บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Acetonitrile	J.T.Baker
Agarose	Sigma
Bovine serum albumin	Sigma
Calcium chloride	Merck
Carbazole	Fluka
Chondroitin sulfate A	Sigma
Chondroitin sulfate C	Sigma
Cysteine	Fluka
DEAE cellulose DE –52	Whatman
Dextran sulfate	Sigma
1,3 diaminopropane acetate	Fluka
1,9 dimethylmethylene blue chloride pure	Serva
Disodium hydrogen phosphate	Merck
Feric chloride	Fluka
Fluorescence latex bead	Polysciences
Fuchsin	BDH
Glutaraldehyde	Merck
Glycine	Fluka
Hexadecyltrimethylammonium bromide	Sigma

Central Library
Prince of Songkla University

Hydrochloric acid	Merck
L- dopa	Sigma
L- fucose	Sigma
M-199	Gibco
Magnesium chloride	Merck
Methanol	Merck
Nutrient agar	Difco
Periodic acid	Sigma
Potassium nitrate	Ajax
Sodium acetate	Fluka
Sodium cacodylate	Serva
Sodium chloride	Merck
Sodium citrate	Fluka
Sodium hydrogen carbonate	Merck
Sodium metasilicate	Fluka
Trifluoroacetic acid	Sigma
Trypsin	Merck
Tryphan blue	Wako

2.1.2 พืชและสัตว์ทดลอง

2.1.2.1 สาหร่ายทะเล *S. polycystum* จากบริเวณเกาะหนู จังหวัดสงขลา และแพลงก์ตอนพืชชนิด *I. galbana* จากศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา

2.1.2.2 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) อายุ 2 เดือน และ 3 เดือน ที่มีน้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 5-8 กรัม และ 12-15 กรัมตามลำดับ กุ้งที่ใช้จะต้องมีสุขภาพดี ตรวจไม่พบไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

2.1.3 จุลินทรีย์

S. aureus, E. coli ได้รับการอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ *Vibrio harveyi* จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2.2 อุปกรณ์

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น Ultraspec III (Pharmacia)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น Junior 2000 C (Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius)

เครื่องวัดพีเอช รุ่น 109 (Action)

เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RC 5B (Sorvall)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Bio Rad)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (Neurair)

ตู้บ่มเชื้อ 37 $^{\circ}$C (Heraeus)

ตู้แช่แข็ง –20 $^{\circ}$C (Sanyo)

ตู้แช่แข็ง –70 $^{\circ}$C (Revco)

หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA –300 M II (Founday)

เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (Advance)

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent)

เครื่องหมุนเหวี่ยงรุ่น 5414 C (Eppendorf)

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator)

เครื่อง Freeze dry (Labconco)

2.3 วิธีการ

2.3.1 การสกัดสาร fucoidan จากสาหร่ายทะเลและแพลงค์ตอน

2.3.1.1 การสกัด crude fucoidan จากสาหร่ายทะเล *S. polycystum*

นำสาหร่ายทะเล *S. polycystum* ที่ได้จากบริเวณเกาะหนู จังหวัดสงขลา มาล้างทำความสะอาด ตากให้แห้ง แล้วนำไปบดเป็นผงหลังจากนั้นชั่งผงสาหร่ายแห้งที่เตรียมไว้ ปริมาณ 100 กรัมนำมาสกัดสารโดยวิธีการของ Doner and Whistler, (1973) โดยการเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรและให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมงเพื่อแยก alginate และโปรตีนออก หลังจากนั้นนำไปกรองและทิ้งส่วนใส กากที่ได้นำไปสกัดต่อด้วย 0.1 M HCl, pH 2 -2.5 จำนวน 1,500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อสกัดแยก fucoidan ออกจากผนังเซลล์ ต่อจากนั้นนำไปกรอง เก็บส่วนใส กากที่ได้สกัดต่อด้วย 0.1 M HCl ซ้ำ อีก 2 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยกระบวนการ lyophilization, ชั่งหาน้ำหนักแห้งก็จะได้สาร crude fucoidan ที่ใช้สำหรับทดสอบ

