

ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

Genes Involved in Immune System of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*)



พจนพร ไกรดิษฐ์

Potchanapond Graidist

๑ .

เลขที่	01111.1111 1111 1111 1111 1111 2
Bib Key	207772
	- 6 ส.ค. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

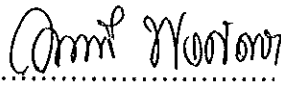
Prince of Songkla University

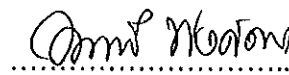
2544

ชื่อวิทยานิพนธ์ ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกูดดำ (*Penaeus monodon*)
ผู้เขียน นางสาวพจนพร ไกรศิษฐ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

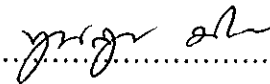
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

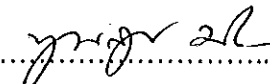
.....กรรมการ

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ สุขมาตย์)


(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ สุขมาตย์)

.....กรรมการ

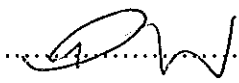
.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรพ์)

(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรพ์)

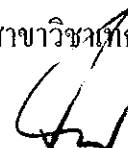
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติสร รัตนพันธ์)

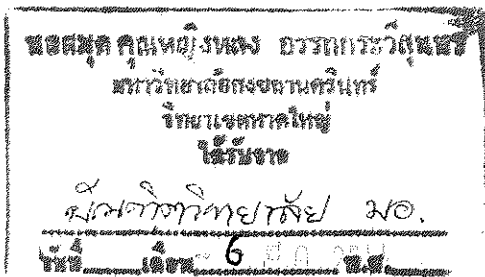
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณ ชูฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ ทฤษฎีกุณ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย



ชื่อวิทยานิพนธ์ ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)
ผู้เขียน นางสาวพจนพร ไกรดิษฐ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังพวกครัสตาเซียประกอบด้วยระบบกลไกการป้องกันตัวของเซลล์และสารน้ำ ปัจจุบันยังมีการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่และความสัมพันธ์ของสารเหล่านี้ค่อนข้างน้อย การศึกษาในครั้งนี้จึงใช้เทคนิค cDNA subtractive hybridization เพื่อระบุชนิดของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้แยกความแตกต่างของ mRNA จากเลือดกุ้งที่ไม่ติดเชื้อและกุ้งที่ติดเชื้อ โคลนจาก subtracted cDNA จำนวน 808 โคลน มีขนาด 200 - >1,500 bp เมื่อนำโคลนที่ได้ไปทำ hybridization มีโคลนจำนวน 202 โคลน ที่ให้ผล hybridize ด้วย forward และ reverse probe ตรงข้ามกัน เลือกโคลนที่ตรงข้ามกันไปหาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสกับข้อมูลของธนาคารยีน จากการเปรียบเทียบพบว่า โคลน pTE8, pTE66 และ pTE70 มีความเหมือนกับยีน scaffold protein 84%, tyrosine kinase 72% และ chromosome 21 (interferon/interleukin) 64% ตามลำดับ โคลน pT21 และ p43S2 มีความเหมือนกับยีน translationally controlled tumor protein (TCTP) 66% ซึ่งยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องในกระบวนการ signal transduction ซึ่งเป็นกระบวนการกระตุ้นระบบต่างๆ ของร่างกายของสิ่งมีชีวิต

Thesis Title Genes Involved in Immune System of Black Tiger Prawn
(*Penaeus monodon*)

Author Miss Potchanapond Graidist

Major Program Biotechnology

Academic Year 2000

Abstract

The invertebrate immune system contains cellular and humoral defense mechanism. However, knowledge of substances that involved in shrimp immune system was remained limit. In this study cDNA subtractive hybridization was performed in order to identify the proteins that related to the immune system. cDNA was constructed from mRNA isolated from normal shrimp hemolymph and was subtracted with those from infected shrimp. Eight hundred and eight clones of cDNA fragments ranging from 200 - >1,500 bp were obtained. Among them, 202 clones were strongly hybridized with forward probe but not hybridized with reverse probe. The resultant clones were sequenced and then the sequences were compared with data from GenBank. It was shown that the sequences of pTE8, pTE66 and pTE70 clones were similar to scaffold protein (84%), tyrosine kinase (72%) and chromosome 21 (interferon/interleukin) (64%) , respectively. pT21 and p43S1 clones had sequenced homology to translationally controlled tumor protein (TCTP) (66%). These genes were reported to involve in the signal transduction of organisms.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์คารา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จโดยสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสุรทรัพย์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติสร รัตนพันธ์ กรรมการผู้แทนภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่าง กุ้งและสถานที่ในการเตรียมตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการศึกษาและการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาโดยตลอด ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำและอบรมสั่งสอน ผู้เขียนขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่มีได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ให้กำลังใจและมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

พจนพร ไกรศิษฐ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	24
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	25
วัสดุ	25
อุปกรณ์	29
วิธีการ	30
3. ผลและวิจารณ์	49
4. สรุป	96
เอกสารอ้างอิง	97
ภาคผนวก	106
ผลงานทางวิชาการ	113
ประวัติผู้เขียน	114

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา (Ligation master mix)	35
2. ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อม cDNA กับ adaptor	35
3. ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา first hybridization	37
4. ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา Primary PCR	39
5. สภาวะที่ทำปฏิกิริยา Primary PCR	39
6. ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา Secondary PCR	40
7. สภาวะที่ทำปฏิกิริยา Secondary PCR	40
8. ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	47
9. สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR	47
10. โคลนที่ได้จากการทำ subtracted cDNA library	54
11. ผลการทำ hybridization ด้วย Forward probe และ Reverse probe	89

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะทั่วไปของกุ้ง	3
2. ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ	5
3. เมตาบอลิซึมของไทโรซีนในแมลง	19
4. ปฏิกริยาและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ reactive oxygen species (ROS)	20
5. ขบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเข้าสู่ร่างกาย	23
6. การเชื่อม Adaptor กับ tester cDNA สำหรับการทำให้ hybridization และ PCR ของ Forward subtraction	41
7. การเชื่อม Adaptor กับ tester cDNA สำหรับการทำให้ hybridization และ PCR ของ Reverse subtraction	42
8. การเชื่อม Adaptor กับ tester cDNA สำหรับการทำให้ hybridization และ PCR ของ Control subtraction	43
9. ผลการสังเคราะห์ cDNA และการตัด cDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i> วิเคราะห์บน 1.8% agarose gel eletrophoresis	51
10. แผนภาพการเตรียม cDNA subtractive hybridization	52
11. ผลที่ได้จากการทำให้ cDNA subtractive hybridization วิเคราะห์บน 1.8% agarose gel eletrophresis	53
12. PCR products ที่ได้จากโคลน pT2, pT4, pT5, pT6, pTE9, pTE13, pTE15, pTE18, pTE19, pTE21, pTE23, pTE87, pTE98, pTE114	55
13. PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน pTE6, pTE8, pTE9, pTE10, pTE11, pTE12, pTE13, pTE14, pTE27, pTE29, pTE31, pTE46, pTE57, pTE66, pTE70, pTE71 และ p1S1 - p1S1	56
14. PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p16S1 - p40S1	57

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p41S1 - p64S1	58
16. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p65S1 - p94S1	59
17. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p95S1 - p124S1	60
18. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA โคลน p125S1 - p156S1	61
19. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p157S1 - p185S1	62
20. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p186S1 - p213S1	63
21. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p214S1 - p245S1	64
22. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p246S1 - p256S1 และ p1S2 - p21S2	65
23. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p22S2 - p52S2	66
24. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p53S2 - p83S2	67
25. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p84S2 - p114S2	68
26. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p115S2 - p147S2	69

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
27. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p148S2 - p179S2	70
28. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p180S2 - p210S2	71
29. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p211S2 - p242S2	72
30. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p243S2 - p266S2 และ p1S3 - p8S3	73
31. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p9S3 - p40S3	74
32. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p41S3 - p72S3	75
33. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p73S3 - p104S3	76
34. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p105S3 - p135S3	77
35. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p136S3 - p168S3	78
36. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p169S3 - p200S3	79
37. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p201S3 - p232S3	80
38. PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library โคลน p233S3 - p259S3	81

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
39. ผลการทำ hybridization โคลน pT และ pTE ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)	82
40. ผลการทำ hybridization โคลน p1S1 - p75S1 ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)	83
41. ผลการทำ hybridization โคลน p64S1 - p134S1 ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)	84
42. ผลการทำ hybridization โคลน p135S1 - p210S1 ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)	85
43. ผลการทำ hybridization โคลน p211S1 - p256S1 และ p1S2 - p20S2 ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)	86
44. ผลการทำ hybridization โคลน p21S2 - p88S2 ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)	87
45. ผลการทำ hybridization โคลน p89S2 - p158S2 ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)	88

ตัวย่อและสัญลักษณ์

μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
AMV	=	avian myeloblastosis virus
AP	=	alkaline phosphatase
ATP	=	Adenosine triphosphate
BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
bp	=	basepair
BSA	=	Bovine serum albumine
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
DIG	=	Digoxigenin
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dNTP	=	deoxynucleoside triphosphate
ds	=	double strand
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
HEPES	=	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid
kDa	=	kilodalton
kb	=	kilobase
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
NAD	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
NBT	=	Nitroblue tetrazolium

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

PCR = Polymerase Chain Reaction

RNA = Ribonucleic acid

RNase A = Ribonuclease A

rpm = revolution per minute

SDS = Sodium dodecyl sulfate

Tris = Tris (hydroxymethyl) aminomethane

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กุ้งเป็นสินค้าเกษตรส่งออกที่สำคัญของไทย สามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นอันดับ 1 ใน 3 ของการส่งออก มีผลผลิต 200,000 ตันต่อปี และส่งออกประมาณร้อยละ 90 ในรูปแช่แข็งและแปรรูป โดยที่ประเทศไทยครองอันดับหนึ่งในการส่งออกลานหลายปี (นิรนาม, 2541) ในปี 2540 ประเทศไทยส่งออกกุ้งและผลิตภัณฑ์คิดเป็นมูลค่ารวมสูงถึงประมาณ 6 หมื่นล้านบาท หรือปริมาณกุ้งส่งออก 1.8 แสนตัน การขยายตัวของมูลค่าการส่งออกจากปี 2539 สูงถึงร้อยละ 40 (พิบูลย์ เขียมอนุกุลกิจ, 2541) อย่างไรก็ตามเนื่องจากผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ขาดประสบการณ์และไม่มีระบบการจัดการที่ดีพอมีการเลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น เมื่อเลี้ยงไปนานๆ จะทำให้แหล่งเพาะเลี้ยงเสื่อมโทรมเกิดโรคระบาดผลผลิตลดลง ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่าหลายล้านบาทต่อปี ในปี 2535 มีการระบาดของโรคหัวเหลืองที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช มูลค่าความเสียหายไม่น้อยกว่า 80 ล้านบาท และในระยะเวลาไม่นานก็มีการระบาดในพื้นที่ใกล้เคียง (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ, 2535) อ้างโดย จิราพร เกษรจันทร์ และ สิทธิ บุญยรัตผลิน, 2538) จากการแพร่ระบาดของโรคหัวเหลืองเฉพาะในปี 2535 ได้สร้างความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในภาคใต้คิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 500 ล้านบาท (จิราพร เกษรจันทร์ และ สิทธิ บุญยรัตผลิน, 2538) การจัดการในการเลี้ยงที่ผิดวิธี เช่น สภาพพื้นที่นบ่อ คุณภาพของน้ำ การให้อาหาร รวมถึงการใช้สารเคมีที่ผิดวิธี ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและติดเชื้อโรคที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ ในสภาพที่กุ้งเกิดความเครียดร่างกายจะอ่อนแอและระบบภูมิคุ้มกันโรคลดลง กุ้งจึงแสดงอาการของโรคและมีอัตราการตายสูง โรคที่เกิดในบ่อเลี้ยงกุ้งและโรงเพาะฟักโดยทั่วไปเกิดจากสิ่งมีชีวิต 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ปรสิตร เชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรีย แต่ในสภาวะ

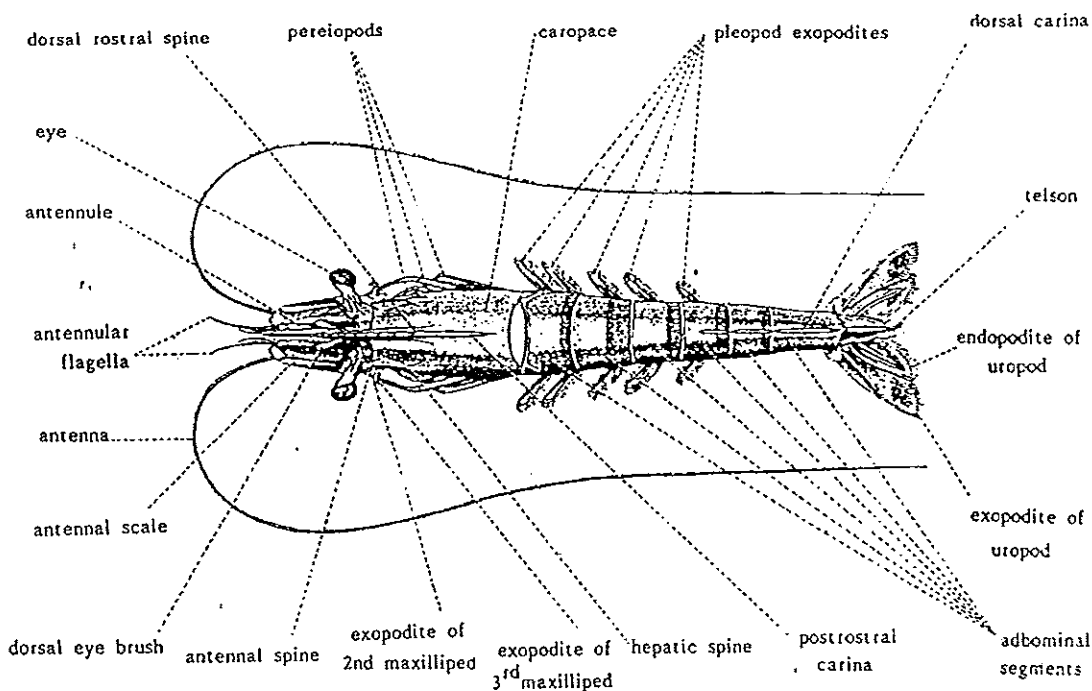
ปกติกึ่งจะสามารถอาศัยอยู่ในสภาวะที่มีโรคได้ ทั้งนี้เนื่องจากกึ่งมีระบบกลไกการป้องกันตัวโดยเซลล์ (cellular defense system) และโดยสารน้ำ (humoral defense system) ทั้งสองระบบมีความเกี่ยวข้องกันผ่านทางสารสื่อในน้ำเลือดของกึ่ง โดยสารสื่อจะทำหน้าที่แยกแยะสิ่งแปลกปลอมเพื่อการกำจัด (นิรนาม, 2538) ปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการแก้ปัญหาคือการติดเชื้อโรคของกึ่งจะเน้นไปที่การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ แต่เนื่องจากความรู้ความเข้าใจในเรื่องการใช้ยาและสารเคมียังส่งเสริมไม่ทั่วถึง ทำให้เกิดปัญหาเรื่องสารตกค้างในธรรมชาติและตกค้างในเนื้อกึ่ง ปัญหานี้ทำให้กึ่งราคาตกหรือขายไม่ได้ ยาปฏิชีวนะที่ใช้กันส่วนใหญ่ได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracyclin), ออกโซลินิกแอซิด (oxolinic acid), ฟูราโซลิโดน (furazolidone), ซัลฟาโมโนเมททอกซีน (sulfamonomethoxine), ซัลฟาโดเมททอกซีน (sulfadimethoxine), นีโอไมซิน (neomycin), กรดนาลิดิสิก (nalidixic acid), กรดไพโรมิติก (piromidic acid), ไนเฟอไพรินอล (nifurpirinol) (Lin and Nash, 1996) ซึ่งหากใช้ยาเหล่านี้ไม่ถูกต้องนอกจากจะรักษาโรคไม่หายแล้วยังทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา (Roch, 1999) และมีปัญหาตามมาอีกมากมาย ด้วยเหตุนี้จึงได้หันมาสนใจเกี่ยวกับระบบป้องกันตัวของกึ่ง อย่างไรก็ตามความเข้าใจถึงรายละเอียดของกลไกดังกล่าวยังมีไม่มากนัก จากข้อมูลของการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในปลา พบสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันหลายชนิดซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโตไคน์ (cytokines) ได้แก่ interleukin-1, chemokines, transforming growth factor- β , fibroblast growth factor (Secombes, *et al.*, 1999) ทำให้น่าสนใจว่าจะมีสารเหล่านี้อยู่ในตัวกึ่งหรือไม่ และกึ่งมีกลไกการป้องกันตัวเช่นเดียวกับครัสเตเชียอื่นๆ หรือไม่ หากมีและสามารถทราบรายละเอียดก็จะเป็นประโยชน์ต่อการหาวิธีเสริมภูมิคุ้มกันและทำให้กึ่งแข็งแรงขึ้น

ในการศึกษาสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากเป็นสารที่มีอยู่ในปริมาณต่ำ ทำให้เป็นการยากที่จะแยกสารนั้นออกมาศึกษา การศึกษาในครั้งนี้จึงใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตน และศึกษารายละเอียดลำดับเบสของยีนที่ได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำข้อมูลไปใช้ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารชีวโมเลกุลต่างๆ เพื่อที่จะนำมาใช้ป้องกันโรคกึ่งต่อไปในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. ชีววิทยาของกุ้งทะเลและความสำคัญทางเศรษฐกิจ

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสตาเซีย (crustacea) มีเปลือกหุ้มลำตัวและระยางค์ต่อกันเป็นปล้อง เปลือกหุ้มเป็นสารไคติน แต่ละปล้องมีลักษณะคล้ายวงแหวนเชื่อมต่อกันด้วยเยื่อบางๆ ทำให้ขยับตัวได้ ส่วนหัวมีก้านตาและตาหนึ่งคู่เคลื่อนไหวได้ มีหนวด 2 คู่ หนวดกุ้งคู่แรกบางชนิดอาจแยกเป็น 2 แฉก เช่น ในกุ้งเคยตัวผู้ หนวดคู่แรกจะแยกเป็น 2 แฉก สร้างเป็นอวัยวะสำหรับยึดเกาะช่วยในการสืบพันธุ์ นอกจากนี้ตรงบริเวณส่วนท้องยังมีขาเดินและขาว่ายน้ำ ส่วนหางมีแพนหางช่วยในการว่ายน้ำ (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2538) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของกุ้ง

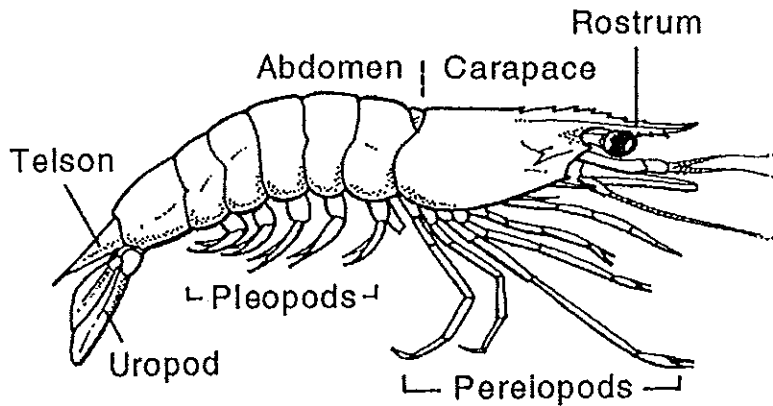
ที่มา : ประจวบ หล้าอุบล (2532)

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเริ่มประมาณ 40 ปี มาแล้ว สันนิษฐานว่าคงจะเริ่มขึ้นที่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม สมุทรปราการ แล้วค่อยขยายออกไปตามแนวชายฝั่ง ทะเลที่ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด และตลอดไปยังชายฝั่งทะเลภาคใต้ พื้นที่ทำการ เลี้ยงกุ้งทะเลประมาณ 70,000 - 80,000 ไร่ ผลผลิตที่ได้ประมาณ 6,000 ตันต่อปี หรือคิด เป็นไร่ละ 40 กิโลกรัม (ไชยา อัยสูงเนิน, 2536 อ้างโดย สุภาพร สุกสีเหลือง, 2538) พื้นที่ เลี้ยงกุ้งกุลาดำปี 2541 มีประมาณ 440,000 ไร่ เพิ่มขึ้นจาก 432,000 ไร่ ในปี 2540 ร้อยละ 1.85 ผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงประมาณ 230,000 ตัน และ 215,000 ตัน ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2541) กุ้งทะเลที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ กุ้งแช่ขี้หรือกุ้งหางแดงหรือกุ้งขาว และกุ้งกุลาดำ (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2538)

กุ้งเป็นสินค้าที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ และถือได้ว่าเป็นประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกอันดับหนึ่งของโลก ตลาดส่งออกที่สำคัญของไทย ได้แก่ ญี่ปุ่น ตลาด อียู สหรัฐอเมริกา สิงคโปร์ จีน ไต้หวัน และฮ่องกง (เลขานุการสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2541) โดยมีประเทศที่เป็นคู่แข่งสำคัญ ได้แก่ เอกวาดอร์ อินโดนีเซีย อินเดีย เวียดนาม และจีน (World Shrimp Farming. Annual Report, 1996 อ้างโดย พิบูลย์ ภิเษม นุกุลกิจ, 2541)

2. กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius)

กุ้งกุลาดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon*, Fabricius ชื่อสามัญ Black tiger prawn เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ ลักษณะเปลือกเกลี้ยงไม่มีขน มีกริยาว มีสันตับ (hepatic ridge) ยาว ลำตัวมีสีน้ำตาลเงินแกมม่วง มีแถบดำพาดขวางลำตัวตามปล้องและ ปลายหาง (Grey, *et al.*, 1983) (ภาพที่ 2) ขนาดโตเต็มที่มีความยาว 270 มิลลิเมตร และมี น้ำหนักถึง 260 กรัม (Motoh, 1981 อ้างโดย วรวิทย์ ชีวพรและคณะ, 2534) ในทางอนุกรมวิธาน จัดกุ้งอยู่ในอันดับต่อไปนี้ Phylum Arthropoda, Class Crustacea, Subclass Malacostraca, Superorder Eucarida, Order Decapoda, Suborder Natantia, Family Penaeidea, Genus *Penaeus* (ประจวบ หล้าอุบล, 2532 ; Roch, 1999) พบตามธรรมชาติ แถบชายฝั่งไทย ฮ่องกง ออสเตรเลีย และชายฝั่งอินโดแปซิฟิก (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2538)



ภาพที่ 2 ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งกุลาดำ
ที่มา : King (1995)

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่นิยมเลี้ยงกันมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย (ประจวบ หล้าอุบล, 2532) สามารถเลี้ยงได้ในบ่อทุกประเภทเพราะมีความอดทนสูง ทนต่อความเค็มในระดับ 0.2 - 70 ส่วนในพัน แต่ช่วงที่เหมาะสมคือ 10 - 20 ส่วนในพัน ชอบหากินตามพื้นบ่อ กินอาหารได้ตลอดเวลา มักหมกตัวและหากินตามหน้าดิน (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2538)

✓ วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำเริ่มจากกุ้ง โตเต็มวัยซึ่งอาศัยอยู่ในทะเลที่มีความลึก 20 - 70 เมตร ผสมพันธุ์และวางไข่ เมื่อไข่ฟักเป็นตัวอ่อนก็จะมีการพัฒนาผ่านระยะต่างๆ คือ ตัวอ่อนระยะที่ 1 (Nauplius) ตัวอ่อนระยะที่ 2 (Protozoa) ตัวอ่อนระยะที่ 3 (Mysis) ตัวอ่อนระยะที่ 4 (Postlarva) และกุ้งวัยรุ่น (Juvenile) ตลอดการพัฒนาจะมีการอพยพของลูกกุ้งเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง โดยเฉพาะบริเวณป่าชายเลน ลูกกุ้งจะหากินและหลบภัยในบริเวณนี้จนถึงวัยเจริญพันธุ์ (Subadult) จึงอพยพกลับสู่ทะเลภายนอก (Motoh, 1985 อ้างโดย วรวิทย์ ชีวาพร และคณะ, 2534)

3. โรคกุ้งทะเล

ปัจจุบันปัญหาโรคระบาดกุ้งยังคงสร้างความเสียหายต่อผลผลิตกุ้งกุลาดำของไทย โดยเฉพาะบริเวณแหล่งเลี้ยงที่มีฟาร์มตั้งอยู่หนาแน่น ทำให้การบริหารน้ำและการควบคุมคุณภาพ ตลอดจนการบำบัดน้ำก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะไม่สามารถทำได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ดังนั้นเมื่อเกิดโรคระบาดเชื้อโรคจะแพร่กระจายได้ง่ายสร้างความเสียหายต่อผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำทำให้คุณภาพผลผลิตกุ้งด้อยลง ทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้นและก่อให้เกิดต้นทุนที่ต้องใช้ในการกำจัดโรค โรคกุ้งที่มีการระบาดในปัจจุบันมีสาเหตุมาจาก ไวรัส แบคทีเรีย รา และโปรโตซัว (Ligntner, *et al.*, 1994 อ้างโดย Lavilla-Pitogo, 1996)

3.1 โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

โรคที่เกิดจากแบคทีเรียได้แก่ *Vibrio* spp. เช่น *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* (วนิดดา คมเวช, 2532 ; Liu, 1990 ; Lin and Nash, 1996) โรคเรืองแสงที่เกิดจากแบคทีเรีย *V. harveyi* เป็นโรคที่เกิดกับลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก มีรายงานว่าแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous bacteria) เช่น *Leucothrix mucor*, *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* ทำให้เกิดโรคในกุ้งระยะ larva และ postlarva (Lin and Nash, 1996)

3.2 โรคที่เกิดจากไวรัส

มีไวรัสอย่างน้อย 15 ชนิด ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งที่เพาะเลี้ยงและในกุ้งทะเลที่อยู่ตามธรรมชาติ ชนิดของไวรัสที่มีรายงานได้แก่ rhabdoviruses, parvoviruses, baculoviruses, reoviruses, togaviruses ไวรัสในกลุ่ม baculoviruses ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งตระกูลพีเนียส เช่น hemolymph baculoviruses (Owen, 1993 อ้างโดย Lavilla-Pitogo, 1996) และ systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) (Wongteerasupaya, *et al.*, 1995 อ้างโดย Lavilla-Pitogo, 1996) Liu (1990) พบว่าไวรัสที่ทำให้กุ้งตระกูลพีเนียสเกิดโรครวม 6 ชนิด คือ *Baculovirus penaei* (BP), Baculoviral midgut gland necrosis (BMN), monodon baculovirus (MBV), infectious hypodermal

and hemotopoietic necrosis virus (IHNV), Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV), Reo-like virus ใน hepatopancreas ของ *P. japonicus*

3.3 โรคที่เกิดจากรา, โปรโตซัว และโรคอื่นๆที่เกิดจากปรสิต

1. โรคที่เกิดจากรา เช่น *Lagenidium* sp., *Haliphthoros*, *Sirolopidium* sp. และ *Fusarium* sp. พวกนี้จะระบาดในโรงเพาะฟักลูกกุ้ง (วนิดดา คมเวช, 2532 ; Baticados, et al., 1990 อ้างโดย Lavilla-Pitogo, 1996 ; Lin and Nash, 1996) และบ่อเลี้ยง (Lin and Nash, 1996) *Aspergillus* sp. ทำให้เกิดโรคในบ่อเลี้ยง (วนิดดา คมเวช, 2532)

2. ปรสิตพวก parasitic microsporidian เช่น *Agmasoma penaei* มีผลทำให้กุ้งที่เพาะเลี้ยงตาย (Flegel, et al., 1992 อ้างโดย Lavilla-Pitogo, 1996)

3. โปรโตซัว เช่น *Acenita* sp., *Epistylis* sp., *Licmophora* sp., *Lagenophrys* sp., *Thelohania* sp., *Vorticella* sp., *Carchesium* sp. และ *Euphelota* sp. (วนิดดา คมเวช, 2532 ; Lin and Nash, 1996) gregarines และ ciliates พวกนี้ทำให้เกิดโรคกับกุ้งที่เพาะเลี้ยง (Lavilla-Pitogo, 1996) *Zoothamnium* sp. พบว่ามีการระบาดทั้งในโรงเพาะฟักและบ่อเลี้ยง (Lin and Nash, 1996)

4. การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูง

ระบบภูมิคุ้มกัน คือ ระบบที่ทำหน้าที่คุ้มกันร่างกายเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน (antigen) เข้าสู่ร่างกาย และจะมีการตอบสนองหลายอย่างเกิดขึ้น เพื่อป้องกันตัวเองและเพื่อกำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมนั้น ระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วย สารน้ำและเซลล์หลายพวกทำหน้าที่ร่วมกัน เซลล์ดังกล่าวคือ ลิมโฟไซต์ (lymphocyte), เซลล์พลาสมา (plasma cell), ฟาโกไซต์ (phagocyte) ซึ่งได้แก่ นิวโทรฟิล (neutrophil), อีโอสิโนฟิล (eosinophil), โมโนไซต์ (monocyte), มาโครฟาจ (macrophage), เซลล์มาสต์ (mast cell), เบโซฟิล (basophil) ในภาวะปกติเซลล์เหล่านี้ส่วนใหญ่อยู่ใน lymphoid tissue, เลือด, น้ำเหลือง (lymph) และไขกระดูก (bone marrow) ยกเว้นเซลล์พลาสมาซึ่งไม่พบในเลือด (วิบูลศรี พิมลพันธ์, 2537)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน คือ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ต่อสิ่งแปลกปลอมเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้น ความสามารถในการตอบสนองจะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ปัจจัยที่มีผลในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ พันธุกรรม อายุ สารในกระบวนการเมแทบอลิซึม สิ่งแวดล้อม ร่างกาย จุลินทรีย์ สรีรวิทยา แบ่งภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายได้ 2 แบบ คือ ภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ (non-specific immunity หรือ innate immunity) และภูมิคุ้มกันจำเพาะ (specific immunity หรือ acquired immunity) (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, 2537)

4.1 ภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ

เป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด มีอยู่แล้วในร่างกายโดยที่ร่างกายไม่เคยได้รับสิ่งแปลกปลอมนั้น (Benjamini, *et al.*, 1989) หรือแม้จะได้รับซ้ำอีกร่างกายก็อาจใช้วิธีการนี้ร่วมกับการตอบสนองแบบจำเพาะ วิธีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้แก่

1. กลไกทางฟิสิกส์ (Physiologic Barrier) เป็นเครื่องมือกีดขวางตามธรรมชาติเพื่อไม่ให้จุลินทรีย์เข้าสู่ร่างกาย เช่น ผิวหนัง, เยื่อเมือก (Benjamini, *et al.*, 1989), การไหลของสิ่งคัดหลั่งและสิ่งขับถ่าย, การไอ, จาม (สคไพ เวชชาชีวะ และคณะ, 2522)
2. กลไกของการอักเสบ (Inflammatory response) เป็นการเคลื่อนย้ายฟาโกไซตต์มายังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม ซึ่งบริเวณนั้นจะมีลักษณะจำเพาะ คือ บวม แดง ร้อน พบว่าหลังจากที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้าไป เม็ดเลือดขาวจำพวกนิวโทรฟิลจะเป็นพวกแรกที่มาถึงบริเวณนี้ เพื่อจะมากินและทำลายสิ่งแปลกปลอม หลังจากนั้นเซลล์พวก mononuclear cell ซึ่งได้แก่ ลิมโฟไซตต์ โมโนไซตต์ จะเข้ามา แล้วโมโนไซตต์จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นมาโครฟาจ เพื่อกินและทำลายสิ่งแปลกปลอม ตลอดจนเตรียมแอนติเจนไว้ให้ลิมโฟไซตต์ ส่วนลิมโฟไซตต์จะมาทำหน้าที่ตอบสนองต่อแอนติเจนแบบจำเพาะ (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, 2537) นอกจากนี้ยังมีสารในกลุ่มไซโตไคน์ เช่น interferons (IFN), interleukins, tumor necrosis factor (TNF), alpha and lymphotoxin, colony stimulating factor (G-CSF, M-CSF และ GM-CSF), transforming growth factor (TGF β) ตอบสนองการอักเสบด้วย (Neta, *et al.*, 1990 อ้างโดย Cooper, *et al.*, 1996)

