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นเวลา 10 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส หรือนำไปเข้ากระบวนการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอต่อไป (OIE, 2006)

2 การวัดความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ

1. นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Take-3 option) รุ่น Epoch (BioTek)
2. เครื่องจะคำนวณค่าความบริสุทธิ์และปริมาณของอาร์เอ็นเอรวมมาให้ ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอรวมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 สำหรับปริมาณอาร์เอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครกรัม) จะนำไปใช้ในการปรับปริมาณของอาร์เอ็นเอในการสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA)

3 การสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (Complimentary DNA synthesis: cDNA)

1. ใช้ชุดทดสอบ iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) ในการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น cDNA
2. กำหนดปริมาตรสารที่จะทำปฏิกิริยาตามเอกสารแนบของชุดทดสอบ โดยผสม iScript™ reverse transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ 5x iScript™ reaction mix ปริมาตร 4 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง GMC-260
3. แบ่งส่วนผสมที่เข้ากันดีแล้วใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ปริมาตรหลอดละ 5 ไมโครลิตร
4. เติม Nuclease-free water และ RNA template ตามลำดับ (ปริมาตรของ Nuclease-free water และ RNA template ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ) จนได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง
5. นำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์บรรจุในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมซึ่งตั้งระบบไว้ตามเอกสารแนบของชุดทดสอบ (ตาราง ง-2) เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอ
6. เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำหลอดตัวอย่าง cDNA ไปเก็บที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -18 องศาเซลเซียส หรือนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

ตาราง ง-1 ส่วนผสมและปริมาณของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

No.	Reagents (μ l)	1X (μ l)
1	Nuclease-free water	x
2	iScript reverse transcriptase	1
3	5x iScript reaction Mix	4
4	RNA template (100 fg to 1 ug total RNA)	x
	total	20

ตาราง ง-2 โปรแกรมการสังเคราะห์ cDNA ของชุดทดสอบ iScript™ cDNA Synthesis Kit

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
25	5 นาที
42	30 นาที
85	5 นาที
4	hold

4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป **Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity** ในชุดทดสอบ ประกอบด้วย **50mMMgSO₄**, **10x HIFI buffer** และ **Platinum Taq HIFI**
- นำซีดีเอ็นเอต้นแบบ (**cDNA template**) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยผสมน้ำกลั่นมาเชื้อ ปริมาตร **17.9 ไมโครลิตร**, **10x HIFI buffer** ปริมาตร **2.5 ไมโครลิตร**, **10 mM dNTP mixture** ปริมาตร **0.5 ไมโครลิตร**, **50mMMgSO₄** ปริมาตร **1 ไมโครลิตร**, **Platinum® Taq HIFI** ปริมาตร **0.1 ไมโครลิตร**, **forward primer VP28** หรือ **β -actin** ปริมาตร **1 ไมโครลิตร** และ **reverse primer VP28** หรือ **β -actin** ปริมาตร **1 ไมโครลิตร** ต่อ **1** ตัวอย่าง
- นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (**vortex**) และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง **GMC-260** แบ่งส่วนผสมที่เข้ากันดีแล้วใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ปริมาตรหลอดละ **24 ไมโครลิตร**
- เติมซีดีเอ็นเอต้นแบบหลอดละ **1 ไมโครลิตร**

5. นำหลอดบรรจุในเครื่องเทอร์โมไซเคลอเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
6. เมื่อสิ้นสุดโปรแกรม นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ที่มี **PCR product** ออกจากเครื่อง

5. การแยกสายดีเอ็นเอของ **PCR product** ด้วยเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

และการคำนวณผล

1. เตรียมอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์
2. นำเจลใส่ในบล็อกรูปร่างของเครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิส เติม 1x TBE, pH 8.0 ให้ท่วมเจล
3. ผสม **PCR product** ปริมาตร 5 ไมโครลิตรกับสีย้อม (dye) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร
4. คัดสารผสมทั้งหมด (8 ไมโครลิตร) มาโหลดในหลุมเจล โดยหลุมที่ 1 โหลด **DNA marker (M)** หลุมที่ 2 โหลด **negative control (N)** หลุมที่ 3 โหลด **positive control (P)** และหลุมที่ 4 โหลดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบตามลำดับ
5. เปิดเครื่อง และตั้งค่าการทำงาน โดยใช้ไฟ 100 โวลต์ ทำงานเป็นเวลา 30-50 นาที
6. นำเจลใส่ถาดย้อมด้วยสารละลายเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 30 นาที ล้างเอทิดียมโบรไมด์ออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
7. ตรวจสอบผลของแบนดิเอ็นเอบนแผ่นเจล พร้อมถ่ายภาพด้วยชุดเครื่องอ่านเจลพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
8. นำภาพเจลมาคำนวณหาความเข้มของแบนด์เพื่อคำนวณอัตราส่วนการแสดงผลของยีน **VP28** ต่อยีน β -actin (**VP28/actin ratio**) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป **free quantity one v450 PC**

