

การป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดย

โปรตีน RPS3a และดีเอ็นเอ PAP

Prevention of White Spot Syndrome Viral of White Shrimp

(*Litopenaeus vannamei*) by RPS3a Protein and PAP DNA

อิลฮาม สีอริ

Ilham Sueree

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Molecular Biology and Bioinformatics

Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วน
เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นายอิสฮาม สือรี)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายอิทธาม สีอริ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>) โดยโปรตีน RPS3a และดีเอ็นเอ PAP
ผู้เขียน	นายอิสฮาม สือรี
สาขาวิชา	ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2555

บทคัดย่อ

การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวเพื่อให้สามารถป้องกันตัวเองจากโรคตัวแดงดวงขาวหรือ White spot disease ได้ โดยทดสอบด้วยชีวโมเลกุล 2 ชนิดคือโปรตีน Ribosomal Protein S3a (RPS3a) และดีเอ็นเอ Phagocytosis Activating Protein (PAP) โดยวิธีการกิน (oral) นั้นพบว่าทั้งสองให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน โดยโปรตีนลูกผสม His-RPS3a ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัมที่ให้กุ้งกินต่อวัน ในวันที่ 3 และ 7 ของการให้กินโปรตีนนั้นพบการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase) ในทุกกลุ่มเป็นไปในทางเดียวกัน กล่าวคือมีแนวโน้มสูงขึ้นในทุกกลุ่มหากไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มต่างๆ และเมื่อทำการทดสอบต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบการรอดชีวิตของกุ้งขาวเพียงเล็กน้อย(กลุ่ม pET และ His-RPS3a มีค่าเท่ากับที่ 4.76% RPS) ในขณะที่ดีเอ็นเอ PAP ให้ผลที่ดีต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวโดยพบอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม phMGFP-PAP ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อวันสูงที่สุด (61.89% RPS) ในสภาวะแวดล้อมที่เครียด (เมื่อเลี้ยงกุ้งในน้ำละลายด้วย NaCl อย่างเดียว) ในเวลา 7 วัน และเมื่อดูการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งที่ได้รับ phMGFP-PAP ที่ความเข้มข้นดังกล่าวก็พบว่าในวันที่ 3 ของการได้รับ phMGFP-PAP มีการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสที่สูง (60.33 ± 8.34 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งขาวที่ได้รับพลาสมิดเปล่า phMGFP (34.87 ± 7.06 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) อีกทั้งเมื่อกุ้งได้รับ phMGFP-PAP ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 3 วันนั้นยังพบว่ามีผลต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิสที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้รับพลาสมิดลูกผสมดังกล่าว อย่างไรก็ตามเมื่อกุ้งขาวที่ได้รับ phMGFP-PAP ดังกล่าวเป็นเวลา 3 วันไม่สามารถให้อัตราการรอดชีวิตหลังจากที่กุ้งขาวติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 6 วันได้ แต่ทั้งนี้ยังสามารถชะลอการตายได้โดยชัดเจนในวันที่ 5 (38% RPS) ของการติดเชื้อไวรัสดังกล่าว

Thesis Title	Prevention of White Spot Syndrome Viral of White Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>) by RPS3a Protein and PAP DNA
Author	Mr. Ilham Sueree
Major Program	Molecular biology and bioinformatics
Academic year	2012

Abstract

This study is aim to activated the immune of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to prevented it from the White spot disease. Ribosomal Protein S3a (RPS3a) or recombinant plasmid Phagocytosis Activating Protein (phMGFP-PAP) were orally feeded to the shrimp. His-RPS3a protein at 90 micrograms did not effect the Prophenoloxidase activity. It seems this enzyme activity increased by day3 to day7 post feeded but it is no significant difference between His-RPS3a and non His-RPS3a feeder group and shrimp survived only 4.76% from White spot disease.

While the phMGFP-PAP plasmid was effective to protect shrimp from WSSV as. The shrimp fed with 150 micrograms phMGFP-PAP had the highest relative percent survival (61.89% RPS) when it was in the stress environment (NaCl added water). In addition, when the shrimp fed with 150 micrograms of phMGFP-PAP for 3 days had the higher activity of Prophenoloxidase (60.33 ± 8.34 unit/min/mg.protein) and higher percentage of phagocytosis (32.21 ± 2.42) than phMGFP feeder group. However, these 150 micrograms phMGFP-PAP fed to the shrimp for 3 days before WSSV injected cannot protected the shrimp in 6 days but the shrimp survived (38% RPS) in day5. Therefore, it can conclude that the PAP can activates the immune response in white shrimp and can slow down the dead rate when the shrimp infected by WSSV.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยดูแลให้ความรู้ ตักเตือนในเรื่องความมุมานะในการทำงาน รวมทั้งช่วยเหลือในการทำวิจัยโดยตลอดมา ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์เกษม อัครวีร์ตันกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่เสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และทำการตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ ดร.มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ ที่กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมทั้งมิตรภาพที่ดีที่มีให้กันเสมอมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศทุกท่านที่กรุณาสั่งสอนให้ความรู้ที่มีคุณค่ายิ่งแก่ผู้วิจัย และขอขอบพระคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ สำหรับสถานที่และเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย รวมถึงสนับสนุนทุนการศึกษาในชื่อ ทุนผู้ช่วยสอน (Teacher Assistant)

ขอขอบคุณพี่ตึก ปัญชลิกา เดชะมาก พี่สาวที่แสนดีสำหรับคำแนะนำต่าง ๆ ด้วยความจริงใจ รวมถึงพี่ๆน้องๆและเพื่อนๆทุกคนทั้งพี่ภุช พี่ชายนัน พี่แอร์ พี่ฝน ละมัย ตาล เอิงอาหาร โจ บีทั้งสาม โบทั้งสอง น้องกิ๊ก น้องยุ้ย น้องหงส์ และทุกๆคนที่มีได้เอ่ยนาม ณ ที่นี้ รวมทั้งสมาชิกห้อง BT310 ทุกท่านสำหรับมิตรภาพที่ดีตลอดมา

และที่ลืมเสียมิได้ ขอขอบคุณ คุณแม่ และคุณพ่อ ผู้เป็นตั้งดวงใจ อบรมเลี้ยงดูผู้วิจัยมาแต่เยาว์วัยด้วยศานาและความรัก ครอบครัวยุติธรรมทุกท่านที่เป็นกำลังใจชั้นเยี่ยม ขอขอบคุณครับ

อิลฮาม สีอริ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	19
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	20
วัสดุ	20
อุปกรณ์	23
วิธีการ	24
3. ผลการทดลอง	34
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	45
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	59
ประวัติผู้เขียน	63

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงโรคติดเชื้อในกุ้งทะเล	12
2	ส่วนประกอบของโพลีอะครีลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)	26
3	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า %RPS ของกุ้งขาวในกลุ่มต่างๆหลังจากได้รับไวรัส ตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 15 วัน	38
4	ผลการทดสอบการฟาโกไซโทซิสในกุ้งขาว	43
5	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมและค่า %RPS ของกุ้งขาวในกลุ่ม phMGFP-PAP หลังจากได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 5 วัน	44

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า	
1	ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว	5
2	กระบวนการโพรพีนอลออกซิเดส (proPO)	10
3	แสดงลักษณะของไวรัสตัวแดงดวงขาว	14
4	แสดงลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว (ตัวล่าง) และกุ้งปกติ (ตัวบน)	15
5	แสดงยีนต่างๆที่มีการแสดงออกใน hemocyte ของกุ้งขาวในสภาวะปกติ	18
6	การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน RPS3a ในแบคทีเรีย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ BL21 ที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pET และ pET-RPS3a ด้วยวิธี โพลีอะครีลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue	34
7	แสดงผลการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (proPO) ของแต่ละกลุ่ม การทดลองในวันต่างๆ	36
8	แสดงอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่วันต่างๆภายใน 15 วัน	37
9	แสดงลักษณะของพลาสมิด phMGFP และพลาสมิดลูกผสม phMGFP-PAP	39
10	แสดงอัตราการตายของกุ้งขาวในสภาวะน้ำทะเลเทียมใน 7 วัน	40
11	แสดงผลการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (proPO) ของแต่ละกลุ่มการทดลองในวันต่างๆ	41
12	แสดงภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอม (latex bead) ของเซลล์เม็ดเลือดของ กุ้งขาวในกลุ่มทดลองต่างๆ	42
13	แสดงอัตราการตายของกุ้งขาวในกลุ่มต่างๆ ภายในระยะเวลา 6 วันหลังจาก ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	44

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

β	=	beta
α	=	alpha
μg	=	microgram
kDa	=	kilodalton
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
bp	=	base pair
LB	=	Luria Bertani
min	=	minute
mg	=	milligram
IPTG	=	Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside
w/v	=	weight by volume
OD	=	optical density
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
v/v	=	volume by volume
mM	=	millimolar
M	=	molar
pH	=	$-\log$ hydrogen ion concentrate
TEMED	=	N, N, N, N' -tetramethyl-ethylenediamine
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethyl) aminoethane hydrochloric acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

กุ้ง (Shrimp) นับเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการบริโภคและส่งออก ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมหาศาล โดยเฉพาะประเทศในแถบทวีปอเมริกา เช่น เอกวาดอร์ บราซิล ฮอนดูรัส และเม็กซิโก นั้นมีสัดส่วนของผลผลิตกุ้งประมาณร้อยละ 20 จากผลผลิตโดยรวมทั้งโลก (Lightner, 2011) โดยกุ้งชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงหลักๆ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) และกุ้งน้ำตาลออสเตรเลีย (*Metapenaeis endeavouri*) เป็นต้น (อาทินันท์, 2546) เอเชียก็เป็นทวีปหนึ่งที่ทำรายได้จากการส่งออกกุ้งเป็นจำนวนมหาศาลต่อปี โดยประเทศไทยก็เป็นหนึ่งในประเทศผู้ค้ารายสำคัญที่มีปริมาณการส่งออกกุ้งไปขายยังต่างประเทศมากเป็นอันดับต้นๆ ของเอเชียนับแต่อดีตมา ทำรายได้ให้กับประเทศมากกว่าพันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี (Flegel, 2006) โดยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นต้นมานั้น กุ้งขาวหรือกุ้งแวนนาไม นับเป็นสายพันธุ์กุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมากขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งปี พ.ศ. 2548 ที่มากที่สุดถึงร้อยละ 80 จากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทุกชนิดแทนที่กุ้งกุลาดำซึ่งเป็นที่นิยมเลี้ยงมากกว่าก่อนหน้านี้ ซึ่งประสบปัญหากุ้งโตช้า และผลผลิตที่ไม่แน่นอน ทั้งนี้กุ้งขาวยังมีคุณสมบัติเลี้ยงง่าย โตเร็ว และให้ผลผลิตสูง จึงเป็นที่นิยมของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในไทย (นิติ และคณะ, 2549)

กระนั้นก็ตามในระยะเวลาต่อมาพบว่าการระบาดของโรคหลายชนิดในกุ้งขาวที่มีสาเหตุจากไวรัส โดยเฉพาะไวรัสที่มีชื่อว่า White Spot Syndrome Virus (WSSV) หรือไวรัสตัวแดงดวงขาว (Flegel, 2006) ที่เป็นสาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งหลายชนิดรวมทั้งในกุ้งขาวด้วยนั้น ทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โดยในแถบอเมริกาเฉพาะในปี ค.ศ. 1999 นั้นพบว่าได้สร้างความเสียหายให้กับฟาร์มกุ้งคิดเป็นมูลค่าประมาณ 1-2 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ ส่วนในแถบเอเชียซึ่งพบการระบาดก่อนหน้านี้ในช่วงปี ค.ศ. 1992-1993 ก็มีความเสียหายทางเศรษฐกิจเช่นกันโดยเฉลี่ยราวๆ 6 พันล้านบาท (Lightner, 2011) สำหรับประเทศไทยนั้น

เริ่มพบการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวมาตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2537 เป็นต้นมา (Wongteerasupaya *et al.*, 1996) สร้างความเสียหายมากเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะในช่วงปี ค.ศ. 1996-1997 นั้นประเทศไทยต้องสูญเสียรายได้จากการส่งออกกุ้งประมาณ 1 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ (Flegel, 2006) และปัญหาดังกล่าวยังมีผลต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน

ในอดีตนั้นมีความพยายามแก้ปัญหาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง จนนำไปสู่วิธีการต่างๆ อาทิเช่น การตรวจสอบแม่พันธุ์กุ้งที่จะนำมาเลี้ยงว่ามีการติดเชื้อไวรัสหรือไม่ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) หรือการย้อมเซลล์เหียงและเยื่อบุผิวใต้เปลือกโดยวิธีการ H and E staining (Lighthner 1996, ชลอ, 2543 อ้างโดย สิริลักษณ์, 2545) การนำกุ้งพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (Specific pathogen free, SPF) (Flegel, 2006) มาเพาะเลี้ยง รวมถึงการใช้ผงคลอรีนหรือไตรคลอโรฟอนเติมลงในบ่อเลี้ยงเพื่อฆ่าเชื้อ (นิตติ และคณะ, 2549) อย่างไรก็ตามสิ่งเหล่านี้เป็นเพียงการป้องกันโรคไม่แพร่กระจายเท่านั้น โดยในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อหาวิธีการที่จะช่วยให้กุ้งสามารถต้านทานต่อโรคตัวแดงดวงขาวได้ ทำให้พบวิธีการใหม่ๆ เช่น การใช้เชื้อก่อโรคที่อ่อนแอ (inactivated pathogen) รวมถึงการใช้โปรตีนบางส่วนจากตัวไวรัสที่ก่อโรคไปเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

อย่างไรก็ตามยังมีอีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจคือการใช้โปรตีนหรือดีเอ็นเอวัคซีน (Protein or DNA vaccine) (Fu *et al.*, 2010) โดยในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงวิธีการป้องกันรวมถึงการรักษาโรคตัวแดงดวงขาวโดยประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีวโมเลกุล ซึ่งกล่าวได้ว่าปัจจุบันนี้ความรู้ในเรื่องของยีนรวมทั้งผลผลิตของยีนนั้นนับเป็นเรื่องสำคัญมากในแนวทางสำหรับใช้ศึกษาเพื่อเข้าใจถึงกลไกการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย โดยเฉพาะกุ้ง ซึ่งขณะนี้ยังขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องดังกล่าวนี้ (Robalino *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามการใช้วัคซีนดังกล่าวยังเป็นไปในรูปแบบของการฉีด (injected) ซึ่งสร้างคามยุ่งยากเมื่อต้องการประยุกต์ใช้ในระดับฟาร์ม (Fu *et al.*, 2010)

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาถึงโปรตีนตัวหนึ่งที่มีชื่อว่า Ribosomal Protein S3a หรือ RPS3a ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับหลายประการในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น กระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth), กระบวนการ transformation รวมทั้งยังมีบทบาทในกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) (Kho and Zarbl, 1992 ; Kho *et al.*, 1996 ; Naora *et al.*, 1998 and Russell *et al.*, 2000 อ้างโดย Navakanitworakul *et al.*, 2012) จากการศึกษา

ที่ผ่านมาพบว่า RPS3a มีการแสดงออกอย่างสูงในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Suuda *et al.*, 2000 and Kim *et al.*, 2001 อ้างโดย Lim *et al.*, 2011) อีกทั้งมีรายงานจาก da Silva และคณะ (2001) ว่า RPS3a สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน polyclonal ของเม็ดเลือดขาวชนิด B-cell ในหนูได้

ชีวโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งคือดีเอ็นเอ Phagocytosis Activating Protein หรือ PAP ซึ่งมีความเหมือนอย่างสูง (homology) กับไรโบโซมอลโปรตีน L26 (RPL26) (Chotigeat *et al.*, 2007) โดยมีรายงานว่า PAP มีบทบาทสำคัญในกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) (Deachamag *et al.*, 2006 ; Chotigeat *et al.*, 2007 and Khimmakthong *et al.*, 2011) และยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) (Takagi *et al.*, 2005) อีกด้วย

จะเห็นได้ว่าทั้งโปรตีน RPS3a และดีเอ็นเอ PAP ต่างมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้จึงได้นำชีวโมเลกุลทั้งสองชนิดที่กล่าวมาเพื่อศึกษาดูว่าจะมีผลอย่างไรเมื่อมีการประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวโดยเลือกใช้วิธีการให้กิน (oral) แก่สัตว์ทดลองโดยใช้กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสัตว์ทดลอง

1.2 บทตรวจสอบเอกสาร

กุ้งขาว (White Shrimp) ถูกค้นพบโดย Boom เมื่อปี ค.ศ.1931 มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่มกุ้งขาวแปซิฟิก (Pacific white shrimp) มีการเพาะเลี้ยงกันมากแถบแนวชายฝั่งทะเลแปซิฟิก นับเป็นกุ้งสายพันธุ์ที่มีความแข็งแรงมาก (อาทินันท์, 2546) ถูกนำเข้ามาเพาะเลี้ยงในเอเชียครั้งแรกที่ประเทศจีนเมื่อปี ค.ศ. 1995 (Tu *et al.*, 1999 อ้างโดย พนารัตน์ , 2549) และได้รับอนุญาตให้นำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยได้โดยกรมประมงเมื่อปี พ.ศ. 2545 (นิตติ และคณะ, 2549)

1.2.1 อนุกรมวิธาน (Holthuis, 1980; Perez-Farfante และ Kensley, 1997
อ้างโดย Roman, 2006)

Kingdom	:	Animalia
Phylum	:	Arthropoda
Subphylum	:	Crustacea
Class	:	Malacostraca
Subclass	:	Eumalacostraca
Superorder	:	Eucarida
Order	:	Decapoda
Suborder	:	Dendrobranchiata
Superfamily	:	Penaeoidea
Family	:	Penaeidae
Genus	:	<i>Litopenaeus</i>
Species	:	<i>Litopenaeus Vannamei</i>