3. สารเคมี ได้แก่ สารเมือก, กรดแลคติกพบในเหงือก, กรดไขมันพบที่ผิวหนัง, ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในน้ำลาย น้ำมูก และน้ำตา, ไกลโคลิพิด (glycolipid) พบในน้ำลาย, lactoferrin มีในสารคัดหลั่ง, fibronectin เป็นสารพวกไกลโคโปรตีนพบในน้ำลาย, กรดไฮโดรคลอริกซึ่งหลั่งออกมาในกระเพาะอาหาร และ spermine พบในสารคัดหลั่งของต่อม prostate (วิบูลย์ศรี พิมพ์พันธุ์, 2537)

4. กระบวนการกินและทำลายสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ขั้นตอนการจับกินสิ่งแปลกปลอมประกอบด้วย การเข้ามาประชิดกัน (adherence) ระหว่างฟาโกไซต์และสิ่งแปลกปลอม, การกลืนสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในเซลล์ (ingestion), การฆ่าและการย่อยสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular killing and digestion) แล้วจึงปล่อยสิ่งแปลกปลอมที่ถูกทำลายแล้วออกไปจากเซลล์ (elimination) (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, 2537)

5. คอมพลีเมนต์ (Complement) เป็นโปรตีนกลุ่มหนึ่งในเซรัม การทำงานของคอมพลีเมนต์มี 2 แบบ คือ แบบทางลัด (alternative pathway) เป็นขบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื่อจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์จะไปกระตุ้นขบวนการนี้โดยตรง (Abbas, *et al.*, 1994) พบว่าส่วนประกอบของเซลล์ของจุลินทรีย์หรือตัวจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ด้วยวิธีการนี้ได้ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์, เพปทิโดไกลแคน และลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียหลายชนิด, ปรลิตบางอย่าง, ไวรัสหลายชนิด รวมทั้งเซลล์ที่มีการติดเชื่อไวรัส (นภาพร บานชื่น, 2537) และแบบทางตรง (classical pathway) ขบวนการนี้ส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยการกระตุ้นของสารประกอบเชิงซ้อนของแอนติบอดี-แอนติเจน (antibody-antigen complex) หรือโดยแอนติเจนบนผิวเซลล์ หรือจับอยู่กับแอนติเจนที่เป็นชิ้นๆ โดยที่แอนติบอดีดังกล่าวจะต้องเป็น IgG1, IgG2, IgG3 หรือ IgM (Abbas, *et al.*, 1994)

4.2 ภูมิคุ้มกันจำเพาะ

การกำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยภูมิคุ้มกันจำเพาะต้องอาศัยกลไกที่ยุ่งยากกว่า การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ภูมิคุ้มกันชนิดนี้เป็นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมชนิดหนึ่ง จะเกิดขึ้นเมื่อระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม

ชนิดนั้น สิ่งแปลกปลอมในที่นี้จะต้องมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนหรืออิมมูโนเจน ภูมิคุ้มกันจำเพาะพบเฉพาะในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เซลล์หลักที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันจำเพาะ คือ B lymphocyte, T lymphocyte, macrophage (Benjamini, *et al.*, 1989)

1. B lymphocyte มีหน้าที่ผลิตและหลั่งสารแอนติบอดีที่จำเพาะกับสิ่งแปลกปลอม แอนติบอดีเป็นสารไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 82-96% และคาร์โบไฮเดรต 4-18% เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ antigenic determinant ที่แปลกปลอมและจะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ antigenic determinant นั้นเท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้จะกำจัดสารพิษ จุลินทรีย์ ปรสิตและสารแปลกปลอมอื่นๆ ออกจากร่างกายได้ เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) หรือ Ig ซึ่งมี 5 ชนิด คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE (ทัศนีย์ สุโกศล, 2537)

2. T lymphocyte มีทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจำเพาะ โดยการผลิตสารลิมโฟไคน์ (lymphokine) ชนิดต่างๆ เพื่อช่วย B lymphocyte สร้างแอนติบอดีและช่วย T lymphocyte ชนิดอื่น, NK cell, ฟาโกไซตส์ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม และมีหน้าที่ผลิตสารลิมโฟไคน์เพื่อควบคุมการทำงานของ B lymphocyte และ T lymphocyte ไม่ให้มากเกินไป (วิบูลย์ศรี พิมลพันธ์, 2537)

3. มาโครฟาจ (macrophage) มีหน้าที่เสนอ antigenic determinant ให้แก่ T lymphocyte ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม (Benjamini, *et al.*, 1989)

5. กลไกการป้องกันตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

กึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีกลไกการป้องกันตัวที่ไม่พัฒนามากนัก มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ไม่มีอิมมูโนโกลบูลินและความจำ (Roch, 1999 ; Holmblad and Soderhall, 1999) กลไกการป้องกันตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังประกอบด้วยกลไกการป้องกันตัวโดยเซลล์ (Cellular Defense System) กลไกนี้เกี่ยวข้องกับโดยตรงกับเม็ดเลือด (Holmblad and Soderhall, 1999) เช่น กระบวนการทำให้เกิดการห่อหุ้มเชื้อโรค (Encapsulation), การทำงานของเซลล์เม็ดเลือด (Haemocyte), กระบวน

การจับกินเชื้อโรค (Phagocytosis) (Michelson, 1975 ; Bachere, *et al.*, 1995) และกลไกการป้องกันตัวโดยสารน้ำ (Humoral Defense System) เช่น lectin, bacteriocins, agglutinin, antimicrobial peptides, cytolysins, lysosomal enzymes, serine proteases (Tripp, 1975 ; Bachere, *et al.*, 1995 ; Roch, 1999) นอกจากการทำงานของกลไกทั้งสองชนิดนี้ กุ้งยังมีเปลือกซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวตามธรรมชาติ (Holmblad and Soderhall, 1999)

กลไกการป้องกันตัวโดยเซลล์และสารน้ำมีความเกี่ยวข้องกันผ่านทางสารสื่อในน้ำเลือดของกุ้ง โดยสารสื่อจะทำหน้าที่แยกแยะสิ่งแปลกปลอมเพื่อกำจัด สารสื่อจะหลั่งสารซึ่งเป็นแอนไซม์ชนิดหนึ่ง ไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือด (Haemocyte) กลุ่มที่ไม่มีแกรนูล (agranulocyte cell) ให้เกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิสกับสิ่งแปลกปลอมพร้อมๆ ไปกับกระบวนการของสารประกอบโปรตีนในส่วนของระบบป้องกันตัวโดยสารน้ำ (นิรนาม, 2538)

5.1 เม็ดเลือด (Haemocyte)

สัตว์พวกครัสตาเซียมีระบบไหลเวียนเลือดแบบเปิดซึ่งต่างจากระบบไหลเวียนเลือดในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Holmblad and Soderhall, 1999) เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งเป็นเซลล์ที่สำคัญมากในระบบการป้องกันตัวของพวกครัสตาเซีย โดยจะทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยกระบวนการต่างๆ เช่น ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis), เอนแคปซูลชัน (encapsulation), โนดูลฟอร์มชัน (nodule formation) และกระบวนการอื่นๆ การจำแนกเม็ดเลือดจะดูจากขนาด, จำนวน, การย้อมสีและโครงสร้างของแกรนูลในไซโทพลาซึม (Soderhall and Cerenius, 1992) การจำแนกจะใช้วิธีการหมุนเหวี่ยงโดยอาศัยความหนาแน่นที่ต่างกันอย่างต่อเนื่อง (density gradient centrifugation) โดยใช้ EDTA-citrate buffer (pH 4.6) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (Soderhall and Smith, 1983 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) สามารถจำแนกชนิดเม็ดเลือดของหอยสองฝาได้ 2 ชนิด คือ ไฮยาลิโนไซต์ (hyalinocytes) และแกรนูลโอไซต์ (granulocytes) (Cheng, 1980 อ้างโดย Bachere, *et al.*,

1995) ในสัตว์พวกครัสเตเชียสามารถจำแนกชนิดของเม็ดเลือดได้เป็น 3 ชนิด (Hose, *et al.*, 1987 ; Holmblad and Soderhall, 1999) ดังนี้

5.1.1 ไฮยาโลไซต์ (hyalocytes) หรือ ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cells) หรือ อะแกรนูโลไซต์ (agranulocyte) เป็นเซลล์ที่ไม่มีแกรนูโลหรือมีแกรนูโลจำนวนน้อยมากในไซโทพลาซึม (Tsing, *et al.*, 1989) เซลล์ชนิดนี้สามารถเกาะติดกับกระจกสไลด์และทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิสได้ (Smith and Soderhall, 1983 ; Holmblad and Soderhall, 1999) จำนวนไฮยาลินเซลล์ในกุ้งแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น ในปูชนิดหนึ่ง (shore crab, *Carcinus maenas*) มีไฮยาลินเซลล์ 60% ของเม็ดเลือดทั้งหมด แต่ในกุ้งน้ำจืด (*Pacifastacus leniusculus*) มี 3% ของเม็ดเลือดทั้งหมด (Holmblad and Soderhall, 1999)

5.1.2 แกรนูโลไซต์ (granulocytes) หรือ แกรนูลาร์เซลล์ (granular cells) หรือ อีโอซิโนฟิลิก แกรนูโลไซต์ (eosinophilic granulocytes) เป็นเซลล์ที่มีแกรนูโลขนาดใหญ่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน โดยแกรนูโลมีหน้าที่ในการหลั่งสาร (Holmblad and Soderhall, 1999) เช่น เอนไซม์ไลโซไซม์ (Carballal, *et al.*, 1997) ในกุ้งน้ำจืดเซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่เป็นเหมือนที่เก็บสะสม โปรตีนออกซิเดสแอกติเวติงซิสเต็มหรือระบบโปรฟีโอ (prophenoloxidase activating system ; proPO-system) แต่แกรนูลาร์เซลล์จะไม่มี การหลั่งสารจากแกรนูโลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ และไม่เกิดกระบวนการเอนแคปซูลชัน (encapsulation) โปรตีน 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งสารจากระบบโปรฟีโอ คือ แฟกเตอร์ที่มีขนาด 76 kD (76 kD factor) และ β -1,3-glucan binding protein (Soderhall and Cerenius, 1992)

5.1.3 เซมิแกรนูโลไซต์ (semi-granulocytes) หรือ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cells) เป็นเซลล์ที่มีจำนวนแกรนูโลน้อยกว่าแกรนูโลไซต์ ทำหน้าที่ในการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกาย โดยการดีแกรนูเลชัน (degranulation) และจะเกิดการแผ่กระจายไปบนผิวของสิ่งแปลกปลอม (Johansson and

ควบคุม ต่อมา มีการทดลองใช้เพปทิโดไกลแคนที่สกัดได้จาก *Bifidobacterium thermophilum* ผสมกับอาหารให้กุ้ง (*Penaeus japonicus*) กินและสู่มุ้งมาทำให้ติดเชื้อ *Vibrio penaeicida* และ white spot syndrome baculovirus จากการทดลองพบว่ากุ้งที่กิน เพปทิโดไกลแคนมีอัตราการรอดสูงกว่าชุดควบคุมและมีการฟาโกไซโทซิสเพิ่มขึ้น (Itami, et al., 1998)

Soderhall และคณะ (1986, อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) ได้แยก โยธาลินเซลล์จาก *Carcinus maenas* พบว่าอัตราการฟาโกไซโทซิสเพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อทำการออปโซไนซ์ (opsonize) ด้วย haemocyte lysate ซึ่งคาดว่าออปโซนิน (opsonin) ตัวนี้ จะไม่ใช่เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส แต่อาจเป็นโปรตีนที่มีขนาด 76 kD ซึ่งโปรตีนตัวนี้ สามารถสนับสนุนการเกิดเอนแคปซูลชั้นได้ คาดว่าโปรตีนตัวนี้อาจมีหน้าที่เหมือนกับออปโซนินสำหรับฟาโกไซติกเซลล์ (Kobayashi, et al., 1990)

5.2.2 โนดูลฟอร์มเมชัน (nodule formation)

เมื่อมีจุลินทรีย์จำนวนมากบุกรุกเข้าสู่ร่างกาย สามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้โดยการฟาโกไซโทซิสและโนดูลฟอร์มเมชัน เซลล์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ คือ เม็ดเลือด (Holmblad and Soderhall, 1999) กระบวนการโนดูลฟอร์มเมชันเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์จะถูกจับอยู่ในชั้นต่างๆ ของเม็ดเลือด และกลายเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส สามารถพบกระบวนการนี้ได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั่วไป รวมทั้งในสัตว์จำพวกครัสเตเชีย (Soderhall and Cerenius, 1992) กระบวนการสร้างโนดูลเกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ คือ เกิดการจับกันของเม็ดเลือดกับแบคทีเรีย จากนั้นจะมีการปล่อยสารออกจากเม็ดเลือด มีการกระตุ้นเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) และสร้างเมลานิน และอีกลักษณะจะเกี่ยวข้องกับการสร้างแคปซูล (Mandato, et al., 1997)

5.2.3 เอนแคปซูลชัน (encapsulation)

เมื่อปรสิตที่มีขนาดใหญ่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย สามารถกำจัดได้โดยการที่เม็ดเลือดแผ่กระจายออกและกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Nappi, 1975) โดยมีเม็ดเลือดหลายชนิดเข้าร่วมในการฟาโกไซโทซิสและการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (Hose, et al., 1984 ;

Benjamin and James, 1987 ; Sparks, 1987) ได้มีการศึกษาเพื่อจำแนกว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดใดที่จะตอบสนองต่อโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม Hose and Martin (1989) อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) พบว่าเซลล์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมพวกบีตา-1,3-กลูแคนจากเชื้อราหรือเอนโดทอกซิน (endotoxin) และพวกลิโปพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย คือ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ โดยเซลล์ชนิดนี้จะเป็นเซลล์ชนิดแรกที่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลแปลกปลอมและเกิดกระบวนการเอนแคปซูลชัน พบว่าโปรตีนที่มีขนาด 76 kDa มีหน้าที่เป็นออปโซนินสำหรับเซมิแกรนูลาร์เซลล์ในระหว่างการเกิดเอนแคปซูลชัน (Kobayashi, *et al.*, 1990) และเกี่ยวข้องกับระบบโปรตีนของกึ่งน้ำจืดด้วยแต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น เป็นตัวช่วยให้เกิดการยึดเกาะ (adhesion factor) ในเซมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์ของกึ่งน้ำจืด (Johansson and Soderhall, 1988) เป็นตัวช่วยให้เกิดคีแกรนูเลชันในเซมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์ และยังเป็นตัวสนับสนุนให้เกิดเอนแคปซูลชันอีกด้วย (Kobayashi, *et al.*, 1990) นอกจากนี้แฟกเตอร์ที่มีขนาด 76 kDa อาจมีหน้าที่เป็นออปโซนินแฟกเตอร์สำหรับฟาโกไซติกเซลล์ (Soderhall and Cerenius, 1992) ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

5.2.4 ไซโทท็อกซิกซิตี (cytotoxicity)

มีการศึกษาถึงเซลล์ที่ทำให้เกิดไซโทท็อกซิกซิตีในสัตว์พวกครัสเตเชียชั้นน้อยมาก พบว่ากึ่งน้ำจืดในออสเตรเลียสามารถทำให้เกิดกระบวนการนี้ได้โดยใช้เซลล์เนื้องอกเป็นเซลล์เป้าหมาย (Tyson and Jenkin, 1974 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) ส่วนกึ่งน้ำจืดในแถบทวีปยุโรป (*Astacus astacus*) เซลล์เม็ดเลือดจะฆ่าทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ (Soderhall, *et al.*, 1985) อย่างไรก็ตามในขณะนี้กำลังทำการจำแนกว่าเซลล์ใดที่ทำหน้าที่ตอบสนองในลักษณะนี้ กระบวนการนี้ทำงานอย่างไรในสิ่งมีชีวิตและอะไรเป็นตัวการสำคัญที่ทำหน้าที่ป้องกันในกระบวนการนี้ (Soderhall and Cerenius, 1992)

5.2.5 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเลคติน (lectin)

เลคตินเป็นไกลโคโปรตีนหรือโปรตีนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตได้ มีหน้าที่ทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนหรือทำให้เซลล์เกาะกลุ่มได้ (agglutination) (Goldstein, *et al.*, 1980) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี lipopolysaccharide binding protein ซึ่งมีความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตและโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคชนิดต่างๆ เช่น mannan-binding protein เป็นโปรตีนที่จับกับแมนแนนซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ โดยที่โปรตีนเหล่านี้กระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์และแสดงความเป็นออปโซนิน carbohydrate binding protein แต่ละชนิดจะมีความจำกับโครงสร้างของผิวจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคชนิดต่างๆ (Soderhall and Cerenius, 1992) Takahashi และคณะ (1985) ศึกษาหน้าที่ของ endogeneous galactose-binding protein จากน้ำเลือดของแมลง (*Sarcophaga peregrina*) พบว่าในสภาวะปกติยีนที่สร้างเลคตินของตัวอ่อนที่อยู่ในระหว่างลอกคราบและตัวเต็มวัยจะไม่แสดงออก แต่ยีนนี้จะถูกเหนี่ยวนำเมื่อมีการบาดเจ็บ เลคตินหรือแอกคลูตินินมีความสำคัญในสัตว์พวกครึ่งตาเขยและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัว เช่น พบแอกคลูตินิน 2 ชนิด (Lag-1 และ Lag-2) ในน้ำเลือดของกุ้งมังกร (*Homarus americanus*) แอกคลูตินินเหล่านี้ไม่ทนร้อนและต้องการแคลเซียมไอออนในการทำปฏิกิริยา (Hall and Rowlands, 1974a, b) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่จับกับลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งแยกให้บริสุทธิ์ได้จากแมลงชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่ในการดักจับแบคทีเรียภายในน้ำเลือด (Jomori, *et al.*, 1990 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) โปรตีนที่แยกได้จากตัวไหม (*Bombyx mori*) (Ochiai and Ashida, 1988) และกุ้งน้ำจืด (*Pacifastacus leniusculus*) (Duvic and Soderhall, 1990) สามารถเชื่อมกับบีตา-1,3-กลูแคนจากเชื้อราได้ โปรตีนเหล่านี้จะเกี่ยวข้องโดยตรงในการป้องกันตัว โดยจะมีการกระตุ้นระบบโปรฟีโอหลังจากการเชื่อมต่อกับบีตา-1,3-กลูแคน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้คือ เลคติน (Duvic and Soderhall, 1990) สามารถพบเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพวก echinodermata, arthropoda และ mollusca ได้ในส่วนของน้ำเลือด (haemolymph) เมือก (mucus) น้ำในโพรงลำตัว (coelomic fluid) และเมมเบรนของเซลล์ มีหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะมีหน้าที่คล้ายกับ IgG ในสัตว์มีกระดูก

ต้นหลัง (Komono, *et al.*, 1980 อ้างโดย อุไรวรรณ ไพชำนาญ, 2542) Ratanapo และ Chulavatnato (1990 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) ศึกษาเลคตินในกึ่งกลาดำ พบว่าเลคตินในกึ่งกลาดำมีน้ำหนักโมเลกุล 420 kDa ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาด 27 kDa และพบว่าเลคตินที่พบในน้ำเลือดของกึ่งกลาดำ มีส่วนสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* เพราะพบระดับเลคตินในน้ำเลือดเพิ่มมากขึ้นหลังจากกึ่งติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ นอกจากนี้เลคตินยังสามารถทำให้แบคทีเรียชนิดนี้เกาะกลุ่มได้ ในขณะที่เลคตินจากน้ำเลือดของแมงดาทะเลทำให้เชื้อ *Staphylococcus saprophyticus* เกาะกลุ่ม (Okino, *et al.*, 1995)

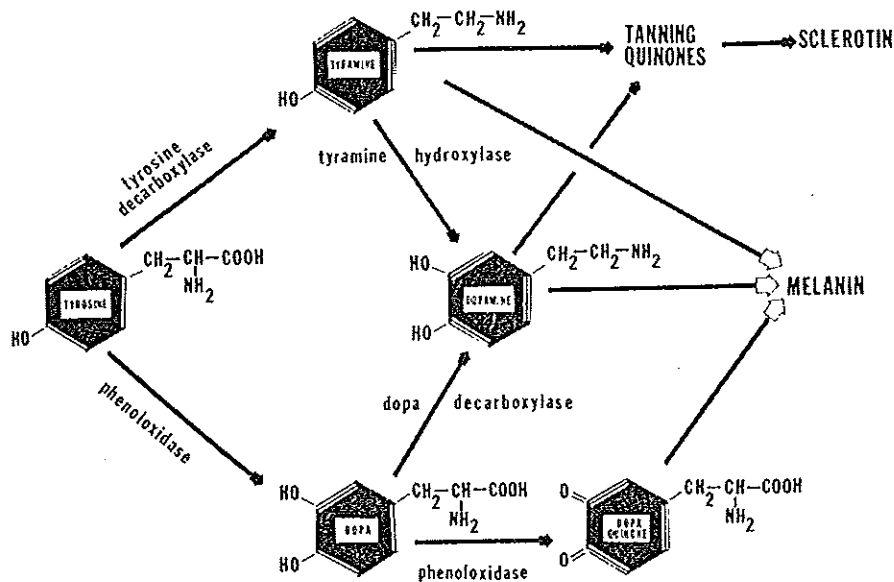
5.2.6 ระบบโปรฟีโนลออกซิเดสแอกทิเวติง (prophenoloxidase activating system, proPO)

เอนไซม์ในระบบโปรฟีโนลออกซิเดสแอกทิเวติง คือ โปรฟีโนลออกซิเดส (prophenoloxidase; E.C.1.10.3.1) ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยามেলাไนเซชัน (melanization reaction) ตอบสนองต่อจุลินทรีย์ที่เข้ามาภายในร่างกาย พบระบบนี้ทั้งในสัตว์พวกครัสตาเซียและแมลง (Soderhall and Cerenius, 1992) Unstrem และ Soderhall (1977) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีโนลออกซิเดส (phenoloxidase) สามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการกระตุ้นของปีตา-1,3-กลูแคนจากผนังเซลล์ของรา ตีกรีของการพอลิเมอร์ไรเซชัน (degree of polymerization) ที่สามารถกระตุ้นระบบโปรฟีโอได้ คือ มีกลูโคส 5 หน่วยเชื่อมด้วย (1 → 3) β-D-glucopyranosyl residues แต่โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีจำนวนกลูโคสน้อยจะไม่สามารถกระตุ้นได้ พอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ จากจุลินทรีย์ เช่น ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ และเพปติโดไกลแคน สามารถกระตุ้นระบบโปรฟีโอในพวกอาร์โทรพอด (arthropod) ได้ (Duvic and Soderhall, 1990 ; Yoshida, *et al.*, 1996) ในครัสตาเซีย เอนไซม์โปรฟีโนลออกซิเดสจะถูกเปลี่ยนเป็นรูปที่สามารถทำงานได้ คือ ฟีโนลออกซิเดส หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ endogeneous serine proteinase (Bachere, *et al.*, 1995) จากการทดลองของ Barracco และ Soderhall (1991 อ้างโดย Soderhall and Cerenius, 1992) สนับสนุนความคิดที่คาดว่าระบบโปรฟีโอมีหน้าที่เป็นระบบการจดจำ (recognition system)

ระบบโปรตีนโพรตีโอมเริ่มจากพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ เช่น เพปทิโดไกลแคน ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ และบีตา-1,3-กลูแคน ไปกระตุ้นให้ระบบอยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ โดยการเชื่อมต่อของบีตา-1,3-กลูแคน กับ β -1,3-glucan binding protein จากนั้นจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไปกระตุ้นตัวรับที่เยื่อเซลล์ (membrane receptor) ของเคมีแกรนูลาร์เซลล์ทำให้เกิดการหลั่งเอนไซม์ออกมา เพื่อเปลี่ยนเอนไซม์โปรตีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถทำงานได้ เอนไซม์ตัวนี้จะไปออกซิไดซ์ไทโรซีน (tyrosine) ให้กลายเป็นโดปา (dopa) และเปลี่ยนต่อเป็นควิโนน (quinone) จากนั้นควิโนนจะถูกเปลี่ยนเป็นเมลานิน (melanin) (ภาพที่ 3) ซึ่งจะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลดำ เมลานินทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค และจะกระตุ้นให้มีการหลั่งสารต่างๆ จากเซลล์เม็ดเลือดอย่างต่อเนื่อง (Nappi, 1975 ; Holmblad and Soderhall, 1999) Vargas-Albores และคณะ (1997) รายงานว่า β -1,3-glucan binding protein (β GBP) ที่แยกได้จากพลาสมาของกุ้ง *Penaeus vannamei* และ *Penaeus stylirostris* มีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ β GBP ที่แยกได้จากกุ้ง *Penaeus californiensis* และกุ้งน้ำจืด *Pacifastacus leniusculus* มีการทดลองแช่กุ้งกุลาดำในสารละลายกลูแคน (glucan) ซึ่งได้จากยีสต์ พบว่ากลูแคนสามารถส่งเสริมการป้องกันการติดเชื้อ *V. vulnificus* ได้ (Sung, et al., 1994 อ้างโดย Sakai, 1999)

Hernandez-Lopez และคณะ (1996) ศึกษาการกระตุ้นระบบโปรตีนโพรตีโอมในกุ้ง (*Penaeus californiensis*, Holmes) พบว่าระบบโปรตีนโพรตีโอมถูกเก็บอยู่ในเม็ดเลือด และลามินาริน (laminarin) สามารถกระตุ้นให้ระบบทำงานได้ นอกจากนี้ยังพบว่าระบบโปรตีนโพรตีโอมสามารถถูกกระตุ้นได้ในสภาวะที่ Ca^{2+} มากกว่า 5 mM (Gollas-Galvan, et al., 1997)

Sritunyalucksana และคณะ (1999) ทดลองโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรตีนอลออกซิเดสซึ่งแยกได้จากเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ จากการทดลองพบว่า cDNA ที่ได้มีขนาด 3,002 bp ประกอบด้วยส่วนที่แปลรหัสได้ 2,121 bp และส่วนที่ไม่สามารถแปลรหัสได้ 881 bp และพบว่าเอนไซม์โปรตีนอลออกซิเดส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 688 ตัว น้ำหนักโมเลกุล 78,700 Da มีตำแหน่งจำเพาะในการตัดด้วยเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ คือ ระหว่างอาร์จินีน (Arg) ตำแหน่งที่ 44 และ เวลีน (Val) ตำแหน่งที่ 45



ภาพที่ 3 เมแทบอลิซึมของไทโรซีนในแมลง
ที่มา : Nappi (1975)

5.2.7 กระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยใช้สารประกอบออกซิเจน

กลไกนี้เกี่ยวข้องกับการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ภายในเซลล์ของกระบวนการฟาโกไซโทซิสซึ่งจะมีการสร้างสารพวก reactive oxygen species (ROS) หลายชนิดได้แก่ superoxides ion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicals (OH) (Song and Hsieh, 1994) โดยที่โมเลกุลของ superoxides จะถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยาที่มีออกซิเจน เอนไซม์ superoxide dismutase จะเปลี่ยน superoxides เป็นออกซิเจน และ hydrogen peroxide จากนั้นเอนไซม์ catalase จะเปลี่ยน hydrogen peroxide เป็นน้ำและออกซิเจน แต่ในสภาวะที่มี reducing agent โมเลกุลของ hydrogen peroxide จะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ peroxidase (ภาพที่ 4) (Holmblad and Soderhall, 1999) สารเหล่านี้เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค หรืออาจทำปฏิกิริยาร่วมกับ hypohalides และ halidamines ที่สร้างโดยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส หรือทำปฏิกิริยาร่วม

กับเอนไซม์ในไลโซซอมหลายชนิด ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต reactive oxygen intermediates (ROIs) พบว่า zymosan ที่สกัดจากผนังเซลล์ของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) สามารถกระตุ้นการผลิต ROIs ใน *Crassostrea gigas* (Roch, 1999) Song และ Hsieh (1994) พบว่าบีตา-กลูแคนที่สกัดได้จาก *Saccharomyces cerevisiae* มีผลกระตุ้นเม็ดเลือดให้ผลิต O_2^- และ H_2O_2 ส่วน phorbol myristate acetate (PMA) สามารถกระตุ้นการผลิต OCI^- และกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) มีรายงานจาก Adema และคณะ (1991 อ้างโดย Roch, 1999) พบว่าเม็ดเลือดของสัตว์พวกหอยมีกระบวนการ respiratory burst คล้ายกับกระบวนการ respiratory burst ในฟาโกไซต์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Superoxide dismutase :



Catalase :



Peroxidase :



A = reducing agent

ภาพที่ 4 ปฏิกริยาและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ reactive oxygen species (ROS)

ที่มา : Holmblad และ Soderhall (1999)

5.2.8 Anti-microbial peptides

เป็นโปรตีนที่มีผลในยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โปรตีนในกลุ่มนี้ เช่น lysins, precipitins, killing factors, แอคกลูตินิน, โมเลกุลที่มีลักษณะคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like molecules), สารที่ช่วยให้เกิดการแข็งตัว (clotting agents) (Smith and Chisholm, 1992 อ้างโดย Roch, 1999) มีรายงานว่าในเม็ดเลือดของหอยแมลงภู

(*Mytilus edulis*) มีสารที่มีกิจกรรมเหมือนกับเอนไซม์ไลโซไซม์ ซึ่งมีผลกับแบคทีเรีย (Nottage and Birkbeck, 1990) Destoumieux และคณะ (1997) ทำการศึกษาสารในเม็ดเลือดและพลาสมาของกุ้ง *Penaeus vannamei* ด้วยวิธี reverse phase chromatography จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกได้ 3 โมเลกุล คือ penaeidin 1, 2 และ 3 ทั้ง 3 โมเลกุลมีกิจกรรมในการยับยั้งราและแบคทีเรีย Murali และคณะ (1999) ศึกษาลักษณะของ แอคกลูตินินจากซีรัมของปูเสฉวน (*Diogenes affinis*) โดยใช้ affinity chromatography พบว่าแอคกลูตินินที่ได้เป็นชนิด C และต้องการ Ca^{2+} ในการทำปฏิกิริยา แอคกลูตินินในรูปที่สามารถทำกิจกรรมได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 185 kDa ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย ที่มีขนาด 51, 49, 42 และ 39 kDa นอกจากนี้ยังพบว่าแอคกลูตินินตัวนี้สามารถจดจำแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามาได้

Alabi และคณะ (2000) รายงานว่าพลาสมาที่ได้จากกุ้งปกติไม่มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ แต่เมื่อฉีดวัคซีนที่มีเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่าพลาสมาที่ได้หลังการฉีดวัคซีนมีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยเริ่มมีตั้งแต่ 6 ชั่วโมง ถึง 7 วัน หลังฉีดเชื้อ

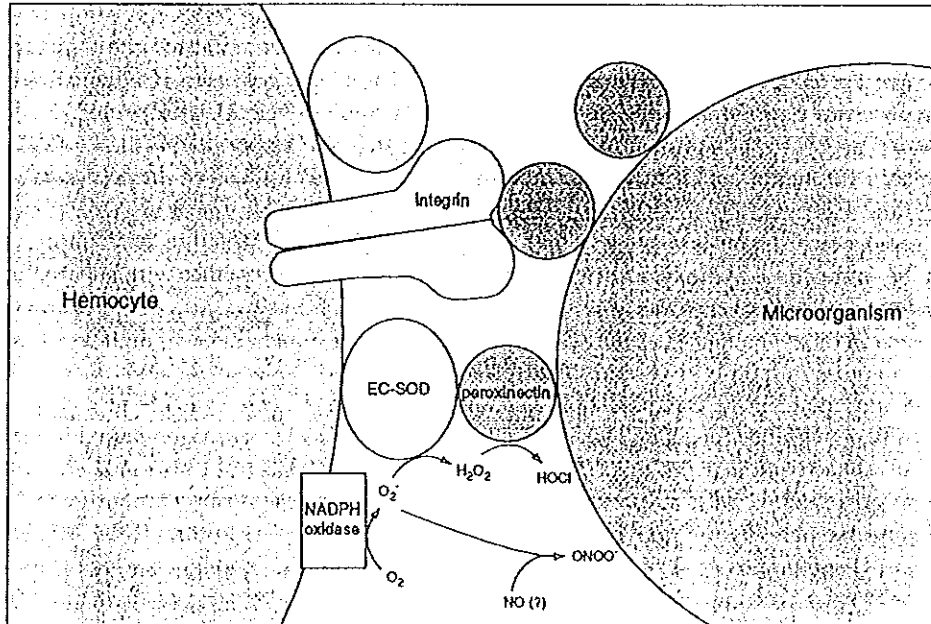
Miyata และคณะ (1989) สามารถแยกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ (anti-microbial peptides) 2 ชนิด คือ tachypleusins ที่มีขนาด 2263 Da ประกอบด้วยกรดอะมิโน 17 ตัว และ polyphemusins ที่มีขนาด 2453 Da ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ตัว เปปไทด์ทั้ง 2 ชนิด นี้แยกได้จากเลือดของแมงดาทะเล *Tachypleus tridentatus* และ *Limulus polyphemus* ตามลำดับ และเป็นเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นบวก (cationic peptides) สามารถยับยั้งการเจริญของรา เช่น *Candida*, *Cryptococcus* และแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