2.3.1.2 การสกัดสาร fucoidan จากแพลงค์ตอน

เลี้ยงแพลงค์ตอนกลุ่ม *I. galbana* โดยใช้อาหารสูตร Sato และ Serikawa (KNO_3 100 กรัม, Na_2HPO_4 10 กรัม, Na_2SiO_3 5 กรัม, $FeCl_2$ 2.5 กรัม ในน้ำทะเล 1 ตัน) (ลัดดา, 2540) เมื่อมีปริมาณมากพอจึงทำการกรองและอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา24ชั่วโมงก่อนนำไปสกัดโดยใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับ fucoidan จากสาหร่ายทะเล *S. polycystum* ดังข้อ 2.3.1.1

2.3.1.3 การหาความเข้มข้นของ fucose และ fucoidan

หาความเข้มข้นของ fucose ตามวิธี Cysteine-H_2SO_4 method (Winzler, 1971) โดยนำ crude fucoidan ที่ได้จากข้อ2.3.1.1 และ2.3.1.2 ปริมาณ 0.05

กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น สำหรับสารมาตรฐานใช้ L- fucose ที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการดูดสารจากความเข้มข้นเริ่มต้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างเป็น blank ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม 2.25 มิลลิลิตรของ H_2SO_4 : H_2O อัตราส่วน 6 : 1 (v/v)ในสภาพที่เย็นจัดผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นแล้วจึงเติม 50 ไมโครลิตร ของ 3% Cysteine reagent (0.3 กรัม ของ L- cysteine ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60-90 นาทีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 396 และ 427 นาโนเมตร โดยใช้ L-fucose เป็นสารมาตรฐานนำค่าของการดูดกลืนแสงที่ได้จากค่า OD_{396}-OD_{427} ไปเทียบค่าหาปริมาณของ fucose กับกราฟมาตรฐานแล้วจึงคำนวณหาปริมาณของ fucoidan ได้จากความสัมพันธ์ ปริมาณของ fucoidan = 1.75 x ปริมาณของ fucose (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (Doner and Whistler, 1973)

2.3.2 การศึกษาคุณลักษณะของ fucoidan

2.3.2.1 การทำบริสุทธิ์ fucoidan จากสาหร่าย *S. polycystum*

นำ crude fucoidan จากข้อ 2.3.1.1 ปริมาณ 0.5 กรัมโดยน้ำหนัก ซึ่งมี fucoidan เท่ากับ 29 มิลลิกรัม ละลายใน 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แยกด้วย ion-exchange chromatography แบบ DEAE-cellulose column (DEAE- 52) (ขนาด 9 x 2 cm) ล้างสารที่ไม่เกาะติดกับ column ออกด้วย 0.2 M NaCl ใน 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) หลังจากนั้นทำการชะด้วยสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (linear gradient) ที่ประกอบด้วยส่วนผสมของ 150 มิลลิลิตร ของ 0.2 M NaCl ใน 50 mM sodium acetate (pH 5.0) และ 150 มิลลิลิตร ของ 1.2 M NaCl ใน50 mM sodium acetate (pH 5.0) ด้วยอัตราเร็ว 12 มิลลิลิตร/ชั่วโมง โดยเก็บสารละลายที่ชะหลอดละ 3 มิลลิลิตร (Pereira *et al.*, 1999) จำนวน 80 หลอด ทำการตรวจสอบปริมาณของน้ำตาล fucoseโดยวิธี Cysteine-H_2SO_4 (Winzler, 1971), ตรวจ

สอบปริมาณของ uronic acid โดยวิธี Carbazole reaction (Dische, 1947) และคุณสมบัติในการย้อมติดสีของสาร (Metachromasia) โดยการใช้ 1, 9 dimethylmethylene blue chloride pure (Farndale *et al.*, 1986) เก็บสารละลายส่วนต่างๆที่มี fucoidan มากำจัดเกลือออกโดยการ dialysis , ทำให้แห้งแล้วเก็บที่ 4°C

2.3.2.1.1 การหาปริมาณ uronic acid โดยวิธี carbazole reaction (Dische, 1947)

ใช้ตัวอย่างสารละลายที่แยกได้จากข้อ2.3.2.1ปริมาตร1 มิลลิลิตร รวมกับกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ 1% Carbazole ใน H_2SO_4 ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้ glucose เป็นสารมาตรฐาน (ปฏิกิริยาจะเห็นชัดเมื่อ uronic acid มีค่ามากกว่า 5ไมโครกรัม)