1.2.2 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

ลักษณะทั่วไปลำตัวขาวใสและแบ่งเป็นปล้อง 6 ปล้อง ส่วนหัวมี 1 ปล้อง และส่วนหางอีก 1 ปล้อง หน่ออกใหญ่ มีขาสีขาวใช้ว่ายน้ำทั้งหมด 5 คู่ มีหางสีแดงโดยเฉพาะตรงปลายจะมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบและ มีกืออยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือก ลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล หัวสันกรีสสูง ปลายกริแคบ กริด้านบนมี 8 ฟัน ส่วนกริด้านล่างมี 2 ฟัน กุ้งเพศผู้น้ำหนักตัว 60-85 กรัม และกุ้งเพศเมียมีน้ำหนักตัว 45-60

กรัม หากินได้ทุกระดับความลึกของน้ำ ว่ายน้ำได้ว่องไว อีกทั้งยังมีนิสัยไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมและตกใจง่าย กุ้งขาวสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของฟาร์มเพาะเลี้ยงได้ดี โดยอาศัยได้ในน้ำที่ระดับความเค็มระหว่าง 0-35 ส่วนในพันส่วน (ppt) (กมลศิริ, 2551 และ Rafael *et al.*, 1994 อ้างโดย วีรยุทธ, 2553) อีกทั้งยังมีรายงานของประเทศอิสราเอลว่าสามารถเลี้ยงได้ในน้ำกร่อยที่ความเค็ม 3 ส่วนในพันส่วนอีกด้วย (อาทินันท์, 2546)



รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

Figure 1 Morphology of White Shrimp (*L. vannamei*)

ที่มา : <http://benzsei.siam2web.com> อ้างโดย วีรยุทธ (2553)

1.2.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ (ปิยะบุตร, 2545)

กุ้งขาวจะมีอายุขัยประมาณ 36 เดือน มีลักษณะการวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 มิลลิเมตรใกล้พื้นทราย โดยปกติแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000 ถึง 250,000 ฟอง ส่วนแม่กุ้งขนาด 30-45 กรัม จะวางไข่ประมาณไม่เกิน 100,000 ฟอง ทั้งนี้กุ้งขาวจะวางไข่ในตอนกลางคืนบนพื้น แม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มออกไข่ขณะที่ลดความเร็วลงอย่างช้าๆ ทั้งนี้อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งขาวนี้จะมีลักษณะเป็นแบบเปิด (opened thelycum)

ปกติแล้วกุ้งขาวจะผสมพันธุ์ในเวลากลางวัน หลังจากมีการลอกคราบของตัวเมียจะมีการเกี่ยวพาราสีและผสมพันธุ์กันที่ความลึก 10-15 เมตรถึง 30-50 เมตร โดยธรรมชาติแล้วแม่กุ้งที่มีไข่แก่พร้อมที่จะวางไข่นั้น จะสังเกตเห็นได้จากจะเห็นรังไข่ซึ่งจะเป็นลำทึบมีสีเขียวเกือบดำอยู่บนแถบหลังของลำตัว ตั้งแต่บริเวณหลังไปจรดหางและตรงบริเวณด้านข้างของลำตัว ตรงปล้องที่ 1-2 จะเห็นรังไข่แผ่ออกไปเป็นหยักๆ โค้งลงมาทางด้านข้างของลำตัวทั้งสองข้าง โดยพฤติกรรมในการผสมพันธุ์ของกุ้งขาวนั้นแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่หนึ่ง ตัวเมียจะว่ายน้ำขานานไปกับตัวผู้ โดยตัวเมียจะว่ายน้ำสูงกว่าประมาณ 30-40 เซนติเมตร แล้วว่ายน้ำวกกลับมาสลับกับการหยุดพักที่พื้นเป็นระยะๆ โดยมักจะมีตัวผู้ว่ายน้ำไล่ตามหลายตัว แต่จะมีเพียงตัวเดียวที่สามารถว่ายน้ำเข้ามาขานานซ้อนอยู่ด้านล่างของตัวเมียพอดีแล้วตัวเมียจะค่อยๆ ใช้ขาเดินโอברัดที่ส่วนหัว (carapace) ของตัวผู้ ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที ถ้าตัวผู้สามารถจัดตำแหน่งได้เหมาะสมถ้ายังจัดตำแหน่งไม่เหมาะสมหรือมีการหยุดพักนาน อาจใช้เวลานานมากกว่าหนึ่งชั่วโมง ระยะที่สองตัวผู้จะพลิกตัวค่อยๆ หายขึ้นมาติดตัวเมีย พอทั้งคู่ประกบกันได้ ตัวผู้จะแนบส่วนต่อของอกกับท้องเข้ากับส่วนนอกด้านล่างของตัวเมีย ซึ่งจะทำให้ตัวผู้ตัวอื่นๆ หหมดโอกาสในการเข้าทำการผสมพันธุ์กับตัวเมียในจังหวะนี้ แต่ถ้าในขณะนี้ตัวผู้ยังเข้าทำไม่ได้ไม่สำเร็จ ตัวผู้จะกลับมาอยู่ในท่าคว่ำ แล้วจะพยายามว่ายน้ำขานานกับตัวเมียเพื่อสร้างโอกาสใหม่อีกครั้ง และระยะที่สามตัวผู้จะทำตัวเกือบตั้งฉากกับตัวเมีย หลังจากจังหวะที่ประกบตัวได้แล้ว ตัวผู้จะใช้ขาเดินคู่ที่ 5 เขียวัววะสืบพันธุ์ (petasma) อยู่ด้านข้างเป็นคู่ มีลักษณะคล้ายตะขอ อยู่ที่ขาว่ายน้ำ คู่ที่ 1 ซึ่งเป็นอวัยวะที่ช่วยในการปล่อยน้ำเชื้อแล้วจับ petasma ยัดเข้าไปที่ thelycum ของตัวเมียซึ่งลักษณะเป็นแผ่นรูปคล้ายมีเสื่อกางปีก มีรูเปิดอยู่ตรงกลางยาวลงไปเป็นร่องเหมือนรังกระดุมเสื่อเช็ด อยู่ตรงกลางระหว่างขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 กับขาเดินคู่ที่ 5 ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีไว้สำหรับเก็บน้ำเชื้อของกุ้งตัวผู้ จากนั้นตัวผู้จะโค้งรอบตัวเมีย แล้วกระตุกหัวและหางเป็นจังหวะอย่างต่อเนื่องเพื่อบีบให้น้ำเชื้อออกมา ตัวเมียจะเก็บน้ำเชื้อเข้าไปแล้วปล่อยไข่เลยซึ่งในกุ้งขาวนี้ไข่ของตัวเมียจะอยู่ข้างใน ส่วนของน้ำเชื้อที่เข้าไปจะอยู่ด้านนอก ซึ่งปากของ thelycum ต้องเปิดก่อนถึงจะเก็บน้ำเชื้อที่ได้รับมา ทำให้ปริมาณของเชื้อตัวผู้ที่เข้าปฏิสนธิกับไข่เป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ จึงทำให้โอกาสในการได้ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วเจริญต่อไปเป็นตัวอ่อนน้อยกว่ากรณีของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย หลังจากนั้นจึงค่อยแยกตัวออกจากกันแล้วว่ายน้ำออกไปในเวลา 2-3 วินาที ซึ่งรวมเวลาทั้งสิ้นในการผสมพันธุ์ทั้งหมดประมาณ 1-3 ชั่วโมง จากนั้นแม่กุ้งจะทำการวางไข่ โดยจะใช้เวลา 3-5 นาที

1.2.4 ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังรวมทั้งกุ้งนั้นจะไม่มีภูมิคุ้มกันที่แท้จริง หรือ adaptive immunity ที่เป็นการทำงานของแอนติบอดีต่อสิ่งแปลกปลอม (pathogen) ที่เข้าสู่เซลล์ มีการจดจำอย่างจำเพาะและตอบสนองได้อย่างรวดเร็วเมื่อเกิดการรุกรานจากสิ่งแปลกปลอมในครั้งต่อไปเหมือนเช่นที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง อย่างไรก็ตามเราพบระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ว่าเป็นส่วนสำคัญในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังรวมทั้งในกุ้งด้วย ซึ่งภูมิคุ้มกันแบบนี้จะแสดงความไม่จำเพาะและขาดการจดจำที่ดีต่อสิ่งแปลกปลอม (อมรรัตน์, 2550 ; Iwanaga and Lee, 2005) อย่างไรก็ตามกระบวนการจดจำดังกล่าวสามารถถูกกระตุ้นได้โดยสิ่งแปลกปลอม รวมถึงโปรตีนลูกผสมที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม (Witteveldt *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2009 ; Namikoshi *et al.*, 2004 and Fu *et al.*, 2008 อ้างโดย Fu *et al.*, 2010) โดยในกุ้งนั้นพบ innate immunity อยู่ 2 ชนิดคือ ชนิดอาศัยเซลล์ (cellular immunity) ซึ่งใช้เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ในกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ และอีกชนิดคือชนิดอาศัยสารน้ำ (humoral immunity) ทั้งนี้พบว่าภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมาีการทำงานที่แยกจากกันแต่ในบางครั้งก็มีการทำงานร่วมกันได้เช่นเดียวกัน (Wang and Wang, 2012)

1.2.4.1 ภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์ (cellular immunity)

เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีในกุ้งมาแต่กำเนิด (อมรรัตน์, 2550) โดยมีเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) คอยทำหน้าที่หลักในระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดหลายชนิด ได้แก่ ไฮยาลิน (hyaline cell), เซมิกรานูลาร์ (semigranular cell) และกรานูลาร์ (granular cell) เมื่อร่างกายเกิดบาดแผล จะมีกระบวนการแข็งตัวของเลือด ทำหน้าที่โดยเซลล์ไฮยาลิน เพื่อยับยั้งการสูญเสียเลือดของร่างกาย รวมทั้งป้องกันเชื้อโรคที่อาจจะผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ในกรณีที่เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้แล้วนั้น เซลล์เซมิกรานูลาร์ รวมทั้งเซลล์กรานูลาร์ ก็จะทำหน้าที่ต่อด้วยการทำลายสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวด้วยวิธีการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) คือเซลล์จะกลืนสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ส่วนไซโทพลาสซึม จากนั้นเซลล์จะสร้างสารที่เป็นพิษต่อสิ่งแปลกปลอมโดยการเปลี่ยนรูปออกซิเจนภายในเซลล์ด้วยการรีดิวซ์ไปเป็นซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ต่อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) รวมทั้งไฮดรอกซิลเรดิคัล (OH) เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม แต่เมื่อสิ่งแปลกปลอมมีจำนวนมากเกินความสามารถที่จะฟาโกไซโทซิสได้ เซลล์ก็จะใช้วิธีการสร้างโนดูล (nodulation) คือเซลล์เม็ดเลือดจะมารวมตัวกันหลายๆเซลล์เพื่อล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมมิให้

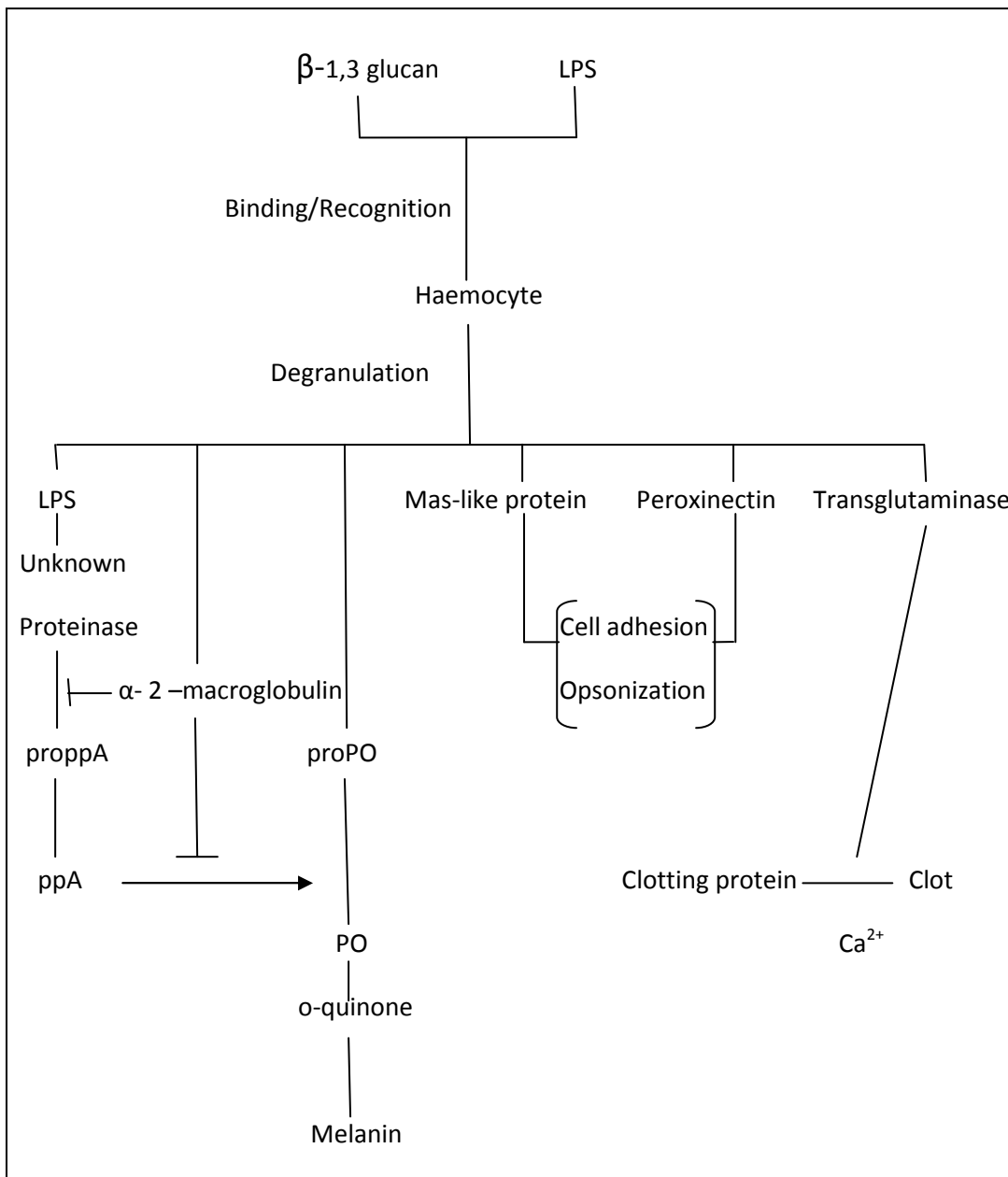
แพร่กระจายออกไปทั่วร่างกาย แต่ถ้าสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่หรือมีการลามและเพิ่มจำนวนมากแล้ว เซลล์ก็จะใช้วิธีการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) โดยเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมากที่จะมาล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม และจะมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโพรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase, proPO) ร่วมด้วย (กิจการ, 2543 อ้างโดย วีรยุทธ, 2553) ซึ่งทั้งเซลล์เซมิกรานูลาร์ และเซลล์กรานูลาร์ต่างมีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ (Bachere *et al.*, 1995)

1.2.4.2 ระบบภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยสารน้ำ (humoral immunity)

เป็นระบบที่เกิดขึ้นจากการทำงานของสารบางชนิดที่ละลายได้ในน้ำ ซึ่งเป็นผลผลิตจากเซลล์เม็ดเลือด เช่น Lysosomal enzyme, Bactericidins และ Cytolysins เป็นต้น (Bachere *et al.*, 1995) พบในสัตว์ในตระกูลมอลลัส (Molluscs) ส่วนในครัสเตเชียนั้นพบว่า มีเลคติน (lectin) หรืออะกลูตินิน (agglutinin) เป็นสารสำคัญในกระบวนการนี้ โดยสารดังกล่าวมีความจำเพาะต่อกรดไซยาลิก (Sialic acid) และอนุพันธ์ของมัน โดยเลคตินจะมีกระบวนการจดจำและต่อต้านต่อสิ่งแปลกปลอม และอาจจะทำหน้าที่เป็นออปซินิน (Opsinins) ได้ด้วย (Vasta, 1990 อ้างโดย Bachere *et al.*, 1995) รวมทั้งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและฟังไจ (Smith และ Chisholm, 1992 อ้างโดย อภิชัย, 2001) ทั้งนี้ยังพบกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยใช้สารประกอบออกซิเจน (Reactive Oxygen Species, ROS) รวมทั้งกระบวนการโพรฟีนอลออกซิเดสที่มีบทบาทสำคัญต่อการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (อมรรัตน์, 2550)

ระบบภูมิคุ้มกันโพรฟีนอลออกซิเดส เป็นกระบวนการสร้างเมลานิน (Melanization) พบได้ทั้งสัตว์ในจำพวกแมลง และครัสเตเชีย จะเริ่มต้นระบบด้วยการทำงานของเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดส แอกติเวติง (Prophenoloxidase-activating enzymy , PPA) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซอรีน โปรตีเอส (Serine protease) ถูกสร้างจากเซลล์เม็ดเลือด มีขนาดโปรตีน 76 กิโลดาลตัน (Johansson and Soderhall, 1989 อ้างโดย Bachere *et al.*, 1995) ถูกกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โดยโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย เบต้า 1-3 กลูแคน (β -1,3 glucan) และไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ที่มาจากผนังเซลล์ของจุลชีพ จากนั้นเอนไซม์จะไปกระตุ้นให้มีการปล่อยส่วนกรานูล (Degranulation) จากเซลล์เซมิกรานูลาร์ และเซลล์กรานูลาร์ โดยจะมีการปล่อยเพอรอกซิเนคติน (Peroxinectin, PE) ซึ่งมีการสร้างและเก็บไว้ภายในกรานูลออกมานอกเซลล์ เพื่อจะไปทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการโพรฟีนอลออกซิ

เดสให้เกิดขึ้น (Chiu *et al.*, 2007) โดยในระหว่างกระบวนการจะมีการสังเคราะห์สารควิโนน (Quinone) ซึ่งเป็นสารพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย (Mavrouli *et al.*, 2005) รวมทั้งมีการกระตุ้นให้เกิดการฟาโกไซโทซิสโดยเซลล์ไฮยาไลน์ โพรทีนอลออกซิเดสจะถูกยับยั้งโดย Proteinase inhibitor ได้แก่ α -2-macroglobulin และ Trypsin inhibitor (Johansson and Soderhall, 1989 อ้างโดย Bachere *et al.*, 1995) โดยมีรายงานว่า α -2-macroglobulin มีการแสดงออกลดลงในสภาวะแวดล้อมที่ทำให้การแสดงออกของโพรทีนอลออกซิเดสสูงขึ้น (Yue *et al.*, 2010) ทั้งนี้ยังพบว่าโพรทีนอลออกซิเดสยังมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของกระบวนการฟาโกไซโทซิส, การสร้างโนดูล (nodule formation) รวมถึงการแข็งตัวของเลือด (coagulation) (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006)



รูปที่ 2 กระบวนการโปรเฟโนออกซิเดส (proPO)

Figure 2 The Prophenoloxidase pathway

ที่มา : Lee และ Soderhall (2002)

1.2.5 โรคกุ้ง (Shrimps' disease)

โรคกุ้ง (Shrimps' disease) คืออาการผิดปกติของกุ้ง เป็นเหตุให้กุ้งตาย โดยสาเหตุเกิดจากความสัมพันธ์กันระหว่างสภาพแวดล้อมและเชื้อก่อโรค เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค จำนวนชนิดของเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของกุ้ง ซึ่งจะส่งผลต่อความรุนแรงของโรคไปด้วย (Snieszko, 1973 อ้างโดย วีรยุทธ, 2553) แต่ทั้งนี้ การติดเชื้อก่อโรคในกุ้งนั้น นับเป็นปัจจัยหลักที่สร้างความเสียหายให้กับฟาร์มกุ้งได้มาก โดยในประเทศไทยนั้นมีการรายงานว่า เชื้อชนิดแรกที่พบในโรคกุ้งคือไวรัสที่มีชื่อว่า Yellow-head Virus (YHV) หรือไวรัสหัวเหลือง ซึ่งพบการระบาดในไทยเมื่อปี ค.ศ. 1992 (Flegel, 2006) ซึ่งนับแต่นั้นเป็นต้นมาก็มีโรคกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆตามมาอีกมากมายหลายชนิด เช่น ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon Baculovirus, MBV), ไวรัสเฮซพีวี (Hepatopancreatic parvovirus, HPV), ไวรัสเทาร่า (Taura syndrome virus, TSV), ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) รวมถึงแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio*) เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงโรคติดเชื้อในกุ้งทะเล

Table 1 Most Shrimp's disease

Protozoa and Fungi	Bacteria	Virus
Ciliates protozoan, Suctorians,	Black gill disease, Epicommensal,	BMNV, BP, BPSV,
Gregarine, Larval metazoan,	Gill brown disease, Necrotizing,	TCBV, GAV, HPV,
Microsporidian,	Mycobacteriosis, Vibriosis,	IHHNV, LOPV,
Haplosporidian	Rickettsial like organism	LPV, LSNV, MBV,
Larvae mycosis		MOV, MSGS, RPS, YHV, TSV, WSSV,

ที่มา : Lightner *et al.*, 1997 ; Sangamaheswaran and Jeyaseelan, 2001 and Flegel, 2006 อ้างโดย อมรรัตน์, 2550

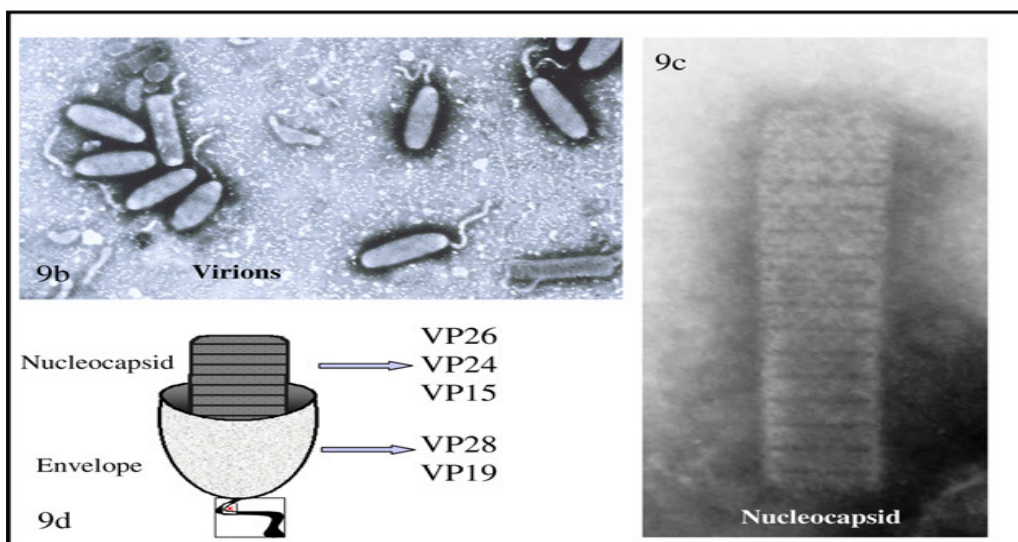
1.2.6 โรคตัวแดงดวงขาว

โรคตัวแดงดวงขาวพบได้ในกุ้งทะเลหลายชนิด มีชื่อเรียกแตกต่างกันมากมาย เช่น white spot viral disease (WSVD), white spot syndrome (WSS), white spot syndrome associated baculovirus (WSBV), systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV), white spot viral infection และ white spot syndrome virus (WSSV) เป็นต้น (อมรรัตน์, 2550) จัดเป็นโรคในกุ้งที่รุนแรงที่สุดที่มีต่อฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลก (Wu *et al.*, 2002) พบครั้งแรกในประเทศไต้หวัน (Chen, 1995) และมีการระบาดอย่างต่อเนื่องสู่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งแถบอเมริกา (Flegel, 1997 อ้างโดย Kim *et al.*, 2004) โดยในประเทศไทยพบการระบาดเมื่อปี พ.ศ. 2538 (อมรรัตน์, 2550) สามารถพบได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในช่วงหน้าฝนที่อุณหภูมิต่ำช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม อีกทั้งยังพบการระบาดในพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเนื่องจากเป็นบริเวณเดียวกับที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวด้วย

เช่นกัน (นิตี และคณะ, 2549) โรคตัวแดงดวงขาวถูกขึ้นบัญชีเป็นโรคที่สำคัญต่อสัตว์จำพวกครัสตาเซียนประจำปี 2006 โดยองค์การอนามัยสัตว์โลก หรือ World Animal Health Organization (Lightner, 2011) สาเหตุของโรคเกิดจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV)

1.2.6.1 ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาว หรือ WSSV เดิมถูกเรียกว่าแบคคูลิโอไวรัส (Baculovirus) เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานที่เป็นทรงกระบอก (Rod shape) รวมทั้งลักษณะทางกายวิภาคที่ไม่มีเกราะโปรตีนหุ้ม (non occluded) (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) เป็นเชื้อก่อโรคต่อกุ้งในตระกูล Penaeid เป็นสำคัญ (Kim *et al.*, 2004) จัดเป็นไวรัสในตระกูล *Nimaviridae* และสกุล *Whispovirus* (Mayo, 2002) มีสารพันธุกรรมชนิด double-stranded DNA (dsDNA) ลักษณะทางสัณฐานเป็นแท่งยาว 250-380 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 80-120 นาโนเมตร ปกคลุมด้วยส่วนโปรตีน envelope จำนวน 3 ชั้น และมีส่วนติ่งคล้ายหาง (tail-like appendages) ยื่นออกมา (Wang *et al.*, 1995 อ้างโดย Lightner, 2011) ส่วนปลายด้านหนึ่งของอนุภาคมีลักษณะคล้ายหางหรือแฟลกเจลลัม (Flagellum) (Van Hulten *et al.*, 2000 และ Huang *et al.*, 2001 อ้างโดย สิริลักษณ์, 2545) มีโปรตีนที่สำคัญเป็นองค์ประกอบอยู่ 4 ชนิดใหญ่ๆคือ VP28 และ VP19 อยู่บริเวณ envelope และ VP26 และ VP24 อยู่บริเวณ nucleocapsid (Kim *et al.*, 2004) ทั้งนี้มีรายงานว่าโปรตีน VP28 เป็นปัจจัยสำคัญในการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง (Van Hulten *et al.*, 2001 อ้างโดย สิริลักษณ์, 2545)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของไวรัสตัวแดงดวงขาว

Figure 3 Morphology of White Spot Syndrome Virus (WSSV)

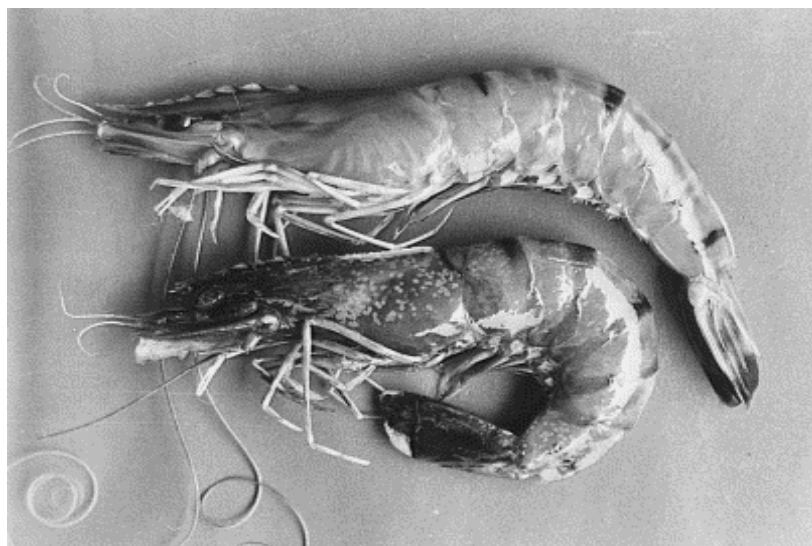
ที่มา : Vlask และคณะ (2005) อ้างโดย Lighthner (2011)

1.2.6.2 ลักษณะอาการของโรคตัวแดงดวงขาว

อาการของโรคนี้พบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1993 ในกุ้งกุลารุมา (*Penaeus japonicus*) ที่ประเทศญี่ปุ่น (Flegel, 2006) อาการที่สังเกตเห็นได้ชัดคือ ตัวจะแดงเมื่อมีการติดเชื้ออย่างรุนแรง ซึ่งเป็นที่มาของชื่อโรคตัวแดงดวงขาว บริเวณใต้ผิวหนังเปลือกกุ้งจะมีลักษณะวงขาวๆหลายวงกระจายออกไป เนื่องมาจากความผิดปกติของการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัส (Lighthner 1996, ชลอ, 2543 อ้างโดย สิริลักษณ์, 2545) และอาจเชื่อมติดกันเป็นแผ่นได้ด้วย (Alday de Graindorge and Flegel, 1998 ; Lighthner, 1996 และ Wongteerasupaya *et al.*, 1995 อ้างโดย นภดล และคณะ 2547) นิวเคลียสขยายตัวผิดปกติ โครมาตินอัดแน่นและเห็นเป็นขอบเด่นชัด กุ้งมีอาการเซื่องซึม กินอาหารน้อยลง ลำตัวเกิดเป็นสีชมพูถึงน้ำตาลแดง เนื่องจากการแพร่กระจายของเมดิสี (chromatophore) เมื่อมีอาการรุนแรงกุ้งจะว่ายน้ำขึ้นมาอยู่บริเวณผิวน้ำตรงขอบบ่อ (อมรรัตน์, 2550) และจะตายหมดภายใน 3-10 วันหลังจากติดเชื้อ

แล้ว (Liu *et al.*, 2009) สามารถพบการติดเชื้อของไวรัสบริเวณส่วนหัว (cephalothorax) ได้มากกว่าส่วนหาง (abdomen) ของกุ้ง (Durand *et al.*, 2003 อ้างโดย อมรรัตน์, 2550)

จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงอาการของโรค (Vidal *et al.*, 2001) โดยที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นช่วงที่ไวรัสตัวแดงดวงขาวยังไม่แสดงผลต่อกุ้ง แต่เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 25 องศาเซลเซียส จะมีผลให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว 100 เปอร์เซ็นต์ (Lightner, 2011) และจะหยุดปรากฏการณ์ดังกล่าวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (hyperthermic) (Du *et al.*, 2006 อ้างโดย Lightner, 2011)



รูปที่ 4 แสดงลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว (ตัวล่าง) และกุ้งปกติ (ตัวบน)

Figure 4 Differentiation between normal shrimp (upper) and WSSV infected shrimp (Lower)

ที่มา : Sahul และคณะ (1997) อ้างโดย สิริลักษณ์ (2545)

1.2.7 ไรโบโซมอลโปรตีน S3a (RPS3a)

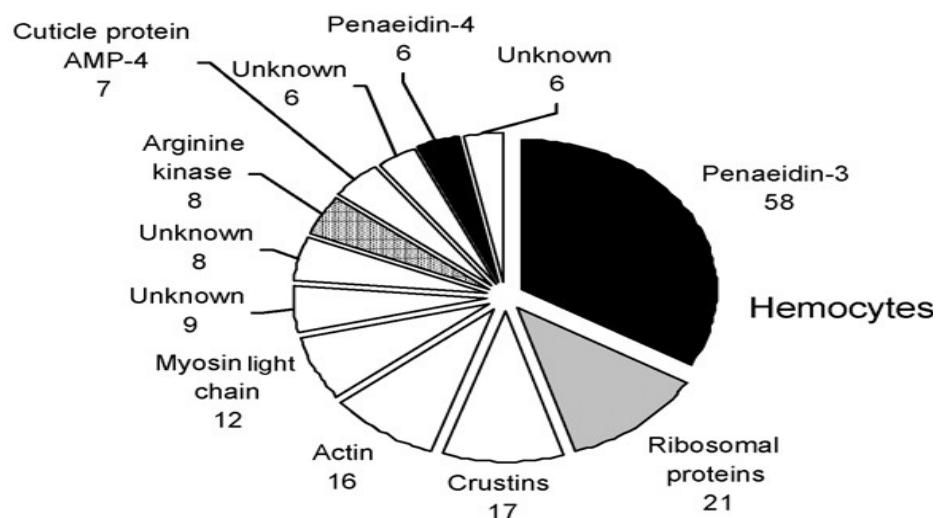
ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดต่างมีไรโบโซม (Ribosome) เป็นออร์แกเนล (Organelle) ในแต่ละเซลล์ ทำหน้าที่หลักคือสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ไรโบโซมของเซลล์โปรคาริโอตจะมีขนาด 70S (svedberge) ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อย 2 หน่วยคือ หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large

subunit) ขนาด 50S น้ำหนักประมาณ 2.7×10^6 ดาลตัน ประกอบด้วย ไรโบโซมอลโปรตีน (Ribosomal protein) ประมาณ 31-34 ชนิด และไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอหรืออาร์อาร์เอ็นเอ (Ribosomal RNA, rRNA) ขนาด 23S และ 5S และหน่วยย่อยขนาดเล็ก (Small subunit) ขนาด 30S ประกอบด้วยโปรตีน 21 ชนิด และอาร์อาร์เอ็นเอขนาด 16S โปรตีนโดยในขณะที่ไรโบโซมในเซลล์ยูคาริโอตนั้นจะมีขนาดใหญ่กว่าคือ ขนาด 80S ซึ่งประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยขนาดใหญ่ขนาด 60S ประกอบด้วยไรโบโซมอลโปรตีน 49 ชนิดและอาร์อาร์เอ็นเอขนาด 28S, 5.8S และ 5S และหน่วยย่อยขนาดเล็กขนาด 40S ประกอบด้วยไรโบโซมอลโปรตีนประมาณ 33 ชนิดและอาร์อาร์เอ็นเอขนาด 18S อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า จำนวนไรโบโซมอลโปรตีนในเซลล์ยูคาริโอตจะแตกต่างกันออกไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (ลัดดา, 2547) รวมทั้งยังมีหน้าที่เฉพาะนอกเหนือไปจากเป็นองค์ประกอบของไรโบโซม (Wool *et al.*, 1995 ; Wool, 1996 อ้างโดย Naora *et al.*, 1998) โดยมีรายงานว่าไรโบโซมอลโปรตีนหลายชนิดนั้นมีบทบาทในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (Bevort and Leffers, 2000), กระบวนการ apoptosis (Naora *et al.*, 1998) รวมทั้งกระบวนการ cell transformation (Lim *et al.*, 2011) กระนั้นยังพบว่าไรโบโซมอลโปรตีนมีส่วนการแสดงออกที่มากเมื่อเทียบกับยีนอื่นๆใน hemocyte ของกุงข้าว (Huang *et al.*, 1999 อ้างโดย Robalino *et al.*, 2009) (รูปที่ 5) ขณะที่มีการรายงานด้วยว่าการแสดงออกของยีนไรโบโซมอลโปรตีนและการสังเคราะห์โปรตีนมีความเกี่ยวข้องกันอย่างแน่นแฟ้น อีกทั้งอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมต่างๆทางกายภาพมีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของไรโบโซมอลโปรตีนในช่วงที่เซลล์มีการปรับตัวเข้าหาสภาพแวดล้อม รวมทั้งการตอบสนองต่อสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด (Mager, 1988 อ้างโดย Hou และคณะ, 2008)

ยีน RPS3a เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างไรโบโซมอลโปรตีน S3a (RPS3a) (Metspalu *et al.*, 1992 ; Starky and Levy, 1995) มีความเหมือน (homology) อย่างมากกับยีนอีกหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆเช่น ยีน *fte-1* และ TU11 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Lecomte *et al.*, 1997), ยีน T151 ในข้าว (Kidou *et al.*, 1994) รวมทั้งยีน PLC1 และ PLC2 ในยีสต์ (Ito *et al.*, 1992) เป็นต้น ในเซลล์ยูคาริโอต RPS3a มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน (Shemer *et al.*, 2000) เป็นไรโบโซมอลโปรตีนของหน่วยย่อย 40s ของไรโบโซม พบได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของเซลล์ โดย RPS3a สามารถจับกับ initiation factor ทั้ง eIF-2 และ eIF-3 รวมทั้งยังสามารถจับกับ Initiation tRNA, ไรโบโซมอล