5.2.9 โปรตีนขนาด 76 kDa และ integrin

มีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่มีขนาด 76 kDa ซึ่งแยกได้จากน้ำเลือดของ กุ้งน้ำจืด พบว่าโปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยให้เซลล์เกาะกัน (cell adhesion factor) (Johansson and Soderhall, 1988) และมีกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส จึงเรียกโปรตีนตัวนี้ว่า peroxinectin (Johansson, et al., 1995) กลไกการทำงานของ peroxinectin

เริ่มจาก peroxinectin จับกับจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาเพื่อสื่อให้ integrin รู้ว่ามีสิ่งแปลกปลอม จากนั้นก็จะมีการจับกันระหว่าง peroxinectin และ integrin โดยที่อีกด้านหนึ่งของ integrin จับอยู่กับเม็ดเลือด ซึ่งจุดนี้คือจุดเริ่มต้นของการฟาโกไซโตซิสหรือเอนแคปซูลชัน จากนั้นจะมีกลไกในการทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่น ขบวนการ oxidative burst โดยเอนไซม์ NADPH oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ผนังเซลล์ เอนไซม์ตัวนี้จะเปลี่ยนโมเลกุลของออกซิเจนเป็น superoxide (O_2^-) (Chanock, *et al.*, 1994) จากนั้น superoxide จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยเอนไซม์ extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) และ peroxinectin จะเปลี่ยน hydrogen peroxide เป็นสารประกอบที่มีพิษ เช่น กรด hypochlorous (HOCl) หรือเปลี่ยนเป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) ในสถานะที่มี nitric oxide (NO) ซึ่งสารประกอบที่มีพิษเหล่านี้จะไปทำลายโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม (ภาพที่ 5) (Holmblad and Soderhall, 1999)

Holmblad และ Soderhall (1999) พบว่า integrin เป็น transmembrane protein ที่อยู่บนเม็ดเลือดของกึ่งน้ำจืด มีหน้าที่เป็นตัวรับและจดจำสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้ integrin ยังเกี่ยวข้องในการเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ การรักษาบาดแผลและการสื่อสารระหว่างเซลล์ในระหว่างเกิดการเกิดกระบวนการเอนแคปซูลชัน



ภาพที่ 5 กระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเข้าสู่ร่างกาย
ที่มา : Holmblad และ Soderhall, 1999

วัตถุประสงค์

1. เตรียมห้องสมุดซีดีเอ็นเอ (cDNA library) ของยีนที่เกี่ยวข้องในระบบการป้องกันตนเองของกิ้งกูดดำ โดยการทำให้ cDNA subtractive hybridization
2. ตรวจสอบ cDNA library ด้วยเทคนิค hybridization เพื่อหายีนของระบบป้องกันตนเอง
3. หาลำดับเบสของยีน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Calcium chloride	Merck
Chloroform	Merck
Glycerol	Sigma
Isoamyl alcohol	LABSCAN
Magnesium chloride	Merck
Phenol	Merck
Potassium acetate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium dodecyl sulfate	Riedel-deHaen
Sodium hydroxide	CARLO ERBA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma

1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Merck
Ampicillin	Sigma
Anti-DIG-AP	Boeheringer Mannheim
Blocking reagent	Boeheringer Mannheim
CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech
Ethidium bromide	Sigma
Isopropanol	Sigma
N-Lauroylsarcosine	Sigma
mRNA Separator Kit	Clontech
Maleic acid	Sigma
NBT/BCIP	Boeheringer Mannheim
PCR-Select Differential Screening Kit	Clontech
Ribonuclease A	Merck
Sequencing kit	Perkin Elmer
T4 DNA ligase	Promega
TRIzol Reagent	GIBCO BRL
100bp ladder	Promega
100bp ladder	Biolabs

หมายเหตุ: องค์ประกอบของสารเคมีแสดงในภาคผนวก

2. ตัวอย่างกึ่งและไวรัส

กึ่งกลาดำระยะ juvenile จำนวน 40 ตัว และไวรัสตัวแดงดวงขาว (systemic ectodermal and mesodermal baculovirus, SEMBV) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ (Aquatic Animal Health Research Center) ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

3. แบคทีเรีย

E.coli Top 10F' มีลักษณะ Genotype : F' {*lacI^qTn10(Tet^R)*} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

4. ดีเอ็นเอพาหะ

- pGEM[®]-T Easy บริษัท Promega
- pGEM[®]-T บริษัท Promega

5. ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้น ๆ (Oligonucleotide primer)

- cDNA synthesis primer 5'-TTTTGTACAAGCTT₃₀N₁N-3'
- PCR primer 1 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
- Nested PCR primer 1 5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
- Nested PCR primer 2R 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

6. DNA adaptor

- Adaptor 1

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'

3'-GGCCCGTCCA-5'

- Adaptor 2R

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

3'-GCCGGCTCCA-5'

อุปกรณ์

1. หลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2, 0.5 ml
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุตราไวโอเลต รุ่น Ultraspec III (Pharmacia)
3. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น Junior 2000 C (Precisa)
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius)
5. เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น TLG Z 382K (Hermle)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น 2K 15 (SIGMA)
8. เครื่องวัดพีเอช รุ่น model 25 (Denver Instrument)
9. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (Heraeus)
10. ตู้เย็นแช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (REVCO)
11. เครื่อง UV light transilluminator (UVP)
12. หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA - 300 M II (Hirayama)
13. กล้องถ่ายรูป Polaroid (Fotodyne)
14. เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยวิธี Agarose gel electrophoresis (BIO-RAD)
15. ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (NUAIRE)
16. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (Hybaid)
17. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (BIO-RAD)
18. เครื่องดูดความชื้นระบบสุญญากาศ (B 169 vacuum system)
19. ตู้ Hybridization (Robbins Scientific Corporation)
20. เครื่องบันทึกแผนภาพดีเอ็นเอ รุ่น Gel Doc 1000 (BIO-RAD)

วิธีการ

1. การเตรียม mRNA จากเลือดกิ้ง

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

เลือกกิ้งกุลาดำระยะ juvenile ที่มีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 40 ตัว นำมาเลี้ยงในตู้เลี้ยง โดยเลี้ยงแยก 1 ตัว/ตู้ เจาะเลือดกิ้งประมาณ 0.10 - 0.20 มิลลิลิตร/ตัว เก็บใส่หลอด microcentrifuge โดยแยกตัวอย่างหลอด นำกิ้งไปเลี้ยงต่อในตู้เลี้ยง 1 วัน จนกระทั่งกิ้งแข็งแรง สังเกตและจดบันทึกลักษณะของกิ้งที่อยู่ในตู้เลี้ยง ทำให้กิ้งเกิดโรคโดยการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวปริมาณน้อยเพื่อไม่ให้กิ้งตายเร็ว เลี้ยงต่อโดยนำไปเลี้ยงในตู้นาน 1 วัน เจาะเลือดกิ้งที่ติดเชื้อไวรัสเก็บใส่หลอด microcentrifuge โดยแยกตัวอย่างหลอด ส่วนตัวกิ้งยังคงนำไปเลี้ยงต่อและบันทึกลักษณะทุกวันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

1.2 การเตรียม total RNA (ตามวิธีการของบริษัท GIBCO BRL)

นำเลือดกิ้งที่ได้ประมาณ 0.10 - 0.20 มิลลิลิตร (เลือดกิ้งมีจำนวนเซลล์ 1,000 - 50,000 เซลล์/1 มิลลิลิตร) ถ่ายลงในหลอดที่มี TRIzol Reagent 0.5 มิลลิลิตร ทันทีเพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว (ใช้ TRIzol Reagent 1 มิลลิลิตร/เซลล์ 5×10^6 เซลล์) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม chloroform 0.2 มิลลิลิตร/TRIzol Reagent ที่ใช้เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 นาที ทำให้เกิดการแยกชั้นของ chloroform กับ TRIzol Reagent โดยการนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บไว้ ตกตะกอน RNA โดยการเติม isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตร ต่อ TRIzol Reagent ที่ใช้เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที จะได้ตะกอน RNA ที่มีลักษณะใสติดอยู่ที่ก้นหลอด ทั้งส่วนใส ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol 1 มิลลิลิตร ต่อ TRIzol Reagent ที่ใช้เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 x g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้แล้วนำไปทำให้แห้งโดยใช้ vacuum dry นาน 10 นาที ละลายตะกอนในน้ำที่ปราศจาก RNase

บ่มที่อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณ total RNA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพ RNA ที่ได้โดยใช้ 1.0% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer

1.3 การเตรียม mRNA (ตามวิธีการของบริษัท Clontech)

1.3.1 การเตรียมสปินคอลัมน์พร้อมใช้งาน (Equilibration of spin columns)

ทำให้ oligo(dT)-cellulose เข้ากัน โดยการพลิก spin column กลับไปกลับมาหลายๆ ครั้ง เปิดฝาที่ปิดคอลัมน์ทั้งด้านบนและด้านล่างออก วางคอลัมน์ให้อยู่ในลักษณะตั้งตรงในหลอดที่ใช้สำหรับหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นำคอลัมน์ออกจากหลอดที่ใช้สำหรับหมุนเหวี่ยง ทิ้งส่วนที่ถูกชะออกจากรันหลอด วางคอลัมน์ลงในหลอดอีกครั้ง เติม high salt buffer 2 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ แล้วใช้ tip ปลายตัดดูดสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้งเพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำคอลัมน์ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำคอลัมน์ออกจากหลอด เทบัฟเฟอร์ที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง วางคอลัมน์ลงในหลอดอีกครั้งเพื่อใช้สำหรับแยก mRNA ให้บริสุทธิ์

1.3.2 การเตรียมบริสุทธิ์ mRNA

นำ total RNA ที่ได้จากข้อ 1.2 มาเติม sample buffer ปริมาตร 1/5 เท่า แล้วผสมให้เข้ากัน ถ่าย total RNA ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1.3.1 โดยที่คอลัมน์จะถูกวางอยู่ในหลอดรูปกรวย (conical tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตผสมตัวอย่างกับ oligo(dT)-cellulose ให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง วางคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เพื่อให้ mRNA จับกับ oligo(dT)-cellulose นำคอลัมน์ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ ล้างคอลัมน์โดยการเติม high salt buffer 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนของ high salt buffer ทิ้ง แล้วล้างซ้ำอีก 2 ครั้ง ต่อจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย low salt buffer 0.6 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างซ้ำอีก

2 ครั้ง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ออกให้หมด นำคอลัมน์ออกจากหลอดที่ใช้สำหรับหมุนเหวี่ยง เทส่วนของบัฟเฟอร์ที่อยู่ในหลอดทิ้ง วางหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดใหม่ขนาด 50 มิลลิลิตร (หลอด microcentrifuge จะอยู่ล่างคอลัมน์) ทำให้ elution buffer ร้อน โดยการนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วเติม elution buffer 0.4 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นำคอลัมน์ออกจากหลอดที่ใช้สำหรับหมุนเหวี่ยง วางหลอด microcentrifuge บนน้ำแข็ง วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ที่ได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นทำให้ mRNA ที่ได้จากการเตรียมบริสุทธิ์เข้มข้นโดยการเติม 2M KOAc (pH 5.0) ปริมาณ 1/5 เท่า และ absolute ethanol 2.5 - 3.0 เท่า ของปริมาตรสารละลาย mRNA ที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป เมื่อจะนำมาใช้งานให้นำหลอดที่มีสารละลาย mRNA ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 x g นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งโดยใช้ vacuum dry นาน 5 - 10 นาที แล้วละลายตะกอน mRNA ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

2. การเตรียม cDNA (ดัดแปลงจากวิธีการของบริษัท Clontech ; Arnbrust, 1999)

2.1 การเตรียม First-Strand cDNA

จากการเตรียม mRNA ในข้อ 1.3.2 จะได้ mRNA 2 ชุด คือ mRNA จากเลือดกึ่งที่ไม่ติดเชื้อและ mRNA จากเลือดกึ่งที่ติดเชื้อ คัด mRNA แต่ละชุด ลงในหลอด microcentrifuge โดยทำแยกหลอด หลอดที่ 1 คือ เลือดกึ่งที่ไม่ติดเชื้อ และหลอดที่ 2 คือ เลือดกึ่งที่ติดเชื้อ หลอดละ 2 - 4 ไมโครลิตร และหลอดที่ 3 คือ control mRNA (human skeletal muscle) 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตร mRNA ทั้ง 3 ชุด ให้ได้ 5 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม 10 μ M cDNA synthesis primer 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำให้เย็นในน้ำแข็งนาน 2 นาที จากนั้นเติม 5x First-strand buffer 2 ไมโครลิตร, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1 ไมโครลิตร, น้ำ

กลั่น 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ AMV reverse transcriptase 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง

2.2 การเตรียม Second-Strand cDNA

เติมน้ำกลั่น 48.4 ไมโครลิตร, 5x Second-strand buffer 16.0 ไมโครลิตร, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1.6 ไมโครลิตร, 20x Second-strand enzyme cocktail 4.0 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ทำ first-strand cDNA synthesis แล้วในข้อ 2.1 ได้ ปริมาตรรวมหลอดละ 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 2 ชั่วโมง เติม 20x EDTA/glycogen 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนของสารละลายด้านบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 ไมโครลิตร ด้วยความระมัดระวัง ทิ้งสารละลายที่อยู่ด้านล่าง เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายด้านบนเติมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 ไมโครลิตร เติม 4 M NH_4OAc 40 ไมโครลิตร และ 95% ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลาย ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที ระเหย ethanol ที่เหลือออก ทำให้ตะกอนแห้งนาน 10 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจสอบขนาดของ ds cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยแบ่งสารละลายที่ได้มา 6 ไมโครลิตร วิเคราะห์โดยใช้ 1.8% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer แล้วเก็บสารละลาย ds cDNA ส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. การเตรียม Subtracted cDNA (ดัดแปลงจากวิธีการของบริษัท Clontech ; Hubank and Schatz, 1994 ; Armbrust, 1999)

เตรียม subtracted cDNA 3 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 คือ Forward subtracted cDNA ซึ่งเตรียมโดยใช้ cDNA ของกึ่งที่ไม่ติดเชื้อเป็น driver และใช้ cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อเป็น tester (ภาพที่ 6) ชุดที่ 2 คือ Reverse subtracted cDNA โดยใช้ cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อเป็น driver และใช้ cDNA ของกึ่งที่ไม่ติดเชื้อเป็น tester (ภาพที่ 7) และชุดที่ 3 คือ Control subtraction (ภาพที่ 8) โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

3.1 การตัด cDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*

ตัด ds cDNA ของกึ่งที่ไม่ติดเชื้อ (ข้อ 2.2 หลอดที่ 1), ds cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อ (ข้อ 2.2 หลอดที่ 2) และ control skeletal muscle cDNA (ข้อ 2.2 หลอดที่ 3) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* โดยเติม ds cDNA 43.5 ไมโครลิตร, 10x *RsaI* restriction buffer 1.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *RsaI* 1.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง เติม 20x EDTA/glycogen 2.5 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที เพื่อให้แยกชั้น ดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนเติมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เติม phenol:isoamyl alcohol (24:1) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ดูดสารละลายด้านบนเติมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เติม 4M NH₄OAc 25 ไมโครลิตร และ 95% ethanol 187.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเอาไว้ ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 200 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้งโดยใช้ vacuum dry นาน 5 - 10 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 5.5 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลของ cDNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์โดยนำสารละลาย 5 ไมโครลิตร ไปตรวจดูด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer และเก็บ cDNA ที่เหลือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การเชื่อม tester cDNA กับ Adaptor 1, 2R

3.2.1 การเชื่อม tester cDNA กับ adaptor 1, 2R (สำหรับเตรียม Forward subtraction)

กรณีทำ Forward subtraction ให้เจือจาง cDNA หลอดที่ 2 ในข้อ 3.1 ซึ่งในที่นี้เป็น tester cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร เตรียม ligation master mix ตามตารางที่ 1 และนำ ligation master mix มาผสมกับส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อม cDNA กับ adaptor ตามตารางที่ 2 โดยทำปฏิกิริยา 2 หลอด คือ หลอดของ Tester 1-1 และ Tester 1-2

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา (Ligation master mix)

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (µl)
sterile H ₂ O	3
5x Ligation buffer	2
T4 DNA ligase (400 units/µl)	1

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อม cDNA กับ adaptor

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	Tester 1-1 (µl)	Tester 1-2 (µl)
Diluted tester cDNA	2	2
Adaptor 1 (10 µM)	2	-
Adaptor 2R (10 µM)	-	2
Ligation master Mix	6	6
ปริมาตรรวม	10	10

ผสมส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาให้เข้ากัน และต้องเตรียม unsorted tester control (1-c) ด้วย โดยผสม tester 1-1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ tester 1-2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำหลอด microcentrifuge ทั้ง 3 หลอด ที่มี tester 1-1, tester 1-2 และ unsorted tester control (1-c) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18

ข้าวโมง เดิม EDTA/glycogen 1 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บหลอด tester 1-1 และ หลอด tester 1-2 ที่ได้จากการเชื่อมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วน unsubstracted tester control (1-c) นำมาเจือจาง โดยดูมา 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับทำ PCR ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การเชื่อม tester cDNA กับ adaptor 1, 2R (สำหรับเตรียม Reverse subtraction)

ในกรณีเชื่อม tester cDNA กับ adaptor 1, 2R สำหรับเตรียม Reverse subtraction นั้น ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 เพียงแต่เปลี่ยน tester cDNA (หลอด ที่ 2) เป็น cDNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* ในข้อ 3.1 หลอดที่ 1 (หลอดที่มาจากกึ่งที่ไม่ติดเชื้อ) และให้ชื่อหลอดปฏิกิริยาแต่ละหลอดว่า Tester 2-1, Tester 2-2 และ unsubstracted tester control (2-c)

3.2.3 การเตรียม control skeletal muscle tester cDNA

เตรียม control skeletal muscle tester cDNA โดยนำ DNA ของ ϕ x 174 DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* ความเข้มข้น 3 นาโนกรัม/มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 38 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ control DNA 150 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำ 5 ไมโครลิตร ของ DNA ที่ได้จากการเจือจางไปผสมกับ control skeletal muscle cDNA ที่ได้จากข้อ 3.1 (หลอดที่ 3) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

3.2.4 การเชื่อม control tester cDNA กับ adaptor (สำหรับเตรียม Control subtraction)

ในกรณีเชื่อม control skeletal muscle tester cDNA (จากข้อ 3.2.3) กับ adaptor 1, 2R สำหรับเตรียม Control subtraction นั้น ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 และให้ชื่อหลอดปฏิกิริยาแต่ละหลอดว่า Tester 3-1, Tester 3-2 และ unsubstracted tester control (3-c)

3.3 การทำ First Hybridization

ก่อนทำ Hybridization ให้อุ่น Hybridization buffer ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 - 20 นาที หรือปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าสารต่างๆ ที่เป็นส่วนผสมของ Hybridization buffer ละลายหมด รวมส่วนประกอบในปฏิกิริยา first hybridization สำหรับการทำให้ Forward subtraction (tester 1-1 และ tester 1-2 จากข้อ 3.2.1), Reverse subtraction (tester 2-1 และ tester 2-2 จากข้อ 3.2.2) และ Control subtraction (tester 3-1 และ tester 3-2 จากข้อ 3.2.4) ตามตารางที่ 3 ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที และนำไปปั่นต่อที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา first hybridization

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	Hybridization sample 1 (μl)	Hybridization sample 2 (μl)
<i>Rsa</i> I-digested driver (จากข้อ 3.1)	1.5	1.5
Adaptor 1-ligasted Tester 1-1 (จากข้อ 3.2.1)	1.5	-
Adaptor 2R-ligasted Tester 1-2 (จากข้อ 3.2.1)	-	1.5
4x Hybridization buffer	1.0	1.0
ปริมาณรวม	4.0	4.0

3.4 การทำ Second Hybridization

เติม driver cDNA ที่ได้จากข้อ 3.1 (ใช้ cDNA หลอดที่ 1 เป็น driver สำหรับการทำให้ Forward subtraction, cDNA หลอดที่ 2 เป็น driver สำหรับการทำให้ Reverse subtraction และ cDNA หลอดที่ 3 เป็น driver สำหรับการทำให้ Control subtraction) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 4x Hybridization buffer 1 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดของตัวอย่าง ทั้ง 3 ชุด ผสมให้เข้ากัน คูณมา 1 ไมโครลิตร เติมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 0.5

มิลลิลิตร ป่มในเครื่อง thermal cycler ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที เพื่อทำให้ driver cDNA เสียสภาพ (denature) นำหลอดของ denatured driver cDNA ออกจากเครื่อง thermal cycler จากนั้นผสม hybridization sample 1 (tester cDNA ที่เชื่อมกับ adaptor 1) และ hybridization sample 2 (tester cDNA ที่เชื่อมกับ adaptor 2R) (จากข้อ 3.3) โดยที่ทั้งสองหลอดยังคงอยู่ในเครื่อง thermal cycler) เข้ากับ denatured driver cDNA นำหลอดไปป่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เติม dilution buffer 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต ต่อจากนั้นจึงนำไปป่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เก็บตัวอย่างที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR

ในขั้นตอนนี้ประกอบด้วยตัวอย่างสำหรับทำ PCR 7 ตัวอย่าง คือ (1) forward subtracted cDNA, (2) unsubtracted tester control (1-c), (3) reverse subtracted cDNA, (4) unsubtracted tester control (2-c), (5) subtracted control skeletal muscle cDNA, (6) unsubtracted tester control (3-c) และ (7) PCR control subtracted cDNA (จาก PCR-Select™ cDNA Subtraction kit)

3.5.1 การเตรียม cDNA แม่พิมพ์สำหรับทำ PCR

เตรียมแม่พิมพ์สำหรับทำ PCR โดยจุด cDNA ที่ผ่านการเจือจางแล้วจากการทำ Second hybridization (จากข้อ 3.4), unsubtracted tester control (จากข้อ 3.2.1, 3.2.2, และ 3.2.4) และ PCR control subtracted cDNA (จาก PCR-Select™ cDNA Subtraction kit) มาอย่างละ 1 ไมโครลิตร เติมลงในหลอด microcentrifuge ที่สะอาด

3.5.2 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี Primary PCR

หลังจากทำ Second hybridization แล้ว นำส่วนที่ได้จากข้อ 3.4 มาทำ PCR เพื่อเติมในส่วนของ adaptor ให้เต็ม ผสมส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาตามตารางที่ 4 ให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดที่มี cDNA แม่พิมพ์ที่เตรียมในข้อ 3.5.1 หลอดละ 24 ไมโครลิตร นำ reaction mix ไปป่มในเครื่อง thermal cycler ที่อุณหภูมิ 75 องศา

เซลล์เชื้อส นาน 5 นาที และทำ PCR ตามสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 5 ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.8% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer เก็บดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา Primary PCR

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อ reaction (μ l)
Sterile H ₂ O	19.5
10x PCR reaction buffer	2.5
dNTP Mix (10 mM)	0.5
PCR primer 1 (10 μ M)	1.0
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0.5
ปริมาตรรวม	24.0

ตารางที่ 5 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา Primary PCR

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
94 องศาเซลเซียส	25 วินาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	10 วินาที	30 รอบ
66 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	1.5 นาที	

3.5.3 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี Secondary PCR

ทำการเจือจาง Primary PCR mixture ที่ได้จากข้อ 3.5.2 โดยใช้ตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 27 ไมโครลิตร แบ่งส่วนที่ทำเจือจางมาอย่างละ 1 ไมโครลิตร ผสมกับส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 6 ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดๆ ละ 24 ไมโครลิตร นำ reaction mix ไปป้อนในเครื่อง thermal cycler ใช้สภาวะที่ทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 7 ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.8% agarose gel

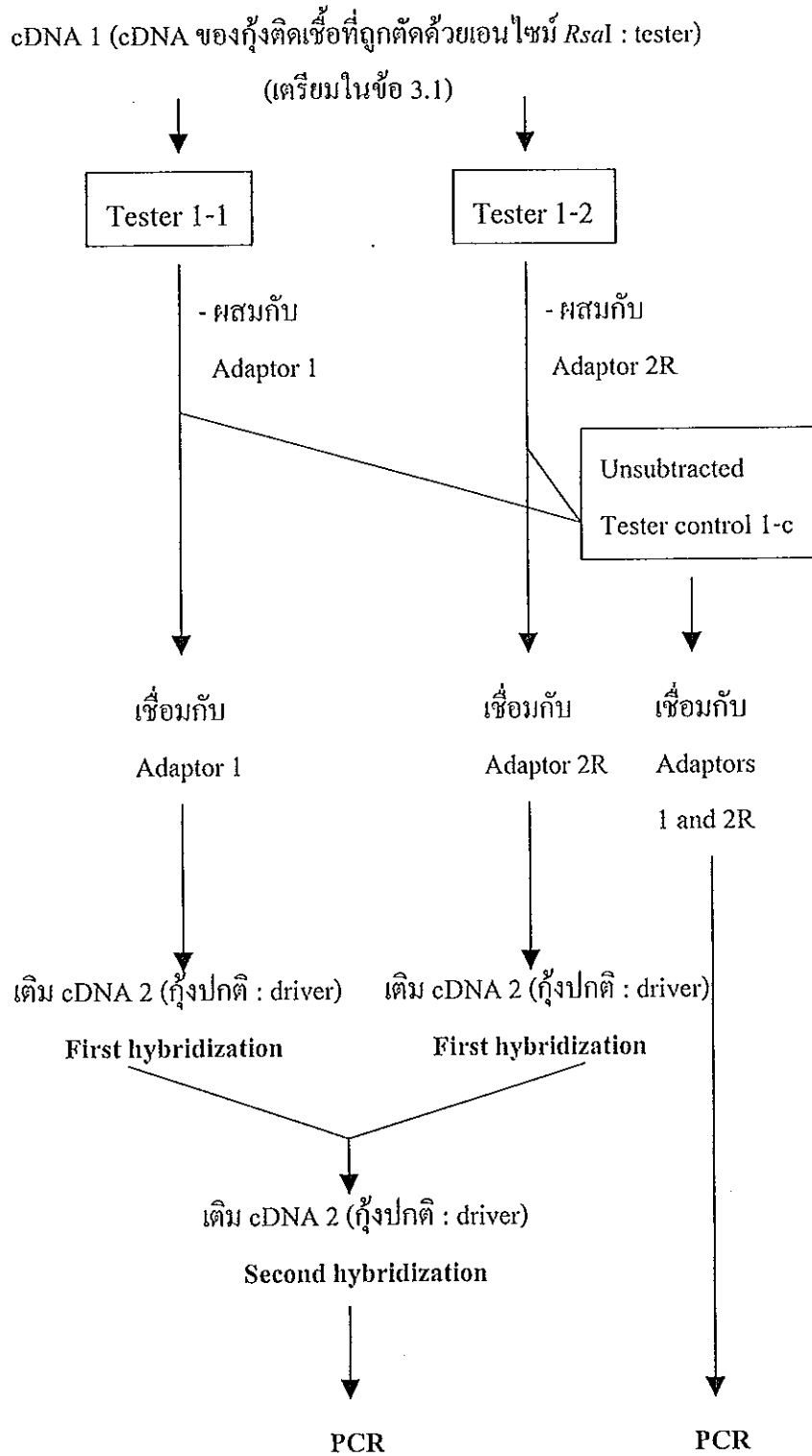
electrophoresis ใน TAE buffer เก็บดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา Secondary PCR

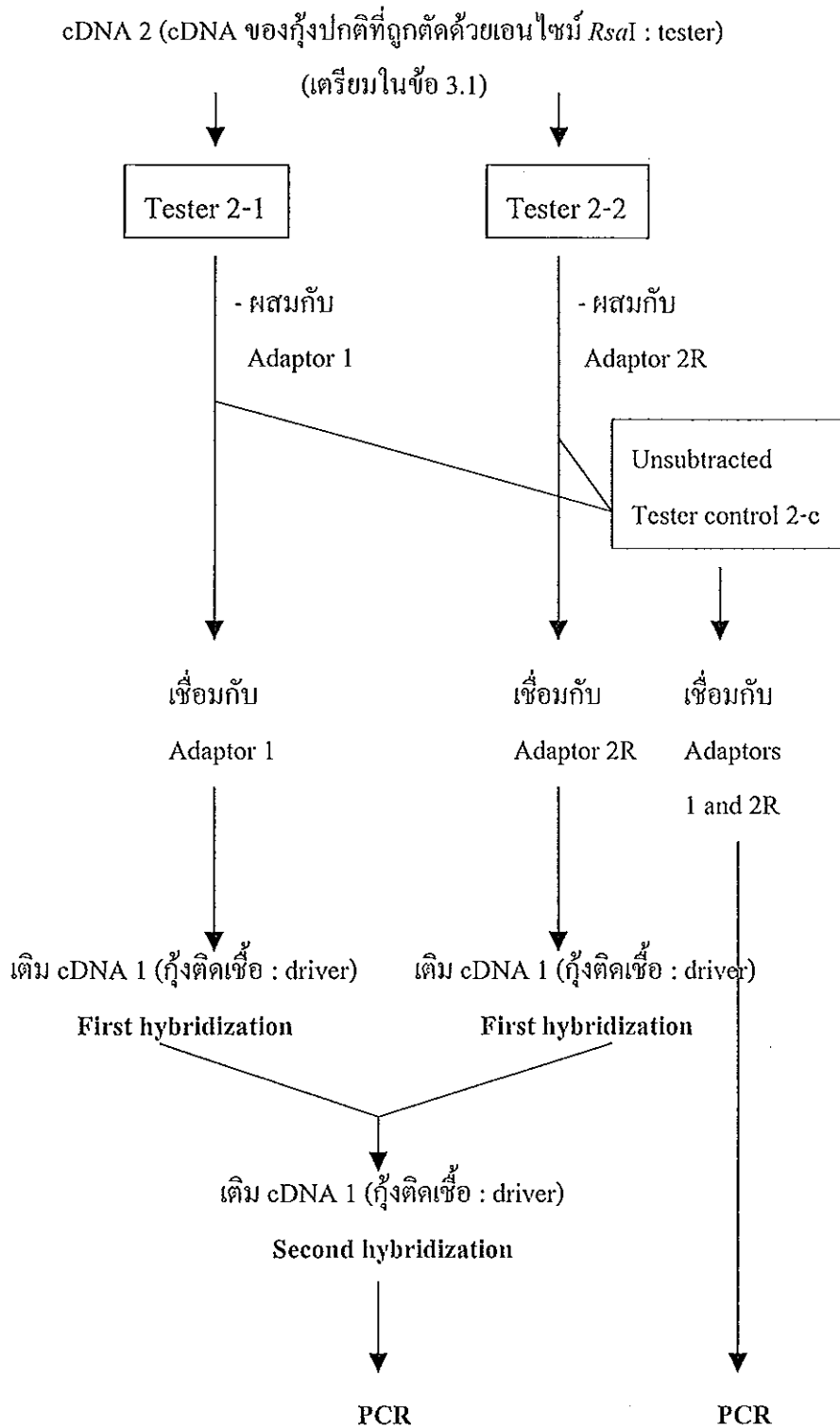
ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อ reaction (μ l)
Sterile H ₂ O	18.5
10x PCR reaction buffer	2.5
Nested PCR primer 1 (10 μ M)	1.0
Nested PCR primer 2R (10 μ M)	1.0
dNTP Mix (10 mM)	0.5
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0.5
ปริมาตรรวม	24.0