2.3.2.1.2 การตรวจหาคุณสมบัติในการย้อมติดสีของสาร (Farndale *et al.*, 1986)

ใช้ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ 0.04 M ของ 1,9 dimethylmethylene blue reagent (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 15 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตรโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างเป็น blank

2.3.2.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยวิธี Agarose gel electrophoresis) (Pereira *et al.*, 1999)

ใช้ fucoidan ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธ์จากข้อ 2.3.2.1 และสารมาตรฐานปริมาณ 1 มิลลิกรัม นำมาละลายใน 0.05 M 1,3 diaminopropane/acetate (pH 9.0) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ loading dye (0.25 % bromophenol blue, 0.25 % xylene cyanol และ 40 % (w/v) sucrose ในน้ำกลั่น)

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในเจลส่วนบนที่ประกอบด้วย 0.7% agaroseใน 0.05 M 1,3 diaminopropane/acetate (pH 9.0) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ให้ความต่างศักย์คงที่ 100 volt ระยะเวลา 1.50 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์ 0.05 M 1,3 diaminopropane/acetate (pH 9.0) นำเจลที่ได้มาทำการย้อมน้ำตาลด้วยวิธี Periodic acid leucofuchsin (PAS) (Lillie and Fullmer, 1976) โดยการย้อมเจลด้วย 0.1% hexadecyltrimethylammonium bromide solution เป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากนั้นแช่ใน 1% periodic acid เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาทีจึงย้อมด้วยสี PAS (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 20 วินาที ล้างด้วย 0.52% NaS_2O_5 จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำจนเห็นแถบของสีน้ำตาลชัดเจนแล้วจึงคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบกับสารมาตรฐานที่ประกอบด้วย Chondroitin sulfate A , Chondroitin sulfate C และ Dextran sulfate ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15, 60 และ 500 kDa ตามลำดับ

2.3.2.3 หาองค์ประกอบของ fucoidan โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ใช้ fucoidan ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธ์ จากข้อ 2.3.2.1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัม สำหรับสารมาตรฐานใช้น้ำตาล fucose, xylose, arabinose, mannose และ galactose ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ทำการ hydrolysis ด้วย 2 N Trifluoroacetic acid ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1.50 ชั่วโมง ทำให้แห้งโดยการพ่นด้วยแก๊สไนโตรเจนแล้วนำมาละลายใน methanol ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)ใช้สารตัวอย่างเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรและสารมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาผ่านการแยกโดยใช้ ZORBAX Carbohydrate analysis column 4.6 mm ID x150 mm (Agilent)ที่ประกอบด้วยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 3-aminopropylsilane และ ZORBAX SIL (silica) ทำการชะด้วยส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 75 : 25 (v/v) ด้วยอัตราเร็ว 1.4 มิลลิลิตร/นาที เป็นระยะเวลา 10 นาที อุณหภูมิของ Refractive index detector (HP 1100 RID) และ column คงที่เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

2.3.2.4 การหาปริมาณซัลเฟต (SO_4^{2-})

ใช้สาร fucoidan ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์จากข้อ 2.3.2.1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำที่กำจัดอิออนปริมาตร 3 มิลลิลิตรนำมาหาปริมาณซัลเฟตโดยการใช้ Test kit Spectroquant 14791 Sulfate (E. Merck, Darmstadt, Germany) ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10-600 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขั้นตอนดังนี้

ใช้สารละลายตัวอย่างปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร เติม SO_4-1A reagent จำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม SO_4-2A ปริมาณ 1 ช้อน นำไปต้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม SO_4-3A reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองนำส่วนใสที่กรองได้มาเติม SO_4-4A reagent จำนวน 4 หยด นำไปต้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm

2.3.3 การทดสอบผลของ fucoidan ที่สกัดได้ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*)