อาร์เอ็นเอ (rRNA), rRNA ขนาด 18s (18s rRNA) และเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) (Lutsch *et al.*, 1990, Bulygin *et al.*, 1997 อ้างโดย Shemer *et al.*, 2000) รวมทั้ง transcription factor ในโครโมโซมของคนนั้นจะมีใน RPS3a อยู่ 1 ตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่ 4 (Nolte *et al.*, 1995) มีการศึกษาอยู่หลายชิ้นที่ระบุว่า RPS3a ทำหน้าที่นอกเหนือจากไรโบโซม (extraribosomal) (Shemer *et al.*, 2000) เช่นควบคุมกระบวนการ apoptosis และ transcription factor (Lim *et al.*, 2011), กระบวนการ v-fos transformation (Kashuba *et al.*, 2005) ทั้งนี้มีรายงานที่บ่งบอกว่า RPS3a มีการแสดงออกอย่างสูงในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Suuda *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001 อ้างโดย Lim *et al.*, 2011) และยืนยันด้วยรายงานจาก Lim และคณะ (2011) ที่พบว่า RPS3a ทำหน้าที่เป็นแชพเพอรอน (chaperone) ให้กับ hepatitis B virus X protein ที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์มะเร็งในเซลล์ hepatopancrease

มีรายงานว่าไรโบโซมอลโปรตีนหลายชนิดมีการแสดงออกอย่างสูงในเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำเมื่อมีการติดเชื้อ Yellow head virus เช่น RPS23, RPS24, RPL3, RPL8, RPL11, RPL18 และ RPL30 (Prapavorarat *et al.*, 2010) ในอีกรายงานหนึ่ง เมื่อมีการให้ไรโบโซมอลโปรตีนจากเชื้อ *Leishmania major* แก่หนูพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้เมื่อถูกทำให้ติดเชื้อ *Leishmania major* (Iborra *et al.*, 2008) อีกทั้งยังพบว่า RPS3a จากเชื้อ *Leishmania major* สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน polyclonal ของเม็ดเลือดขาวชนิด B-cell ในหนู (da Silva *et al.*, 2001) จึงน่าจะเชื่อว่าไรโบโซมอลโปรตีนหลายๆชนิด รวมทั้ง RPS3a น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต แต่ทั้งนี้ยังไม่มียางานเกี่ยวกับบทบาทของ RPS3a ในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียเช่นแต่อย่างใด โดยในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นในเรื่องของผลของ RPS3a ต่อภูมิคุ้มกันของกิ้งซึ่งเป็นครัสตาเซียชนิดหนึ่งว่าเป็นอย่างไรบ้าง



รูปที่ 5 แสดงยีนต่างๆที่มีการแสดงออกใน hemocyte ของกุ้งขาวในสภาวะปกติ

Figure 5 Expression gene in hemocyte of White Shrimp

ที่มา : Huang และ Madan (1999) อ้างโดย Robalino และคณะ (2009)

1.2.8 ยีน Phagocytosis Activating Protein (PAP)

ยีน PAP (GenBank accession no. AY680836) ถูกแยกสกัดได้ครั้งแรกจาก ส่วน Haemolymph ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ติดเชื้อ WSSV (Khimmakthong *et al.*, 2011 ; Deachamag *et al.*, 2006) โดยถูกตั้งชื่อตามบทบาทของยีนที่ทำหน้าที่ฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) (Deachamag *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โดยเซลล์เม็ดเลือดทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการจับกิน โดยเซลล์ที่เกี่ยวข้อง เช่น macrophage, neutrophil และเซลล์อื่นๆอีก เพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร ที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ โดยนำสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพเหล่านี้มาย่อยสลายโดย lysosome ซึ่งมีเอนไซม์ hydrolytic อยู่มาก (Harrison and Grinstein, 2002 ; Greenberg, and Grinstein, 2002) จากการศึกษาพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดโดยการบ่มเซลล์กับ Glutathione S transferase-PAP หรือ GST-PAP จะมีผลให้เกิดการฟาโกไซโทซิสสูงขึ้นและมีผลทำให้กุ้งมีภาวะต้านทานต่อสิ่งแปลกปลอมที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์มากขึ้นตามไปด้วย (Deachamag *et al.*, 2006) อีกทั้งยังพบว่า PAP มีปฏิกริยาร่วมกับ alpha-2-macroglobulin (α_2m) ในการช่วยให้ GST-PAP สามารถเข้าสู่เซลล์ฟาโกไซติก (Phagocytic

cell) และนำไปสู่การลดอัตราการตายของกุ้งเมื่อติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (Chotigeat *et al.*, 2007) โดยยีน PAP มีความเหมือน (Homology) อย่างสูงกับไรโบโซมอลโปรตีน L26 (Ribosomal protein L26, RPL26) ในกุ้ง (*Penaeus Japonicus*) (Watanabe, 1998 อ้างโดย Chotigeat *et al.*, 2007) และ *Mus musculus* (Chotigeat *et al.*, 2007) โดย RPL26 จะจับกับส่วน 5'UTR ของยีน p53 ซึ่งเป็นยีนที่ยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งโดยอาศัยกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) ซึ่ง RPL26 จะเป็นตัวส่งเสริม (activator) ให้ p53 มีการแสดงออกของยีนที่สูงขึ้นกว่าปกติ (Takagi *et al.*, 2005) โดยมีรายงานว่ามีการแสดงออกของ RPL26 อย่างสูงใน intramuscular ของกุ้งกุลาดำเมื่อถูกฉีดด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ถูกทำให้อ่อนแรงลงร่วมด้วยฟอร์มาลิน (Formalin Inactivated WSSV) (Deachamag *et al.*, 2006) และยังมีรายงานว่า RPL26 มีการแสดงออกอย่างสูงใน *Littorina littorea* ในช่วงที่ขาดออกซิเจน (Larade *et al.*, 2001) จากการศึกษาของ Khimmakthong และคณะ (2011) พบว่า PAP ในรูปพลาสมิดลูกผสม PAP-phMGFP ที่นำเข้าสู่ตัวกุ้งโดยวิธีการฉีดนั้น มีผลให้การแสดงออกของยีน PAP และยีนโปรไฟโนลออกซิเดส (proPO) ในกุ้งสูงขึ้นกว่าปกติ อีกทั้งสามารถกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโทซิส และมีผลให้กุ้งขาวรอดชีวิตได้ดีเมื่อถูกกระทำโดยเชื้อโรคชนิดต่างๆ เช่น ไวรัสหัวเหลือง, ไวรัสตัวแดงดวงขาว รวมถึงแบคทีเรีย vibrio

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อศึกษาผลของโปรตีนลูกผสม His-RPS3a ต่อภูมิคุ้มกันโปรไฟโนลออกซิเดส และศึกษาผลของโปรตีนลูกผสม His-RPS3a ต่อการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

1.3.2 เพื่อศึกษาผลของดีเอ็นเอ PAP ต่อระบบภูมิคุ้มกัน และศึกษาผลของดีเอ็นเอ PAP ต่อการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	BDH
Acrylamide	Fluka
Ammonium persulfate	Fluka
Acetic acid	J.T Baker
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Calcium chloride dehydrate	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck
Folin ciocalteus' s reagent ERBA	CARLO
Glucose	Fluka
Glycerol	Fisher
Glycine	BDH
HEPES	Sigma

สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Hydrochloric acid	Merck
Magnesium sulfate hydrate	CARLO ERBA
Magnesium chloride-hexahydrate reinst	Merck
Methanol	LAB-SCAN
N, N' –methylene-bis-acrylamide	Merck
N, N, N, N' –Tetramethylethylene Diamine (TEMED)	Fluka
Nutrient Agar	Difco
Potassium acetate	Merck
Potassium chloride	Fluka
Potassium dihydrogenphosphate	Merck
Potassium sulphate	Merck
Sodium acetate	Merck
Sodium bicarbonate	BDH
Sodium chloride	LAB-SCAN
Sodium dihydrogen orthophosphate	BDH
Sodium hydrogen carbonate	BDH

สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Sodium Lauryl sulphate	Aps Ajax Finechem
Triton X-100	USB
Tris base	Promega
Tryptone	Himedia
Yeast extract	USB

2.1.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Promega
Ampicilin	Sigma
Ethidium bromide	Sigma
Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranositol (IPTG)	USB
Lamda Hind III	Promega
Low Molecular Weight Caribation Kit	Amersham Biosciences
Lysozyme	Sigma

2.1.2 แบคทีเรีย

2.1.2.1 *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21

แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิดลูกผสม pET-RPS3a ได้รับความอนุเคราะห์จากนางสาวรภัทรพร นวคณิตวรกุล นักศึกษาปริญญาเอก สาขาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.1.2.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10

แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10 ที่มีพลาสมิดลูกผสม pHMGFP-PAP ได้รับความอนุเคราะห์จากนางสาวอุมาพร ชิมมากทอง นักศึกษาปริญญาเอก สาขาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.1.3 ตัวอย่างกุ้งขาว (*Litopenaeus Vannamei*)

กุ้งขาวอายุ 3 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 10-15 กรัม สุขภาพดีปลอดโรค จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งใน อ.ระโนด จ.สงขลา

2.2 อุปกรณ์

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งรุ่น 2200 C SCS (บริษัท Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น AB204 (บริษัท Mettler Toledo)

เครื่องวัดพีเอช (pH METER) รุ่น Cyberscan 1000 (บริษัท Eutech Cybernetics)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้รุ่น RC 5B (บริษัท Sorvall)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะรุ่น Biofuge pico (บริษัท Sorvall)

ตู้อบเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (บริษัท Heraeus)

ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

หม้อนิ่งความดัน รุ่น HA-300 MII (บริษัท Hirayama)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (บริษัท BioRed)

ตู้ปลอดเชื้อ Laminar flow (บริษัท Neurair)

เครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง (บริษัท sonicator)

2.3 วิธีการ

2.3.1 การทดสอบผลของโปรตีน RPS3a ต่อภูมิคุ้มกันและอัตราการรอดชีวิตของกุงขาว

2.3.1.1 การผลิตโปรตีนจากโคลน pET-RPS3a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

นำพลาสมิดลูกผสม pET-RPS3a ที่อยู่ในแบคทีเรีย *E.coli* (BL21) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นหัวเชื้อ จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อดังกล่าวลงในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อได้แล้วจึงนำเซลล์ *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวไป

ทำการชักนำ (Induce) การสร้างโปรตีน RPS3a ด้วยการเติมสาร IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วทำการลดอุณหภูมิของการบ่มเลี้ยงเป็น 18 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเลี้ยงแบบเขย่าต่ออีก 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบการหมุนเท่ากับ 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อได้ตะกอนเซลล์แล้วจึงทำการละลายด้วยสารละลาย PBS ที่มีค่า pH เท่ากับ 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) จนสารละลายที่มีเซลล์ดังกล่าวนั้นใส ทำการเก็บสารละลายดังกล่าวที่อุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์ผลจากการชักนำการสร้างโปรตีนด้วยการทำ SDS-PAGE

2.3.1.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)

นำสารละลายโปรตีนจากข้อ 2.3.1.1 มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) β -mercaptoethanol และ 0.1% (w/v) Bromophenol blue) ในอัตราส่วน 1:1 นำไป vortex ให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปต้มบนน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่บนน้ำแข็งทันที ทำการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ 12% (ส่วนประกอบดังตารางที่ 1) เริ่มด้วยการเติมส่วนที่เรียกว่า separating gel ลงไประหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นที่ประกบกัน ในอัตราส่วนประมาณ 3 ใน 4 ของความยาวกระจก แล้วใช้น้ำกลั่นเติมลงไปบนเพื่อปรับให้ผิวหน้าเจลมีความเรียบ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้เจลเกิดกระบวนการ polymerization จนแข็ง จากนั้นเทส่วนน้ำกลั่นทิ้ง ทำการเติมส่วนที่เรียกว่า stacking gel ลงไปต่อจากส่วน separating gel จนเต็มขอบกระจก แล้วเสียบหัวเพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับหยอดสารตัวอย่าง วางเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที จากนั้นจึงนำเจลที่เตรียมได้นี้เข้าประกอบกับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ใช้ Tris-glycine buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine และ 0.1% (w/v) SDS) เป็นสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นทำการเติมสารละลายตัวอย่างลงไปตามช่องเจล ทำการตั้งค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วจึงนำเจลไปย้อมสีด้วย Brilliant Coomassie Blue (0.25% (w/v) Brilliant Coomassie Blue R-250, 50% (v/v) methanol และ

7.5% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างสีออกด้วยสารละลาย Destain 1 (50% (v/v) methanol และ 7% (v/v) acetic acid) อีก 1 ชั่วโมง ต่อด้วยสารละลาย Destain 2 (5% (v/v) methanol และ 7.5% (v/v) acetic acid) เป็นเวลาข้ามคืนหรือจนสามารถเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของโพลีอะครีลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

Table 2 Composition of SDS-PAGE Polyacrylamide gel eletrophoresis

ส่วนประกอบ	Separating gel (ml)	Stacking gel (ml)
30% Acrylamide-bisacrylamide	2.0	0.67
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.5
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.3	-
10% SDS	0.05	0.04
10% APS	0.05	0.04
TEMED	0.002	0.004
น้ำกลั่น	1.7	2.7

2.3.1.3 การทำอาหารกึ่งผสมโปรตีนลูกผสม His-RPS3a

นำอาหารกึ่งมาบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นคลุกสารละลายโปรตีนที่ได้จากข้อ 2.3.1.1 ให้เข้ากันกับอาหารกึ่ง (50 มิลลิลิตรของ culture cell จะได้โปรตีนลูกผสม His-RPS3a เท่ากับ 1 มิลลิกรัม) แล้วทำการบีบอาหารให้เป็นเม็ดโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ตากอาหารให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปใช้ต่อไป

2.3.1.4 การตรวจวัดระบบภูมิคุ้มกันชนิดโพर्फิรินออกซิเดส

2.3.1.4.1 การเตรียมตัวอย่างเลือด

นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50x30 ซม. ให้อาหารผสมโปรตีนลูกผสมที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.1.3 โดยให้โปรตีนแก่กุ้งที่ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัม/ตัว/วัน เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน จากนั้นทำการดูดเลือดกุ้งโดยเจาะเข็มตรงบริเวณขาคู่ที่ 3 แล้วนำเลือดมาผสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CAC ที่ pH 7.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำการแตกเซลล์โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) โดยทำครั้งละ 5 วินาที แล้วพัก 30 วินาที จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสให้หมดใหม่

2.3.1.4.2 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีการ Lowry

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.3.1.4.1 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 100 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย A ประกอบด้วยสารละลาย Copper tartrate carbonate (0.1% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2% (w/v) NaCO_3 , 1% (w/v) Sodium tartrate), 5% (w/v) SDS และ 0.8 M NaOH ในอัตราส่วน 1 : 2 : 1 ตามลำดับ ให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย 2 N Folin และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 5 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ทำการเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin)

2.3.1.4.3 ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพर्फิรินออกซิเดส

ทำการหาคิจกรรมของเอนไซม์โพर्फิรินออกซิเดสโดยนำส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.3.1.4.1 ปริมาตร 70 ไมโครลิตร มาบ่มกับสารละลายทริปซิน (Trypsin) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมด้วยสารละลาย DOPA (Dihydroxy-L-phenylalanine) แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (OD_{490}) โดยการวัดค่า OD ทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อ

หาค่าความสัมพันธ์ของค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหน่วยเวลา โดยค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1 หน่วย คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โพर्फินอลออกซิเดส ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โพर्फินอลออกซิเดส} = \frac{(\text{ค่าความสัมพันธ์ของ OD ต่อหน่วยเวลา}) \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส}}$$

2.3.1.5 การทดสอบการรอดชีวิตของกุ้งขาวเมื่อติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด ให้อาหารผสมโปรตีนลูกผสมที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.1.3 แก่กุ้งเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยให้โปรตีนที่ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัม/ตัว/วัน ก่อนทำการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าตัวกุ้งโดยใช้เข็มฉีดเข้าตรงปล้องที่ 3 ของลำตัวกุ้งโดยเชื้อไวรัสที่นำมาฉีดนี้ควรมีความรุนแรงในระดับที่ทำให้กุ้งตายที่ 50% ภายในเวลา 3-5 วัน ทำการทดลองในตู้เลี้ยงขนาด 50x30 ซม. ให้ออกซิเจนตลอดเวลา ระดับความเค็มของน้ำที่ 10 ppt บันทึกผลการตายของกุ้งทุกวันนับตั้งแต่เริ่มให้เชื้อไวรัส และคำนวณอัตราการมีชีวิตรอดในรูปแบบ RPS (Relative percentage survival) จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{RPS} = \left(1 - \frac{\% \text{ การตายของกลุ่มทดลอง}}{\% \text{ การตายของกลุ่ม Positive}} \right) \times 100$$

2.3.2 การทดสอบผลของดีเอ็นเอ PAP ต่อภูมิคุ้มกันและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว

2.3.2.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอลูกผสม pHMGFP-PAP และพลาสมิดเปล่า pHMGFP ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

นำแบคทีเรีย *E.coli* Top10 (BL21) ที่มีพลาสมิดลูกผสม pHMGFP-PAP และพลาสมิดเปล่า pHMGFP มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* ที่มีพลาสมิดดังกล่าวไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (LB broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เมื่อได้ตะกอนเซลล์แล้วจึงทำการละลายด้วยสารละลาย PBS ที่ pH 7.4 จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) จนสารละลายที่มีเซลล์ดังกล่าวนี้ใส (สารละลายส่วนใส) เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในขณะที่เดียวกันก็ทำการเก็บเชื้อจาก LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาจำนวน 1 มิลลิลิตร ไปทำการสกัดพลาสมิด และนำไปทำการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 1.0% เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ (volt) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อม (stain) ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปล้างสีออก (destain) ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปดูภายใต้แสงยูวี (UV) แล้วทำการถ่ายภาพเก็บไว้ นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้น แล้วทำการคำนวณกลับไปยังเซลล์ทั้งหมดเพื่อคำนวณปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอแบบหายๆโดยการเทียบจากเซลล์ 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของพลาสมิดอยู่เท่าไรแล้วทำการเทียบกลับไปยังเซลล์ 100 มิลลิลิตรว่าจะมีพลาสมิดอยู่ทั้งหมดเท่าไร