ตารางที่ 7 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา Secondary PCR

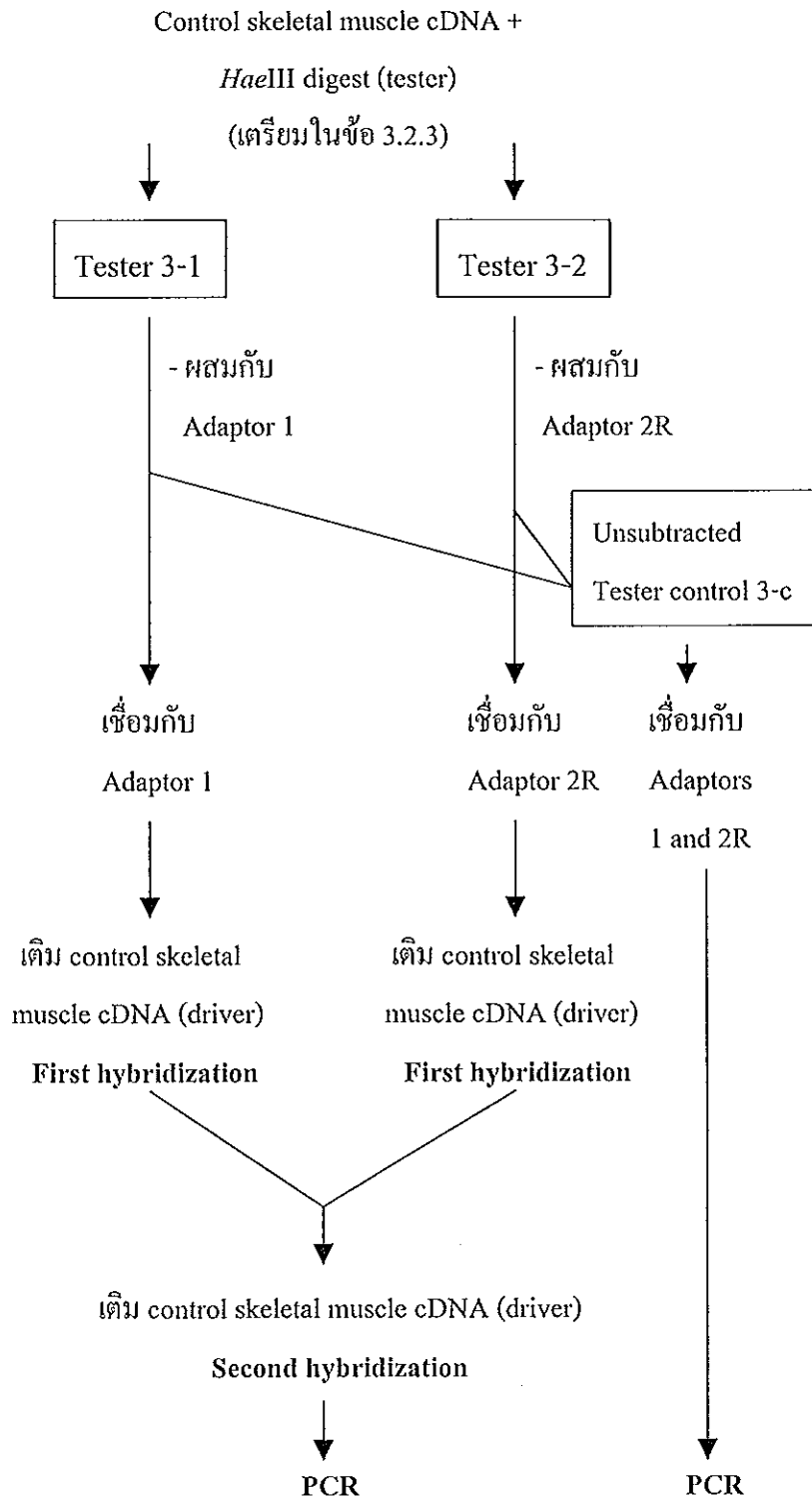
อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
94 องศาเซลเซียส	10 วินาที	15 รอบ
68 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	1.5 นาที	



ภาพที่ 6 การเชื่อม Adaptor กับ tester cDNA สำหรับการทำให้ hybridization และ PCR ของ Forward subtraction



ภาพที่ 7 การเชื่อม Adaptor กับ tester cDNA สำหรับการทำให้ hybridization และ PCR ของ Reverse subtraction



ภาพที่ 8 การเชื่อม Adaptor กับ tester cDNA สำหรับการทำให้ hybridization และ PCR ของ Control subtraction

4. การเตรียม Subtracted cDNA library

4.1 การเชื่อมพลาสมิด pGEM[®]-T กับ Forward subtracted cDNA (ตามวิธีการของบริษัท Promega)

นำพลาสมิด pGEM[®]-T และ forward subtracted cDNA (จากข้อ 3.5.3) มาเชื่อมกันโดยเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร, 2x buffer 15 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของพลาสมิดต่อดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:1 และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

4.2 การเชื่อมพลาสมิด pGEM[®]-T Easy กับ Forward subtracted cDNA (ตามวิธีการของบริษัท Promega)

นำพลาสมิด pGEM[®]-T Easy และ forward subtracted cDNA (จากข้อ 3.5.3) มาเชื่อมกันโดยเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร, 2x buffer 15 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของพลาสมิดต่อดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:1 และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

4.3 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F'

4.3.1 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน competent cells ของ *E. coli* Top 10F' (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hanahan, 1983)

ทำการ streak เชื้อ *E. coli* Top 10F' ลงบนอาหาร LB ที่มี tetracyclin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB (ที่มี tetracyclin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 25 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง inoculate เชื้อทั้งหมดลงในอาหารเหลว LB (ที่มี tetracyclin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้เซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 - 0.6 ถ่ายเชื้อลงหลอดสำหรับปั่น แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 x g

นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใส่ทิ้ง นำตะกอนมาละลายใน 10 มิลลิลิตร ของ 0.1 M CaCl₂ (ที่เย็นจัด) แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนโดยใช้ความเร็ว 4,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใส่ทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ใน 15% glycerol (ที่เย็นจัด) 8 มิลลิลิตร แบ่งลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

4.3.2 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F' (ดัดแปลงจากวิธีการของ Maniatis, *et al.*, 1982)

วาง competent cell ที่ได้จากข้อ 4.3.1 ในน้ำแข็ง เดิมดีเอ็นเอลูกผสม (จากข้อ 4.1 และ 4.2) 5 ไมโครลิตร วางในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำ heat shock โดยการนำหลอดที่มี competent cell และดีเอ็นเอลูกผสม บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที รีบวางหลอดบนน้ำแข็งทันที บ่มในน้ำแข็งนาน 2 - 3 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB ที่ผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 800 ไมโครลิตร นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้น spread ลงบนอาหาร LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านหรือไม่

4.4 การตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม (ตามวิธีการของ Sambrook, *et al.*, 1989)

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 4.3.2 โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง เมื่ออาหารขุ่นดูหนา 1.5 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์โดยใช้ความเร็ว 10,000 x g นาน 1 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง เก็บตะกอนที่ได้เอาไว้ เดิม Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) 100 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเพื่อ

ให้ตะกอนละลาย วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ วางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม 3 M KOAc pH 4.8 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ วางบนน้ำแข็งนาน 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 5 - 10 นาที ดูดส่วนใสให้หมดใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือนานกว่า นำหลอดมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้งโดยใช้เครื่อง vacuum dry นาน 5 - 10 นาที ละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอลูกผสมโดยใช้ 1.0% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer

5. การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมจาก Subtracted cDNA library

5.1 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจจับ Forward และ Reverse subtracted cDNA probe (ตามวิธีการของบริษัท Boehringer Mannheim)

ต้มสารละลายดีเอ็นเอ Forward และ Reverse subtracted cDNA (จากข้อ 3.5.3) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วางบนน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย hexanucleotide 2 ไมโครลิตร, dNTP labelling mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1.0 mM dGTP, 0.65 mM dTTP และ 0.35 mM DIG-dUTP, pH 7.5) 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ Klenow (2 unit/ μ l) 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นจนครบ 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน นำมาหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M EDTA, pH 8.0 2 ไมโครลิตร ตกตะกอน ดีเอ็นเอตรวจจับด้วย 4 M LiCl 2.5 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 75 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 12,000 x g นาน 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 12,000 x g นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE Buffer (10 mM Tris pH 8.0 และ 1 mM EDTA) 50 ไมโครลิตร

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (ตามวิธีการของบริษัท Clontech)

เลี้ยงโคโลนีที่ได้จากข้อ 4.3.2 ในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง คูลน้ำเลี้ยง 1 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายในตารางที่ 8 และสถานะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR	ปริมาตรที่ใช้ (μ l)
H ₂ O	15.2
10x PCR reaction buffer	2.0
Nested Primer 1	0.6
Nested Primer 2R	0.6
dNTP mix (10 mM)	0.4
50x PCR enzyme mix	0.2
ปริมาตรรวม	20.0

ตารางที่ 9 สถานะที่ทำปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	1 รอบ
95 องศาเซลเซียส	10 วินาที	23 รอบ
68 องศาเซลเซียส	3 วินาที	

5.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมด้วยวิธี Hybridization (ดัดแปลงจากวิธีการของบริษัท Boehringer Mannheim; Deering, *et al.*, 1991)

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ในข้อ 5.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.6 N NaOH 5 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่ผสมแล้วมา 1 - 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน ทำให้เป็นกลางโดยแช่ใน 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5) นาน

2 - 4 นาที ล้างด้วยน้ำ จากนั้นนำไปอบในตู้อบโดยใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 - 2 ชั่วโมง (Armbrust, 1999) นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเออยู่ไปบ่มในสารละลาย prehybridization (5xSSC, 1% (w/v) blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบ่มในสารละลาย hybridization (มีส่วนผสมเช่นเดียวกับสารละลาย prehybridization และมีดีเอ็นเอตรวจจับที่ได้จากข้อ 5.1) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย washing I (2xSSC, 0.1% SDS) 4 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย washing II (0.1xSSC, 0.1%SDS) 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ทิ้งให้แผ่นเมมเบรนแห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.4 การตรวจสอบผลการ Hybridization (ดัดแปลงจากวิธีการของบริษัท Boehringer Mannheim; Deering, *et al.*, 1991)

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ได้ในข้อ 5.3 มาล้างในสารละลาย washing buffer (maleic acid buffer, 3% Tween^R20 (v/v)) นาน 1 - 5 นาที บ่มในสารละลาย blocking 30 มิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาบ่มในสารละลายแอนติบอดี (anti-DIG-AP conjugate 1:2,500 ในสารละลาย blocking) 10 มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างในสารละลาย washing buffer 100 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย detection buffer (0.1 M Tris pH 9.5, 0.1M NaCl, 0.05 M MgCl₂) 20 มิลลิลิตร นาน 2 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลาย color substrate (NBT/BCIP 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer 10 มิลลิลิตร) วางไว้ในที่มืด เมื่อปรากฏสีม่วงของดีเอ็นเอ หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

6. การศึกษาลำดับเบส (sequencing)

ศึกษาลำดับเบสของโคลนที่ได้จากการ hybridization (จากข้อ 5.4) โดยใช้เครื่อง ABI PRISM 377 DNA sequencer (Version 3.2) และ ABI PRISMTM BigDyeTM Terminator kit และเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของธนาคารยีน

บทที่ 3

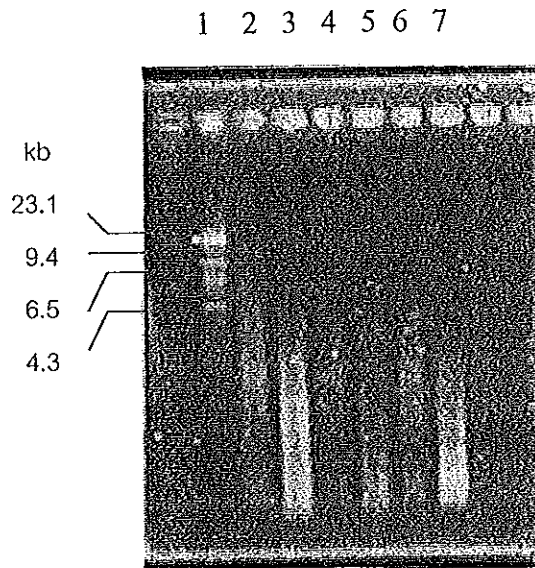
ผลและวิจารณ์

1. การเตรียม mRNA จากเลือดกิ้ง

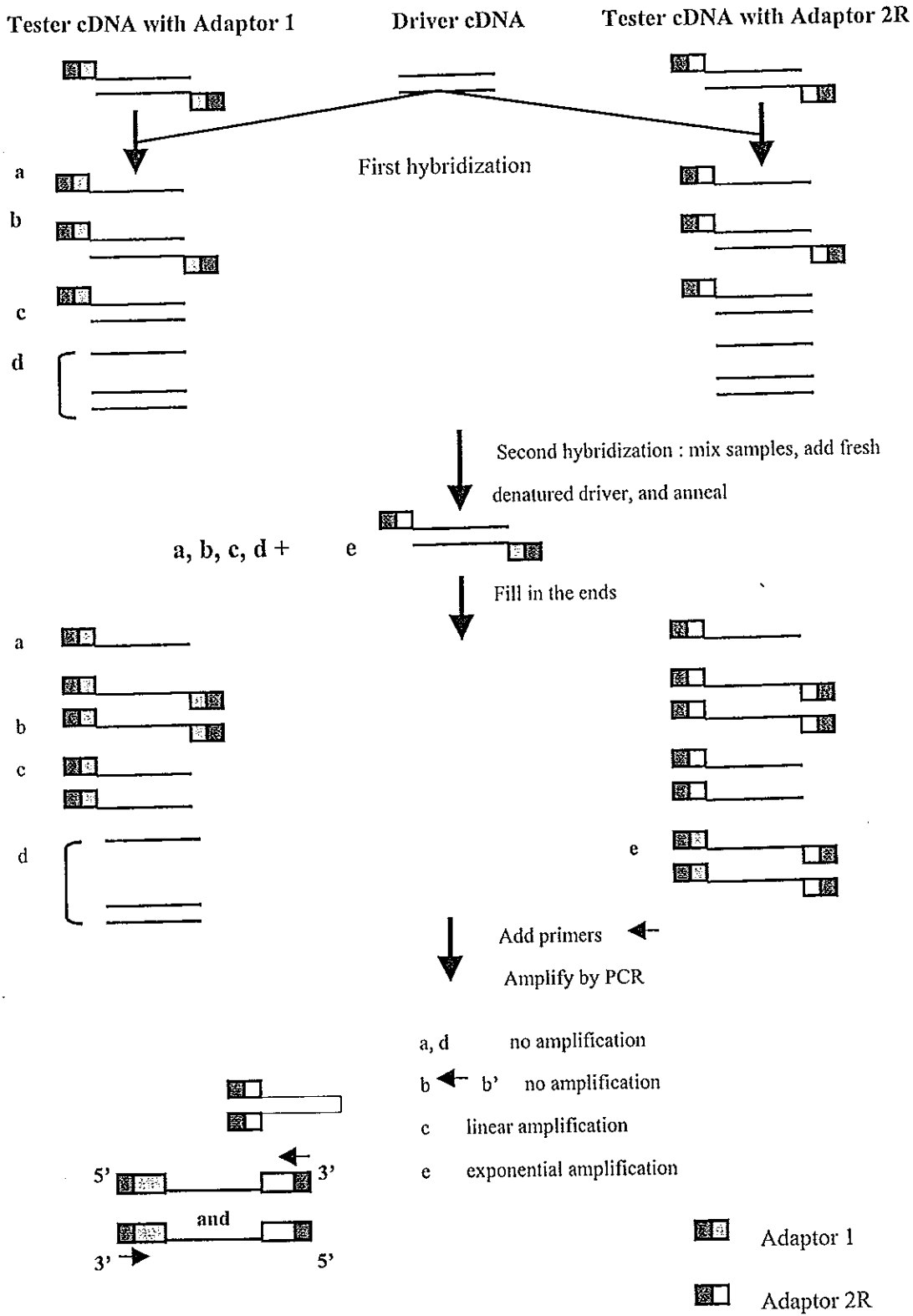
เตรียมตัวอย่างโดยเลี้ยงกิ้งจำนวน 40 ตัว ในตู้เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้กิ้งปรับตัวเข้ากับสภาพที่ใช้เลี้ยง เจาะเลือดตัวละประมาณ 0.10 - 0.20 มิลลิลิตร กิ้งทุกตัวจะถูกเลี้ยงแยกและเก็บเลือดแยกหลอด ภายหลังจากการเจาะเลือดครั้งแรกจะให้กิ้งพักเป็นเวลา 1 วัน โดยในระหว่างพักได้สำรวจพฤติกรรมการกินอาหารเพื่อให้แน่ใจว่ากิ้งที่จะใช้ในการทดลองมีสภาพแข็งแรง หากพบว่าตัวอย่างใดตายภายหลังการเจาะเลือดครั้งแรกก็จะไม่นำเลือดของตัวอย่างนั้นไปทดลองในขั้นตอนต่อไป ในการทดลองครั้งนี้มีกิ้ง 39 ตัว ยังอยู่ในสภาพปกติจนถึงวันฉีดเชื้อ ทำการฉีดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวซึ่งได้เลือกเชื้อไวรัสชนิดนี้ เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีการระบาดมากในปัจจุบันและเป็นเชื้อที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้ว่ากิ้งที่ตายในการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จากนั้นเจาะเลือดตัวละประมาณ 0.1 - 0.2 มิลลิลิตร ภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมง ในขณะที่เก็บเลือดครั้งที่ 2 นี้ กิ้งเริ่มมีอาการอ่อนแอ เมื่อเลี้ยงและสังเกตพฤติกรรมต่ออีก 2 สัปดาห์ พบว่ามีกิ้งตายจำนวน 10 ตัว ภายใน 5 วันแรก ส่วนที่เหลือแสดงอาการใน 2 - 3 วัน แรก แล้วค่อยๆ กลับสู่สภาพปกติ คาดว่ากิ้งสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ จากนั้นนำเลือดกิ้งก่อนฉีดเชื้อไวรัสและหลังฉีดเชื้อไวรัสมาเตรียม total RNA และนำ total RNA ที่ได้มาผ่านคอลัมน์ ที่มี oligo(dT)-cellulose เพื่อแยก mRNA ออกจาก total RNA เนื่องจาก mRNA มีปลาย 3' เป็น poly A⁺ จึงสามารถจับกับ oligo(dT) ที่อยู่ในคอลัมน์ได้ (Howe, 1997) จากการทดลองพบว่า mRNA ที่ได้จากกิ้งที่ไม่ติดเชื้อมีความเข้มข้น 8.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ mRNA ที่ได้จากกิ้งที่ติดเชื้อมีความเข้มข้น 9.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การเตรียม Subtracted cDNA

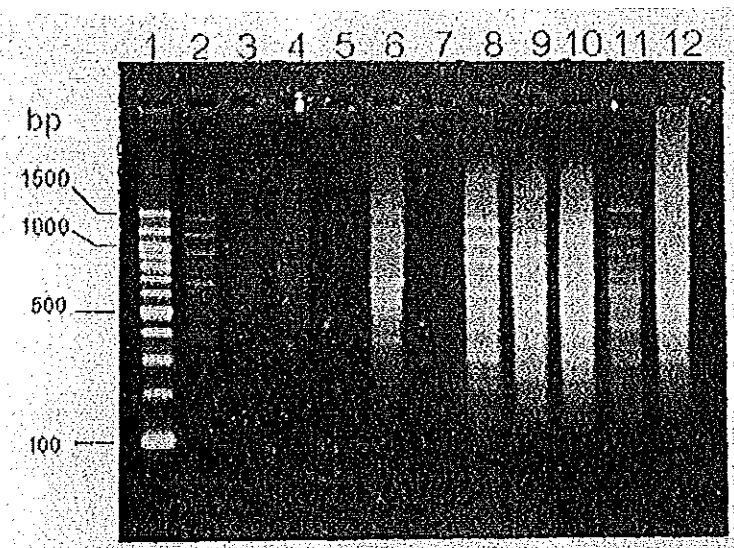
การทดลองครั้งนี้ได้ออกแบบไว้เพื่อคัดเลือก mRNA ที่เกิดขึ้นในขณะที่ร่างกายตอบสนองต่อสถานะการติดเชื้อโดยใช้วิธี cDNA subtractive hybridization โดยอาศัยสมมติฐานว่าเมื่อกึ่งได้รับไวรัสจะมีการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานไวรัส ดังนั้น mRNA ของตัวอย่างที่ได้รับเชื้อแตกต่างจาก mRNA ที่มีอยู่ก่อนได้รับเชื้อ นำ mRNA ที่ได้จากกึ่งที่ไม่ติดเชื้อ (driver) และกึ่งที่ติดเชื้อ (tester) มาเปลี่ยนเป็น cDNA และตัด cDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* (ภาพที่ 9) เพื่อให้ cDNA มีขนาดที่เหมาะสมและสามารถเชื่อมกับ adaptor ได้ เชื่อม adaptor 2 ชนิด โดยทำแยกหลอด คือ เชื่อม adaptor 1 เข้ากับ tester cDNA หลอดที่ 1 และเชื่อม adaptor 2R เข้ากับ tester cDNA หลอดที่ 2 ส่วน cDNA ของ driver จะไม่ติด adaptor นำ driver cDNA ไปจับ (hybridize) กับ cDNA ของ tester ที่ติด adaptor แล้ว จากขั้นตอนนี้ cDNA ของ tester ใดที่ไม่ถูกจับหรือหักล้างโดย driver cDNA ก็จะเหลือว่างอยู่ ซึ่งเมื่อนำ tester ที่มี adaptor ต่างกัน (adaptor 1 และ 2R) มาผสมในหลอดเดียวกัน tester ที่เหลือว่างนั้นก็จะสามารถจับกันได้ และเรียกผลที่ได้จากการจับกันของ cDNA ว่า subtracted cDNA นำ subtracted cDNA มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่มีลำดับเบสของ adaptor 1 และ 2R ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะ cDNA ที่มี adaptor ที่ปลาย 5' ของเส้นหนึ่งเป็น adaptor 1 และอีกเส้นหนึ่งเป็น adaptor 2R (ภาพที่ 10) จากการเพิ่มจำนวน cDNA พบว่า subtracted cDNA ที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 200 - >1,500 bp ดังแสดงในภาพที่ 11 จากภาพจะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้จากการเตรียม Forward และ Reverse subtraction มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอและลักษณะที่ใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้จากการเตรียม control subtraction แสดงว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในทุกขั้นตอนของการทดลองครั้งนี้เป็นไปอย่างถูกต้องและได้ผลดี (Forward และ Reverse subtraction ต่างกัน คือ ในการทำ Forward subtraction จะใช้ cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อเป็น tester และ cDNA ของกึ่งที่ไม่ติดเชื้อเป็น driver ส่วน Reverse subtraction จะใช้ cDNA ของกึ่งที่ไม่ติดเชื้อเป็น tester และ cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อเป็น driver)



ภาพที่ 9 ผลการสังเคราะห์ cDNA และการตัด cDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* วิเคราะห์บน 1.8% agarose gel eletrophoresis : lane 1 ใช้ λ *HindIII* เป็น marker ; lane 2 control cDNA ; lane 3 control cDNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* ; lane 4 cDNA ของกิ้งที่ไม่ติดเชื้อ ; lane 5 cDNA ของกิ้งที่ไม่ติดเชื้อที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* ; lane 6 cDNA ของกิ้งที่ติดเชื้อ ; lane 7 cDNA ของกิ้งที่ติดเชื้อที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*



ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงการเตรียม cDNA subtractive hybridization



ภาพที่ 11 ผลที่ได้จากการทำ cDNA subtractive hybridization วิเคราะห์บน 1.8% agarose gel eletrophresis ผลจากการทำ Primary PCR : lane 1 ใช้ 100 bp DNA ladder (Biolabs) เป็น marker ; lane 2 subtracted control cDNA ; lane 3 forward subtracted cDNA ; lane 4 forward subtracted cDNA ; lane 5 reverse subtracted cDNA ; lane 6 unsubtracting tester control, ผลจากการทำ Secondary PCR : lane 8 subtracted control cDNA ; lane 9 forward subtracted cDNA ; lane 10 forward subtracted cDNA ; lane 11 reverse subtracted cDNA ; lane 12 unsubtracting tester control

3. การเตรียม Subtracted cDNA library

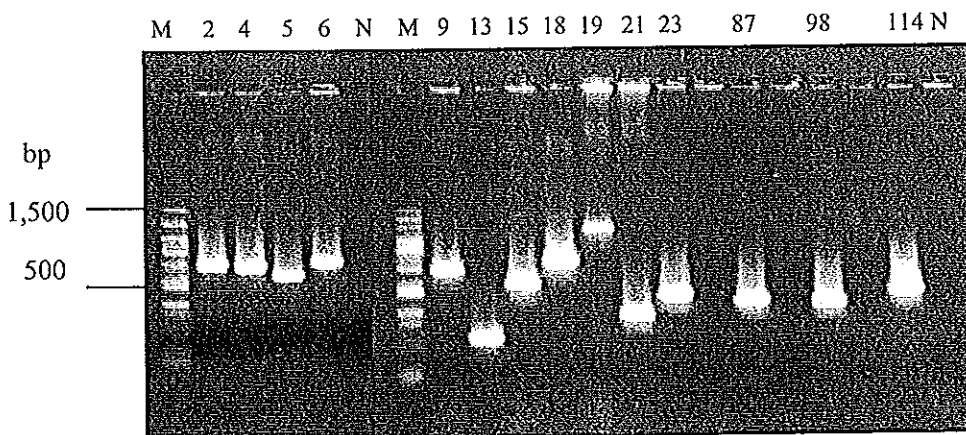
นำ subtracted cDNA เชื่อมกับพลาสมิด pGEM[®]-T และนำดีเอ็นเอลูกผสมไป transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F' พบว่ามี *E. coli* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 40 โคโลนี เป็นโคโลนีที่มีดีเอ็นเอลูกผสมจำนวน 11 โคลน ซึ่งน้อยมาก จึงเปลี่ยนมาใช้พลาสมิด pGEM[®]-T Easy เป็นดีเอ็นเอพาหะ พบว่ามี *E. coli* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 124 โคโลนี เป็นโคโลนีที่มีดีเอ็นเอลูกผสมจำนวน 16 โคลน จากการทดลองพบว่าถึงแม้จะมีจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* Top 10F' เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าการใช้พลาสมิด pGEM[®]-T แต่จำนวนดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ยังมีจำนวนน้อย จึงแบ่ง subtracted cDNA ออกเป็น 3 ขนาด คือ 800 bp - >1,500 bp, 400 bp - <800 bp, 200 bp - <400 bp นำมาเชื่อมกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy ผลจากการนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F' พบว่ามี *E. coli* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 781 โคลน และเป็นโคโลนีที่มีดีเอ็นเอลูกผสมทั้งหมด (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 โคลนที่ได้จากการทำ subtracted cDNA library

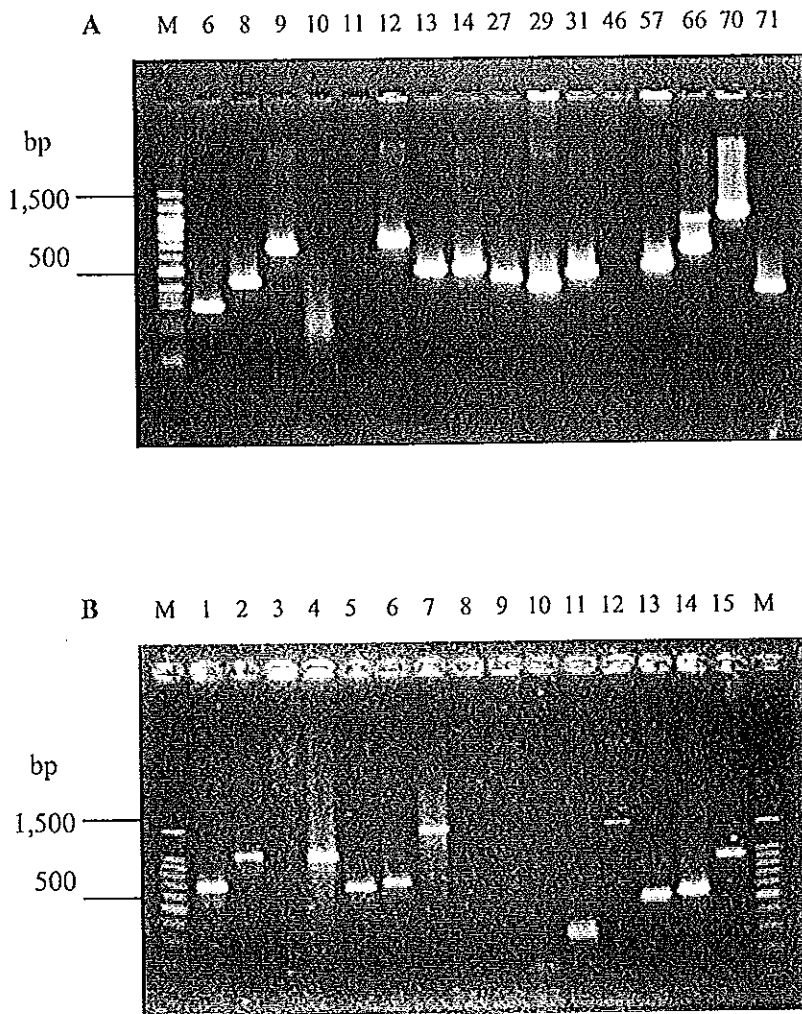
plasmid	ขนาด subtracted cDNA (bp)	Sample No.
pGEM [®] -T	200 bp - >1,500 bp	pT2, pT4, pT5, pT6, pT9, pT13, pT15, pT18, pT19, pT21, pT23
pGEM [®] -T Easy	200 bp - >1,500 bp	pTE6, pTE8, pTE9, pTE12, pTE13, pTE14, pTE27, pTE29, pTE31, pTE57, pTE66, pTE70, pTE71, pTE87, pTE98, pTE114
pGEM [®] -T Easy	800 bp - >1,500 bp	p1S1 - p256S1
	400 bp - <800 bp	p1S2 - p266S2
	200 bp - <400 bp	p1S3 - p259S3

4. การคัดเลือกดีเอ็นเอถูกผสม

นำโคลนที่ได้จากการนำดีเอ็นเอถูกผสมเข้าสู่ *E. coli* Top 10F' จำนวน 808 โคลน มาทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (ภาพที่ 12 - ภาพที่ 38) และเลือก PCR product ที่ได้จากโคลนจำนวน 441 โคลน มาทำ hybridization กับ Forward probe ซึ่งได้จากการทำ cDNA subtractive hybridization โดยใช้ cDNA ของกึ่งที่ไม่ติดเชื้อเป็น driver และ cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อเป็น tester และ Reverse probe ซึ่งได้จากการทำ cDNA subtractive hybridization โดยใช้ cDNA ของกึ่งที่ติดเชื้อเป็น driver และ cDNA ของกึ่งที่ไม่ติดเชื้อเป็น tester จากการทดลองพบว่ามี 202 โคลนที่ hybridize ได้กับ forward probe แต่ไม่ hybridize หรือ hybridize จางๆ กับ reverse probe (ตารางที่ 11 และภาพที่ 39 - ภาพที่ 45) โคลนที่ยังไม่ทำ hybridization คือ โคลน p159S2 - p266S2 และโคลน p1S3 - p259S3



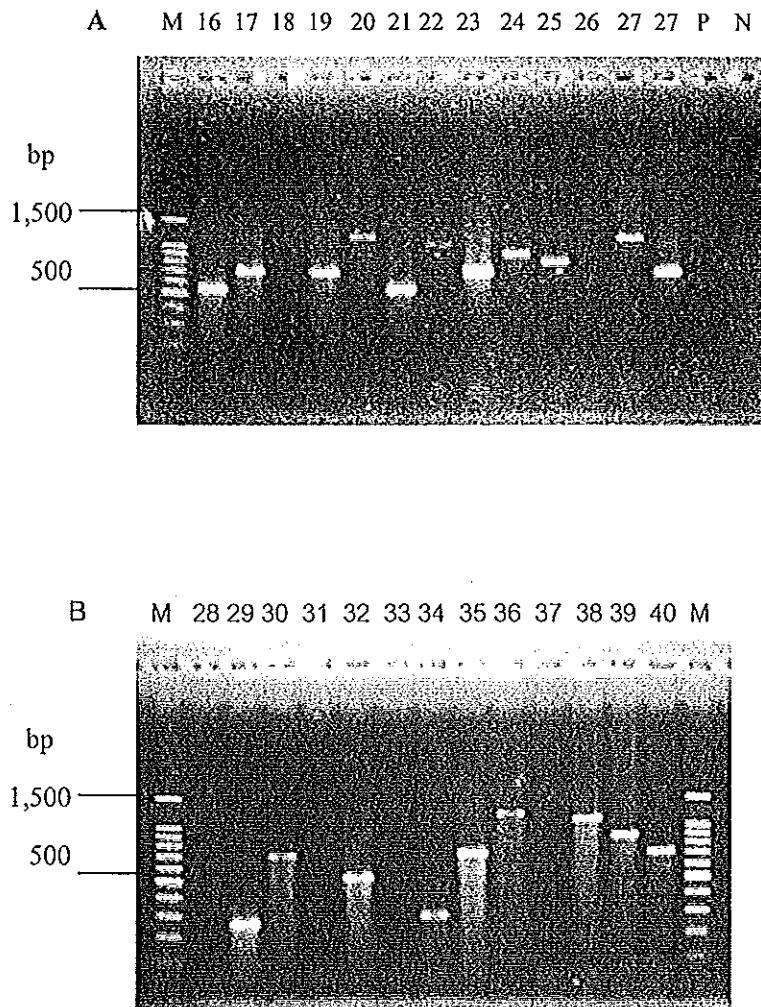
ภาพที่ 12 PCR products ที่ได้จากโคลน pT2, pT4, pT5, pT6, pTE9, pTE13, pTE15, pTE18, pTE19, pTE21, pTE23, pTE87, pTE98, pTE114 ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Biolabs) เป็น marker, lane N = negative control