ภาคผนวก จ

ภาคผนวก จ

ตาราง จ-1 ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD) ของปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC x 10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในกึ่ง
ขา

สัปดาห์ที่	กลุ่มทดลอง				
	1	2	3	4	5
0(initial)	3.68 \pm 1.05 ^{al}	3.64 \pm 0.66 ^{al}	3.50 \pm 0.90 ^{al}	3.73 \pm 1.15 ^{al}	3.81 \pm 1.08 ^{al}
1	3.67 \pm 1.21 ^{al}	3.63 \pm 0.97 ^{al}	3.56 \pm 1.23 ^{al}	3.56 \pm 1.27 ^{al}	3.53 \pm 1.49 ^{al}
2	3.18 \pm 1.19 ^{al}	3.17 \pm 1.92 ^{al}	3.70 \pm 1.74 ^{al}	3.51 \pm 1.20 ^{al}	3.42 \pm 1.74 ^{al}
3	3.15 \pm 1.31 ^{al}	2.96 \pm 1.44 ^{al}	3.04 \pm 0.95 ^{al}	3.35 \pm 1.71 ^{al}	3.03 \pm 1.16 ^{al}

ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P \geq 0.05)

ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในสัปดาห์เดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P \geq 0.05)

ตาราง จ-2 ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD) การแยกชนิดเม็ดเลือด (differential haemocyte count: DHC)
ในกึ่งขา

ชนิดเม็ด เลือด	สัปดาห์ที่	กลุ่มทดลอง				
		1	2	3	4	5
H	0(initial)	75.98 \pm 5.63 ^{al}	76.62 \pm 4.47 ^{al}	76.50 \pm 5.64 ^{al}	76.22 \pm 5.96 ^{al}	74.44 \pm 6.62 ^{al}
	1	75.47 \pm 6.74 ^{al}	74.18 \pm 8.22 ^{al}	74.22 \pm 5.16 ^{al}	76.39 \pm 5.57 ^{al}	71.24 \pm 6.18 ^{al}
	2	74.82 \pm 5.23 ^{al}	74.66 \pm 4.36 ^{al}	72.04 \pm 6.13 ^{al}	73.91 \pm 5.33 ^{al}	71.09 \pm 5.03 ^{al}
	3	74.80 \pm 5.57 ^{al}	73.31 \pm 5.36 ^{al}	72.42 \pm 5.90 ^{al}	72.74 \pm 5.79 ^{al}	70.90 \pm 6.41 ^{al}

S	0 (initial)	13.21±3.34 ^{al}	12.15±3.35 ^{al}	12.06±3.77 ^{al}	12.51±4.53 ^{al}	13.88±4.51 ^{al}
	1	12.75±3.60 ^{al}	13.10±4.87 ^{al}	13.07±3.25 ^{al}	12.49±3.43 ^{al}	16.09±4.04 ^{al}
	2	13.29±4.00 ^{al}	12.88±3.35 ^{al}	12.66±3.46 ^{al}	13.42±3.93 ^{al}	14.71±3.58 ^{al}
	3	13.10±3.51 ^{al}	12.73±3.48 ^{al}	13.30±3.60 ^{al}	13.64±3.69 ^{al}	14.15±3.25 ^{al}
L	0 (initial)	10.81±3.46 ^{al}	11.23±2.32 ^{al}	11.44±3.66 ^{al}	11.27±2.63 ^{al}	11.68±4.41 ^{al}
	1	11.78±4.22 ^{al}	12.71±4.20 ^{al}	12.71±4.20 ^{al}	11.13±3.06 ^{al}	12.68±2.83 ^{al}
	2	11.89±4.03 ^{al}	12.46±2.47 ^{al}	15.30±4.15 ^{al}	12.67±2.56 ^{al}	14.20±2.68 ^{al}
	3	12.10±2.49 ^{al}	13.96±4.62 ^{al}	14.28±3.26 ^{al}	13.63±3.35 ^{al}	14.95±4.01 ^{al}

ตาราง จ-3 ค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) ของความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity: PA) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

สัปดาห์ที่	กลุ่มทดลอง				
	1	2	3	4	5
0 (initial)	22.02±7.34 ^{al}	21.79±5.42 ^{al}	22.87±8.66 ^{al}	22.52±9.07 ^{al}	22.59±7.66 ^{al}
1	22.65±7.58 ^{al}	24.60±4.20 ^{al}	23.87±6.88 ^{al}	21.91±5.43 ^{al}	23.49±4.48 ^{al}
2	23.79±5.20 ^{al}	24.77±7.11 ^{al}	25.74±4.49 ^{al}	26.37±4.51 ^{al}	26.25±6.07 ^{al}
3	23.53±5.29 ^{al}	25.93±4.87 ^{al}	25.50±4.80 ^{al}	26.49±6.23 ^{al}	25.33±5.88 ^{al}

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในสัปดาห์เดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ตาราง จ-4 ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD) ของดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index: PI) ของ เซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาว

สัปดาห์ที่	กลุ่มทดลอง				
	1	2	3	4	5
0(initial)	1.64 \pm 0.23 ^{al}	1.64 \pm 0.23 ^{al}	1.62 \pm 0.18 ^{al}	1.55 \pm 0.19 ^{al}	1.65 \pm 0.21 ^{al}
1	1.58 \pm 0.49 ^{al}	1.55 \pm 0.38 ^{al}	1.54 \pm 0.10 ^{al}	1.52 \pm 0.26 ^{al}	1.48 \pm 0.27 ^{al}
2	1.64 \pm 0.22 ^{al}	1.62 \pm 0.20 ^{al}	1.65 \pm 0.22 ^{al}	1.58 \pm 0.23 ^{al}	1.43 \pm 0.14 ^{al}
3	1.42 \pm 0.18 ^{al}	1.47 \pm 0.18 ^{al}	1.43 \pm 0.20 ^{al}	1.44 \pm 0.15 ^{al}	1.43 \pm 0.20 ^{al}

ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในสัปดาห์เดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ตาราง จ-5 ค่าเฉลี่ย (Mean \pm SD) การสร้างอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2) ของ เซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาว

สัปดาห์ที่	กลุ่มทดลอง				
	1	2	3	4	5
0(initial)	6.62 \pm 1.24 ^{al}	6.13 \pm 1.74 ^{al}	6.57 \pm 1.10 ^{al}	6.42 \pm 1.71 ^{al}	6.26 \pm 1.76 ^{al}
1	6.72 \pm 1.41 ^{al}	6.52 \pm 1.38 ^{al}	6.72 \pm 1.58 ^{al}	6.87 \pm 1.29 ^{al}	6.96 \pm 1.76 ^{al}
2	6.42 \pm 1.60 ^{al}	6.28 \pm 1.33 ^{al}	6.72 \pm 1.53 ^{al}	6.56 \pm 1.39 ^{al}	6.33 \pm 1.58 ^{al}
3	5.71 \pm 1.74 ^{al}	5.83 \pm 1.45 ^{al}	5.83 \pm 1.75 ^{al}	6.12 \pm 1.49 ^{al}	5.95 \pm 1.22 ^{al}

ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในสดมส์เดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ตาราง จ-6 ค่าเฉลี่ย (Mean±SD) การทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO) ของเซลล์เม็ดเลือด
กึ่งขาว

สัปดาห์ที่	กลุ่มทดลอง				
	1	2	3	4	5
0(initial)	224±1.01 ^{al}	233±0.94 ^{al}	232±0.79 ^{al}	223±0.93 ^{al}	213±0.80 ^{al}
1	233±1.42 ^{al}	226±0.90 ^{al}	237±1.29 ^{al}	231±1.19 ^{al}	244±1.25 ^{al}
2	225±0.90 ^{al}	248±1.08 ^{al}	252±1.09 ^{al}	257±1.13 ^{al}	252±1.27 ^{al}
3	231±1.13 ^{al}	266±1.02 ^{al}	272±1.09 ^{al}	288±1.09 ^{al}	281±1.23 ^{al}

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในสดมส์เดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวอรอนงค์ คงทวี
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620036
 วุฒิการศึกษา
 วุฒิ ชื่อสถาบัน ปีที่สำเร็จการศึกษา
 วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2541
 (เทคโนโลยีการประมง) (วิทยาเขตปัตตานี)

ทุนการศึกษาที่ได้รับในระหว่างการศึกษา

ทุนการศึกษาระดับปริญญาโท

- ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
- โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีทางอุตสาหกรรมไทย (iTAP) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
- บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ตำแหน่ง	สถานที่ทำงาน
นักวิชาการประมง	สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง 130/2 หมู่ที่ 8 ต.พะวง อ.เมือง จ. สงขลา 90100 โทรฯ 0-7433-5244-8

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อรอนงค์ คงทวี, ชุตติมา ตันติกิตติ และอมรรรัตน์ พงศ์ดารา. 2554 การประยุกต์ใช้ฟอติลินในอาหาร เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทานโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). วารสารการประมง 64: 320-334

Kongtawee, O., Tantikitti, C. and Phongdara, A. 2012. *Pm*Fortilin supplementation in diets for Immune Stimulation and Resistance Enhancement to White Spot Disease in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Poster presentation on 15th at International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (ISFNF).