2.3.2.2 การทำอาหารกุ้งผสมดีเอ็นเอลูกผสม pHMGFP-PAP

นำอาหารกุ้งมาบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.3.2.1 มาผสมให้เข้ากันกับอาหารกุ้ง ทำการบีบอาหารให้เป็นเม็ดโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ตากอาหารให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปใช้ต่อไป

2.3.2.3 ทดสอบการรอดชีวิตของกุ้งขาวในสภาวะแวดล้อมที่ไม่ปกติ

นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในตู้ขนาด 50x30 ซม. โดยเลี้ยงในน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกง (NaCl) แทนน้ำทะเลจริง ปรับให้ความเค็มของน้ำเท่ากับ 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) แล้วทำการให้อาหารที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.2 แก่กุ้งตลอดการทดลอง 7 วัน บันทึกอัตราการรอดชีวิต

2.3.2.4 การตรวจวัดการแสดงออกของภูมิคุ้มกันชนิดโพธิ์ไฟโนลออกซิเดส

2.3.2.4.1 การเตรียมตัวอย่างเลือด

นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50x30 ซม. ให้อาหารผสมดีเอ็นแอลูผสมที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.2.2 (อีกกลุ่มหนึ่งให้อาหารผสมสารละลาย PBS) โดยให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 150 ไมโครกรัม/ตัว/วัน เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน จากนั้นทำการดูดเลือดกุ้งโดยเจาะเข็มตรงบริเวณขาคู่ที่ 3 แล้วนำเลือดมาผสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CAC ที่ pH 7.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำการแตกเซลล์โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) โดยทำครั้งละ 5 วินาที แล้วพัก 30 วินาที จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสให้หลอดใหม่

2.3.2.4.2 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีการ Lowry

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.3.2.3.1 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 100 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย A ประกอบด้วยสารละลาย Copper tartrate carbonate (0.1% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2% (w/v) NaCO_3 , 1% (w/v) Sodium tartrate), 5% (w/v) SDS และ 0.8 M NaOH ในอัตราส่วน 1 : 2 : 1 ตามลำดับ ให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย 2 N Folin และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 5 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ทำการเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin)

2.3.2.4.3 ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส

ทำการหาคิจกรรมของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดสโดยนำส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.3.2.3.1 ปริมาตร 70 ไมโครลิตร มาป่มกับสารละลายทริปซิน (Trypsin) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมด้วยสารละลาย DOPA (Dihydroxy-L-phenylalanine) แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (OD_{490}) โดยการวัดค่า OD ทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าความสัมพันธ์ของค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหน่วยเวลา โดยค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1 หน่วย คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส} = \frac{(\text{ค่าความสัมพันธ์ของ OD ต่อหน่วยเวลา}) \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส}}$$

2.3.2.5 การทดสอบกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis)

2.3.2.5.1 การเตรียมตัวอย่างเลือด

นำกึ่งขาวมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50x30 ซม. ทำการให้อาหารผสมพลาสמידีเอ็นเอที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.2.2 โดยให้ดีเอ็นเอแก่กึ่งที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/ตัว/วันเป็นเวลา 3 วัน (อีกกลุ่มคือให้อาหารผสมสารละลาย PBS) จากนั้นทำการดูดเลือดกึ่งปริมาณ 200 ไมโครลิตร/ตัว (1k = 5 ตัว) มาละลายในสารละลาย KC-199 ที่ pH 7.4 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6500 รอบต่อนาที 2 นาที อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยการเติมสารละลาย K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6500 รอบต่อนาที 2 นาที อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้งไป ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย K-199 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วทำการเป่าตะกอนด้วยออโต้ไปเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร เพื่อตะกอนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกับสาร

ละลายแล้วนำไปนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดในฮีมาโตแกรม (hematogram) แล้วปรับจำนวนเซลล์ให้มีความเข้มข้นที่ 1×10^6 เซลล์

2.3.2.5.2 การเตรียม latex bead

ในการนี้เราจะใช้ latex bead เป็นดั่งสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ทดสอบการฟาโกไซโทซิสของเซลล์เม็ดเลือด โดยนำ latex bead จาก stock มา 10 ไมโครลิตร ละลายในสารละลาย K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันให้ดีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง (ทำ 3 ครั้ง) แล้วละลายกลับด้วยสารละลาย K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการนับจำนวน latex bead โดยใช้ hematogram แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^7 เซลล์

2.3.2.5.3 การทดสอบฟาโกไซโทซิสและทำสไลด์ถาวร

นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้จากข้อ 2.3.2.3.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาบ่มด้วย latex bead ที่ได้จากข้อ 2.3.2.3.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บนสไลด์กระจก (glass slide) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตรึงเซลล์ด้วย 0.25% glutaraldehyde ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างเซลล์ที่ไม่เกาะกับสไลด์ออกด้วยสารละลาย PBS ที่ pH 7.4 จากนั้นทำการย้อมสีเซลล์ด้วย wright stain ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 7 นาทีแล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใช้ลูกยางเป่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นจึงล้างสีที่ไม่ติดเซลล์ออกด้วยน้ำกลั่น ทำการปิดสไลด์ด้วย cover glass แล้วปิดขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ

นำสไลด์ไปตรวจดูการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการคำนวณหาค่าที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ดังนี้ : %phagocytosis, average number of the bead ingested per cell (ABPC) และ phagocytosis index (PI)

$$\% \text{phagocytosis} = (\text{จำนวนเซลล์ที่กิน latex bead} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เห็น}) \times 100$$

$$\text{ABPC} = \text{จำนวน latex bead ที่ถูกกิน} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เห็น}$$

$$\text{PI} = (\text{จำนวนเซลล์ที่กิน latex bead} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เห็น}) \times (\text{จำนวน latex bead ที่ถูกกิน} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เห็น}) \times 100$$

2.3.2.6 การทดสอบการรอดชีวิตของกุ้งขาวเมื่อติดเชื้อไวรัส WSSV

นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50x30 ซม. ให้อาหารผสมดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3.2.2 แก่กุ้งเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยให้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/ตัว/วัน ก่อนทำการฉีดเชื้อไวรัส WSSV ที่ต้องการทดสอบเข้าตัวกุ้ง โดยเลือกฉีดเข้าตรงปล้องที่ 3 ของลำตัวกุ้งโดย ซึ่งเชื้อไวรัส WSSV ที่นำมาฉีดนี้ควรมีความรุนแรงในระดับที่ทำให้กุ้งตายที่ 50% ภายในเวลา 3-5 วัน โดยทำการทดลองในตู้เลี้ยงขนาดให้ออกซิเจนตลอดเวลา ระดับความเค็มของน้ำทะเล 10 ppt บันทึกผลการตายของกุ้งทุกวันนี้ นับตั้งแต่เริ่มให้เชื้อไวรัส และคำนวณอัตราการมีชีวิตรอดในรูปแบบ RPS (Relative percentage survival) จากสูตรต่อไปนี้

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ การตายของกลุ่มทดลอง}}{\% \text{ การตายของกลุ่ม Positive}} \right) \times 100$$

% การตายของกลุ่ม Positive

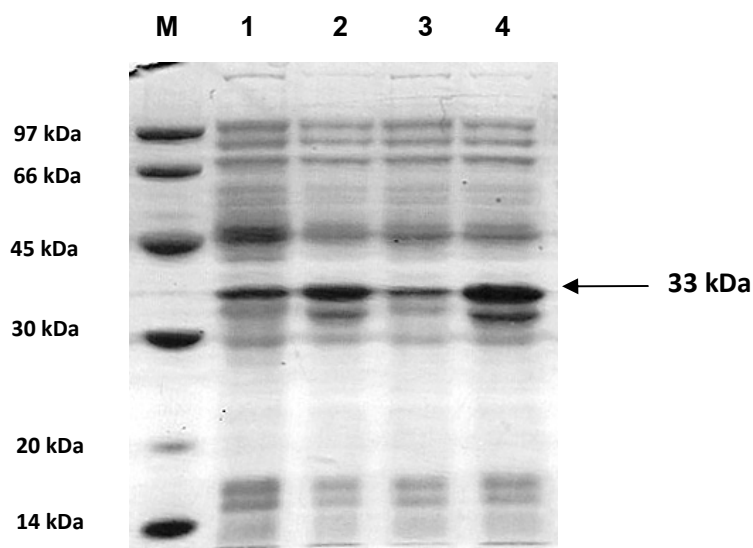
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลของโปรตีน RPS3a ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกึ่งขาว

3.1.1 การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม His-RPS3a

สามารถชักนำการสร้างโปรตีน His-RPS3a จากเวกเตอร์ pET ได้สำเร็จ โดยโปรตีน RPS3a มีขนาดเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน (kDa) (รวมกับโปรตีน His 3 kDa เท่ากับ 33 kDa) ซึ่งจากรูปที่ 6 จะเห็นว่าในช่องที่ไม่มีการชักนำโปรตีนโดยสาร IPTG (ช่องที่ 1 และ 3) รวมทั้งในช่องที่มีการชักนำโปรตีนโดยสาร IPTG (ช่องที่ 2) ซึ่งทั้งสองส่วนนี้ต่างไม่มีส่วนของโปรตีน RPS3a อยู่ แต่ก็ปรากฏแถบโปรตีนที่ขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน RPS3a ให้เห็น เพราะการทดลองในครั้งนี้เราได้ใช้การสกัดโปรตีนจาก crude cell โดยการทำให้เซลล์แตก แล้วนำมาทำ SDS-PAGE ทำให้สังเกตเห็นโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียที่มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน RPS3a ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถเกิดการชักนำโดย IPTG ได้เช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้ก็ยังเห็นได้เบาบางกว่าช่องที่มีการชักนำ RPS3a (ช่องที่ 4) อย่างชัดเจน



รูปที่ 6 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน RPS3a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pET และ pET-RPS3a ด้วยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue

แถวที่ M : โปรตีนเทียบมาตรฐาน low molecular weight

แถวที่ 1 : สารละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอพาหะ pET ที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG

แถวที่ 2 : สารละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอพาหะ pET ที่ชักนำด้วย IPTG

แถวที่ 3 : สารละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPS3a ที่ไม่ได้ชักนำด้วย IPTG

แถวที่ 4 : สารละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPS3a ที่ชักนำด้วย IPTG

Figure 6 Coomassie brilliant blue stained 12% SDS-PAGE of His-RPS3a protein expression in *E. coli* (BL21).

Lane M : Low molecular weight (LMW) protein marker

Lane 1 : Lysate of bacteria containing pET plasmid before induced with 1 mM IPTG

Lane 2 : Lysate of bacteria containing pET plasmid after induced with 1 mM IPTG

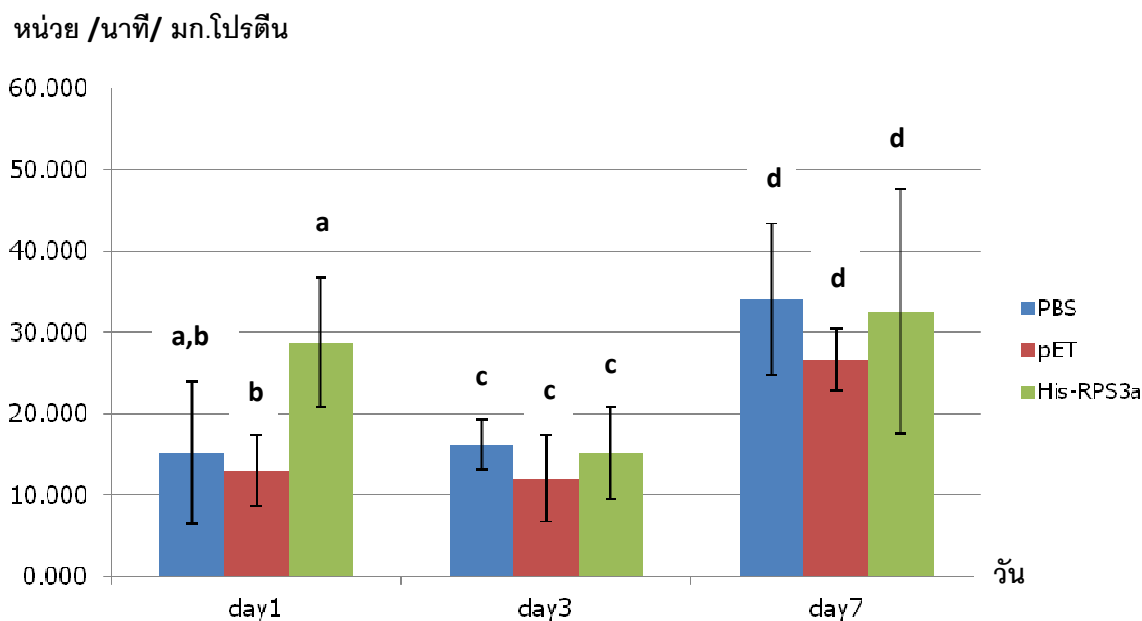
Lane 3 : Lysate of bacteria containing pET-RPS3a plasmid before induced with 1 mM IPTG

Lane 4 : Lysate of bacteria containing pET-RPS3a plasmid after induced with 1 mM IPTG

3.1.2 การแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (proPO)

จากการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดสในกุ้งขาว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นกุ้งที่ให้กินอาหารผสมสารละลาย PBS (กลุ่ม PBS), อาหารผสมสารละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดเปล่า pET (กลุ่ม pET) และอาหารผสมสารละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีโปรตีนลูกผสม His-RPS3a (กลุ่ม His-RPS3a) ในวันต่างๆ พบว่า ในวันที่ 1 กลุ่ม His-RPS3a มีการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (28.80 ± 8.01 หน่วย/นาทีก/มก.โปรตีน) สูงกว่ากลุ่ม PBS (15.19 ± 8.80 หน่วย/นาทีก/มก.โปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) กับกลุ่ม pET ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ของการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดสระหว่างกลุ่มต่างๆ ในวันที่ 3 และ 7 โดยในวันที่ 3

พบการแสดงออกของเอนไซม์โพรฟีนอกซิเดสในกลุ่ม PBS, pET และ His-RPS3a เท่ากับ 16.19 ± 3.01 , 11.98 ± 5.28 และ 15.17 ± 5.65 หน่วย/นาทีก/มก.โปรตีน ตามลำดับ และวันที่ 7 การแสดงออกของเอนไซม์โพรฟีนอกซิเดสในกลุ่ม PBS, pET และ His-RPS3a เท่ากับ 34.05 ± 9.38 , 26.65 ± 3.76 และ 32.58 ± 15.15 หน่วย/นาทีก/มก.โปรตีน ตามลำดับ



รูปที่ 7 แสดงผลการแสดงออกของเอนไซม์โพรฟีนอกซิเดส (proPO) ของแต่ละกลุ่มการทดลองในวันต่างๆ (n=5)

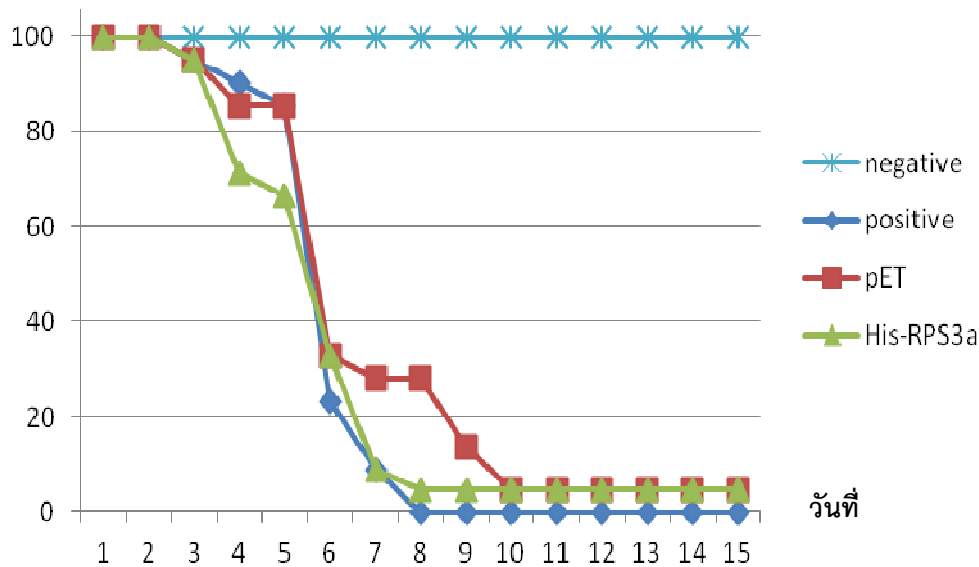
Figure 7 The Prophenoloxidase activity of the shrimp that fed by meal with PBS, 90 micrograms pET and 90 micrograms His-RPS3a protein per shrimp on day1, 3 and day7.