ภาพที่ 13 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library

A : โคลน pTE6, pTE8, pTE9, pTE10, pTE11, pTE12, pTE13, pTE14, pTE27, pTE29, pTE31, pTE46, pTE57, pTE66, pTE70, pTE71 ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Biolabs) เป็น marker

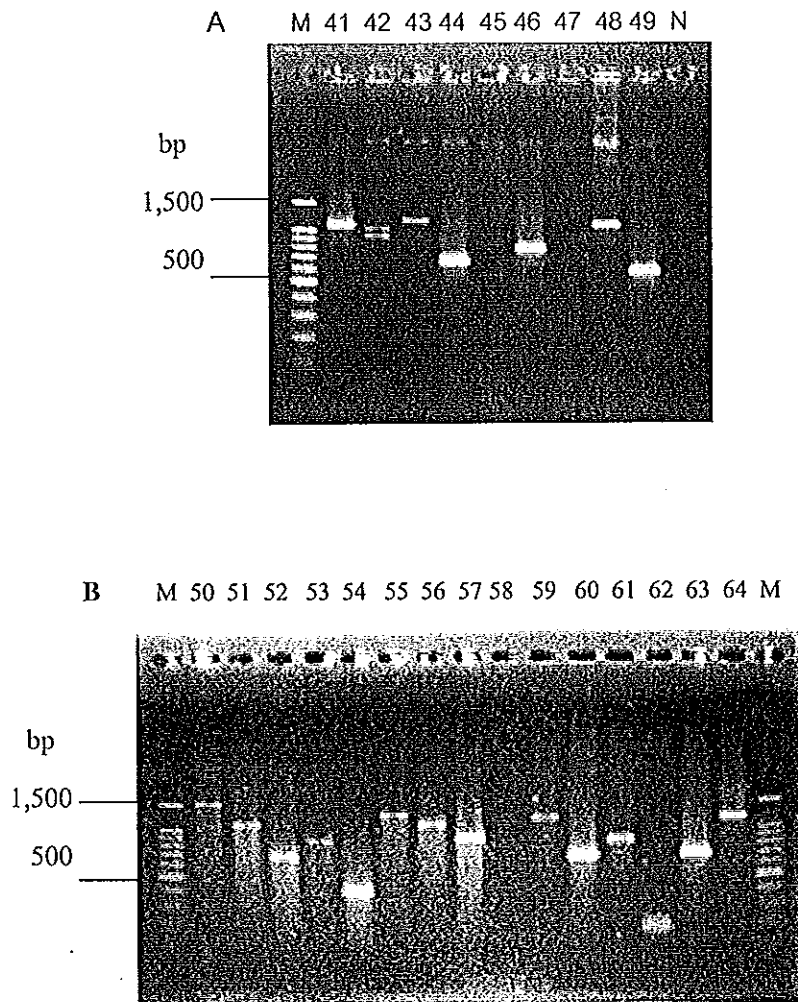
B : โคลน p1S1, p2S1, p3S1, p4S1, p5S1, p6S1, p7S1, p8S1, p9S1, p10S1, p11S1, p12S1, p13S1, p14S1, p15S1 ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker



ภาพที่ 14 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane P= positive control, lane N= negative control

A : โคลน p16S1, p17S1, p18S1, p19S1, p20S1, p21S1, p22S1, p23S1, p1S24, p25S1, p1S26, p27S1

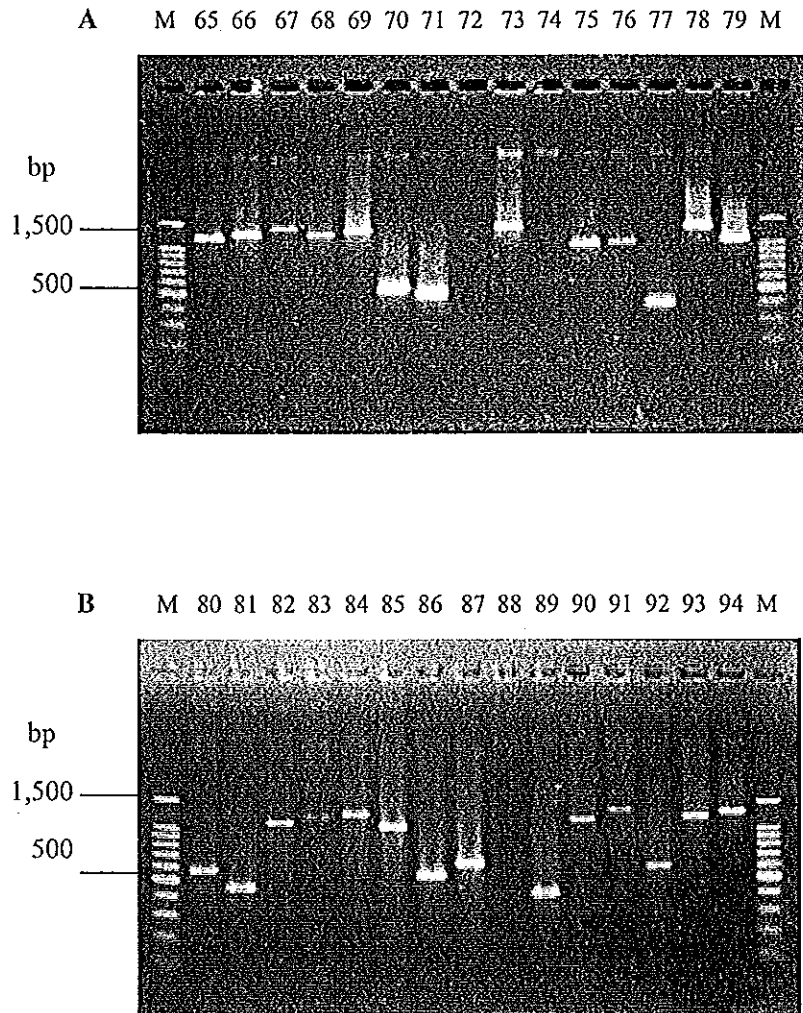
B : โคลน p28S1, p29S1, p30S1, p31S1, p32S1, p33S1, p34S1, p35S1, p36S1, p37S1, p38S1, p39S1, p40S



ภาพที่ 15 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane N= negative control

A : โคลน p41S1, p42S1, p43S1, p44S1, p45S1, p46S1, p47S1, p48S1, p49S1

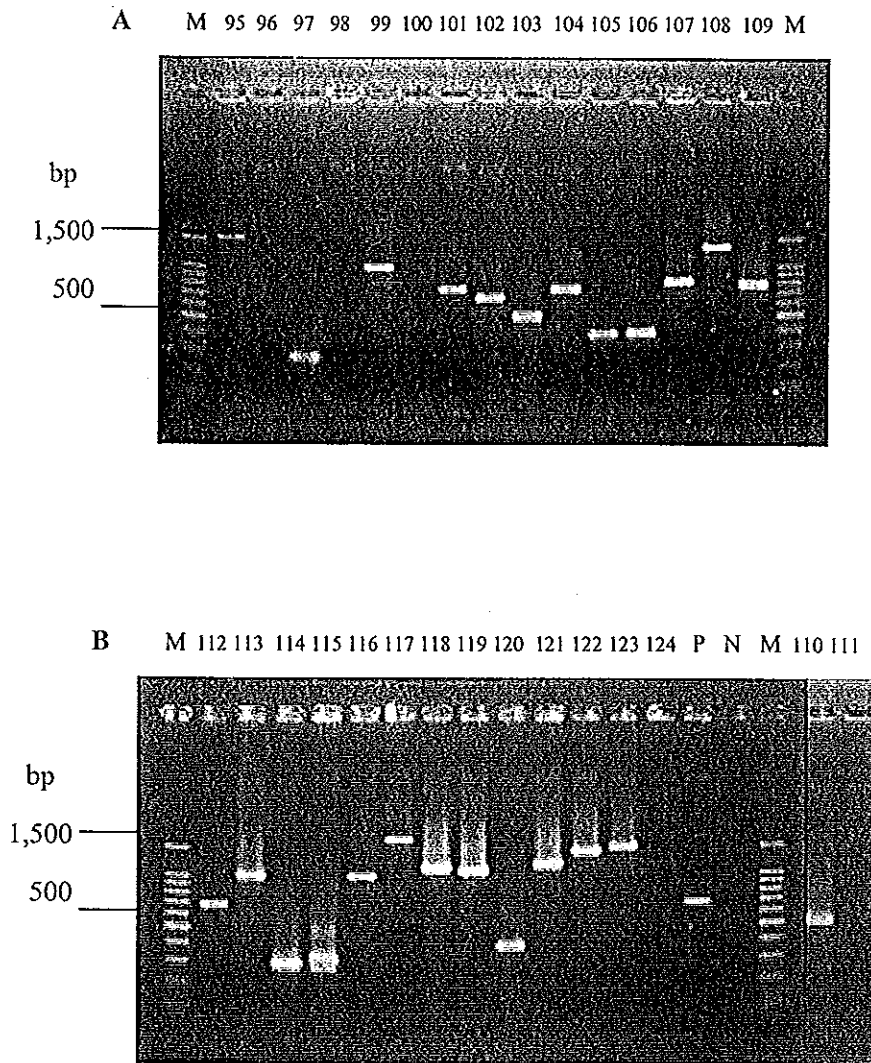
B : โคลน p50S1, p51S1, p52S1, p53S1, p54S1, p55S1, p56S1, p57S1, p58S1, p59S1, p60S1, p61S1, p62S1, p63S1, p64S1



ภาพที่ 16 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p65S1, p66S1, p67S1, p68S1, p69S1, p70S1, p71S1, p72S1, p73S1, p1S74, p75S1, p76S1, p77S1, p78S1, p79S1

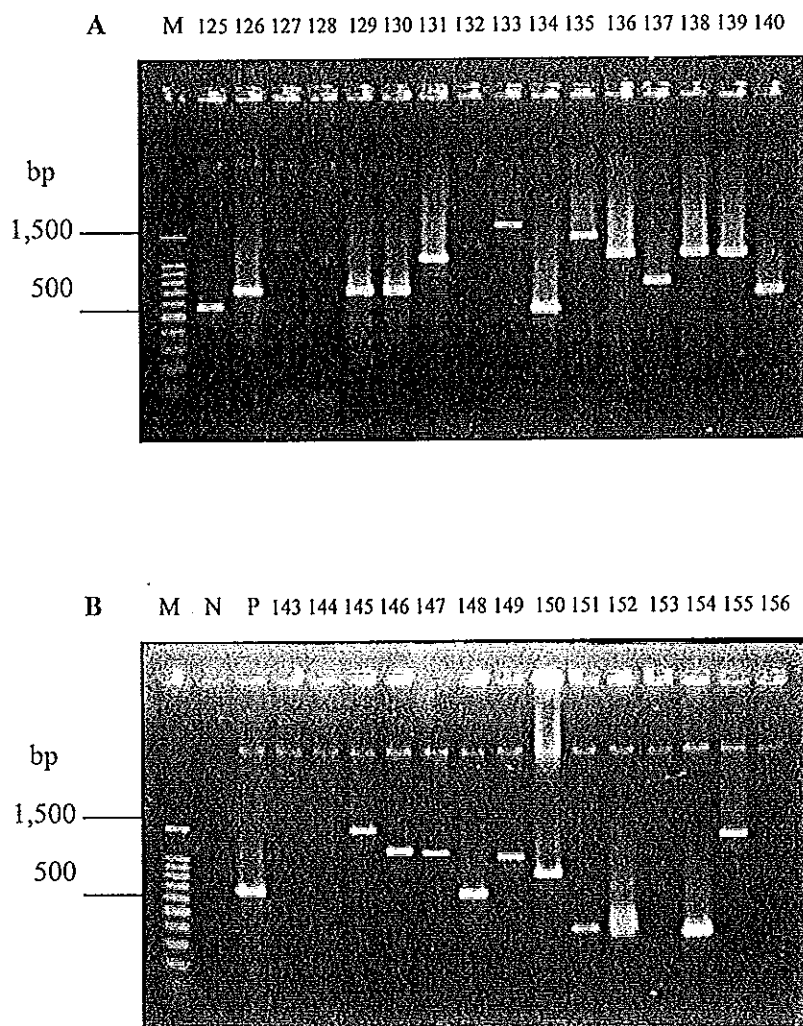
B : โคลน p80S1, p81S1, p82S1, p83S1, p84S1, p85S1, p86S1, p87S1, p88S1, p89S1, p90S1, p91S1, p92S1, p93S1, p94S1



ภาพที่ 17 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane P= positive control, lane N= negative control

A : โคลน p95S1, p96S1, p97S1, p98S1, p99S1, p100S1, p101S1, p102S1, p103S1, p104S1, p105S1, p106S1, p107S1, p108S1, p109S1

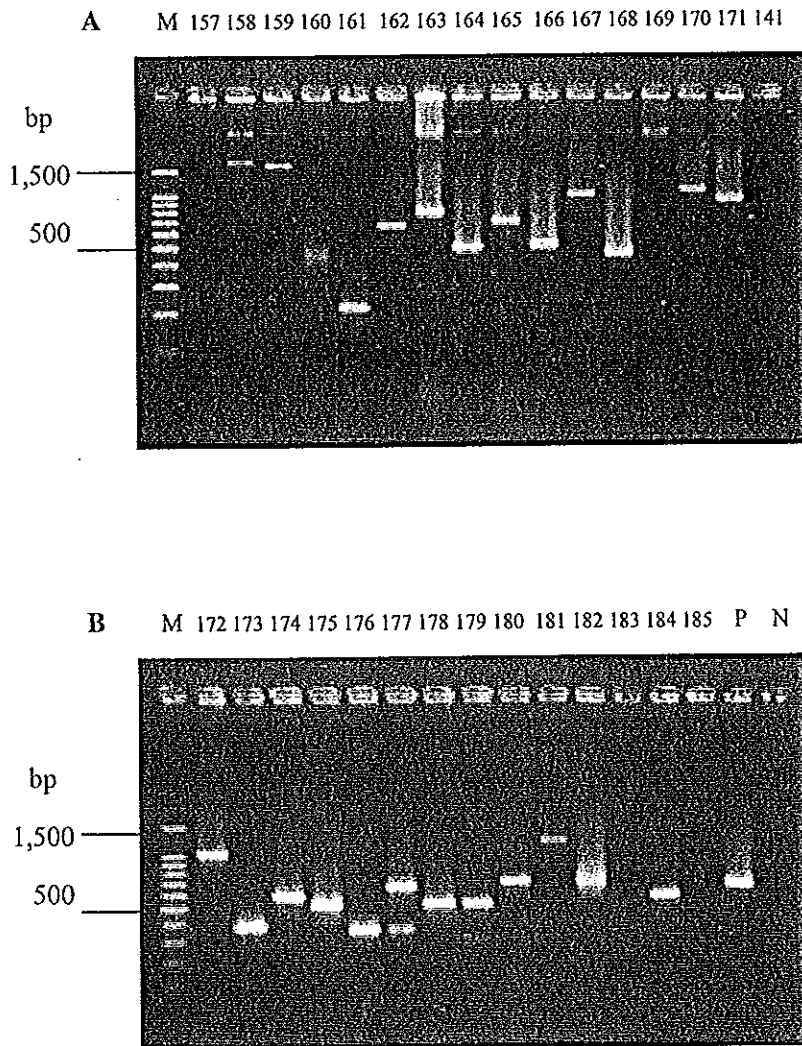
B : โคลน p112S1, p113S1, p114S1, p115S1, p116S1, p117S1, p118S1, p119S1, p120S1, p121S1, p122S1, p123S1, p124S1, p110S1, p111S1



ภาพที่ 18 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane P= positive control, lane N= negative control

A : โคลน p125S1, p126S1, p127S1, p128S1, p129S1, p1S130, p1S131, p1S132, p1S133, p1S134, p1S135, p1S136, p1S137, p1S138, p1S139, p1S140

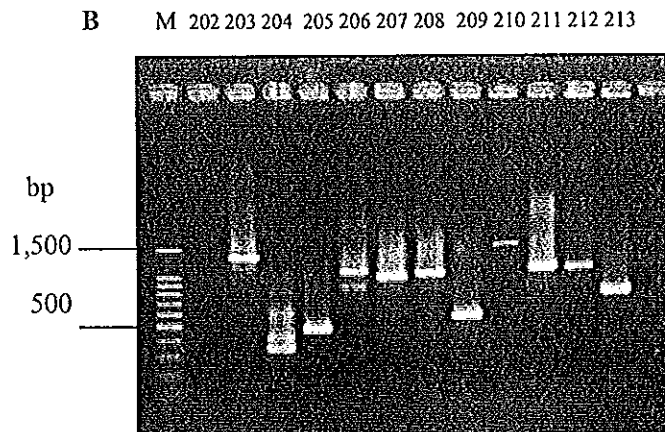
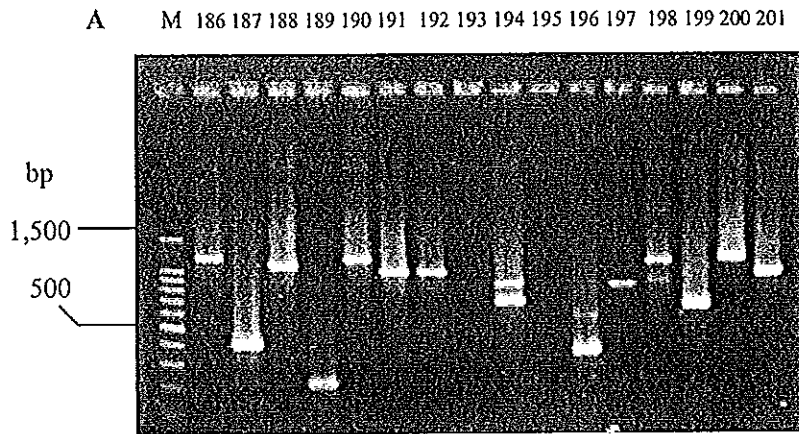
B : โคลน p1S141, p1S142, p1S143, p1S144, p1S145, p1S146, p1S147, p1S148, p1S149, p1S150, p1S151, p1S152, p1S153, p1S154, p1S155, p1S156



ภาพที่ 19 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane P= positive control, lane N= negative control

A : โคลน p1S157, p1S158, p1S159, p1S160, p1S161, p1S162, p1S163, p1S164, p1S165, p1S166, p1S167, p1S167, p1S168, p1S169, p1S170, p1S171, p1S141

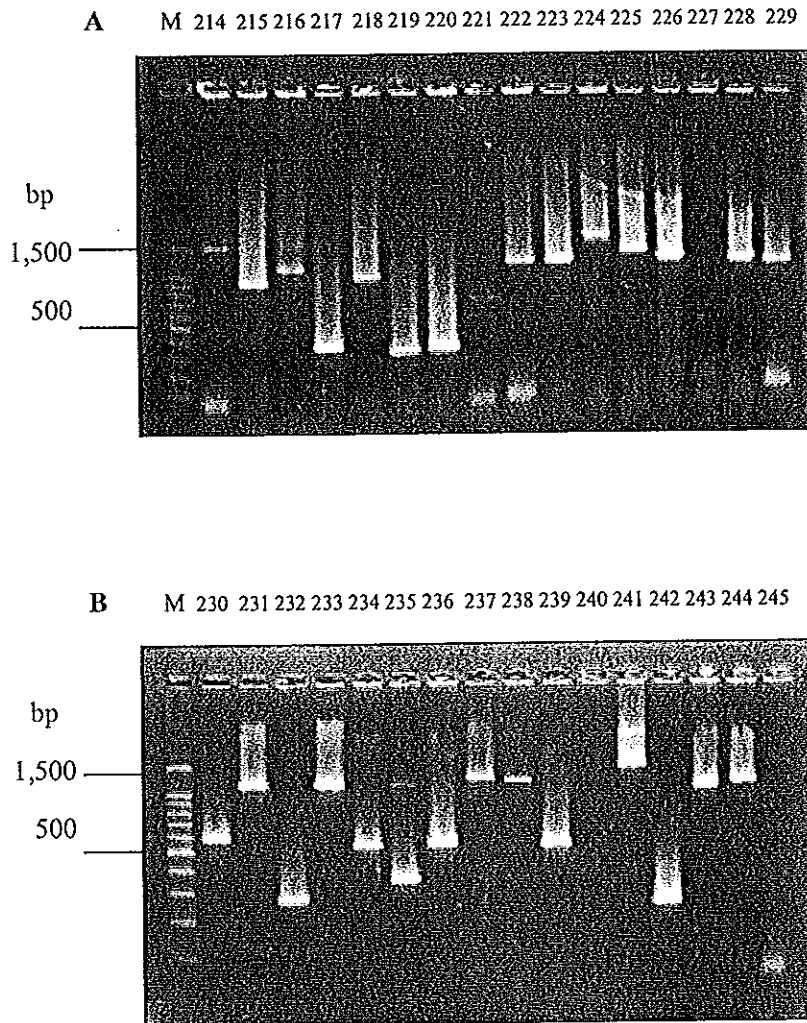
B : โคลน p1S172, p1S173, p1S174, p1S175, p1S176, p1S177, p1S178, p1S179, p1S180, p1S181, p1S182, p1S183, p1S184, p1S185



ภาพที่ 20 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p1S186, p1S187, p1S188, p1S189, p1S190, p1S191, p1S192, p1S193, p1S194, p1S195, p1S196, p1S197, p1S197, p1S198, p1S199, p1S200, p1S201

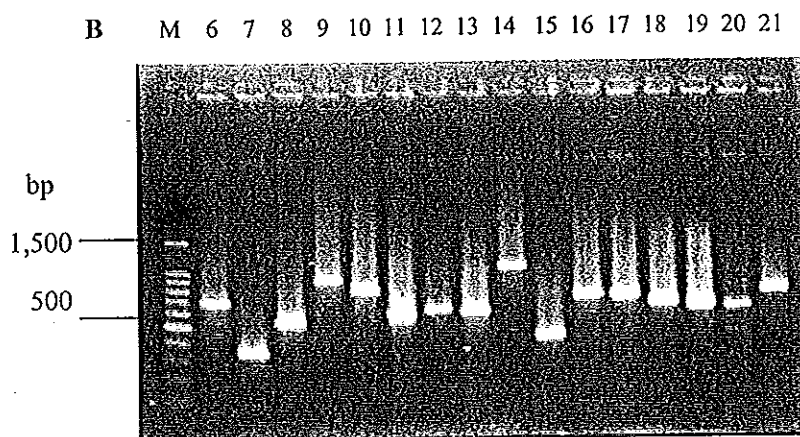
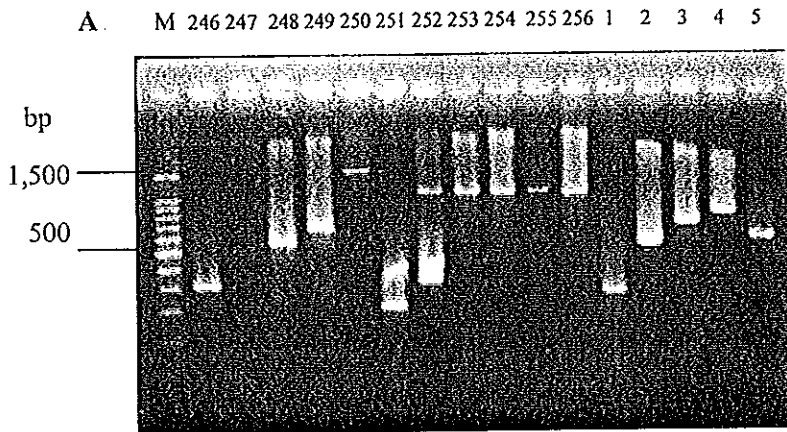
B : โคลน p1S202, p1S203, p1S204, p1S205, p1S206, p1S207, p1S208, p1S209, p1S210, p1S211, p1S212, p1S213



ภาพที่ 21 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p214S1, p215S1, p216S1, p217S1, p218S1, p219S1, p220S1, p221S1, p222S1, p223S1, p224S1, p225S1, p226S1, p227S1, p228S1, p229S1

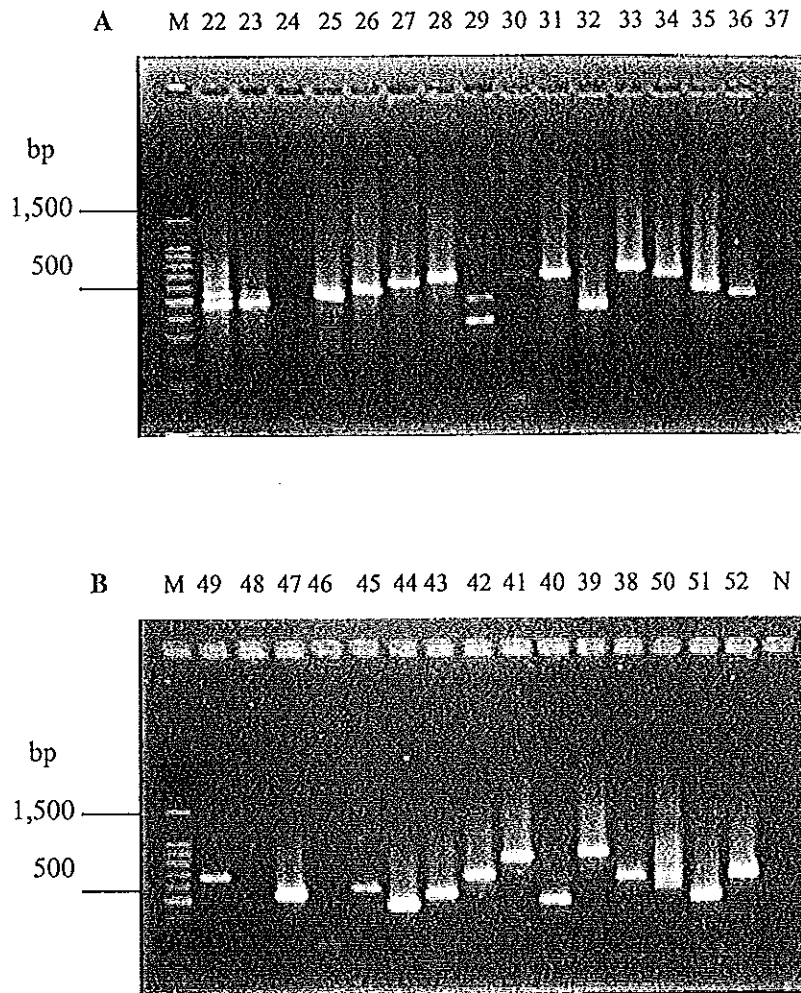
B : โคลน p230S1, p231S1, p232S1, p233S1, p234S1, p235S1, p236S1, p237S1, p238S1, p239S1, p240S1, p241S1, p242S1, p243S1, p244S1, p245S1



ภาพที่ 22 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p246S1, p247S1, p248S1, p249S1, p250S1, p251S1, p252S1, p253S1, p254S1, p255S1, p256S1, p1S2, p2S2, p3S2, p4S2, p5S2

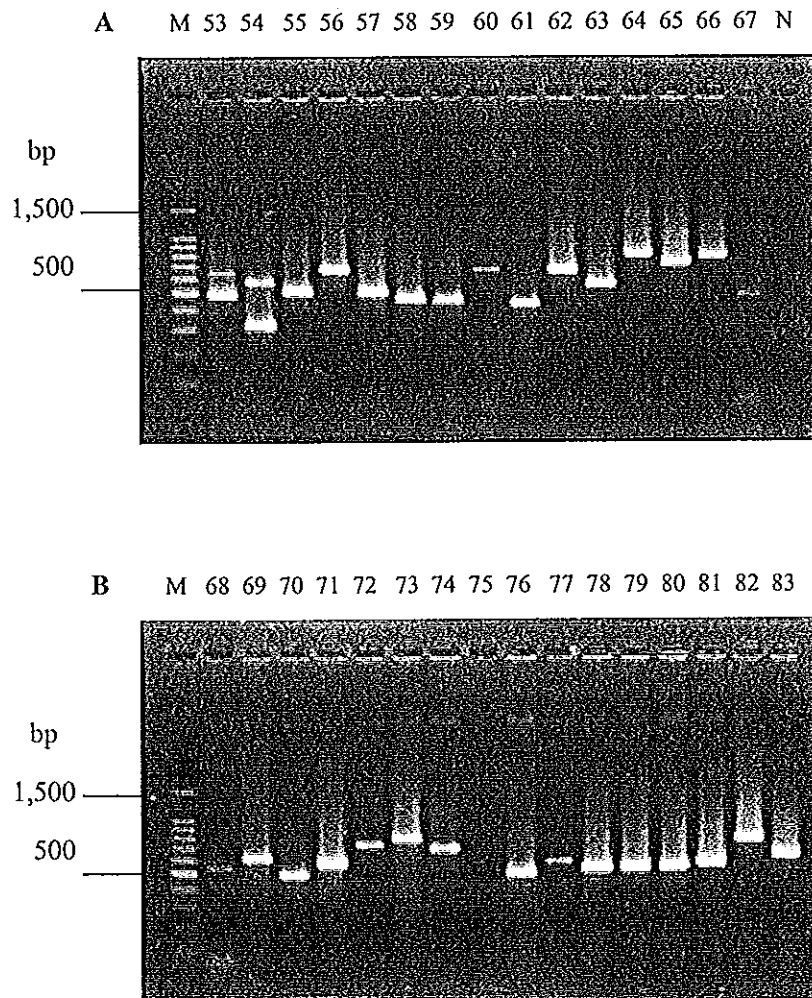
B : โคลน p5S2, p6S2, p7S2, p8S2, p9S2, p10S2, p11S2, p12S2, p13S2, p14S2, p15S2, p16S2, p17S2, p18S2, p19S2, p20S2, p21S2



ภาพที่ 23 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane N= negative control

A : โคลน p22S2, p23S2, p24S2, p25S2, p26S2, p27S2, p28S2, p29S2, p30S2, p31S2, p32S2, p33S2, p34S2, p35S2, p36S2, p37S2

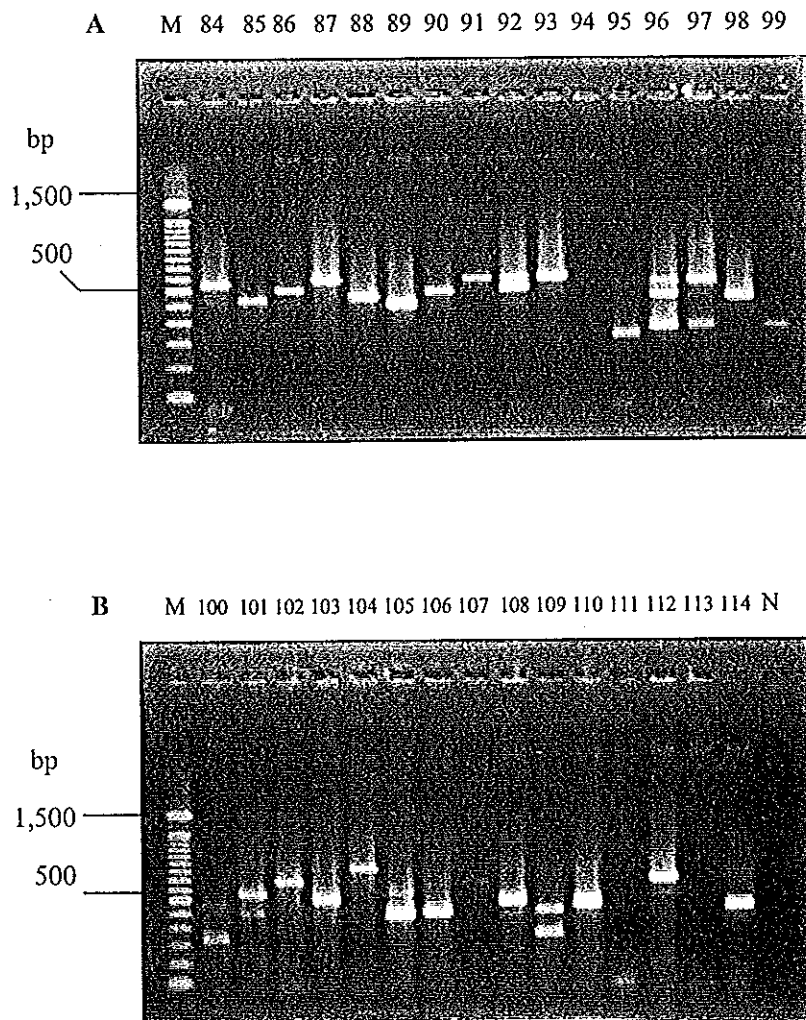
B : โคลน p38S2, p39S2, p40S2, p41S2, p42S2, p43S2, p44S2, p45S2, p46S2, p47S2, p48S2, p49S2, p50S2, p51S2, p52S2