2.3.3.1 การเตรียมกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ อายุ 2 เดือน และ 3 เดือน ที่มีน้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 5-8 กรัม และ 12-15 กรัม ตามลำดับ นำมาเลี้ยงไว้ที่โรงเพาะฟักของศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยมีสภาพการเลี้ยงคือบ่อซีเมนต์ขนาด 2 ตัน ปล่อยกุ้ง 200 ตัว/บ่อ ให้อากาศตลอดเวลาความเค็มของน้ำคงที่ที่ 15 ส่วนในพันส่วน เลี้ยงไว้ก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นระยะเวลา 3-5 วัน ในช่วงของการเลี้ยงให้อาหารเม็ดวันละ 3 มื้อ ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

2.3.3.2 การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ใช้กุ้งกุลาดำที่ตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตัดเอาเฉพาะส่วนที่ติดเชื้อประกอบด้วย ขาว่ายน้ำ หัวใจ เหงือก นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งแล้วผสมด้วย K-199 (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1 กรัมของเนื้อเยื่อติดเชื้อต่อ 2 มิลลิลิตรของ K-199 เหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสและเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เก็บใส่หลอดขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 15% glycerol ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

2.3.3.3 ศึกษาการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อ WSSV (White Spot Syndrome Virus) เมื่อมีการให้สาร fucoidan (modified fromTakahashi *et al.*, 1998)

เตรียมตู้กระจกขนาด 40x75x75 ซม จำนวน 12 ตู้ ทำความสะอาดและใช้ผ้าพลาสติกสีดำหุ้มตู้กระจกด้านข้าง เติมน้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วนปริมาตร 0.195 ลูกบาศก์เมตร ลงในตู้โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 โดยในชุดที่ 1 ใช้กุ้งอายุ 60 วันที่มีขนาด 5-8 กรัม ปล่อยลงตู้ๆละ 15 ตัว จำนวน 4 ตู้โดยใช้เป็นกลุ่มควบคุม (ให้อาหารปกติที่ไม่มี crude fucoidan) จำนวน 2 ตู้ และอีก 2 ตู้ ให้ crude fucoidan ผสมในอาหารในอัตรา 100 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว/ วัน วันละ 3 มื้อ เป็นระยะเวลา 4 วันแล้วจึงให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ในอัตราความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3-5 วันโดยวิธีการแช่เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงและให้อาหารที่มี crude fucoidan และกลุ่มควบคุมให้อาหารปกติต่ออีกจนครบระยะเวลา 15 วัน ทำการทดลองแบบเดียวกันกับในชุดที่ 1โดยเพิ่มปริมาณของfucoidan เป็น 200 และ400 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว/ วัน ตามลำดับ ส่วนในชุดที่ 2 ใช้กุ้งอายุ 90 วันที่มีขนาด 12-15 กรัมทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดที่ 1 ตรวจดูจำนวนตัวที่ตายในแต่ละวัน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดภายหลังการเลี้ยง 15 วัน ระหว่างการเลี้ยงดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

2.3.3.4 การเตรียมกุ้งกุลาดำเพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกัน

โดยการเตรียมตู้กระจกขนาด 45x45x45 ซม จำนวน 6 ตู้ ทำความสะอาดและใช้ผ้าพลาสติกสีดำหุ้มตู้กระจกด้านข้าง เติมน้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วนปริมาตร 0.07 ลูกบาศก์เมตรลงในตู้กำหนดการทดลองเป็นกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยเลือกระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งขนาด 5-8 กรัมหรือ 12-15 กรัมที่มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงที่สุดภายหลังการให้ crude fucoidan ผสมในอาหารความเข้มข้นต่างๆภายใน 15 วันตามการทดลองข้อที่ 2.3.3.3 กลุ่มทดลองทำการเลี้ยงกุ้งขนาดนั้นๆซ้ำ ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 2 ตู้ ให้ crude fucoidan ผสมในอาหารในอัตราความเข้มข้นเดิม (ที่ทำให้กุ้งรอดตายสูงสุด) โดยทำการเลี้ยง 4 วันแล้วจึงให้เชื้อ WSSV ในอัตราความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3-5 วันโดยวิธีการแช่เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงและให้อาหารที่มี crude fucoidan และกลุ่มควบคุมทั้งหมดต่ออีกจนครบระยะเวลา 7 วันโดยมีกลุ่มควบคุมประกอบด้วย กลุ่มควบคุมที่ 1 (ให้อาหารปกติที่ไม่มี crude fucoidan และไม่ได้รับเชื้อ WSSV จำนวน 2 ตู้) กลุ่มควบคุมที่ 2 (ให้อาหารปกติที่ไม่มี crude fucoidan และได้รับเชื้อ WSSV จำนวน 2 ตู้) ให้อาหารเม็ดวันละ 3 มื้อ เป็นระยะเวลา 4 วันแล้วจึงให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) กลุ่มควบคุมทั้ง 2 ชุดให้อาหารปกติจนครบ 7 วัน เก็บกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิตทั้งหมดมาทดสอบผลของสาร fucoidan ในสาหร่ายต่อความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่า phagocytosis