3.1.3 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV)

จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวหลังจากได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหรือ White spot syndrome virus (WSSV) 15 วัน ที่จำนวน copies โดยทำการฉีดไวรัสเข้าตรงกล้ามเนื้อบริเวณปล้องที่ 3 ของตัวกุ้งขาว ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองต่างๆที่แบ่งเป็นสี่กลุ่มคือ กลุ่ม negative ซึ่งกุ้งได้รับอาหารปกติโดยไม่มีการให้ไวรัส, กลุ่ม positive control ซึ่งกุ้งได้รับอาหารปกติและให้ไวรัสด้วย, กลุ่ม pET ซึ่งกุ้งได้รับอาหารผสมสาร

ละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอพาหะ pET และให้ไวรัส และกลุ่ม His-RPS3a ซึ่ง กุ้งได้รับอาหารผสมสารละลายโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่มีโปรตีนลูกผสม His-RPS3a และให้ ไวรัส พบว่ากลุ่ม negative control ให้อัตราการรอดชีวิต 100% ในขณะที่กลุ่ม positive control ให้อัตราการรอดชีวิต 0 % ส่วนกลุ่ม pET และกลุ่ม His-RPS3a ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับที่ 4.76 % RPS (Relative percentage survival) เมื่อเทียบกับกลุ่ม positive control ดังรูปที่ 8 ตารางที่ 3

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต



รูปที่ 8 แสดงอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่วันต่างๆภายใน 15 วัน (3n แต่ละ n = 7 ตัว)

Figure 8 Percentage of survivors of shrimp that fed by meal with PBS, 90 micrograms pET and 90 micrograms His-RPS3a protein per shrimp after shrimp infected with WSSV

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมและค่า %RPS ของกุ้งขาวในกลุ่มต่างๆหลังจากได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 15 วัน

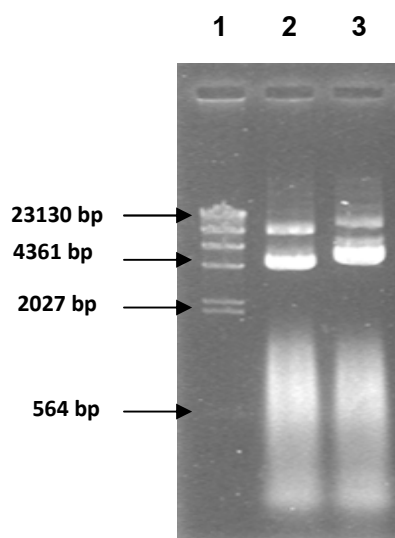
Table 3 Percentage of mortality and RPS of shrimp that fed by by meal with PBS (Positive),90 micrograms pET and 90 micrograms His-RPS3a protein per shrimp after shrimp infected with WSSV

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
pET	95.24	4.76
Positive	100.0	
His-RPS3a	95.24	4.76
Positive	100.0	

3.2 ผลของยีน PAP ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

3.2.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอลูกผสม phMGFP-PAP และพลาสมิด phMGFP

สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอลูกผสม phMGFP-PAP และพลาสมิด phMGFP ในเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ได้ โดย PAP มีขนาด 558 คู่เบส (GenBank accession no. AY680836) และ พลาสมิด phMGFP มีขนาด 4707 คู่เบส (phMGFP-PAP เท่ากับ 5265 คู่เบส)ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของพลาสมิด phMGFP และพลาสมิดลูกผสม phMGFP-PAP

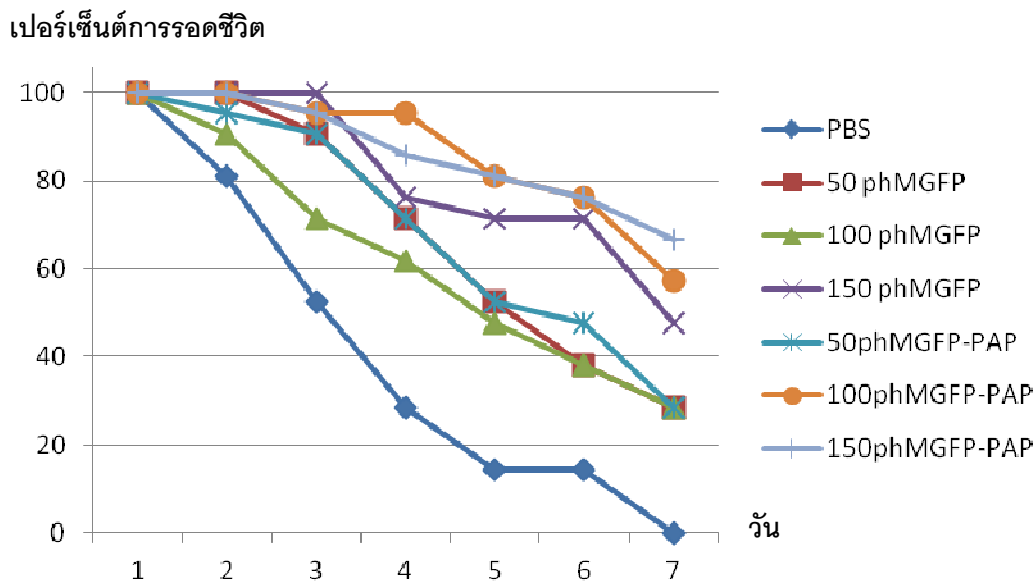
- 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน lamda HindIII marker
- 2 = พลาสมิดเปล่า phMGFP
- 3 = พลาสมิดลูกผสม phMGFP-PAP

Figure 9 1.0% agarose gel of phMGFP-PAP plasmid.

- 1 = lamda HindIII marker
- 2 = phMGFP plasmid
- 3 = phMGFP-PAP plasmid

3.2.2 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวในช่วงที่เกิดความเครียด

ภายในระยะเวลา 7 วัน กุ้งขาวที่เลี้ยงไว้ในน้ำที่ละลายเกลือที่ความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน มีอัตราการรอดชีวิตในแต่ละกลุ่มการทดลองแตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ให้กินอาหารปกติผสมสารละลาย PBS ให้อัตราการรอด 0 เปอร์เซ็นต์, กลุ่มที่ให้กินอาหารผสมสารละลายเซลล์ที่มีเวกเตอร์ phMGFP ที่ความเข้มข้น 50,100 และ 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 28.57%, 28.57% และ 47.62% ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมสารละลายเซลล์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม phMGFP-PAP ที่ความเข้มข้น 50,100 และ 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 28.57%, 57.13% และ 61.89% ตามลำดับ (รูปที่ 10)



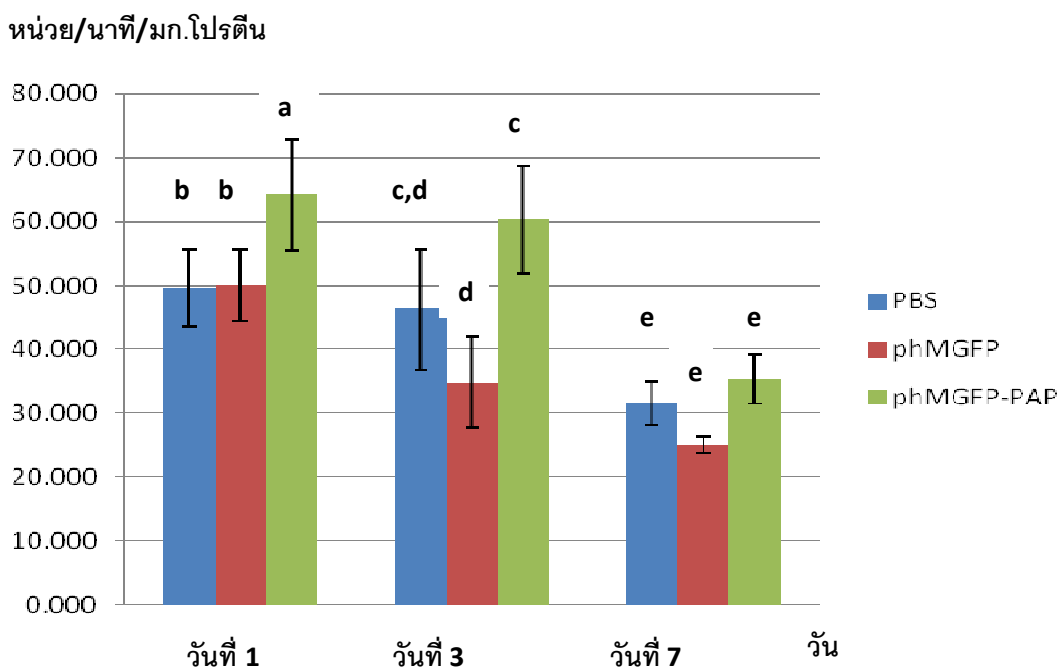
รูปที่ 10 แสดงอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวในสภาวะน้ำทะเลเทียมใน 7 วัน (3n, แต่ละ n = 7 ตัว)

Figure 10 Percentage of survivors of shrimp in the NaCl added water that fed by meal with PBS, 50, 100 and 150 micrograms phMGFP plasmid and 50, 100 and 150 micrograms phMGFP-PAP plasmid per shrimp along 7 days

3.2.3 การแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (proPO)

จากการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดสในกุ้งขาว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นกุ้งที่ให้กินอาหารผสมสารละลาย PBS (กลุ่ม PBS), อาหารผสมเวคเตอร์เปล่า phMGFP (กลุ่ม phMGFP) และอาหารผสมโปรตีนลูกผสม phMGFP-PAP (กลุ่ม phMGFP-PAP) ในวันต่างๆ พบว่า ในวันที่ 1 กลุ่ม phMGFP-PAP มีการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (64.16 ± 8.73 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) สูงกว่ากลุ่ม PBS (49.62 ± 6.13 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) และกลุ่ม phMGFP (50.09 ± 5.65 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม PBS และ phMGFP ส่วนในวันที่ 3 กลุ่ม phMGFP-PAP มีการแสดงออกของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (60.33 ± 8.34 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) สูงกว่ากลุ่ม phMGFP (34.87 ± 7.06 หน่วย/นาที่/

มก.โปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม PAP และกลุ่ม PBS (46.31 ± 9.42 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) และระหว่างกลุ่ม PBS และ phMGFP และสุดท้ายในวันที่ 7 กลุ่ม phMGFP-PAP มีการแสดงออกของเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดส (35.39 ± 3.90 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) สูงกว่ากลุ่ม phMGFP (25.03 ± 1.27 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม phMGFP-PAP กับกลุ่ม PBS (31.53 ± 3.46 หน่วย/นาที่/มก.โปรตีน) และระหว่างกลุ่ม PBS กับ phMGFP (รูปที่ 3.6)



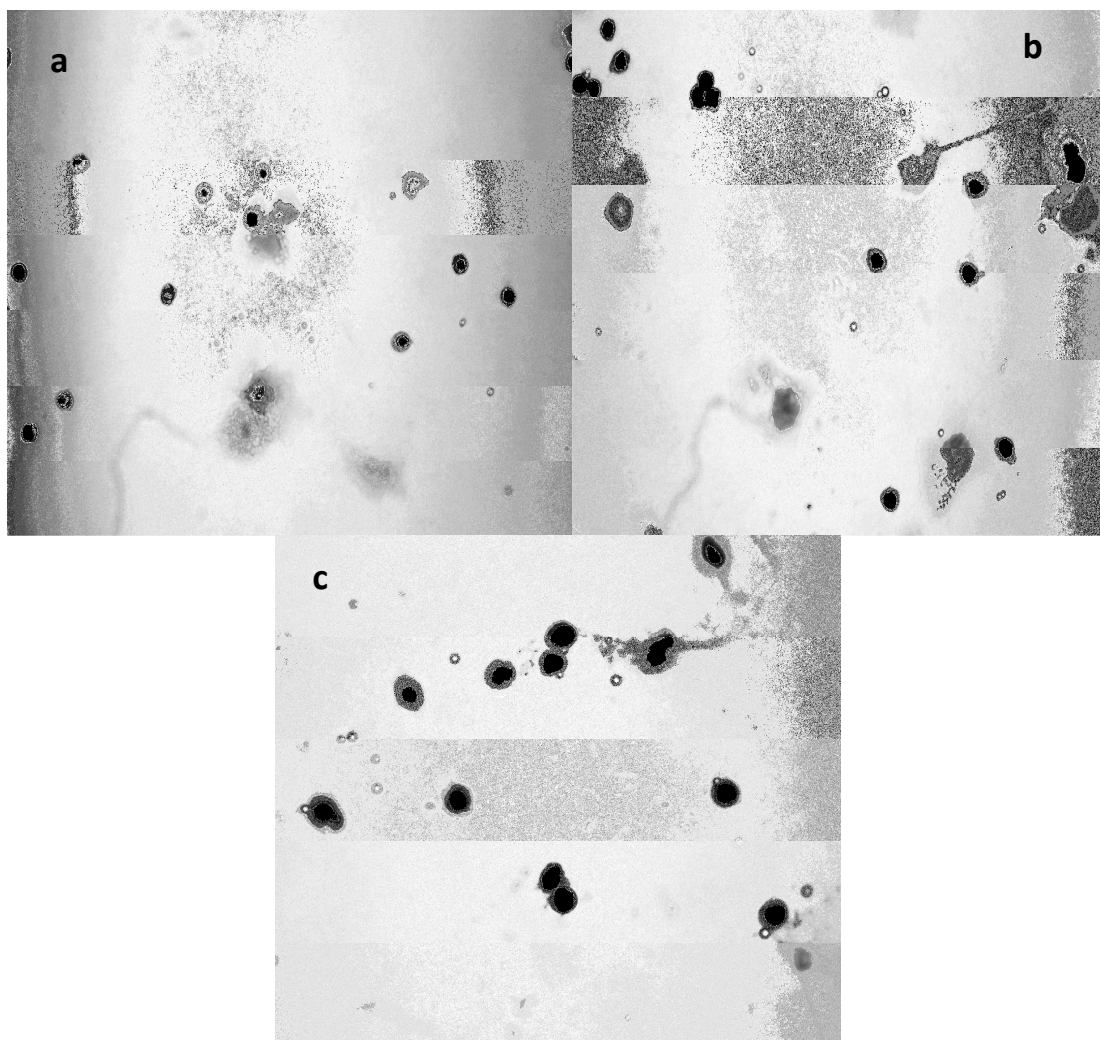
รูปที่ 11 แสดงผลการแสดงออกของเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดส (proPO) ของแต่ละกลุ่มการทดลองในวันต่างๆ (n=5)

Figure 11 The Prophenoloxidase activity of the shrimp that fed by meal with PBS, 150 micrograms phMGFP plasmid and 150 micrograms phMGFP-PAP plasmid per shrimp on day1, 3 and day7.

3.2.4 กระบวนการฟาโกไซโทซิส

จากการศึกษาการตอบสนองของกระบวนการฟาโกไซโทซิสของฮีโมไซต์ในกุ้งขาว หลังจากถูกกระตุ้นด้วยยีน PAP ในรูปของพลาสมิดลูกผสม phMGFP-PAP (กลุ่ม phMGFP-

PAP) โดยวิธีการกินนั้น ปรากฏว่ามีผลต่อภาพรวมของกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม ดังกล่าวแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ PAP (กลุ่ม PBS และ phMGFP) โดยกลุ่ม phMGFP-PAP มีเปอร์เซ็นต์ของการฟาโกไซโทซิส (%phagocytosis) อยู่ที่ 32.21 ± 2.42 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม PBS (13.29 ± 3.27) และกลุ่ม phMGFP (15.04 ± 1.60) ในขณะที่ค่า PI ของกลุ่ม phMGFP-PAP (13.26 ± 2.45) ก็สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.05) เช่นเดียวกันเมื่อเทียบกับกลุ่ม PBS (2.12 ± 0.94) และกลุ่ม phMGFP (2.96 ± 0.64) ส่วนค่า ABPC นั้นไม่มีความแตกต่างในระหว่างกลุ่มต่างๆ (รูปที่ 12 ตารางที่ 4)



รูปที่ 12 แสดงภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอม (latex bead) ของเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งขาวใน กลุ่มทดลองต่างๆ (a = กลุ่ม PBS, b = กลุ่ม phMGFP, c = กลุ่ม phMGFP-PAP)

Figure 12 Phagocytosis of shrimps hemocyte (a : shrimp fed with PBS, b : shrimp fed with 150 micrograms phMGFP plasmid and c : shrimp fed with 150 micrograms phMGFP-PAP plasmid)

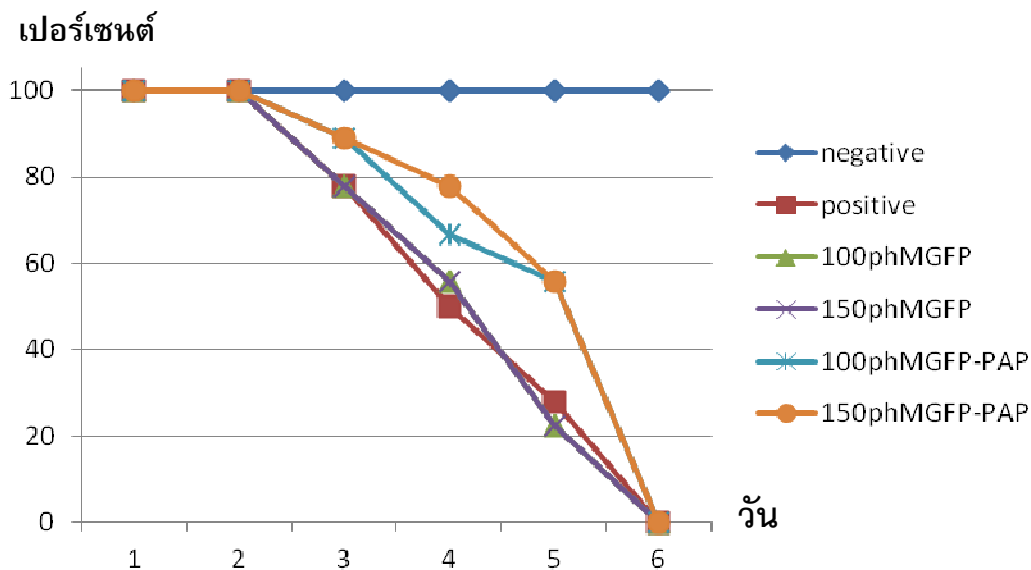
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบการฟาโกไซโทซิสในกุ้งขาว

Table 4 Phagocytosis test of shrimps that fed with PBS, 150 micrograms phMGFP plasmid and 150 phMGFP-PAP plasmid

	%phagocytosis	ABPC	PI
PBS	13.29 \pm 3.27	1.06 \pm 0.05	2.12 \pm 0.94
phMGFP	15.04 \pm 1.60	1.18 \pm 0.07	2.96 \pm 0.64
phMGFP-PAP	32.21 \pm 2.42	1.22 \pm 0.02	13.26 \pm 2.45

3.2.5 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

หลังจากกุ้งขาวได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 3 วันก่อนได้รับไวรัส พบว่ากุ้งขาวในกลุ่มทดลองต่างๆจะเริ่มตายในวันที่ 3 หลังจากได้รับไวรัส (ยกเว้นกลุ่ม negative ที่ไม่ได้รับไวรัส) และตายมากขึ้นเรื่อยๆจนถึงวันที่ 5 ที่สามารถสังเกตความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกุ้งขาวโดยกลุ่ม positive มีเปอร์เซ็นต์การรอดที่ 27.78 เปอร์เซ็นต์, กลุ่ม 100 และ 150 phMGFP มีเปอร์เซ็นต์การรอดที่ 22.23 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ส่วนกลุ่ม 100 และ 150 phMGFP-PAP มีเปอร์เซ็นต์การรอดที่ 55.56 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน แต่ทั้งนี้กุ้งขาวในทุกกลุ่มทดลอง (ยกเว้นกลุ่ม negative) ตายหมดในวันที่ 6 (รูปที่ 3.7 และตารางที่ 3.2)



รูปที่ 13 แสดงอัตราการตายของกุ้งขาวในกลุ่มต่างๆ ภายในระยะเวลา 6 วันหลังจากติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (3n, แต่ละ n = 7 ตัว)

Figure 13 Percentage of mortality of shrimp that fed with PBS (Positive), 150 micrograms phMGFP plasmid and 150 micrograms phMGFP-PAP plasmid per shrimp after shrimp infected by WSSV for 6 days (negative is shrimp that fed with PBS and not infected by WSSV).