ภาพที่ 24 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane N= negative control

A : โคลน p53S2, p54S2, p55S2, p56S2, p57S2, p58S2, p59S2, p60S2, p61S2, p62S2, p63S2, p64S2, p65S2, p66S2, p67S2

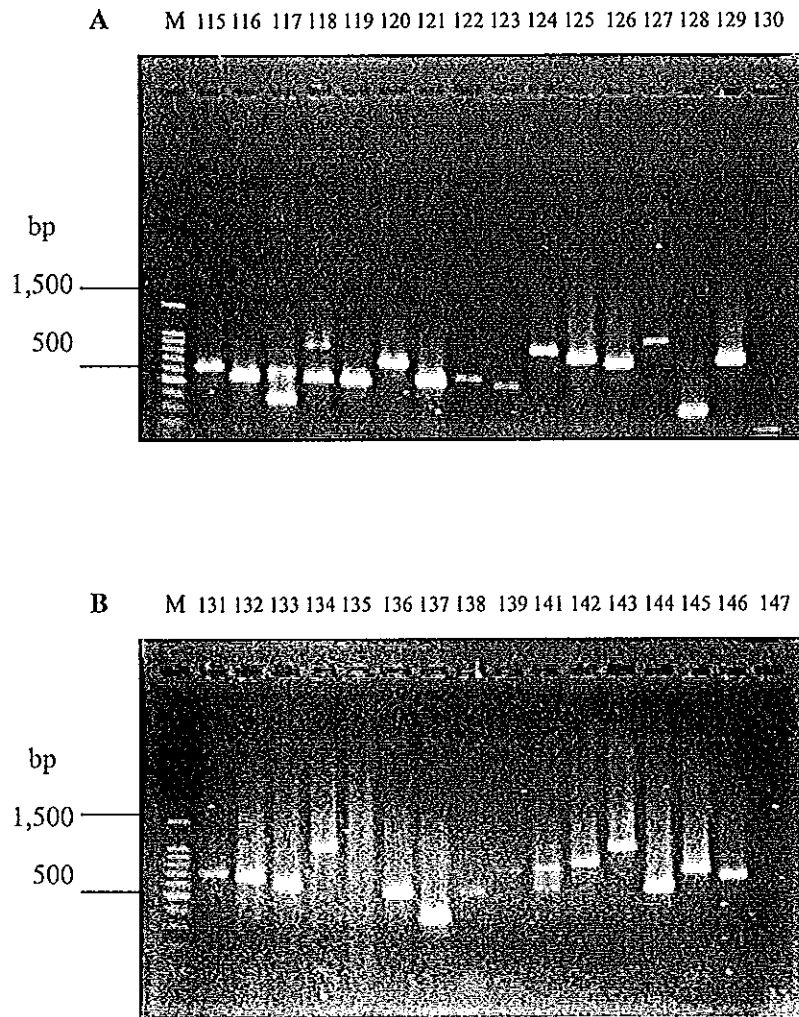
B : โคลน p68S2, p69S2, p70S2, p71S2, p72S2, p73S2, p74S2, p75S2, p76S2, p77S2, p78S2, p79S2, p80S2, p81S2, p82S2, p83S2



ภาพที่ 25 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอลบวมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Biolabs) เป็น marker, lane N= negative control

A : โคลน p84S2, p85S2, p86S2, p87S2, p88S2, p89S2, p90S2, p91S2, p92S2, p93S2, p94S2, p95S2, p96S2, p97S2, p98S2, p99S2

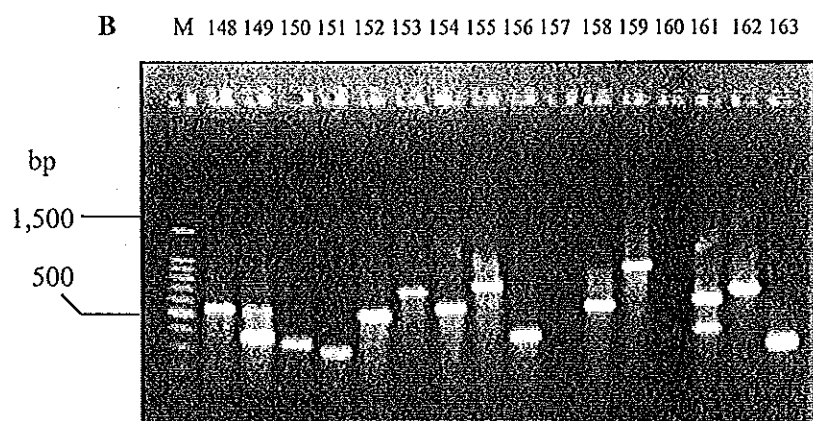
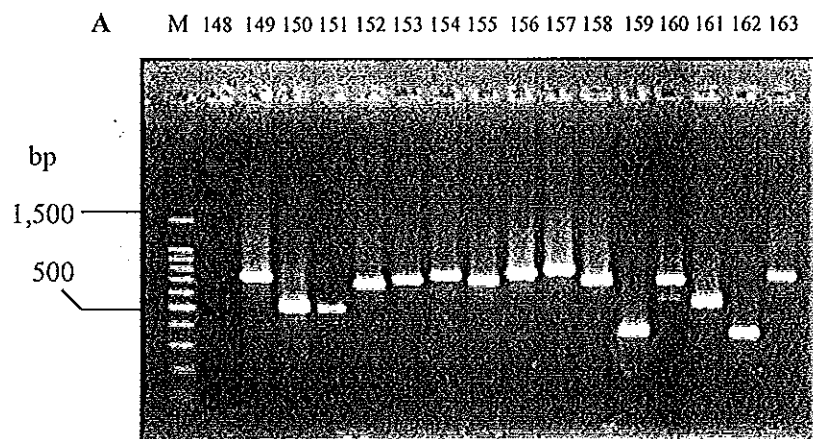
B : โคลน p100S2, p101S2, p102S2, p103S2, p104S2, p105S2, p106S2, p107S2, p108S2, p109S2, p110S2, p111S2, p112S2, p113S2, p114S2



ภาพที่ 26 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p115S2, p116S2, p117S2, p118S2, p119S2, p120S2, p121S2, p122S2, p123S2, p124S2, p125S2, p126S2, p127S2, p128S2, p129S2, p130S2

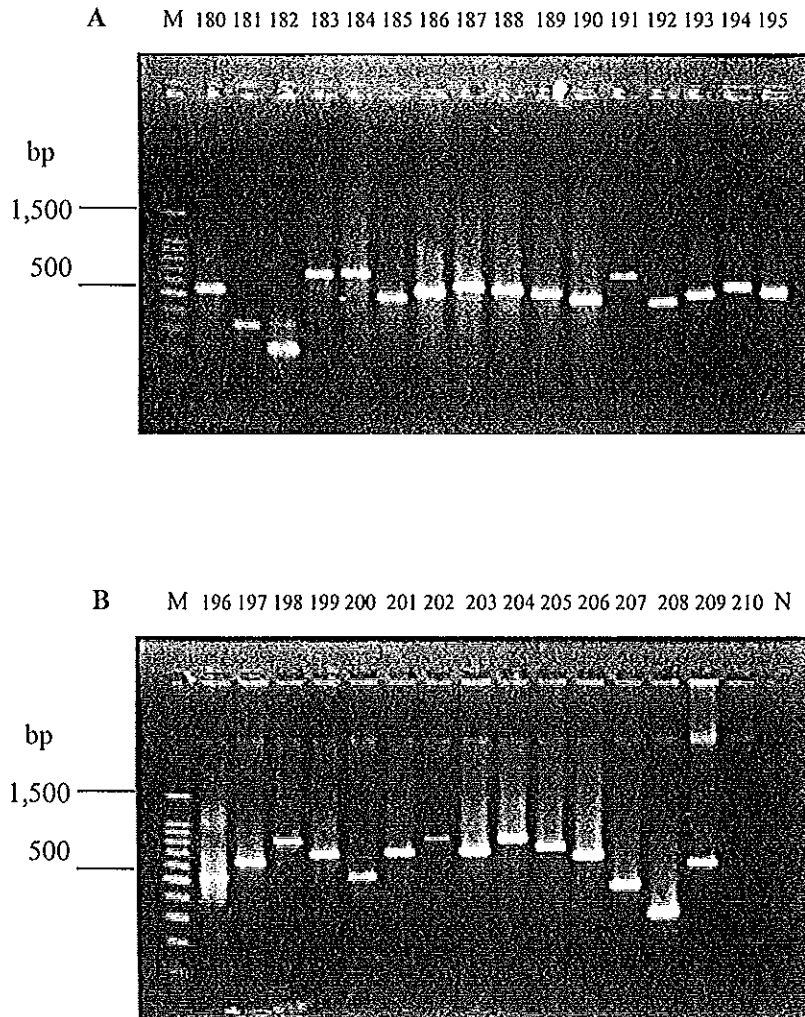
B : โคลน p131S2, p132S2, p133S2, p134S2, p135S2, p136S2, p137S2, p138S2, p139S2, p140S2, p141S2, p142S2, p143S2, p144S2, p145S2, p146S2, p147S2



ภาพที่ 27 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p148S2, p149S2, p150S2, p151S2, p152S2, p153S2, p154S2, p155S2, p156S2, p157S2, p158S2, p159S2, p160S2, p161S2, p162S2, p163S2

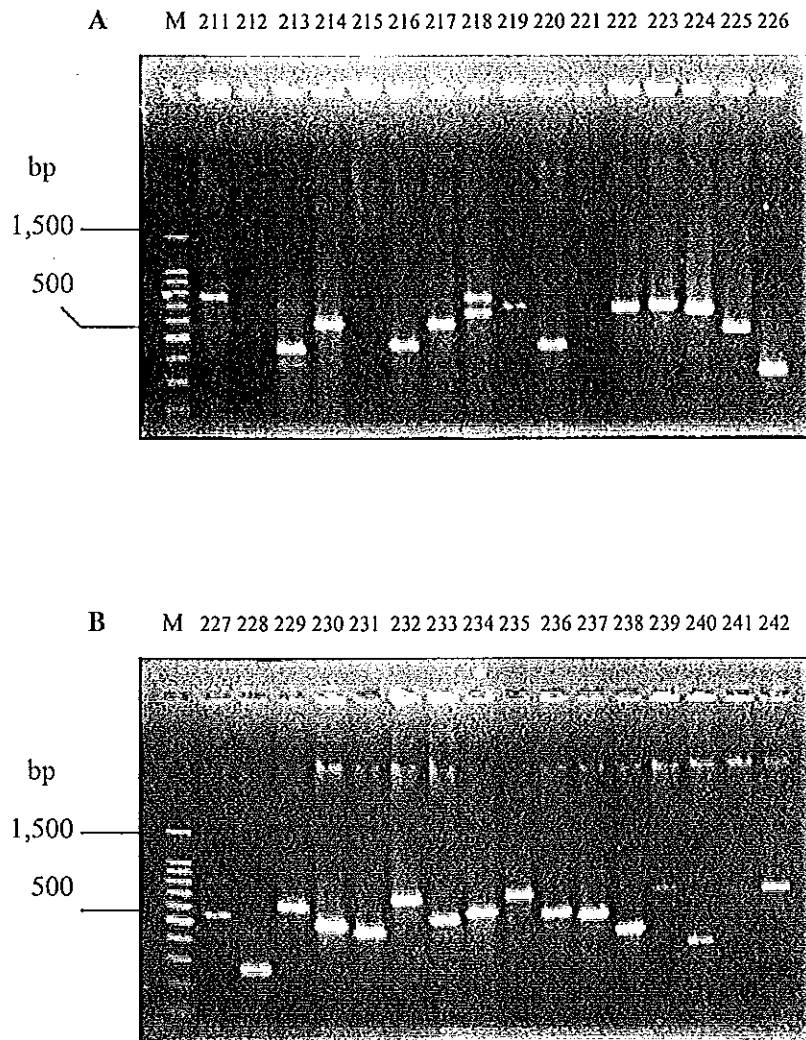
B : โคลน p164S2, p165S2, p166S2, p167S2, p168S2, p169S2, p170S2, p171S2, p172S2, p173S2, p174S2, p175S2, p176S2, p177S2, p178S2, p179S2



ภาพที่ 28 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane N= negative control

A : โคลน p180S2, p181S2, p182S2, p183S2, p184S2, p185S2, p186S2, p187S2, p188S2, p189S2, p190S2, p191S2, p192S2, p193S2, p194S2, p195S2

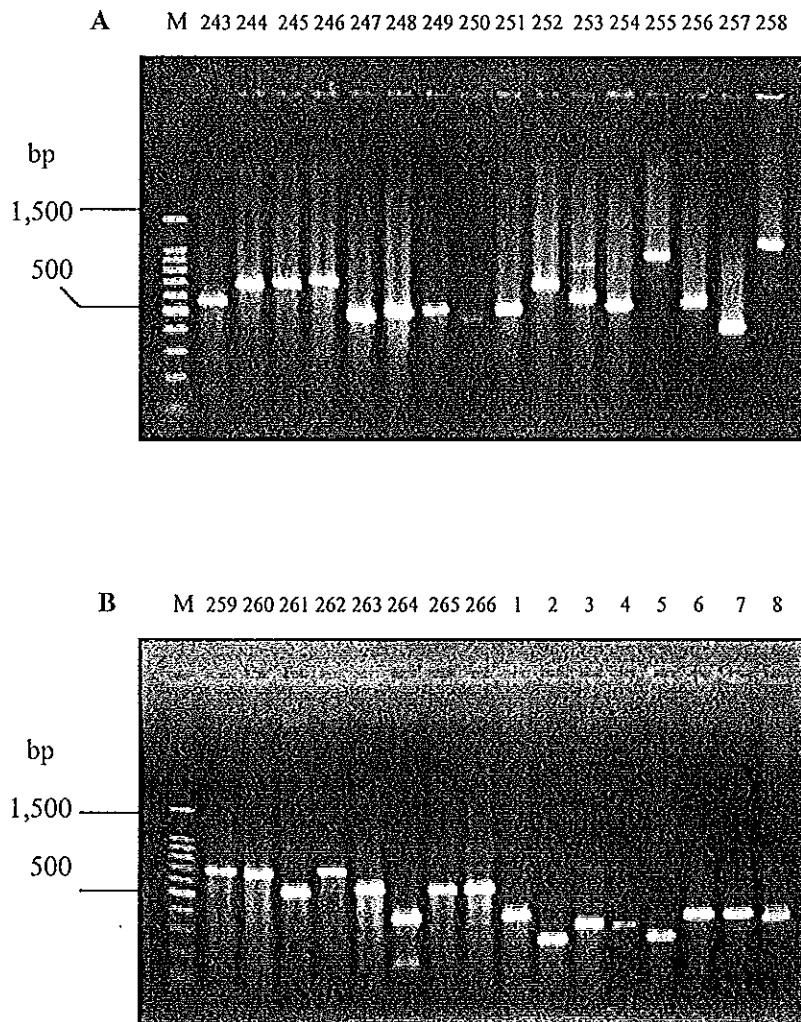
B : โคลน p196S2, p197S2, p198S2, p199S2, p200S2, p201S2, p202S2, p203S2, p204S2, p205S2, p206S2, p207S2, p208S2, p209S2, p210S2



ภาพที่ 29 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p211S2, p212S2, p213S2, p214S2, p215S2, p216S2, p217S2, p218S2, p219S2, p220S2, p221S2, p222S2, p223S2, p224S2, p225S2, p226S2

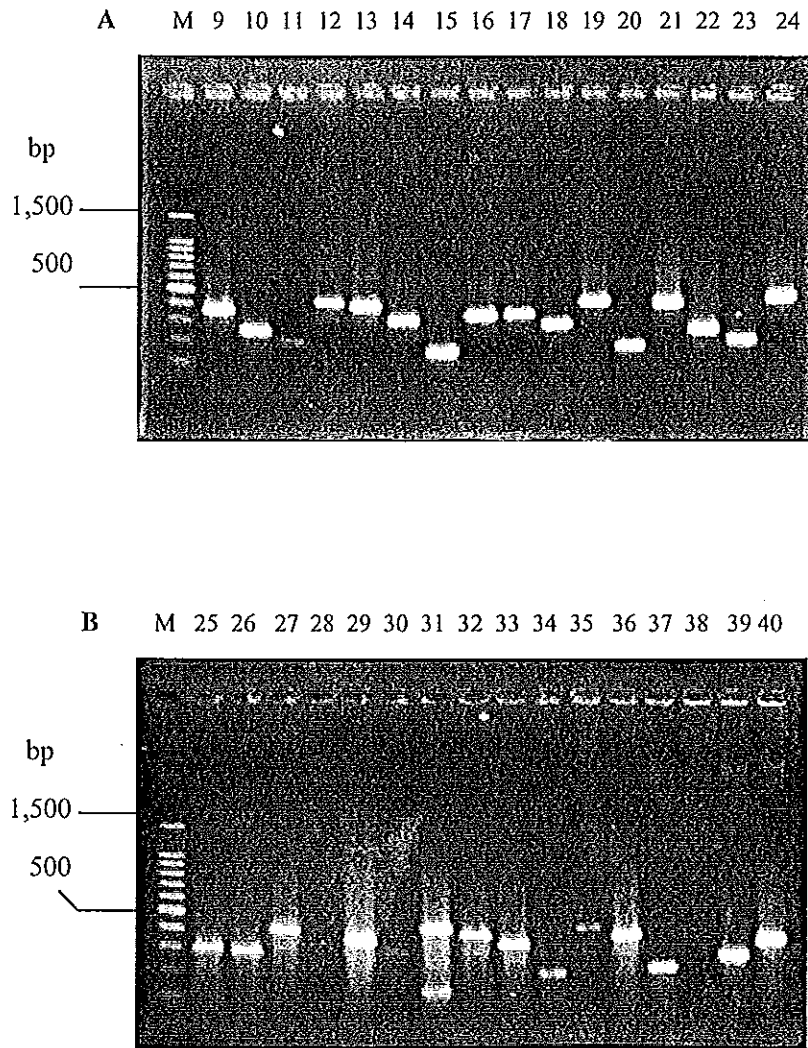
B : โคลน p227S2, p228S2, p229S2, p230S2, p231S2, p232S2, p233S2, p234S2, p235S2, p236S2, p237S2, p238S2, p239S2, p240S2, p241S2, p242S2



ภาพที่ 30 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p243S2, p244S2, p245S2, p246S2, p247S2, p248S2, p249S2, p250S2, p251S2, p252S2, p253S2, p254S2, p255S2, p256S2, p257S2, p258S2

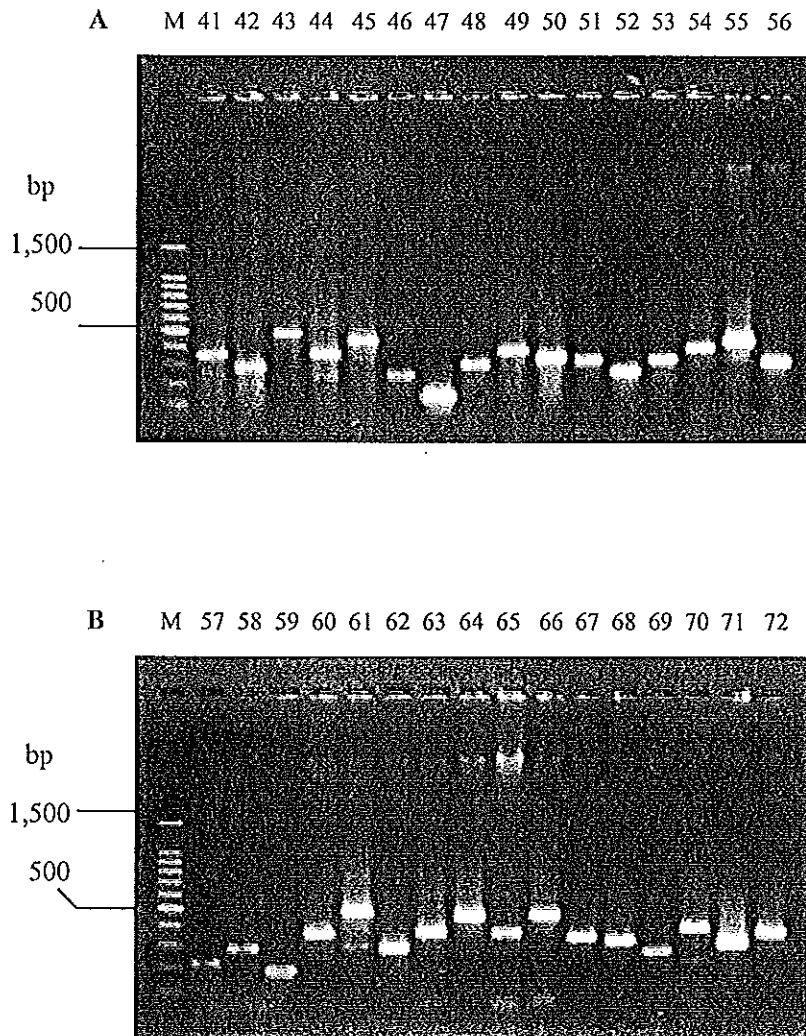
B : โคลน p259S2, p260S2, p261S2, p262S2, p263S2, p264S2, p265S2, p266S2, p1S3, p2S3, p3S3, p4S3, p5S3, p6S3, p7S3, p8S3



ภาพที่ 31 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p9S3, p10S3, p11S3, p12S3, p13S3, p14S3, p15S3, p16S3, p17S3, p18S3, p19S3, p20S3, p21S3, p22S3, p23S3, p24S3

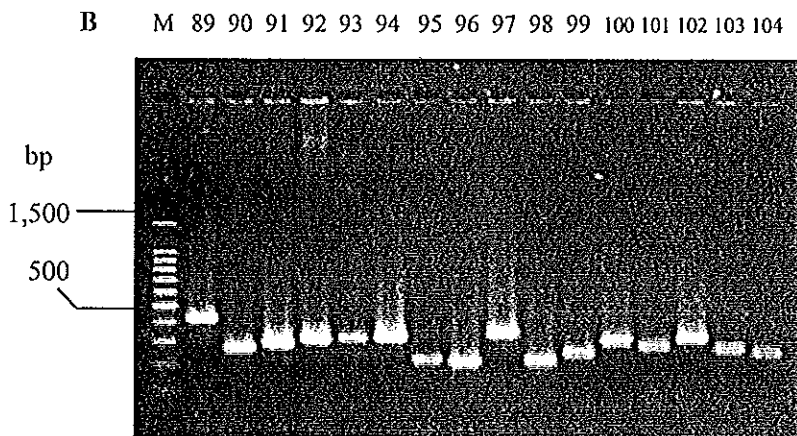
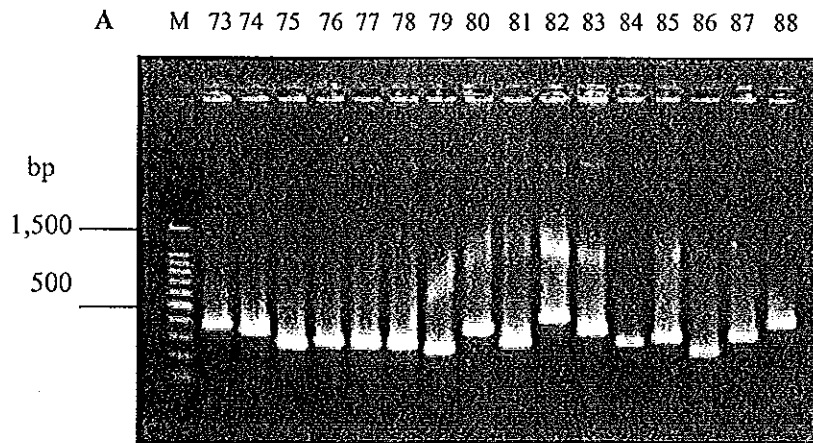
B : โคลน p25S3, p26S3, p27S3, p28S3, p29S3, p30S3, p31S3, p32S3, p33S3, p34S3, p35S3, p36S3, p37S3, p38S3, p39S3, p40S3



ภาพที่ 32 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p41S3, p42S3, p43S3, p44S3, p45S3, p46S3, p47S3, p48S3, p49S3, p50S3, p51S3, p52S3, p53S3, p54S3, p55S3, p56S3

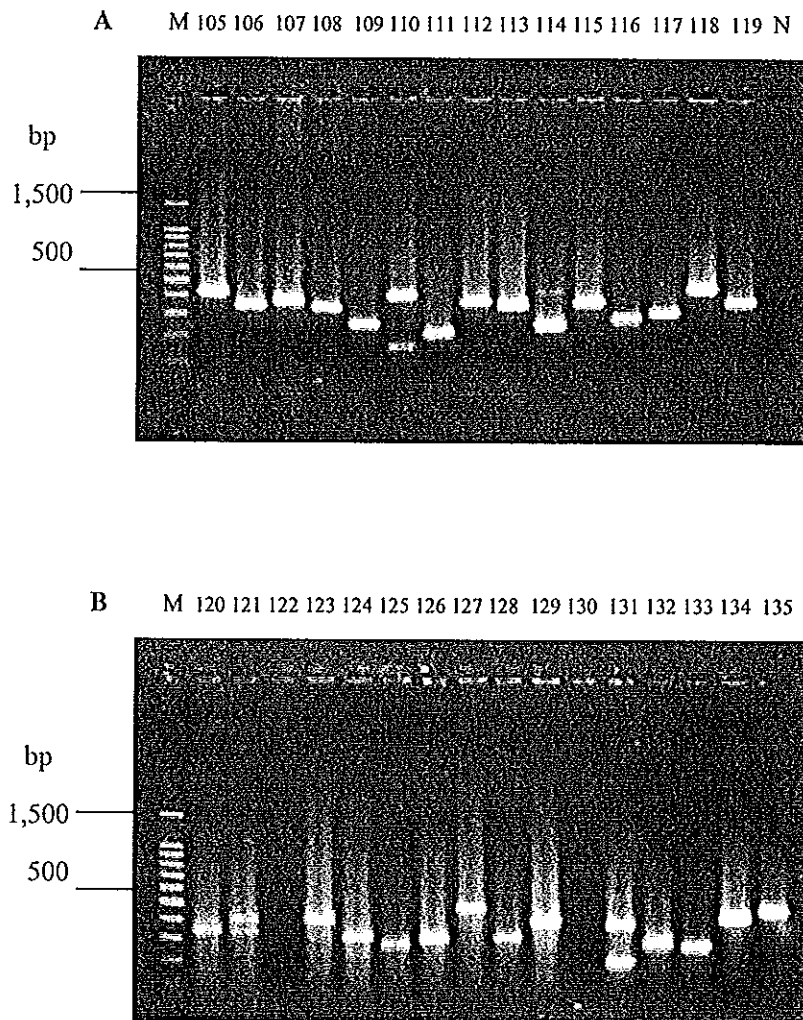
B : โคลน p57S3, p58S3, p59S3, p60S3, p61S3, p62S3, p63S3, p64S3, p65S3, p66S3, p67S3, p68S3, p69S3, p70S3, p71S3, p72S3



ภาพที่ 33 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p73S3, p74S3, p75S3, p76S3, p77S3, p78S3, p79S3, p80S3, p81S3, p82S3, p83S3, p84S3, p85S3, p86S3, p87S3, p88S3

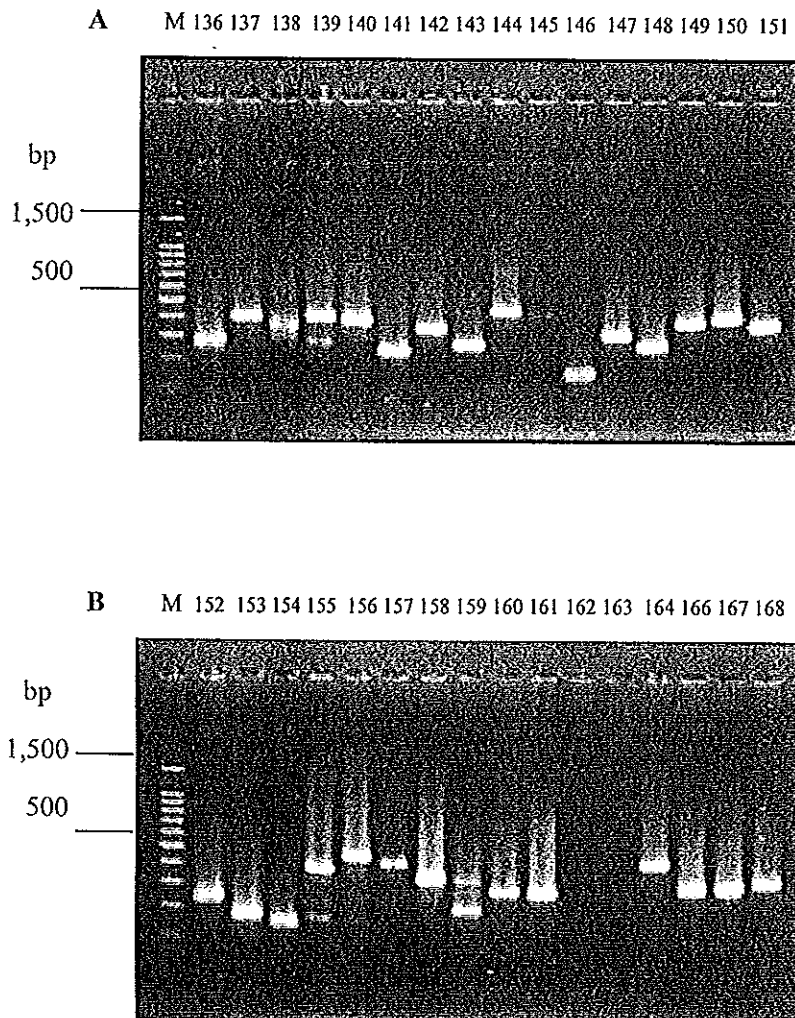
B : โคลน p89S3, p90S3, p91S3, p92S3, p93S3, p94S3, p95S3, p96S3, p97S3, p98S3, p99S3, p100S3, p101S3, p102S3, p103S3, p104S3



ภาพที่ 34 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker, lane N= negative control

A : โคลน p105S3, p106S3, p107S3, p108S3, p109S3, p110S3, p111S3, p112S3, p113S3, p114S3, p115S3, p116S3, p117S3, p118S3, p119S3

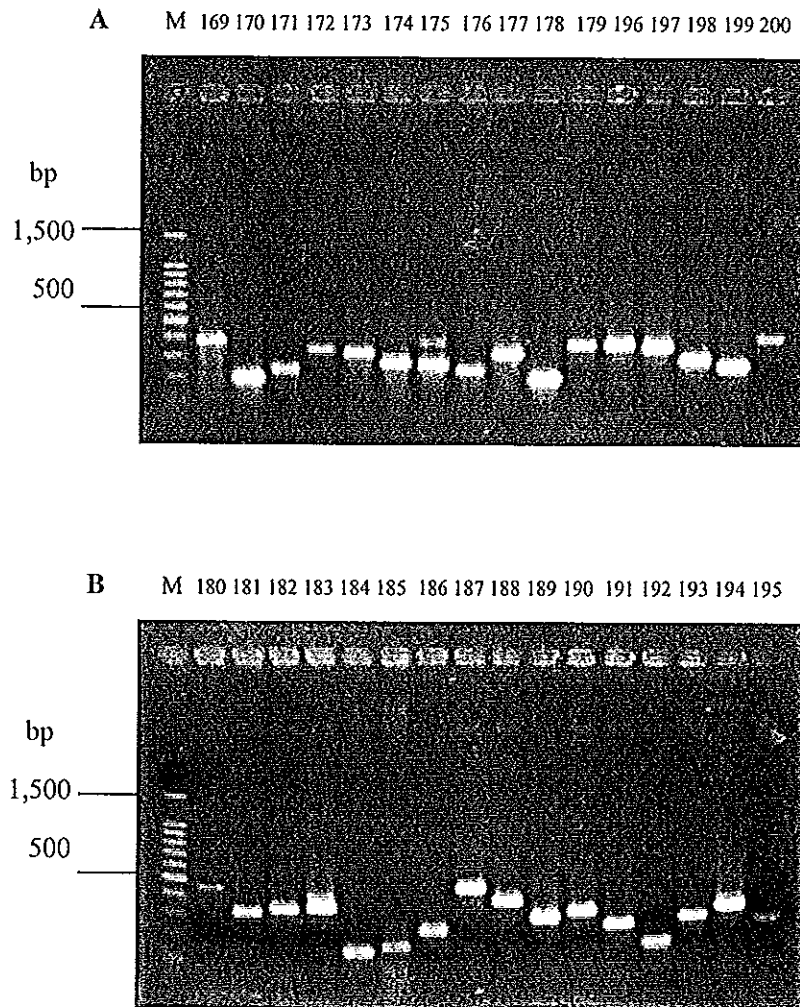
B : โคลน p120S3, p121S3, p122S3, p123S3, p124S3, p125S3, p126S3, p127S3, p128S3, p129S3, p130S3, p131S3, p132S3, p133S3, p134S3, p135S3



ภาพที่ 35 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p136S3, p137S3, p138S3, p139S3, p140S3, p141S3, p142S3, p143S3, p144S3, p145S3, p146S3, p147S3, p148S3, p149S3, p150S3, p151S3

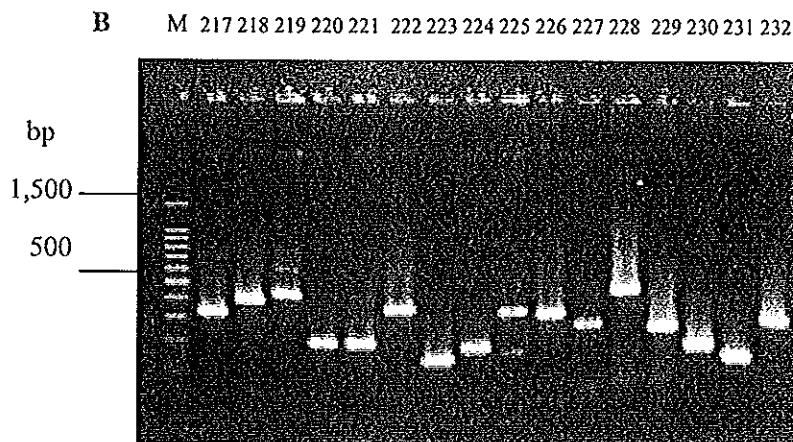
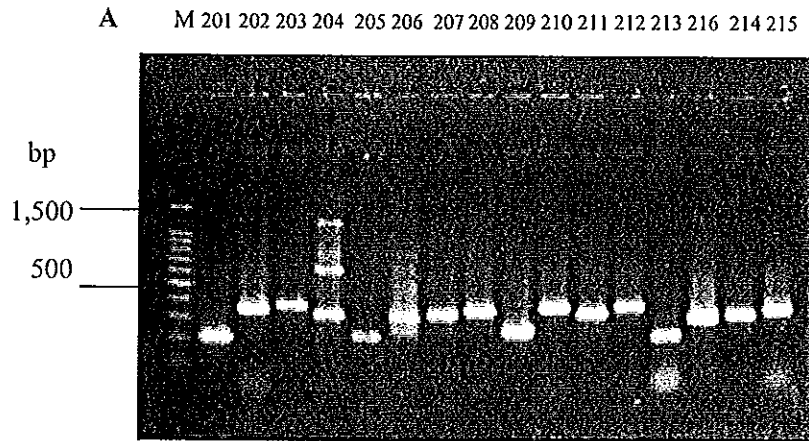
B : โคลน p152S3, p153S3, p154S3, p155S3, p156S3, p157S3, p158S3, p159S3, p160S3, p161S3, p162S3, p163S3, p164S3, p166S3, p167S3, p168S3



ภาพที่ 36 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอถูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p169S3, p170S3, p171S3, p172S3, p173S3, p174S3, p175S3, p176S3, p177S3, p178S3, p179S3, p196S3, p197S3, p198S3, p199S3, p200S3

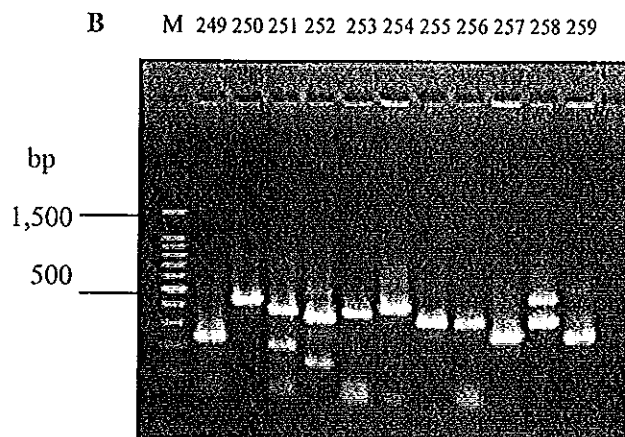
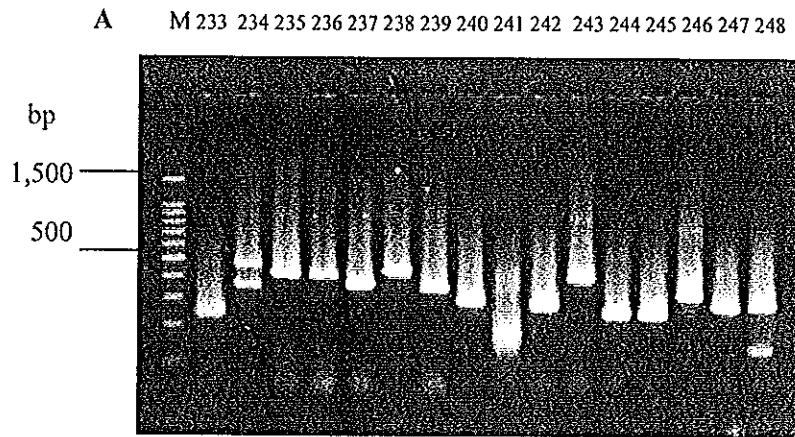
B : โคลน p180S3, p181S3, p182S3, p183S3, p184S3, p185S3, p186S3, p187S3, p188S3, p189S3, p190S3, p191S3, p192S3, p193S3, p194S3, p195S3



ภาพที่ 37 PCR products ที่ได้จากพลาสติกดีเอ็นเอผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p201S3, p202S3, p203S3, p204S3, p205S3, p206S3, p207S3, p208S3, p209S3, p210S3, p211S3, p212S3, p213S3, p214S3, p215S3, p216S3

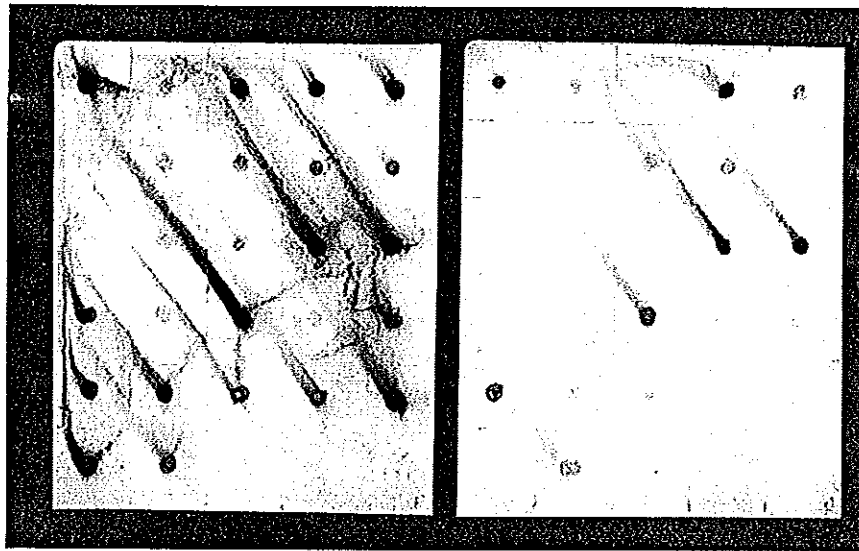
B : โคลน p217S3, p218S3, p219S3, p220S3, p221S3, p222S3, p223S3, p224S3, p225S3, p226S3, p227S3, p228S3, p229S3, p230S3, p231S3, p232S3



ภาพที่ 38 PCR products ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ subtraction cDNA library ; lane M ใช้ 100 bp DNA ladder (Promega) เป็น marker

A : โคลน p233S3, p234S3, p235S3, p236S3, p237S3, p238S3, p239S3, p240S3, p241S3, p242S3, p243S3, p244S3, p245S3, p246S3, p247S3, p248S3

B : โคลน p249S3, p250S3, p251S3, p252S3, p253S3, p254S3, p255S3, p256S3, p257S3, p258S3, p259S3

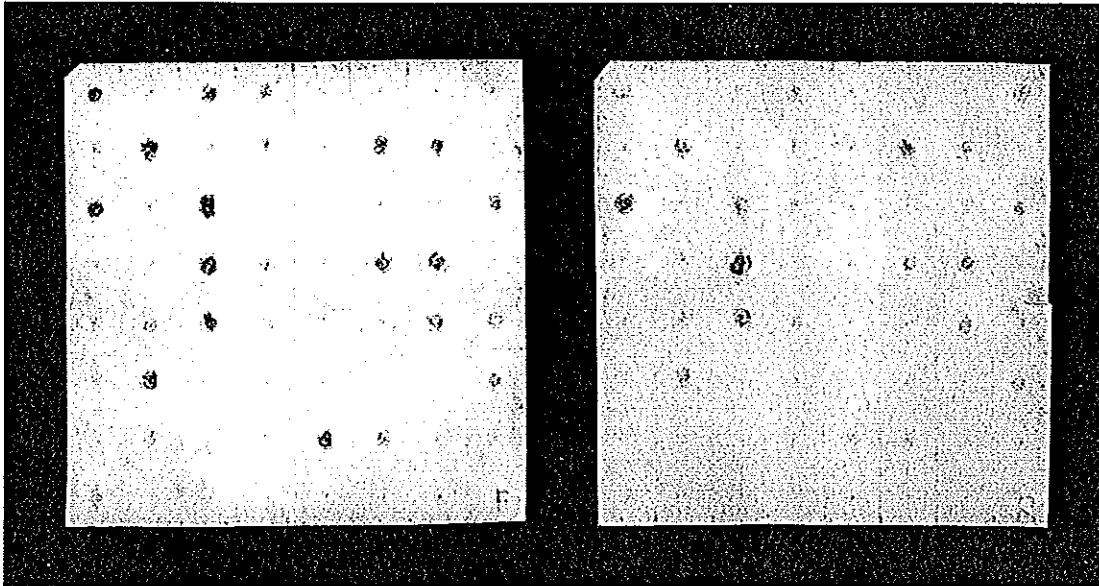


A

B

pT2	pT4	pT5	pT6	pT9
pT13	pT15	pT18	pT19	pT21
pT23	pTE6	pTE8	pTE9	pTE12
pTE13	pTE14	pTE27	pTE29	pTE31
pTE57	pTE66	pTE70	pTE71	pTE87
pTE98	pTE114			F, R

ภาพที่ 39 ผลการทำ hybridization โคลน pT และ pTE ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)



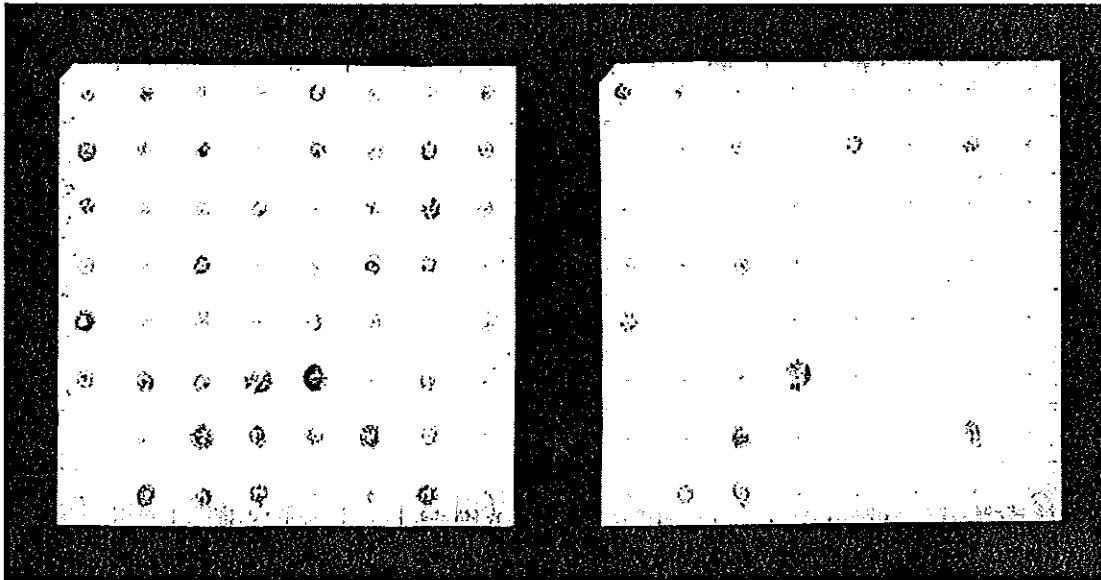
A

B

p1S1	p2S1	p4S1	p5S1	p6S1	p7S1	p10S1	p11S1
p12S1	p13S1	p14S1	p15S1	p16S1	p17S1	p19S1	p20S1
p21S1	p22S1	p23S1	p24S1	p25S1	p27S1	p29S1	p30S1
p32S1	p34S1	p35S1	p36S1	p38S1	p39S1	p40S1	p41S1
p42S1	p43S1	p44S1	p45S1	p46S1	p48S1	p49S1	p50S1
p51S1	p52S1	p53S1	p54S1	p55S1	p56S1	p57S1	p59S1
p60S1	p61S1	p62S1	p63S1	p64S1	p65S1	p66S1	p67S1
p68S1	p69S1	p70S1	p71S1	p73S1	p75S1		F, R

ภาพที่ 40 ผลการทำ hybridization โคลน p1S1 - p75S1 (ขนาด 800 bp - >1,500 bp) ด้วย

Forward probe (A) และ Reverse probe (B)



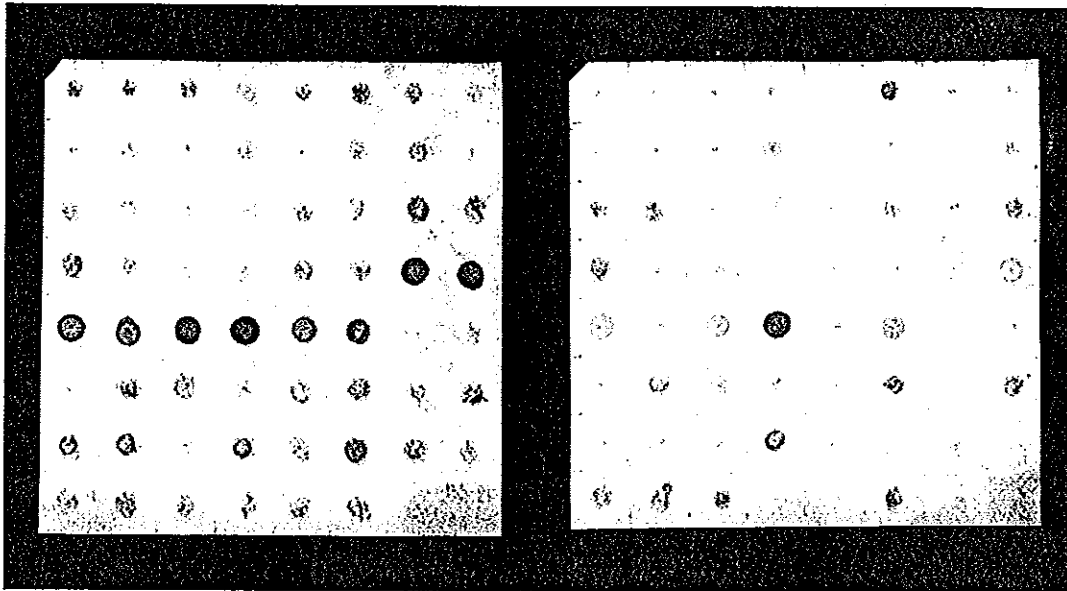
A

B

p64S1	p65S1	p66S1	p67S1	p68S1	p69S1	p70S1	p71S1
p73S1	p75S1	p76S1	p77S1	p78S1	p79S1	p80S1	p81S1
p82S1	p83S1	p84S1	p85S1	p86S1	p87S1	p89S1	p90S1
p91S1	p92S1	p93S1	p94S1	p95S1	p97S1	p99S1	p101S1
p102S1	p103S1	p104S1	p105S1	p106S1	p107S1	p108S1	p109S1
p110S1	p112S1	p113S1	p114S1	p115S1	p116S1	p117S1	p118S1
p119S1	p120S1	p121S1	p122S1	p123S1	p125S1	p126S1	p127S1
p128S1	p129S1	p130S1	p131S1	p132S1	p133S1	p134S1	F, R

ภาพที่ 41 ผลการทำ hybridization โคลน p64S1 - p134S1 (ขนาด 800 bp - >1,500 bp)

ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)



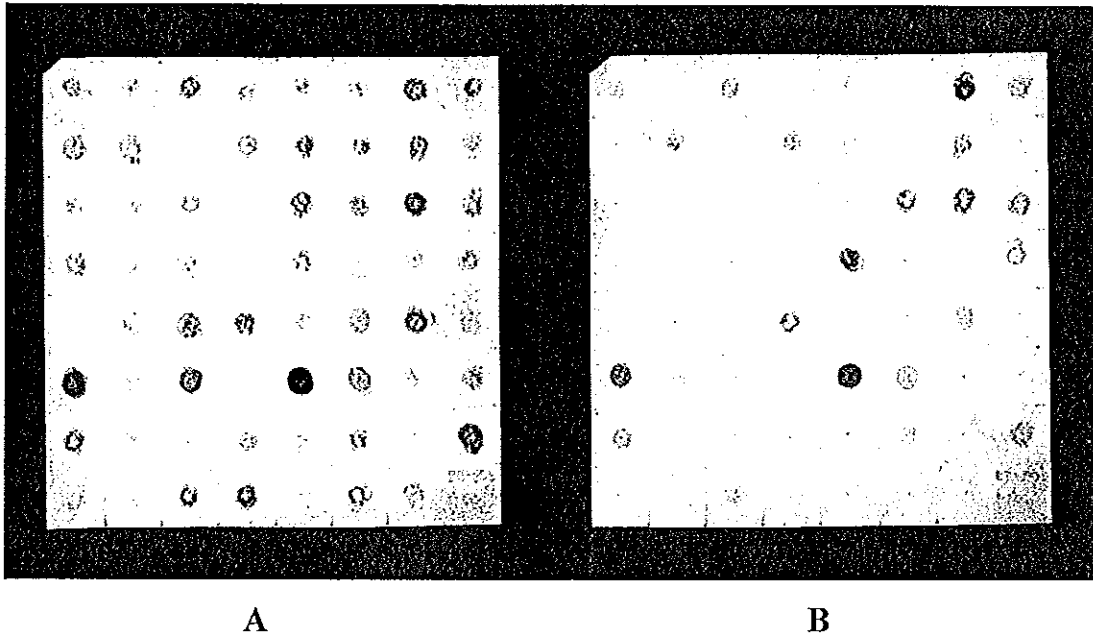
A

B

p135S1	p136S1	p137S1	p138S1	p139S1	p140S1	p145S1	p146S1
p147S1	p148S1	p149S1	p150S1	p151S1	p152S1	p154S1	p155S1
p158S1	p159S1	p160S1	p161S1	p162S1	p163S1	p164S1	p165S1
p166S1	p167S1	p168S1	p170S1	p171S1	P172S1	P173S1	p174S1
p175S1	p176S1	p177S1	p178S1	p179S1	p180S1	p181S1	p182S1
p184S1	p186S1	p187S1	p188S1	p189S1	p190S1	p191S1	p192S1
p194S1	p196S1	p197S1	p198S1	p199S1	p200S1	p201S1	p203S1
p204S1	p205S1	p206S1	p207S1	p208S1	p209S1	P210S1	F, R

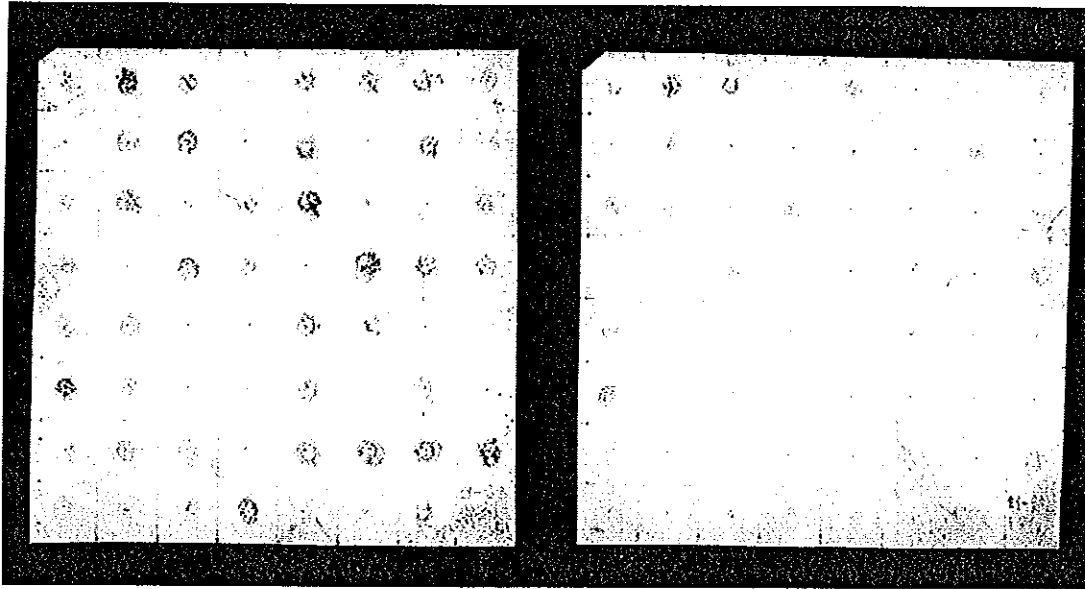
ภาพที่ 42 ผลการทำ hybridization โคลน p135S1 - p210S1 (ขนาด 800 bp - >1,500 bp)

ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)



p211S1	p212S1	p213S1	p214S1	p215S1	p216S1	p217S1	p218S1
p219S1	p220S1	p221S1	p222S1	p223S1	p224S1	p225S1	p226S1
p228S1	p229S1	p230S1	p231S1	p232S1	p233S1	p234S1	p235S1
p236S1	p237S1	p238S1	p239S1	p241S1	p242S1	p243S1	p244S1
p245S1	p246S1	p248S1	p249S1	p250S1	p251S1	p252S1	p253S1
p254S1	p255S1	p256S1	p1S2	p2S2	p3S2	p4S2	p5S2
p6S2	p7S2	p8S2	p9S2	p10S2	p11S2	p12S2	p13S2
p14S2	p15S2	p16S2	p17S2	p18S2	p19S2	p20S2	F, R

ภาพที่ 43 ผลการทำ hybridization โคลน p211S1 - p256S1 (ขนาด 800 bp - >1,500 bp)
 และ p1S2 - p20S2 (ขนาด 400 bp - <800 bp) ด้วย Forward probe (A) และ
 Reverse probe (B)



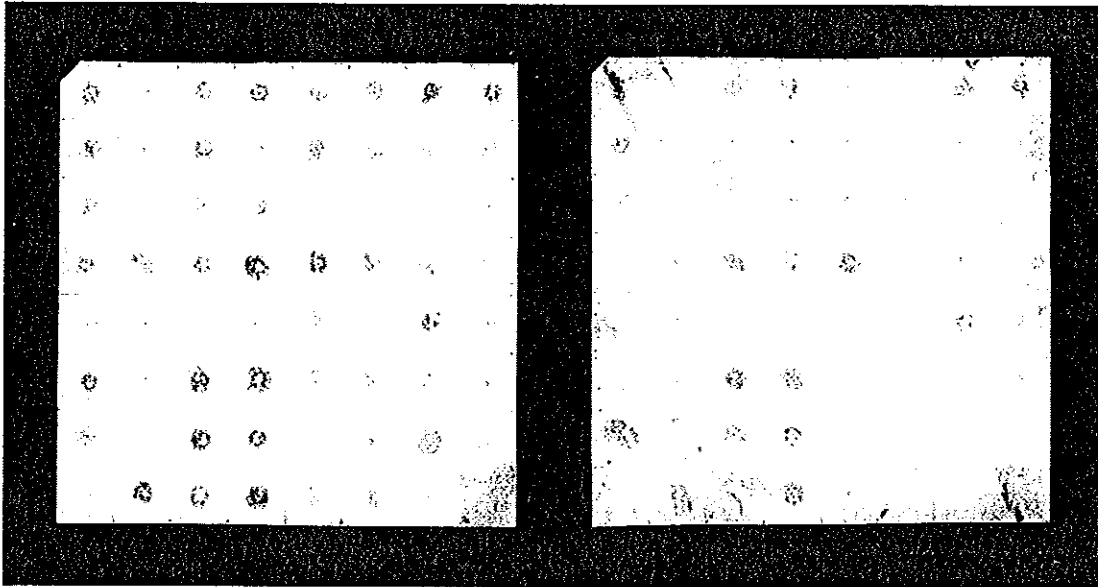
A

B

p21S2	p22S2	p23S2	p25S2	p26S2	p27S2	p28S2	p29S2
p30S2	p31S2	p32S2	p33S2	p34S2	p35S2	p36S2	p38S2
p39S2	p40S2	p41S2	p42S2	p43S2	p44S2	p45S2	p47S2
p49S2	p50S2	p51S2	p52S2	p53S2	p54S2	p55S2	p56S2
p57S2	p58S2	p59S2	p60S2	p61S2	p62S2	p63S2	p64S2
p65S2	p66S2	p67S2	p68S2	p69S2	p70S2	p71S2	p72S2
p73S2	p74S2	p76S2	p77S2	p78S2	p79S2	p80S2	p81S2
p82S2	p83S2	p84S2	p85S2	p86S2	p87S2	p88S2	F, R

ภาพที่ 44 ผลการทำ hybridization โคลน p21S2 - p88S2 (ขนาด 400 bp - <800 bp) ด้วย

Forward probe (A) และ Reverse probe (B)



A

B

p89S2	p90S2	p91S2	p92S2	p93S2	p95S2	p96S2	p97S2
p98S2	p99S2	p100S2	p101S2	p102S2	p103S2	p104S2	p105S2
p106S2	p107S2	p108S2	p109S2	p110S2	p112S2	p114S2	p115S2
p116S2	p117S2	p118S2	p119S2	p120S2	p121S2	p122S2	p123S2
p124S2	p125S2	p126S2	p127S2	p128S2	p129S2	p131S2	p132S2
p133S2	p134S2	p135S2	p136S2	p137S2	p138S2	p139S2	p141S2
p142S2	p143S2	p144S2	p145S2	p146S2	p149S2	p150S2	p151S2
p152S2	p153S2	p154S2	p155S2	p156S2	p157S2	p158S2	F, R

ภาพที่ 45 ผลการทำ hybridization โคลน p89S2 - p158S2 (ขนาด 400 bp - <800 bp)
ด้วย Forward probe (A) และ Reverse probe (B)

ตารางที่ 11 ผลการทำ hybridization ด้วย Forward probe และ Reverse probe

ผลการ hybridization	โคลน
Hybridize (สีม่วง) กับ forward probe และ hybridize ใดๆ หรือไม่ hybridize กับ reverse probe	<p>pT5, pT9, pT15, pT21</p> <p>pTE6, pTE8, pTE13, pTE14, pTE31, pTE57, pTE66, pTE70, pTE71, pTE87, pTE98</p> <p>p1S1, p4S1, p5S1, p11S1, p12S1, p13S1, p14S1, p22S1, p23S1, p36S1, p39S1, p50S1, p51S1, p52S1, p61S1, p64S1, p65S1, p66S1, p67S1, p68S1, p69S1, p70S1, p71S1, p73S1, p75S1, p76S1, p77S1, p79S1, p80S1, p81S1, p82S1, p83S1, p84S1, p85S1, p86S1, p87S1, p89S1, p90S1, p91S1, p93S1, p95S1, p97S1, p99S1, p102S1, p103S1, p104S1, p105S1, p106S1, p107S1, p109S1, p110S1, p112S1, p113S1, p115S1, p117S1, p118S1, p120S1, p122S1, p123S1, p125S1, p129S1, p130S1, p131S1, p133S1, p134S1, p135S1, p136S1, p137S1, p139S1, p145S1, p152S1, p154S1, p162S1, p164S1, p165S1, p171S1, p172S1, p173S1, p174S1, p175S1, p176S1, p177S1, p179S1, p180S1, p187S1, p189S1, p191S1, p194S1, p196S1, p199S1, p200S1, p201S1, p203S1, p207S1, p208S1, p212S1, p214S1, p215S1, p216S1, p219S1, p223S1, p224S1, p226S1, p228S1, p229S1, p231S1, p232S1, p236S1, p237S1, p238S1, p239S1, p242S1, p243S1, p246S1, p248S1, p249S1, p250S1, p251S1, p252S1, p253S1, p254S1, p256S1</p> <p>p4S2, p5S2, p7S2, p9S2, p11S2, p13S2, p14S2, p15S2, p16S2, p17S2, p19S2, p20S2, p23S2, p27S2, p28S2,</p>

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ผลการ hybridization	โคลน
Hybridize (สีม่วง) กับ forward probe และ hybridize ใดๆ หรือไม่ hybridize กับ reverse probe	p29S2, p32S2, p34S2, p43S2, p45S2, p49S2, p54S2, p55S2, p58S2, p59S2, p61S2, p65S2, p69S2, p71S2, p73S2, p74S2, p76S2, p78S2, p79S2, p80S2, p81S2, p82S2, p85S2, p93S2, p95S2, p96S2, p100S2, p102S2, p103S2, p106S2, p108S2, p116S2, p117S2, p119S2, p121S2, p124S2, p128S2, p133S2, p135S2, p136S2, p137S2, p138S2, p144S2, p145S2, p149S2, p150S2, p151S2, p153S2, p154S2, p157S2
hybridize กับ forward probe และ reverse probe	pT2, pT4, pT6, pT18, pT19 pTE9, pTE12, pTE27, pTE29, pTE114 p2S1, p15S1, p17S1, p19S1, p21S1, p30S1, p35S1, p40S1, p43S1, p44S1, p45S1, p49S1, p59S1, p78S1, p92S1, p101S1, p114S1, p116S1, p121S1, p126S1, p127S1, p132S1, p138S1, p140S1, p146S1, p147S1, p148S1, p149S1, p150S1, p151S1, p155S1, p158S1, p159S1, p160S1, p161S1, p163S1, p166S1, p167S1, p168S1, p170S1, p178S1, p181S1, p182S1, p184S1, p186S1, p188S1, p190S1, p192S1, p197S1, p198S1, p204S1, p205S1, p206S1, p209S1, p210S1, p211S1, p213S1, p217S1, p218S1, p220S1, p221S1, p222S1, p225S1, p230S1, p233S1, p234S1, p235S1, p241S1, p244S1, p255S1 p1S2, p2S2, p3S2, p6S2, p8S2, p10S2, p21S2, p22S2, p25S2, p26S2, p30S2, p31S2, p33S2, p35S2, p36S2, p38S2, p39S2, p40S2, p41S2, p42S2, p47S2, p51S2,

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ผลการ hybridization	โคลน
hybridize กับ forward probe และ reverse probe	p52S2, p53S2, p56S2, p57S2, p60S2, p62S2, p63S2, p66S2, p67S2, p68S2, p70S2, p84S2, p86S2, p88S2, p89S2, p90S2, p91S2, p92S2, p97S2, p98S2, p99S2, p101S2, p104S2, p105S2, p109S2, p110S2, p112S2, p115S2, p118S2, p120S2, p122S2, p123S2, p125S2, p127S2, p131S2, p132S2, p134S2, p139S2, p141S2, p142S2, p143S2, p152S2, p155S2, p156S2, p158S2
ไม่ hybridize กับ forward probe และ reverse probe	pT13, pT23 p6S1, p7S1, p10S1, p16S1, p20S1, p24S1, p25S1, p27S1, p29S1, p32S1, p34S1, p38S1, p41S1, p42S1, p46S1, p48S1, p53S1, p54S1, p55S1, p56S1, p57S1, p60S1, p62S1, p63S1, p94S1, p108S1, p119S1, p128S1 p245S1 p12S2, p18S2, p44S2, p50S2, p64S2, p72S2, p77S2, p83S2, p87S2, p107S2, p114S2, p126S2, p129S2, p146S2
ไม่นำมาทำ hybridization เนื่องจากไม่ให้ผลในการทำ PCR	p3S1, p8S1, p9S1, p18S1, p26S1, p28S1, p31S1, p33S1, p37S1, p47S1, p58S1, p72S1, p74S1, p88S1, p96S1, p98S1, p100S1, p111S1, p124S1, p141S1, p142S1, p143S1, p144S1, p153S1, p156S1, p157S1, p169S1, p183S1, p185S1, p193S1, p195S1, p202S1, p227S1, p240S1, p247S1 p24S2, p37S2, p46S2, p48S2, p75S2, p94S2, p111S2, p113S2, p130S2, p140S2, p147S2, p148S2