2.3.3.4.1 การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ Phenoloxidase (Smith and Soderhall (1991 อ้างโดย Rengpipat *et al.*, 2000))

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งกุลาดำในแต่ละการทดลองตามข้อ 2.3.3.4 (กลุ่มควบคุมที่ 1, กลุ่มควบคุมที่ 2 และ กลุ่มทดลอง) อย่างละ 10 ตัวโดยเจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ KC-199 pH 7.6 (ภาคผนวก ก) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาตร 500ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,500 รอบ

ต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอีก 1 ครั้ง ทิ้งส่วนใส และละลายเม็ดเลือดในสารละลายคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ (cacodylate buffer) ความเข้มข้น 0.01 M พีเอช 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) ที่แอมปริจูด 30 เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่เป็น hemocyte lysate (HLS) ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสไว้ใช้งานในการวิเคราะห์ phenoloxidase activity สำหรับการวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ประยุกต์ตามวิธีการของ Smith and Soderhall (1991 อ้างโดย Rengpipat *et al.*, 2000) จะใช้ตัวอย่างเอนไซม์ที่เตรียมได้ (HLS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลาย Trypsin (0.1% ทริปซินในคาโคดีเลทบัฟเฟอร์) 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 0.3% L-dihydroxyphenylalanine (ในคาโคดีเลทบัฟเฟอร์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาทีแล้วจึงเติมคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ อีก 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาทีโดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุมซึ่งมีทริปซินผสมกับ L- DOPA และใช้คาโคดีเลทบัฟเฟอร์แทน HLS บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ได้ทุก 2 นาทีจนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์นาน 20 นาทีแล้วนำไปคำนวณหาค่าความว่องไวของเอนไซม์จากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น0.001/นาที/mg protein

หาปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry *et al.*, (1951) โดยการใช้ตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองเติม Reagent A (Alkaline copper tartate Solution บริษัท BIO-RAD, U.S.A.) ลงไป 125 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Reagent B (Folin Reagent บริษัท BIO-RAD, U.S.A.) ลงไป 1000ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างเป็น blank คำนวณค่าปริมาณโปรตีนในเอนไซม์โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของข้อมูลและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกลุ่มต่างๆ โดยใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

2.3.3.4.2 การศึกษาความว่องไวของฟาโกไซโทซิส (Phagocytic activity) ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำโดยการวัดค่า Phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดที่ต่อต้านเม็ด bead เรืองแสง ประยุกต์จาก Itami และคณะ(1994 อ้างโดย Rengpipat *et al.*, 2000)

เตรียมเม็ดพลาสติกเรืองแสง (Fluorescence latex bead) โดยการใช้เม็ดพลาสติกเรืองแสง (Polysciences) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.98 ไมครอนปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับ K-199 (พีเอช 7.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เม็ดพลาสติกกระจายดี ล้างด้วย K-199 3 ครั้ง นำมานับจำนวนโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์และคำนวณปริมาณเม็ดพลาสติกเป็นจำนวนเม็ด/มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 เม็ด/มิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบต่อไป ทำการเตรียมเม็ดเลือดกุ้งโดยเจาะเลือดกุ้งในแต่ละการทดลองตามข้อ 2.3.3.4 (กลุ่มควบคุมที่1, กลุ่มควบคุมที่2 และ กลุ่มทดลอง)อย่างละ 10 ตัวที่บริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ภายหลังการเลี้ยง 7 วัน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ KC-199 พี-เอช 7.4 เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสทิ้งไป ตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและปั่น อีก 1 ครั้ง ละลายเม็ดเลือดใน K-199 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษากระบวนการฟาโก-ไซโตซิสของเม็ดเลือดกุ้งใช้เซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่มีความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับเม็ด bead เรืองแสง 200 ไมโครลิตร (10^8 เม็ด/มิลลิลิตร) บ่มส่วนผสมทั้ง 2 ชนิดบนสไลด์ในกล่องชื้น ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย 2.5% glutaryldehyde เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดกับสไลด์ออกด้วย 0.85% NaCl และย้อมเซลล์เม็ดเลือดด้วย Wright stain นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 200 เซลล์ และคำนวณค่า Phagocytic index (PI) , % Phagocytosis, และจำนวนเม็ด bead ที่ถูกกินต่อหนึ่งเซลล์ (Average number of the bead ingested per cell, ABPC) ดังนี้