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมและค่า %RPS ของกุ้งขาวในกลุ่ม phMGFP-PAP หลังจากได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 5 วัน

Table 5 Percentage of mortality and RPS of shrimp that fed with PBS (Positive) and 100 and 150 micrograms phMGFP-PAP plasmid per shrimp after shrimp infected with WSSV for 5 days.

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
100ug phMGFP-PAP	44.44	38
150ug phMGFP-PAP	44.44	38
Positive	72.22	

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของโปรตีน RPS3a ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

ไรโบโซมอลโปรตีนสามารถพบได้ทั้งเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต (ลัดดา, 2547) โดยสามารถทำหน้าที่นอกเหนือจากการเป็นส่วนประกอบของไรโบโซม (extraribosomal) (Shemer *et al.*, 2000) ทั้งนี้มีรายงานว่าไรโบโซมอลโปรตีนหลายชนิดมีการแสดงออกอย่างสูงในภาวะที่ระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตถูกกระตุ้น (Prapavorarat *et al.*, 2010 และ Iborra *et al.*, 2008) ซึ่งบ่งบอกได้ว่าไรโบโซมอลโปรตีนมีอิทธิพลต่อกระบวนการป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้นำไรโบโซมอลโปรตีน RPS3a ที่โคลนมาจาก hepatopancreas ของกุ้งแชบ๊วย มาศึกษาดูว่าจะมีผลอย่างไรต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียอย่างกุ้งขาว โดยเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันโพรฟีนอลออกซิเดสซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันแบบอาศัยสารน้ำ (humoral immunity) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า กลุ่มกุ้งที่ได้รับ His-RPS3a จะมีการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสไม่แตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่นๆ หากแต่ในทุกกลุ่มการทดลองก็มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน กล่าวคือ ในวันที่ 7 ทั้งสามกลุ่มการทดลอง (PBS, pET และ His-RPS3a) มีการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสสูงขึ้นทั้งหมด ซึ่งบ่งบอกได้ว่าการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสในการทดลองครั้งนี้ น่าจะเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับผลของ RPS3a ที่ให้กุ้งกิน โดยมีหลายรายงานที่ระบุถึงปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตเช่น Verghese และคณะ (2007) รายงานว่าสภาวะแวดล้อมแบบสุดขั้ว (extreme environmental) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง spiny lobster (*Panulirus homarus*) เพื่อเตรียมพร้อมต่อการบุกรุกของเชื้อโรค โดยงานครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น ความเค็มของน้ำ พีเอช (pH) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ รวมทั้งปริมาณแอมโมเนีย พบว่าปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลต่อดัชนีชี้วัดในระบบภูมิคุ้มกันเช่น total hemocyte count (THC) ฟีนอลออกซิเดส (PO) และ NBT-reduction สอดคล้องกับ Yue และคณะ (2010) ที่รายงานว่าความเข้มข้น ammonia-N ที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลให้ภูมิคุ้มกันของปู swimming crab (*Portunus trituberculatus*) ลดลง

ในการทดลองครั้งนี้เราใช้ lysate cell ซึ่งมีโปรตีน RPS3a มาผสมอาหารแล้วให้กุ้งกินเป็นตัวแปรต้น โดยเราทราบแล้วว่าปัจจัยทางชีวภาพอย่างจุลชีพต่างๆมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระบบภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกัน โดย β -1,3 glucan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในจุลชีพหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรีย เป็นตัวไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดส แอกติเวติง (Prophenoloxidase-activating enzymy , PPA) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตั้งต้นในกระบวนการโพรฟีนอลออกซิเดส (Chiu *et al.*, 2007) จึงอาจเป็นไปได้ว่าการที่โพรฟีนอลออกซิเดสมีการแสดงออกสูงขึ้นในวันที่ 7 อาจสัมพันธ์กับปริมาณของ β -1,3 glucan ที่เพิ่มมากขึ้นตามจำนวนการได้รับอาหารของกุ้งขาว แต่ทั้งนี้ในกลุ่มกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารละลาย PBS ก็พบว่าการเพิ่มขึ้นของโพรฟีนอลออกซิเดสเช่นเดียวกันทั้งๆที่ไม่ได้รับ β -1,3 glucan จากอาหารที่เราให้เลย

การที่เรานำกุ้งออกมาจากถังพักขนาด 60x85 ซม. แล้วนำมาใส่ในตู้กระจกเลี้ยงขนาด 50x30 ซม.เพื่อทำการทดลองดังกล่าว เป็นการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมเดิมและอาจมีผลก่อให้เกิดความเครียดแก่กุ้ง แต่ทั้งนี้เมื่อใช้ระยะเวลาหนึ่งเพื่อปรับสภาพแวดล้อมใหม่ได้แล้ว ก็อาจจะนำสู่ภาวะปกติได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าปัจจัยเรื่องเวลา อาจมีผลต่อการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดส โดย Keith และคณะ (1992) กล่าวว่า สิ่งแปลกปลอมรวมทั้งระยะเวลามีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกลไกการป้องกันตัวของสัตว์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ อาศัยงานวิจัยจาก Chen และคณะ (2005) ที่ระบุว่าระบบภูมิคุ้มกันจะมีการปรับตัวดีขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ผิดปกติหรือภาวะเครียดเป็นเวลานาน โดยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของสารกลุ่ม phthalate ester (PAE) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ประกอบด้วย diethyl phthalate (DEP), dihexyl phthalate (DHP), dipropyl phthalate (DPrP) และ diphenyl phthalate (DPP) ว่ามีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) อย่างไรบ้างเมื่อได้รับสารดังกล่าว ซึ่งพบว่าสาร DEP มีผลให้การแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกุ้งที่ได้รับสารเป็นเวลา 1 และ 4 วัน เมื่อเทียบกับ 8 วันที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งไม่ได้รับสาร DEP ในขณะที่สารอีกสามชนิดคือ DHP, DPrP และ DPP ต่างก็ให้ผลการทดลองไปในแนวทางเดียวกัน โดยพบว่าสารดังกล่าวมีผลให้การแสดงออกของโพรฟีนอลออกซิเดสลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกุ้งได้รับสารเป็นเวลา 4 วันเมื่อ

เทียบกับ 1 และ 8 วัน ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของโปรตีนออกซิเดสเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่ไม่ได้รับสารพิษทั้งสามดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ที่แสดงให้เห็นแนวโน้มของโปรตีนออกซิเดสที่ลดลงในวันที่ 3 และกลับสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่วันที่ 7

ในส่วนของการทดสอบการรอดชีวิตเมื่อกุ้งขาวติดโรคตัวแดงดวงขาวนั้นจะเห็นได้ว่ากุ้งขาวเริ่มตายในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ WSSV โดยไม่มีการตายในกลุ่ม negative control ซึ่งไม่ได้รับเชื้อดังกล่าว อีกทั้งกลุ่ม positive control มีการตาย 100% ในวันที่ 10 บ่งบอกได้ว่าสาเหตุที่กุ้งตายนั้นเกิดจากการกระทำโดยเชื้อ WSSV ซึ่งในสภาวะทั่วไปนั้นกุ้งจะตาย 100% หลังจากติดเชื้อ WSSV ภายในช่วง 3-10 วัน (Liu *et al.*, 2009) ในการศึกษาครั้งนี้เราได้พยายามทำการเพิ่มปริมาณ RPS3a ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไรโบโซมในสิ่งมีชีวิตทั่วไปให้แก่กุ้งขาว ในมิติของการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว (over-expressed) เพื่อต้องการทราบในส่วนของความสามารถในเชิงเป็นภูมิคุ้มกันว่าเกี่ยวข้องกันหรือไม่อย่างไร ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Lim และคณะ (2011) ได้ยืนยันว่า การแสดงออกในรูปแบบ over-expressed ของ RPS3a เป็นผลให้โปรตีนดังกล่าวสามารถทำหน้าที่อื่นจากเพียงแค่การสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) ตามปกติ กระนั้นจากผลการทดลองที่เราได้นั้นยืนยันเบื้องต้นได้ว่า RPS3a ที่เราให้กุ้งโดยการกินนั้นไม่มีผลป้องกันกุ้งขาวจากโรคตัวแดงดวงขาว โดยกุ้งที่ได้รับอาหารผสมพลาสมิด pET ซึ่งมีโปรตีน His และโปรตีนลูกผสม His-RPS3a นั้นให้ผลการรอดชีวิตเท่ากันเพียง 4.76 % RPS โดยเราได้ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีโปรตีนลูกผสม His-RPS3a อยู่ในอาหารเหลว LB แล้วชักนำการสร้างโปรตีน แล้วนำเซลล์มาผสมกับอาหารเม็ดปกติทำเป็นอาหารและให้แก่กุ้งขาวโดยวิธีการกิน ซึ่งเป็นความต้องการที่จะประยุกต์ความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุลอย่างง่ายต่อการที่จะสามารถนำไปใช้ในวงการเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมต่อไปได้

อย่างไรก็ตามยังคงมีปัจจัยอื่นบ้างที่อาจมีผลต่อความคาดหวังว่า RPS3a จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันและช่วยให้กุ้งขาวมีอัตราการรอดชีวิตในช่วงที่ติดเชื้อ WSSV เช่น ระยะเวลาของการให้โปรตีนที่สัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของโปรตีนที่ให้ซึ่งให้การแสดงออกแตกต่างกันออกไป รวมทั้งวิธีการให้โปรตีนดังกล่าวแก่กุ้งขาวที่ในการศึกษารั้งนี้ใช้การกินผ่านระบบย่อยอาหารปกติ ซึ่งอาจจะทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียไปบ้างก่อนที่จะดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดเพื่อส่งไปหล่อเลี้ยงร่างกาย อีกทั้งชีวโมเลกุลชนิดโปรตีน มีการ

สูญเสียสภาพได้ง่าย จึงอาจเกิดการสูญเสียในช่วงที่มีการเตรียมเป็นอาหารเม็ดก็เป็นได้ ทั้งนี้ และทั้งนั้นยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปถึงเทคนิคการเตรียมอาหาร รวมถึงปัจจัยต่างๆที่เหมาะสม ที่อาจเอื้อให้เห็นภาพที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นในส่วนของความเกี่ยวข้องของ RPS3a กับระบบ ภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในกุ้งขาวต่อไป

4.2 ผลของดีเอ็นเอ PAP ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

เราได้จำลองสภาวะน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกง (NaCl) มาใช้เลี้ยงกุ้งขาวแทนน้ำ ทะเลจริงที่มีองค์ประกอบของธาตุชนิดต่างๆ มากมาย รวมทั้งมีแพลงก์ตอนทั้งพืชและสัตว์อีกด้วย ซึ่งเป็นสภาวะแวดล้อมปกติสำหรับการดำรงชีพของสัตว์ทะเลทั่วไปรวมทั้งกุ้งขาวด้วย ซึ่งแตกต่างจากน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกง ซึ่งสูญเสียธาตุชนิดต่างๆไป โดยสามารถแบ่งแร่ธาตุที่ จำเป็นสำหรับกุ้งขาวได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ macro mineral เป็นธาตุหลักชนิดที่สัตว์น้ำต้องการ ในปริมาณมากเช่น แคลเซียม (Ca) คลอรีน (Cl) แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) และโซเดียม (Na) อีกชนิดหนึ่งคือ micro mineral หรือธาตุรอง ได้แก่ ทองแดง (Cu), เหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn) และซีลีเนียม (Se) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณน้อย ซึ่งทั้งธาตุหลักและรองต่างก็มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง การสร้างเปลือก การเจริญเติบโต รวมทั้งพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (บุญรัตน์, 2550) จึงกล่าวได้ว่าการเลี้ยงกุ้งขาวในสภาพที่มีเพียง NaCl นั้นเป็นสภาพแวดล้อมที่ไม่ปกติสำหรับกุ้ง ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดได้ และไม่สามารถ ดำรงชีวิตได้อย่างปกติ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้ก็ยืนยันได้ว่า กุ้งขาวที่อยู่ในภาวะที่ไม่ถูก กระตุ้นและถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยดีเอ็นเอ PAP นั้น มีความสามารถในการดำรงชีวิตในสภาวะ แวดล้อมของน้ำที่ไม่ใช่ น้ำทะเลแตกต่างกัน โดยกุ้งขาวในกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมสารละลาย PBS จะเป็นกุ้งที่อยู่ในภาวะที่ภูมิคุ้มกันไม่ถูกกระตุ้น ส่งผลให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งขาวในกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมเวคเตอร์ phMGFP และ พลาสมิดลูกผสม phMGFP-PAP ต่างให้อัตราการรอดชีวิตในทั้งสองกลุ่มที่เป็นบวกและแตกต่างกันไป ซึ่งบ่งบอก ว่ากุ้งขาวทั้งสองกลุ่มอยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากกว่าปกติ ทั้งนี้เราทราบว่าผนังเซลล์ ของแบคทีเรียนั้นมี lipopolysaccharide ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Deachamag *et al.*, 2006) โดยการทดลองครั้งนี้เราให้กุ้งกินอาหารที่ผสมสารละลายส่วนใส่ที่มีทั้งดีเอ็นเอ PAP รวมถึงแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เป็นผลให้กุ้งขาวในกลุ่มที่กินอาหารผสมพ ลาสมิด phMGFP ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน ซึ่งมากที่สุดในกลุ่ม

ที่กินอาหารผสมพลาสมีด phMGFP นั้นได้รับสารกระตุ้นมากที่สุดด้วยเช่นกันเนื่องจากได้รับ ส่วนของผนังเซลล์แบคทีเรียที่มี lipopolysaccharide ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ได้เช่นเดียวกันมากตามไปด้วย ส่งผลให้กุ้งขาวในกลุ่มนี้มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อเทียบ ภายในกลุ่มที่กินอาหารผสมพลาสมีด phMGFP ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อตัว ต่อวัน แต่ทั้งนี้ยังให้อัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่ากุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมพลาสมีดลูกผสม phMGFP-PAP ที่ความเข้มข้น 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ แสดงให้เห็นว่ายีน PAP มีบทบาทในกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งให้มีความ ต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ผิดปกติได้

ทั้งนี้พบว่าดีเอ็นเอ PAP มีอิทธิพลต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิสอย่างมาก โดยในส่วนของเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโทซิส (%phagocytosis) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับ PAP มีการ แสดงออกสูงซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกุ้งขาวที่ไม่ได้รับยีน PAP ทั้งนี้ กุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับดีเอ็นเอ PAP และกลุ่มที่ได้รับพลาสมีดเปล่า phMGFP ต่างได้รับส่วน lipopolysaccharide (LPS) จากผนังเซลล์แบคทีเรียไปด้วย โดย Deachamag และคณะ (2006) กล่าวว่า LPS สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า กระบวนการฟาโกไซโทซิสนั้นถูกกระตุ้นการแสดงออกอย่างจำเพาะโดยยีน PAP เท่านั้น ซึ่งเป็นไปได้ว่า LPS มีผลต่อภูมิคุ้มกันชนิดอื่นๆ สอดคล้องกับรายงานของ Lee และ Soderhall (2002) ที่พบว่า LPS มีผลกระตุ้นต่อกระบวนการโพรพีนอลออกซิเดสและออปโซนิน (opsonin) รวมทั้งอมรรัตน (2550) ที่กล่าวว่า LPS และ peptidoglycan สามารถกระตุ้นระบบโพรพีนอล ออกซิเดสในพวกอาร์โทรพอด (arthropod) ได้

ผลการทดลองที่ได้นี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับผลของการแสดงออกของโพร พีนอลออกซิเดสที่ได้ก่อนหน้านั้นที่ถึงแม้จะไม่พบว่า PAP สามารถกระตุ้นโพรพีนอลออกซิ เดสได้อย่างชัดเจนตามหลักการทางสถิติ แต่ก็มีแนวโน้มที่พอจะเห็นความแตกต่างโดยเฉพาะ ระหว่างกุ้งในกลุ่ม phMGFP-PAP และ phMGFP ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญซึ่ง สอดคล้องกับรายงานของ Jiravanichpaisal และคณะ (2006) ที่กล่าวว่าโพรพีนอลออกซิเดสมี อิทธิต่อการเพิ่มการแสดงออกของกระบวนการฟาโกไซโทซิส ซึ่งกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่าการ แสดงออกของฟาโกไซโทซิสมีมาก ก็จะมีการแสดงออกของระบบโพรพีนอลออกซิเดสที่มาก ได้เช่นเดียวกัน

และทั้งนี้เมื่อทำการทดสอบการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว พบว่า PAP ไม่สามารถช่วยให้กุ้งขาวรอดชีวิตได้ โดยมีรายงานของ Liu และคณะ (2009) ที่กล่าวว่า กุ้งขาวจะตาย 100% หลังจากติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวภายในช่วง 3-10 วัน จากตรงนี้สามารถยืนยันได้ว่ากุ้งขาวที่เราให้ไวรัสในครั้งนี้นั้นตายโดยการกระทำจากไวรัสจริง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้นี้จะเห็นว่า PAP ไม่สามารถปกป้องกุ้งขาวจากไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ภายในระยะเวลาดังกล่าว (6 วัน) แต่ก็เห็นความสามารถในการชะลอการตายได้ดีในระดับหนึ่ง โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกุ้งขาวที่ได้รับและไม่ได้รับยีน PAP ที่สังเคราะห์ได้ตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 5 พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับยีน PAP มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับยีน PAP (กลุ่ม phMGFP และ positive control) โดยสามารถเห็นได้อย่างชัดเจนจากกราฟ (รูปที่ 13) รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ RPS (ตารางที่ 5) จึงเป็นไปได้ว่าปริมาณของดีเอ็นเอ PAP ที่ให้แก่กุ้งนั้น (100 และ 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน) ยังอาจไม่ใช่สภาวะที่ดีมากนักเมื่อกุ้งขาวต้องต่อสู้กับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง อีกทั้งดีเอ็นเอ PAP อาจมีการสูญเสียในระหว่างที่ให้กุ้งกิน (ละลายไปกับน้ำที่เลี้ยงกุ้ง) รวมทั้งในกระบวนการของระบบทางเดินอาหารที่มีน้ำย่อยชนิดต่างๆมากมายซึ่งมีผลทำให้ดีเอ็นเอเสียหายได้ ซึ่งที่กล่าวมาทั้งหมดนี้อาจเป็นผลให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ PAP ที่ดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของกุ้งนั้นไม่ใช่ปริมาณตามที่ได้วางแผนการทดลองไว้ โดยจะมีความแตกต่างจากการที่กุ้งได้รับดีเอ็นเอโดยวิธีการฉีด (injection) ซึ่งไม่ต้องผ่านระบบทางเดินอาหารและสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดนี้ทำให้เราได้ทราบว่าดีเอ็นเอ PAP มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้และมีแนวโน้มที่ดีในการตอบสนองต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งสามารถนำไปปรับปรุงและศึกษาต่อในวาระต่อไป

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกึ่งขาวโดยใช้ชีวโมเลกุล 2 ชนิดคือ โปรตีน Ribosomal protein S3a (RPS3a) และยีน Phagocytosis activating protein (PAP) เพื่อช่วยให้กึ่งขาวสามารถมีชีวิตรอดได้เมื่อติดโรคตัวแดงดวงขาวนั้นได้ผลการศึกษาดังนี้

1. โปรตีนลูกผสม His-RPS3a ที่ความเข้มข้น 90 ไมโครกรัม ที่ให้กึ่ง 1 ตัวกิน ต่อวัน ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโพพรีนอลออกซิเดสได้ และไม่สามารถป้องกันกึ่ง จากไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

2. พลาสมิดลูกผสม phMGFP-PAP ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม ที่กึ่งกิน ต่อตัวต่อวันตลอดการทดลองมีผลให้กึ่งขาวมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด (61.89% RPS) ในสภาวะ น้ำเลี้ยงละลายด้วยเกลือ NaCl เป็นเวลา 7 วัน และเมื่อให้กินเป็นเวลา 3 วัน มีผลต่อ กระบวนการฟาโกไซโทซิสอย่างมากทั้งต่อ %phagocytosis และ phagocytic index แต่หากไม่สามารถป้องกันการตายของกึ่งจากไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

ข้อเสนอแนะ

1. โปรตีน RPS3a อาจจะสูญเสียโดยการละลายในน้ำไปบ้างในระหว่างการให้ กึ่งกิน จึงควรปรับปรุงความเข้มข้นของโปรตีนให้สูงขึ้นกว่าเดิม รวมทั้งพัฒนาวิธีการที่จะช่วยให้ ไม่เกิดการสูญเสียโปรตีนไปมากนักก่อนที่กึ่งขาวจะได้รับ แต่อีกแง่มุมหนึ่งนั้น RPS3a อาจจะ ไม่มีบทบาทสำคัญมากนักในระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งขาวก็เป็นได้

2. ดีเอ็นเอ PAP สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่ทั้งนี้ความเข้มข้นที่กึ่ง ได้รับดังกล่าว รวมถึงระยะเวลาที่กึ่งได้รับดีเอ็นเออาจต้องมีการปรับเปลี่ยนให้ได้ขึ้นกว่าเดิม เพื่อให้เกิดสภาวะที่ดีที่สุดแก่กึ่งขาวเมื่อต้องต่อสู้กับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีความรุนแรงในการ ก่อโรคมามาก

เอกสารอ้างอิง

- นภดล ศุภระกาญจน์, อัจฉริยา มุสโกภาศ, รัชณี โชติจินดา, สุกฎา คีร์รัฐนิคมและกิจการ
ศุภมาตย์. 2547. โรคติดเชื้อที่สำคัญในกุ้งขาว. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 7 ฉบับที่
1, 68-92.
- นิติ ชูเชิด, ชลอ ลัมสุวรรณ, ภิญโญ เกียรติภิญโญ, ธีรวัฒน์ ลิ้มชัยสมบูรณ์, พรศักดิ์ ลาโกตม,
สุธี วงศ์มณีประทีป, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์, จินตวัฒน์ สระทองขอ และ มธุรดา คันธ
รักษา. 2549. การสร้างเครือข่ายในการส่งเสริมและพัฒนาระบบการจัดการองค์ความรู้ใน
อุตสาหกรรม การเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย. รายงานการวิจัย คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- บุญรัตน์ ปทุมชาติ. (2550) “แร่ธาตุกับกุ้งขาวไทย” เข้าถึงได้จาก :
<http://www.shrimpcenter.com/shrimp001498.html> (วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2555)
- ปิยบุตร วานิชพงษ์พันธ์. 2545. ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนาไม (ตอนที่ 2) วารสารสัตว์
น้ำ. ปีที่ 14 ฉบับที่ 160 หน้า 1.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ชีววิทยาของเซลล์ (Cell Biology). กรุงเทพฯ. โอเดียนสโตร์
- วีรยุทธ อยู่ทอง. 2553. คุณลักษณะของโปรตีนที่จับกับไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์วิทยา
ศาสตร์ มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- พนารัตน์ วิระชร. 2549. ประสิทธิภาพของแคโรทีนอยด์ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย การ
เพิ่มและสะสมสารสีภูมิคุ้มกัน และการต้านทานความเครียดในกุ้งขาวแปซิฟิก (*Penaeus
vannamei*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- สิริลักษณ์ เจริญผล. 2545. การโคลนยีนและผลิตโปรตีนโครงสร้างส่วนสำคัญของเชื้อไวรัสตัว
แดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิชัย พฤษศิริสมบัติ. 2544. การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
Fabricus, 1798. เข้าถึงได้จาก [http://past.talaythai.com/
Education/4162047.php3](http://past.talaythai.com/Education/4162047.php3).
(วันที่สืบค้น 5 กุมภาพันธ์ 2555)

อมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2550. ซีวโมเลกุล : เพื่อการยู่รอดของกุ้ง. กรุงเทพฯ. ไอคิว มีเดีย.

อาทินันท์ ประสมพงศ์. 2546. เทคนิคการเลี้ยงกุ้งขาว หรือ วานาไม. เข้าถึงได้จาก :

<http://www.nicaonline.com/article2>. (วันที่สืบค้น 16 มกราคม 2555)

Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A. and Rodriguez, J. 1995.

Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*. 132 : 17-32.

Bevort, M. and Leffers, H. 2000. Down regulation of ribosomal protein mRNAs during neuronal differentiation of human NTERA2 cells. *Differentiation*. 66 : 81-92.

Chen, S.N. 1995. Current status of shrimp aquaculture in Taiwan. Proceeding of the special Session on Shrimp Farming. *Aquaculture*. pp : 29-34.

Chen, W.L. and Sung, H.H. 2005. The toxic effect of phthalate esters on immune response of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment. *Aquatic Toxicology*. 74 : 160-171.

Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M. and Cheng, W. 2007. Immune response and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*. 23 : 364-377.

Chotigeat, W., Deachamag, P. and Phongdara, A. 2007. Identification of a protein binding to the phagocytosis activating protein (PAP) in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture*. 271 : 112-120.

da-Silva, A.C., Borges, M.C., Guilvard, E. and Ouaiissi, A. (2001). Dual role of the *Leishmania major* Ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. *Infection and Immunity*. 69 : 6588-6596.

Dechamag, P., Intaraphad, U., Phongdara, A. and Chotigeat, W. (2006). Expression of Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture*. 225 : 165-175.

- Flegel, T.W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. 258 : 1-33.
- Fu, L.L., Shuai, J.B., Xu, Z.R., Li, J.R. and Li, W.F. 2010. Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles. *Fish and Shellfish Immunology*. 28 : 49-55.
- Greenberg, S. and Grinstein, S. (2002) Phagocytosis and innate immunity *Immunology*. 14 : 136-145.
- Harrison, R.E. and Grinstein, S. (2002) Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton *Biochem. Cell Biol.* 80 : 509-515.
- Hou, W.R., Sun, G., Chen, Y., Wu, X., Peng, Z.S. and Zhou, C. Molecular cloning of ribosomal protein L26 (RPL26) cDNA from *Ailuropoda melanoleuca* and its potential value in phylogenetic study. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36 : 194-200.
- Iborra, S., Parody, N., Abanades, D.R., Bonay, P., Prates, D., Novais, F.O., Barreletto, M., Alonso, C. and Soto, M. 2008. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous Leishmaniasis in mice. *Microbes and Infection*. 10 : 1133-1141.
- Ito, M., Yasui, A. and Komamine, A. 1992. A gene family homologous to the S-phase specific gene in higher plants is essential for cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 301 : 29-33.
- Iwanaga, S., Lee, B.L. 2005. Recent advance in the innate immunity of invertebrate animal. *Biochemistry and Physiology*. 113 : 641-649.

- Jiravanichpaisal, P., Sricharoen, S., Soderhall, I and Soderhall, K. 2006. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 20 : 718-727.
- Kashuba, E., Yurchenko, M., Szirak, K., Stahl, J., Klein, G. and Szekely, L. (2005). Epstein-barr virus-encoded EBNA-5 binds to Epstein-barr virus-induced Fte1/S3a protein. *Experimental Cell Research*. 303 : 47-55.
- Keith, I.R., Paterson, W.D., Airdrie, D. and Boston, L.D. 1992. Defense mechanisms of the American lobster (*Homarus americanus*) : Vaccination provided protection against gaffkemia infections in laboratory and field trials. *Fish and Shellfish Immunology*. 2 : 109-119.
- Khimmakthong, U., Deachamag, P., Phongdara, A. and Chotigeat, W. 2011. Stimulating the immune response of *Litopenaeus vannamei* using the Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene. *Fish and Shellfish Immunology*. 31 : 415-422.
- Kidou, S., Umeda, M., Tsuge, T., Kato, A. and Uchimiya, H. 1994. Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the S-phase-specific cyc07 gene. *Plant Mol Biol*. 24 : 545-7.
- Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, S.O., Yang, S.Y. and Kim, J.W. 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture*. 237 : 21-30.
- Larade, K., Nimigan, A and Storey, K.B. 2001. Transcription pattern of ribosomal protein L26 during anoxia exposure in *Littorina littorea*. *Experimental Zoology*. 290(7) : 759-768.
- Lecomte, F., Szpirer, J. and Szpirer, C. 1997. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (v-fos transformation effector) gene and the TNF- α -induced

- TU-11 gene and its transcript level is altered in transformed and tumor cells. *Gene*. 186 : 271-277.
- Lee, S.Y., Soderhall, K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*. 12 : 421-437.
- Lim, K.H., Kim, K.H., Choi, S.I., Park, E.S., Park, S.H., Ryu, K., Park, Y.K., Kwon, S.Y., Yang, S.I., Lee, H.C., Sung, I.K. and Seong, B.L. 2011. RPS3a Over-Expressed in HBV-Associated Hepatocellular Carcinoma Enhances the HBx-Induced NF- κ B Signaling via Its Novel Chaperoning Function. <http://www.plosone.org/article/info> (accessed 03/20/2012).
- Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas) : A review. *Invertebrate Pathology*. 106 : 110-130.
- Liu, H., Soderhall, K. and Jiravanichpaisal, P. 2009. Antiviral Immunity in Crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology*. 27 : 79-88.
- Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol*. 14(8) : 1655-1656.
- Mavrouli, M.D., Tsakas, S., Theodorou, G.L., Lampropoulou, M. and Marmaras, V.J. 2005. MAP kinase mediated phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1744 : 145-156.
- Metspalu, A., Rebane, A., Hoth, S., Pooga, M., Stahl, J. and Kruppa, J. 1992. Human ribosomal protein S3a : cloning of the cDNA and primary structure of the protein. *Gene*. 119 : 313-316.
- Naora, H., Takai, I., Adachi, M. and Naora, H. 1998. Altered Cellular Response by Varying Expression of a Ribosomal Protein Gene : Sequential Coordination of Enhancement and Suppression of Ribosomal Protein S3a Gene Expression Induce Apoptosis. *Journal of Cell Biology*. 141(3) : 741.

- Navakanitworakul, R., Deachamag, P., Wonglapsuwan, M. and Chotigeat, W. 2012. The roles of ribosomal protein S3a in ovarian development of *fenneropenaeus merguensis* (De man). *Aquaculture*. 338-341 : 208-215.
- Nolte, D., Taimor, G., Kalff-Suske, M. and Seifart, K.H. 1995. The human S3a ribosomal protein : sequence, location and cell-free transcription of the functional gene. *Gene*. 169 : 179-185.
- Prapavorarat, A., Pongsomboon, S. and Tassanakajon, A. 2010. Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*. 34 : 611-617.
- Robalino, J., Carnegie, R.B., O'Leary, N., Severine, A., Patat, O., de la Vega, E., Prior, S., Gross, P.S., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Schey, K.L. and Warr, G. 2009. Contribution of functional genomics and proteomics to the study of immune response in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Verterinary Immunology and Immunopathology*. 128 : 110-118.
- Roman, J.M.T. 2006. Assesment of genetic variability in two lots of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) introduced to Cuba. Master of Science in International Fisheries Management Thesis, University of Tromso, Norway.
- Shemer, R., Eibschitz, I. and Cavari, B. 2000. Isolation and characterization of *medika* Ribosomal protein S3a (*fte-1*) cDNA and gene. *Gene*. 250 : 209-217.
- Starky, C.R. and Levy, L.S. 1995. Identification of differentially expressed genes in T-lymphoid malignancies in an animal model system. *Int.J.Cancer*. 62 : 325-331.
- Takagi, M., Absalon, M.J., Mclure, K.G and Kaston, M.B. 2005. Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin. *Cell*. 123 : 49-63.

- Verghese, B., Radhakrishnan, E.V. and Padhi, A. 2007. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish and Shellfish Immunology*. 23 : 928-936.
- Vidal, O.M., Granja, C.B., Aranguren, F., Brock, J.A., Salazar, M. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White spot syndrome virus. *World Aquaculture*. 32 : 364-372.
- Wang, X.W. and Wang, J.X. 2012. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 10.1016/j.dci.2012.04.009
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Bonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995. A non-occlude, systemic baculovirus that occurs in the cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquat. Org.* 21 : 69-77.
- Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1996. DNA fragment of *Penaeus Monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*. 143 : 23-32.
- Yue, F., Pan, L., Xie, P., Zheng, D. and Li, J. 2010. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia -N stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 157 : 246-251.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายและบัฟเฟอร์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Yeast extracts	1	กรัม
Tryptone	1	กรัม
Sodium chloride	0.5	กรัม

ใส่สารข้างต้นลงใน volumetric flask จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสาร Kanamycin มา 20 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสาร Ampicillin มา 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมอาหาร K-199 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร M-199 มา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร (2x) แล้วเติม NaHCO_3 จำนวน 1.1 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม

salt mixture (0.05 M KCl, 0.12 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และ 4.16 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0.16 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 10 มิลลิลิตร

1.88 M NaCl จำนวน 10 มิลลิลิตร

0.1 M L-glutamine จำนวน 1 มิลลิลิตร

10 M HEPES

ทำการปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วทำการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

5. การเตรียมอาหาร KC-199

เติม L-Cysteine ในอัตราส่วน 5% ลงในอาหาร K-199

6. การเตรียมสารละลาย 1 M IPTG

ซังสาร IPTG มา 2.38 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. การเตรียมสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ลิตร

Sodium Chloride	8.0	กรัม
Sodium hydrogen phosphate	1.44	กรัม
Potassium Chloride	0.2	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.24	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับ pH เป็น 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. การเตรียมสารละลายสำหรับทำ SDS-PAGE

8.1 การเตรียม 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ซัง Tris base 18.17 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH เป็น 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2 การเตรียม 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8.3 การเตรียม 30% acrylamide-bisacrylamide ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ซัง acrylamide 29 กรัม และ N,N'-methylene-bis acrylamide 1 กรัม ละลาย bisacrylamide ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อยๆเติม acrylamide จนละลายหมด ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ทำการกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.4 การเตรียม 10% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ซังสาร SDS มา 10 กรัม แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น ทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.5 การเตรียม 10% Ammonium persulphate (APS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่งสาร APS มา 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.6 การเตรียม 2X sample buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

10% SDS	4	มิลลิลิตร
Glycerol	2	มิลลิลิตร
1 M DTT	2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.002	กรัม

ทำการปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.7 การเตรียม Tris-glycine buffer ปริมาตร 1 ลิตร

SDS	1	กรัม
Glycine	14.42	กรัม
Tris-base	4	กรัม

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.8 การเตรียมสารละลาย staining ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Coomassie blue R-250 มา 2 กรัม ละลายใน 95% methanol ปริมาตร 525 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.9 การเตรียมสารละลาย Destaining II ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95% methanol ปริมาตร 525 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	อิลฮาม สีอรี	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5110220104	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน (Teacher Assistant) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ ประจำปีการศึกษา 2551

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อิลฮาม สีอรี, วิไลวรรณ โชติเกียรติ และปัญชลิกา เดชะมาก. 2555. ผลของยีน Phagocytosis Activating Protein (PAP) ต่อการรอดชีวิตในสภาวะเครียดในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 2. 4-5 กันยายน 2555. หน้า 260.