5. การศึกษาลำดับเบส (sequencing)

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการทำ hybridization จำนวน 45 โคลน ไปหาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง automate sequencer และเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของธนาคารยีน จากการเปรียบเทียบข้อมูลพบว่ามี 31 โคลน ที่ได้มียีนที่เหมือนกับยีนของสิ่งมีชีวิต และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 10% - 96% และมี 14 โคลน (โคลน pTE14, p23S1, p64S1, p68S1, p82S1, p97S1, p110S1, p131S1, p200S1, p201S1, p93S2, p103S2, p117S2, p154S1) ไม่เหมือนกับยีนของสิ่งมีชีวิตชนิดใดเลย

ในส่วนของยีนที่มีความเหมือนกับยีนของสิ่งมีชีวิตนั้น ได้นำข้อมูลในรายละเอียดจากเอกสารของยีนที่เกี่ยวข้องมาศึกษาเพิ่มเติมว่าส่วนที่เหมือนนั้นตรงกับส่วนใดของยีน และมีช่วงความยาวของความเหมือนมากน้อยเพียงใด ในที่สุดพบว่ามีเพียง 7 โคลนที่มีความเหมือนอยู่ในระดับที่น่าสนใจ ได้แก่ โคลน pTE8, pTE66, pTE70, pTE71 และ pTE87 มีความเหมือนกับยีน scaffold protein (84%), tyrosine kinase (72%), chromosome 21 (interleukin/interferon) (64%), Nrv2 gene (Na^+, K^+ -ATPase) (80%), elongation factor-1 alpha (96%) ตามลำดับ โคลน pT21 และ p43S2 มีความเหมือนกับยีน translationally controlled tumor protein (TCTP) (66%) และแต่ละยีนมีความสำคัญดังต่อไปนี้

1. Scaffold protein

Scaffold protein เป็นสารตัวหนึ่งใน mitogen-activated protein kinase signaling pathway ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ เพื่อไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ (Garrington and Johnson, 1999)

2. Tyrosine kinase

Protein kinase มีหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไทโรซีน ในกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ดังนั้นจึงเรียกเอนไซม์ protein kinase ประเภทนี้ว่า tyrosine-specific protein kinase หรือเรียกย่อๆ ว่า tyrosine kinase (มนตรี จุฬาวัดนทล, 2530 ; Abbas, *et al.*, 1994) พบว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนแต่ละชนิดมีผลทำให้สมบัติของโปรตีนต่างไปจากเดิม มักพบกระบวนการฟอสโฟรีเลชันใน signal transduction pathway เช่นกัน

3. Chromosome 21 (Interferon/interleukin)

Chromosome 21 เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 21 เช่นเดียวกับ Interferon/interleukin และอยู่ใกล้กับยีนของ Interferon/interleukin ดังนั้นจึงคาดว่าจะสามารถทำการศึกษายีน Interferon และ interleukin ได้จากยีนนี้ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม interferon และ interleukin เป็นสารในกลุ่มไซโตไคน์ interferon มีฤทธิ์ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยกระตุ้นให้เซลล์ของร่างกายสร้างเอนไซม์หลายชนิด เช่น protein kinase สามารถแบ่ง interferon ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ type I IFN ซึ่งจะมีการสร้าง interferon ชนิดนี้เมื่อมีการติดเชื้อไวรัส (Bogdan, 2000) โดยไวรัสที่เข้าไปอยู่ในเซลล์ร่างกายชักนำให้ type I IFN ถูกสร้างขึ้น หน้าที่หลักของ type I IFN คือ ต่อสู้กับการติดเชื้อไวรัส และอาจทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ร่างกายในภาวะปกติ interferon อีกชนิดหนึ่งคือ type II IFN มีหน้าที่ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ และขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์เหมือนกับ type I IFN แต่มีฤทธิ์ในด้านการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่างกัน (วิบูลย์ศรี พิมพ์พันธุ์, 2537) ส่วน interleukin เกี่ยวข้องในขบวนการอักเสบ (Cooper, *et al.*, 1996)

4. Na^+, K^+ -ATPase

เป็น membrane protein ที่สำคัญในการลำเลียง Na^+ และ K^+ แบบใช้พลังงาน (active transport) ผ่านเยื่อเซลล์ (cell membrane) ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ α และ β มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษายีน Na^+, K^+ -ATPase β subunit ใน *Drosophila melanogaster* พบว่า Na^+, K^+ -ATPase β subunit ประกอบด้วยยีน 2 ยีน คือ Nervana 1 (Nrv 1) เป็นยีนที่แสดงออกใน muscle tissue และ Nervana 2 (Nrv 2) แสดงออกในระบบประสาท (Xu, *et al.*, 1999)

5. Elongation factor-1 α

เป็นตัวช่วยในการแปลรหัส (translation) ของ mRNA ในเซลล์ยูคาริโอต และจากการศึกษาใน *Tetrahymena pyriformis* โดย Nakazawa และคณะ (1999) พบว่า elongation factor-1 α สามารถจับกับ tubulin ได้

6. Translationally controlled tumor protein (TCTP)

พบโปรตีนชนิดนี้ใน คน, ไก่, พืชหลายชนิด เช่น ถั่ว, ข้าว, มันฝรั่ง และในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น parasitic trematode (*Schistosoma japonicum*), nematode (*Caenorhabditis elegans*) และ earthworm (*Lumbricus rubellus*) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนชนิดนี้ในยีสต์ (*Schizosaccharomyces pombe*) จากการศึกษาในคนและหนูพบว่าโปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับเซลล์เนื้องอกและมีกิจกรรมที่ตอบสนองกับ histamine-releasing factor (HRF) ซึ่งเป็นตัวสำคัญในโรคมะเร็งแพ้เรื้อรัง (chronic allergic disease) นอกจากนี้ยังพบว่า recombinant TCTP ของคนและหนูมีการปล่อย histamine ในขณะที่มี Ig E ในปริมาณที่สัมพันธ์กัน จากการศึกษาพบว่าโปรตีน TCTP ไม่ได้เกี่ยวข้องกับเฉพาะเซลล์เนื้องอกเท่านั้น แต่ TCTP ยังเกี่ยวข้องกับ basic housekeeping functions ด้วย จากการศึกษาใน earthworm พบว่าโปรตีน TCTP ช่วยในการกำจัดโลหะออกจากเซลล์ (Struzenbaum, *et al.*, 1998)

นอกจากยีนที่กล่าวข้างต้น 6 ชนิด ก็ยังมียีนอื่นที่แม้โคลนที่ได้จะมีช่วงที่มี homology ไม่ยาวมากนัก แต่จากการตรวจเอกสารพบว่า เป็นยีนที่มีความสำคัญไม่น้อย จึงได้สรุปไว้ด้วยในที่นี้ ได้แก่

1. Ferritin

เป็น transport protein ที่ช่วยในการขนถ่ายเหล็ก (Fe) ไปจับกับ superoxide ion เพื่อป้องกันการสร้าง hydroxyl radicals มีการศึกษาลักษณะและโคลน ferritin ในกึ่งน้ำจืด (Huang, *et al.*, 1996 อ้างโดย Holmblad and Soderhall, 1999) พบว่าการจับกับเหล็กอิสระของ ferritin มีผลให้แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโต เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์องค์ประกอบที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบได้ (Holmblad and Soderhall, 1999)

2. Fengycin synthetase

เป็น lipodecapeptide ที่สร้างจาก *Bacillus subtilis* จากการศึกษาพบว่า lipopeptide ที่จุลินทรีย์ตัวนี้สร้างขึ้น มีคุณสมบัติเป็น biosurfactants และมีกิจกรรมของ antimicrobial และ antiviral ที่จำเพาะ เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ fengycin คือ fengycin synthetase ซึ่งเป็น multienzyme system จากการศึกษาใน *Bacillus subtilis*

สายพันธุ์ b213 และ A1/3 พบว่าเอนไซม์ในระบบนี้ประกอบด้วย Fen 1 - 5 โดยที่แต่ละตัวมีขนาดต่างกัน คือ Fen 1, 2 และ 3 มีขนาด 286 kDa เอนไซม์ Fen 4 มีขนาด 400 kDa และเอนไซม์ Fen 5 มีขนาด 150 kDa (Steller, *et al.*, 1999)

3. Ubiquitin C-terminal hydrolase

มีหน้าที่ช่วยในการย่อยโปรตีน โดยการไปจับกับโปรตีนที่จะถูกย่อย และมีผลทำให้พันธะของโปรตีนถูกทำลายได้ง่ายขึ้น (Lewin, 1997)

จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่าในการทำ subtraction library ครั้งนี้ ทำให้ได้ยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องในกระบวนการ signal transduction อย่างน้อย 4 ชนิด คือ scaffold protein, tyrosine kinase, interleukin/interferon และ translationally controlled tumor protein (TCTP) ซึ่ง signal transduction เป็นกระบวนการสำคัญของสิ่งมีชีวิตโดยไปเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบต่างๆของร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม หรือ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน หรือ กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์บางชนิด เป็นต้น โดยยีนทั้ง 4 ชนิดในที่นี้อาจมีความสำคัญต่อระบบใดระบบหนึ่งซึ่งจะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป อนึ่งในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้หาการเรียงลำดับเบสของโคลนที่เป็น positive clones อีกเป็นจำนวน 157 โคลน ทั้งนี้เนื่องจากความจำกัดของค่าใช้จ่าย ซึ่งหากมีการหาการเรียงลำดับเบสเพิ่มเติมก็คาดว่าจะพบยีนที่สำคัญอีกจำนวนหนึ่ง และจากการสุ่มเลือกเพียง 45 โคลนไปหาการเรียงลำดับเบสก็พบยีนที่สำคัญถึง 4 ยีน ก็แสดงว่า library ที่เตรียมในครั้งนี้เป็น library ที่ดี นอกจากนั้นยีนของอีก 14 โคลนที่แม้ไม่เหมือนกับของสิ่งมีชีวิตใดในฐานข้อมูลก็มิได้หมายความว่า เป็นยีนที่ไม่มีความสำคัญ ทั้งนี้จะต้องมีการนำไปศึกษาในรายละเอียดของหน้าต่อไป

บทที่ 4

สรุป

จากการศึกษาชิ้นที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดดำ โดยใช้เทคนิค cDNA subtractive hybridization ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. subtracted cDNA ที่ได้จากการทำ cDNA subtractive hybridization มีขนาดตั้งแต่ 200 - >1,500 bp

2. ผลการนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F' พบว่าเป็นโคลนที่มีดีเอ็นเอลูกผสมทั้งหมด 808 โคลน

3. เลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอลูกผสมจำนวน 441 โคลน มาทำ hybridization กับ forward และ reverse probe พบว่ามี 202 โคลน ที่ให้ผล hybridized แตกต่างกัน

4. เลือกโคลนที่ให้ผลบวกในการทำ hybridization จำนวน 45 โคลน มาศึกษาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสกับข้อมูลของธนาคารยีน พบว่ามี 14 โคลน ที่ไม่เหมือนกับยีนของสิ่งมีชีวิตชนิดใดเลย (31.11%) และมี 31 โคลน เหมือนกับดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ (2.22%), ยีนของไมโทคอนเดรีย (8.89%), โปรตีนโรโบโซม (8.89%), ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ signal transduction (11.11%) และ coding region (37.78%) โคลนที่มียีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ signal transduction คือ pTE8 เหมือนกับยีน scaffold protein (84%), pTE66 เหมือนกับยีน tyrosine kinase (72%), pTE70 เหมือนกับยีน chromosome 21 interferon/interleukin (64%), pT21 และ p43S2 เหมือนกับยีน translationally controlled tumor protein (66%) ซึ่ง signal transduction เป็นกระบวนการสำคัญของสิ่งมีชีวิตโดยไปเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบต่างๆ ของร่างกาย

เอกสารอ้างอิง

- จิราพร เกษรจันทร์ และ สิทธี บุญยรัตผลิน. 2538. การผลิต monoclonal antibodies ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัดเหลืองในกึ่งกุลาคำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 15. หน้า 1-14.
- ทัศนีย์ สุโกศล. 2537. แอนติเจนและแอนติบอดี. ใน อิมมูโนวิทยา. (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, บรรณาธิการ). หน้า 7-59. กรุงเทพฯ : เค. พี. พรินติ้ง จำกัด.
- นภาพร บานชื่น. 2537. คอมพลีเมนต์. ใน อิมมูโนวิทยา. (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, บรรณาธิการ). หน้า 7-59. กรุงเทพฯ : เค. พี. พรินติ้ง จำกัด.
- ✓นิรนาม. 2538. ความสำคัญของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับการเลี้ยงกุ้งในสถานะการณ์ปัจจุบัน. ว. กุ้งธุรกิจ. 1 : 13-14.
- นิรนาม. 2541. สัมมนาแนวทางการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาคำแบบยั่งยืน. ว. การประมง. 51 : 255-262.
- ประจวบ หล้าอุบล. 2531. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. ใน กุ้ง. หน้า 51-70. กรุงเทพฯ : ฝ่ายสื่อการศึกษา สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิบูลย์ เขียมอนุกุลกิจ. 2541. โอกาสตลาดส่งออกกุ้งกุลาคำของไทย. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 44 : 5-9.
- มนตรี จุฬาวัดนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ชัยณัฐสร สวัสดิวัฒน์, ประหยัด โกมารทัต, ประพนธ์ วิไลรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม และ ภิญโญ พานิชพันธ์. 2530. ระบบฮอว์โมน. ใน ชีวเคมี. หน้า 473-492. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เลขาธิการสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย. 2541. แนวโน้มด้านการตลาดและการส่งออก กุ้งกุลาคำ. ว. การประมง. 51 : 264-270.
- วรวิทย์ ชีวาพร, วิญญิต มั่นทะเลจิตร และ สมถวิล จริตควร. 2534. ปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาคำ. รายงานวิจัย ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. พฤศจิกายน 2534. หน้า 3-12.

- วันดีดา คมเวช. 2532. สรุบทบทวนผลงานวิชาการเรื่องกุ้ง. การประชุมวิชาการเรื่องกุ้ง ณ สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จ. สงขลา. 25-27 มกราคม 2532. หน้า 67-76.
- วิบูลย์ศรี พิมพ์พันธุ์. 2537. ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อจุลชีพ. ใน อิมมูโนวิทยา. (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, บรรณาธิการ). หน้า 7-59. กรุงเทพฯ : เค. พี. พรินติ้ง จำกัด.
- สดใส เวชชาชีวะ. 2522. ภูมิคุ้มกันของร่างกายและวิธีเพิ่มพูน. ใน วิทยาภูมิคุ้มกัน. หน้า 6-32. กรุงเทพฯ : คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุภาพร สุกสีเหลือง. 2538. การเพาะเลี้ยงกุ้ง. ใน การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. หน้า 197-214. กรุงเทพฯ : พิมพ์ดี จำกัด.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ. 2537. การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอม. ใน อิมมูโนวิทยา. (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, บรรณาธิการ). หน้า 127-140. กรุงเทพฯ : เค. พี. พรินติ้ง จำกัด.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2541. สถานการณ์การผลิตและการตลาดกุ้งกุลาดำปี 2541 และแนวโน้มปี 2542. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 44 : 7-9.
- อุไรวรรณ ไพชำนาญ. 2542. การวิเคราะห์สมบัติของเลคตินจากพลาสมาของปลากะรัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2nd edition. USA : W. B. saunders.
- Alabi, A. O., Latchford, J. W. and Jones, D. A. 2000. Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 187 : 15-34.
- Armbrust, E. V. 1999. Identification of a New Gene Family Expressed during the Onset of Sexual Reproduction in the Centric Diatom *Thalassiosira weissflogii*. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 3121-3128.

- 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.
- Benjamin, L. R. and James, B. L. 1987. The responses of *Ligia oceanica* (L.) (Crustacea: Isopoda) to infection by *Maritrema liinguilla* Jag, 1908 and *Microphallus similis* (Jag: 1900) (Digenea: Microphallidae) and to abiotic implants. *J. Invertebr. Pathol.* 49 : 26-36.
- Benjamini, E. and Leskowitz, S. 1989. *Immunology : A Short Course*. New York : Alan R. Liss.
- Bogdan, C. 2000. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12 : 419-424.
- Boonyaratapalin, S., Boonyaratapalin, M., Supamattaya, K. and Toride, Y. 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In *Diseases in Asian Aquaculture II*. (ed. Shariff, M., Arthur, J. R. and Subasinghe, R. P.) pp. 469-477. Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Carballal, M. J., Lopez, C., Azevedo, C. and Villalba, A. 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 70 : 96-105.
- Chanock, S. J., El Benna, J., Smith, R. M. and Babior, B. M. 1994. The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269 : 24519-24522.
- Cooper, E. L., Mansour, M. H. and Negm, H. I. 1996. Marine invertebrate immunodefense responses: molecular and cellular approaches in tunicates. *Annu. Rev. Fish Dis.* 6 : 133-149.

- Deering, R. E., Arakawa, C. K., Oshima, K. H., O'Hara, P. J., Landolt, M. L. and Winton, J. R. 1991. Development of a biotinylated DNA probe for detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* 11 : 57-65.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorselaer, A. V., Rodriguez, J. and Bachere, E. 1997. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 272 : 28398-28406.
- Duvic, B. and Soderhall, K. 1990. Purification and characterization of a β -1,3-glucan binding protein from plasma of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 265 : 9327-9332.
- Garrington, T. P. and Johnson, G. L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Cell Biol.* 11 : 211-218.
- Goldstein, I. J., Huges, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. What should be called a lectin. *Nature* 285 : 66.
- Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J. and Vargas-Albores, F. 1997. Effect of Calcium on the Prophenoloxidase System Activation of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 117A : 419-425.
- Grey, D. L., Dall W. and Baker A. 1983. Species Accounts. *In* A Guide to the Australian Penaeid Prawn. pp 35-135. Australia : Northern Territory Government Printing Office.
- Hall, J. L. and Rowlands, D. T. 1974a. Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. *Biochemistry.* 13 : 821-827.
- Hall, J. L. and Rowlands, D. T. 1974b. Heterogeneity of lobster agglutinins. II. Specificity of agglutinin erythrocyte binding. *Biochemistry.* 13 : 828-832.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Mol. Biol.* 166 : 557-580.

- Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T. and Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physioll.* 113C : 61-66.
- Holmblad, T. and Soderhall, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture.* 172 : 111-123.
- Hose, J. E., Lightner, D., Redman, R. and Donald, D. 1984. Observation on the pathogenesis of the imperfect fungus, *Fusarium solani* in the californian brown shrimp, *Penaeus californiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 44 : 292-303.
- Hose, J. E., Martin, G. G., Nguyen, V. A., Lucas, J. and Rosenstein, T. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biol. Bull.* 173 : 178-187.
- Howe, C. 1997. Making Libraries. In *Gene Cloning and Manipulation*. pp. 67-80. USA : Cambridge University Press.
- Hubank, M. and Schatz, D. G. 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22 : 5640-5648.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture.* 164 : 277-288.
- Johansson, M. W. and Soderhall, K. 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106 : 1795-1803
- Johansson, M. W., Lind, M. I., Holmblad, T., Thornqvist, P.-O. and Soderhall, K. 1995. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 : 1079-1087.

- King, M. 1995. Fisheries biology, assessment and management. Victoria : Fishing News Books.
- Kobayashi, M., Johansson, M. W. and Soderhall, K. 1990. The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation *in vitro*. Cell Tissue Res. 260 : 13-18.
- Lavilla-Pitogo, C. R. 1996. Shrimp Health Research in the Asia-Pacific : Present Status and Future Directives. *In* Health management in Asian aquaculture. Proceeding of the Regional Expert Consultation on Aquaculture Health Management in Asia and the Pacific. Serdang, Malaysia, 22-24 May 1995. pp. 41-49.
- Lewin, B. 1997. Protein localization. *In* Genes VI. Pp 244-283. New York : Oxford University Press.
- ✓Lin, C. K. and Nash, G. L. 1996. Asian Shrimp News Collected Volume, 1989-1995. Bangkok : Asian Shrimp Culture Council.
- Liu, C-I. 1990. Shrimp Disease, Prevention and Treatment. Proceedings of the Southeast Asia Shrimp Farm Management Workshop, Philippines, Indonesia, Thailand. 26 July-11 August 1989. pp 64-74.
- Mandato, C. A., Diehl-Jones, W. L., Moore, S. J. and Downer, R. G. H. 1997. The Effects of Eicosanoid Biosynthesis Inhibitors on Prophenoloxidase Activation, Phagocytosis and Cell Spreading in *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 43 : 1-8.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. New York. : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Michelson, E. H. 1975. Cellular defense mechanisms and tissue alterations in gastropod molluscs. *In* Invertebrate Immunity. (ed.Maramorosch, K. and Shpoe, R. E.) pp. 181-198. New York : Academic press.

- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T. and Shimonishi, Y. 1989. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* 106 : 663-668.
- Murali, S., Mullainadhan, P. and Arumugan, M. 1999. Purification and characterization of a natural agglutinin from the serum of the hermit crab *Diogenes affinis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472 : 13-24.
- Nakazawa, M., Moreira, D., Laurent, J., Guyader, H. L., Fukami, Y. and Ito, K. 1999. Biochemical analysis of the interaction between elongation factor 1 α and α/β -tubulins from a ciliate, *Tetrahymena pyriformis*. *FEBS Letter.* 453 : 29-34.
- Nappi, A. J. 1975. Parasite encapsulation in insects. *In Invertebrate Immunity.* (ed.Maramorosch, K. and Shpoe, R. E.) pp. 293-321. New York : Academic press.
- Nottage, A. S. and Birkbeck, T. H. 1990. Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* 56 : 15-19.
- Ochiai, M. and Ashida, M. 1988. Purification of a β -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 263 : 12056-12062.
- Okino, N., Kawabata, S. I., Saito, T., Hirata, M., Takagi, T. and Iwanaga, S. 1995. Purification, characterization, and cDNA cloning of a 27-kDa lectin (L10) from horseshoe crab hemocytes. *J. Biol. Chem.* 270 : 31008-31015.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture.* 172 : 125-145.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture.* 172 : 63-92.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manunl. 2nd edition. New York. : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Secombes, C. J., Zou, J., Laing, K., Daniels, G. D. and Cunningham, C. 1999. Cytokine genes in fish. *Aquaculture*. 172 : 93-102.
- Smith, V. J. and Soderhall, K. 1983. β -1,3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Bull.* 164 : 299-314.
- Soderhall, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2 : 3-23.
- Soderhall, K., Wingren, A., Johansson, M. W. and Bertheussen, K. 1985. The cytotoxic reaction from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cell. Immunol.* 94 : 326-332.
- Song, Y.-L. and Hsieh, Y.-T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.* 18 : 201-209.
- Sparks, A. K. 1987. The red king crab (*Paralithodes camtschatica*) as a host for juvenile acanthocephalans. *J. Invertebr. Pathol.* 50 : 166-168.
- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L. and Soderhall, K. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 23 : 179-186.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P. and Vater, J. 1999. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 ans A1/3. *Chem. Biol.* 6 : 31-41.
- Sturzenbaum, S. R., Kille, P. and Morgan, A. J. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1398 : 294-304.

- Takahashi, H., Komano, H., Kawagushi, N., Kitamura, N., Nakanishi, S. and Natori, S. 1985. Cloning and sequencing of cDNA of *Sarcophaga peregrina* humoral lectin induced on injury of the body wall. *J. Biol. Chem.* 260 : 12228-12233.
- Tripp, M. R. 1975. Humoral factors and molluscan immunity. *In* *Invertebrate Immunity*. (ed.Maramorosch, K. and Shpoe, R. E.) pp. 201-281. New York : Academic press.
- Tsing, A., Arcier, J. M. and Brehelin, M. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimp: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.* 53 : 64-77.
- Unestam, T. and Soderhall, K. 1977. Soluble fragments from fungal cell wall elicit defence reactions in crayfish. *Nature.* 267 : 45-46.
- Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. M. 1997. Purification and Comparison of β -1,3-Glucan Binding Protein From White Shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B : 453-458.
- Xu, P., Sun, B. and Salvaterra, P. M. 1999. Organization and transcriptional regulation of *Drosophila* Na^+, K^+ -ATPase β subunit genes: *Nrv1* and *Nrv2*. *Gene.* 236 : 303-313.
- Yoshida, H., Kinoshita, K. and Ashida, M. 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 271 : 13854-13860.

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร (Sambrook, *et al.*, 1989)

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม

2. การเตรียมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Maniatis, *et al.*, 1982)

ชั่งเอนไซม์ RNase A 10 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris HCl, pH 7.5 และ 15 mM NaCl ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

3.1 Ampicillin (Maniatis, *et al.*, 1982)

ชั่ง Ampicillin sodium salt 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 Tetracyclin (Maniatis, *et al.*, 1982)

ชั่ง Tetracyclin 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วต่อเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

10x <i>Eag</i> I Buffer =	100 mM NaCl
pH 7.9	50 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM dithiothreitol

10x *Sma*I Buffer = 50 mM potassium acetate
pH 7.9 20 mM Tris-acetate
10 mM magnesium acetate
1 mM dithiothreitol

5. สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ของชุดทดลองที่ใช้ในการเตรียม mRNA (mRNA Separator Kit, Clontech)

5.1 High Salt Buffer ประกอบด้วย

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.4
- 1 mM EDTA
- 0.5 mM NaCl

5.2 Low Salt Buffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.4
- 1 mM EDTA
- 0.1 mM NaCl

5.3 Sample Buffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.4
- 1 mM EDTA
- 3 mM NaCl

5.4 Elution Buffer

- 10 mM Tris-HCl, pH 7.4
- 1 mM EDTA

5.5 2M KOAc, pH 5.0

6. สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ของชุดทดลองที่ใช้ในการเตรียม cDNA Subtraction (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, Clontech)

6.1 สารละลายสำหรับการสังเคราะห์ first-strand cDNA

AMV reverse transcriptase (20 unit/μl)

cDNA synthesis primer (10 μM)

5x First-strand buffer ประกอบด้วย

- 250 mM Tris-HCl, pH 8.5
- 40 mM MgCl₂
- 150 mM KCl
- 5 mM Dithiothreitol

6.2 สารละลายสำหรับการสังเคราะห์ second-strand cDNA

20x Second-strand enzyme cocktail ประกอบด้วย

- DNA polymerase I, 6 units/μl
- RNase H 0.25 units/μl
- *E. coli* DNA ligase 1.2 units/μl

5x Second-strand buffer ประกอบด้วย

- 500 mM KCl
- 50 mM Ammonium sulfate
- 25 mM MgCl₂
- 0.75 mM β-NAD
- 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 0.25 mg/ml BSA

T4 DNA polymerase 3 units/μl

6.3 สารละลายสำหรับการตัดด้วยเอนไซม์ Endonuclease

10x *Rsa*I restriction buffer ประกอบด้วย

- 100 mM Bis Tris Propane-HCl, pH 7.0
- 100 mM MgCl₂

- 1 mM DTT

RsaI 10 units/ μ l

6.4 สารละลายสำหรับการเชื่อม cDNA กับ Adaptor

T4 DNA ligase 400 units/ μ l ที่มี 3 mM ATP

5x DNA ligation buffer ประกอบด้วย

- 250 mM Tris-HCl, pH 7.8

- 50 mM MgCl₂

- 10 mM DTT

- 0.25 mM BSA

10 mM Adaptor 1

10 mM Adaptor 2R

6.5 สารละลายสำหรับการเตรียม Hybridization

4x Hybridization buffer

Dilution buffer ประกอบด้วย

- 20 mM HEPES-HCl, pH 8.3

- 50 mM NaCl

- 0.2 mM EDTA, pH 8.0

6.6 สารละลายสำหรับการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี PCR

10 mM PCR primer 1

10 mM Nested PCR primer 1

10 mM Nested PCR primer 2R

PCR control subtracted cDNA

6.7 สารละลายสำหรับการเตรียมชุดควบคุม

Control poly A RNA 1 μ g/ μ l ได้จาก human skeletal muscle

Control DNA 3 ng/ μ l ได้จากการตัด bacteriophage ϕ x 174 DNA ด้วย

เอนไซม์ *HaeIII*

6.8 Reagent ที่ใช้ทั่วไป

10mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

20x EDTA/glycogen mix ประกอบด้วย

- 0.2 M EDTA

- 1 mg/ml glycogen

4M NH₄ OAc

sterile H₂O

7. การเตรียม 50x TAE buffer สำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sambrook, *et al.*, 1989)

ชั่ง Tris base 242 กรัม, glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร, 0.5 M EDTA, pH

8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

8. การเตรียม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (ตามวิธีของบริษัท Clontech)

1. ละลาย phenol
2. ทำให้ phenol อิมัลชันด้วย TNE buffer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตรที่เท่ากัน (TNE buffer ประกอบด้วย 50 mM Tris (pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)
3. บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 - 3 ชั่วโมง
4. อุดสารละลายส่วนที่อยู่ด้านบนทิ้ง
5. เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน อุดสารละลายส่วนที่อยู่ด้านบนทิ้ง
6. เก็บส่วนล่างที่เป็น phenol:chloroform:isoamyl alcohol ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 2 สัปดาห์

9. การเตรียมน้ำที่ปราศจาก RNase และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม total RNA และ mRNA (Maniatis, *et al.*, 1982)

9.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอเพื่อใช้ในการทดลองจะต้องระมัดระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนจากเอนไซม์ RNase ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดเอนไซม์ที่ปนเปื้อนในระหว่างการเตรียม

1. สารละลายหรือน้ำที่ใช้จะต้องผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ที่อาจปนเปื้อนด้วยการ treat ด้วย Diethylpyrocarbonate (DEPC) ซึ่งสารตัวนี้จะไปทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

2. เครื่องแก้วและพลาสติกที่ใช้ในการเตรียมอาร์เอ็นเอ ควรอบที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส นาน 2 - 4 ชั่วโมง ส่วนหลอดหรือ tip ที่เป็นพลาสติกอาจแช่ในน้ำที่ผสม DEPC แล้ว autoclave เพื่อทำลาย DEPC

9.2 การเตรียมสารละลายที่มี tris ผสมอยู่

1. เตรียมสารละลายที่ยังไม่ผสม tris แล้ว treat สารละลายด้วย DEPC

2. นำสารละลายที่ผ่านการ treat แล้วไป autoclave

3. เติม tris และนำสารละลายไป autoclave อีกครั้ง

10. การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA (ตามวิธีการของบริษัท CLONTECH)

mRNA ที่ได้จากการสกัดควรมีปริมาณ 1.2 มิลลิกรัม

1. ดูด mRNA ที่ได้จากการสกัดมา 50 ไมโครลิตร เติมนลงใน cuvette ขนาด 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 0.8 มิลลิกรัม ด้วยน้ำที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง (ddH₂O)

2. วัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง (ddH₂O) เป็น blank

3. คำนวณหา yield และความบริสุทธิ์ (purity) ของ mRNA

3.1 Total OD260 = (OD260) x (dilution factor)

3.2 ความเข้มข้น (μg/ml) = (total OD260) x (40)

3.3 Yield (μg) = (elution volume) x (concentration)

4. mRNA ที่สกัดได้ควรมีอัตราส่วนของ OD260/280 อยู่ในช่วง 1.8 - 2.0

ผลงานทางวิชาการ

พจนพร ไกรดิษฐ์, วิไลวรรณ โชติเกียรติ, อมรรัตน์ พงศ์ดารา และ กิจการ สุภมาตย์.

2542. การเตรียม subtraction library ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ. การประชุมวิชาการ กุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 1 “การวิจัยกับการพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งทะเล”. 15-17 ธันวาคม, 2542, สงขลา.

ภูวคณ บางรัมย์, พจนพร ไกรดิษฐ์, กิจการ สุภมาตย์, วิไลวรรณ โชติเกียรติ และ

อมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2543. cDNA Encoding Tyrosine kinases and Scaffold Protein Isolated from Haemocyte of *Penaeus monodon*. การประชุมวิชาการ กุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 2 “การยกระดับมาตรฐานกุ้งไทยด้วยงานวิจัยและพัฒนา”. 23-25 พฤศจิกายน, 2543, ภูเก็ต.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวพจนพร ไกรดิษฐ์

วัน เดือน ปีเกิด 26 พฤษภาคม 2518

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2540

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประเภทผลการเรียนดีเด่น ของมหาวิทยาลัย
สงขลานครินทร์