PI = (จำนวนเม็ดbeadที่ถูกกิน / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกตุ) X (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ด bead/จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกตุ) X 100

% Phagocytosis = (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดbead / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกตุ) X 100

ABPC = (จำนวนเม็ดbeadที่ถูกกิน / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดbead)

เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของข้อมูลและวิเคราะห์ความแตกต่างโดยการใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

2.3.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2.3.4.1 การศึกษาผลของ fucoidan ที่สกัดได้ต่อการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar-Plate-Sensitivity Method (Cappuccino, 1986)

เตรียม fucoidan สำหรับทดสอบโดยใช้ crude fucoidan จาก *S. polycystum* ทำการเจือจางด้วย 0.85% NaClให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 250, 25 , 2.5 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เชื้อที่ทำการทดสอบประกอบด้วย *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งทำการเลี้ยงบน Nutrient agar และ *V. harveyi* ที่เลี้ยงบน Nutrient agar ที่มี 1.5 % NaCl และจากแพลงก์ตอนต่อเชื้อ *S. aureus* และ *V. harveyi* ทำการเจือจางเชื้อที่ต้องการทดสอบประกอบด้วย *S. aureus, E. coli* และ *V. harveyi* ด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 (ประกอบด้วย 1% $BaCl_2$ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรและ 1% H_2SO_4 ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 640 nm เท่ากับ 0.27 มีจำนวนเชื้อโดยประมาณเท่ากับ $1.5x10^9$ เซลล์) ใช้ swab จุ่มเชื้อที่เจือจางแล้วมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ 3-5 นาที ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟ คีบแผ่น disc แตะลงในสารละลาย fucoidan ที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วนำไปวางบนอาหารที่ปลูกเชื้อไว้ โดยส่วนของตัวควบคุมใช้ 0.85% NaCl ทำการบ่มจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 1 วัน อ่านผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยดูบริเวณวงใสรอบๆแผ่น disc (Inhibition zone) ที่แตะสารละลาย fucoidan

2.3.4.2 หาค่า MIC (Minimum inhibition concentration test) (Lennette *et al.*, 1974)

ใช้ sterile pipet ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Nutrient broth สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ Nutrient broth ที่มี 1.5% NaCl สำหรับเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* ลงในหลอดทดลองตั้งแต่หลอดที่ 2-10 หลอดละ 0.5 ml และดูดสารละลาย fucoidan ความเข้มข้น 250 mg/ml จากสาหร่ายและแพลงก์ตอนลงในหลอดทดลองตั้งแต่หลอดที่ 1-2 หลอดละ 0.5 ml ดูดสารละลาย fucoidan ความเข้มข้น 250 mg/mlในอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการเจือจางแบบ serial dilution ตั้งแต่หลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 9 ส่วนในหลอดที่ 9ให้ดูดทิ้งไป 0.5 ml เพื่อใช้ หลอดที่ 10 เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นดูดเชื้อที่เตรียมได้จากการละลายใน 0.85 % NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 หลังจากนั้นนำมาเจือจางต่ออีก 200 เท่าด้วย 0.85 % NaCl จะมีจำนวนเชื้อโดยเฉลี่ยในแต่ละหลอดเท่ากับ 10^6 CFU/ml ลงในหลอดๆละ 0.5 ml ทุกหลอดตั้งแต่ 1-10 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตุความขุ่น อ่านค่า MIC และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร