2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษาคือ กุ้งแชบ๊วยที่มีขนาดลำตัวยาว 10-14 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 30 - 40 กรัม และอยู่ในระยะคราบแข็ง (ไม่อยู่ในระยะลอกคราบ) จับจากทะเลอันดามัน แล้วเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 500 ลิตร ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade สั่งซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Fluka
Agar	BD Biosciences
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Fluka
Bisacrylamide (N,N′-methylene diacrylamide)	Fluka
Blue dextran	Sigma
Bovine serum albumin	Sigma Chemical Co.
Broad range molecular weight marker	Bio-rad
Bromophenol blue	Merck
Carboxymethyl-Cellulose	Sigma
Calcium hypochlorite	Carlo erba
Citric acid	Ajex Chemicals
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma Chemical Co.
Coomassie plus protein assay reagent kit	Pierce
Copper sulphate	Merck
DEAE-Sephacel	Sigma Chemical Co.

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
D-Glucose	APS Ajex Finechem
Dimethylsulphoxide	Lab scan
3,5-dinitosalicylic acid	BDH
Ethanol	BDH
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka
Folin-ciocalteu's reagent	Carlo erba
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Sigma Chemical Co.
Glycine	Fluka
Hydrochloric acid	Merck
Laminarin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Fluka
Methanol	Merck
N-Acetyl-β-D-glucosamine	Sigma Chemical Co.
Ortho-phosphoric acid	Merck
p-Nitrophenol	Sigma Chemical Co.
p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide	Sigma Chemical Co.
Phenylmethylsulphonyl fluoride	Fluka
Plate count agar	Difco Laboratories
Potassium dichromate	Sigma
Potassium sodium tartrate	M&B
Sephadex G-200	Pharmacia
Silver stain Kit	Bio-Rad
Sodium acetate	Carlo erba
Sodium carbonate	Carlo erba
Sodium chloride	Fluka
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de Haen
Sodium hydroxide	Fluka
Superdex 200 HR 10/30 column	Pharmacia

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar	HiMedia
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma Chemical Co.
Triton X-100	Merck
Tryptic soy broth	BD-Bioscience

3. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-5	Mettler
Autoclave	-	Hirayama
Centrifuge	5415C, 5804R	Eppendorf
Centrifuge	Avanti J-30I	Beckman Coulter
Fast protein liquid chromatography	-	Pharmacia Biotech
Heat box	Accu Block	Labnet
Hot plate	-	EGD
Incubator	1510E	Shel lab
Micropipette	-	Eppendrof, Gilson
Microtube pump MP-3	MP-3N	Eyela
Orbital shaker	OS 20	Boeco
pH meter	Accumet 15	Fisher Scientific
Power supply	1000/500	Bio-Rad
Slab gel electrophoresis apparatus	AE-6400	Atto
UV-VIS spectrophotometer	160A	Shimadzu
Vortex	G-560E	Scientific Industries
Water bath	WB-170M	Optima

วิธีการ

1. การเตรียมซีรัมจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

ดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแชบ๊วยทันทีหลังจับขึ้นมาด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณ pericadium หรือขาเดินคู่ที่ 3 เก็บฮีโมลิมฟ์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัว นำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 20 นาที เก็บส่วนใสหรือซีรัมไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดจากเนื้อเยื่อของกุ้ง

ตัดเนื้อเยื่อจากกุ้งไปชั่งน้ำหนักแล้วนำใส่หลอด homogenizer เติม 50 mM Tris-HCI, pH 7.5 ที่มี 0.85% NaCI และ 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (TBS-PMSF) โดยใช้อัตราส่วนเนื้อเยื่อ 1 กรัม : TBS-PMSF 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ให้เซลล์แตก ดูดใส่หลอด eppendorf ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกตะกอนและไขมันทิ้งไป นำส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดเนื้อเยื่อแบ่งใส่หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °ซ

3. การหาปริมาณโปรตีน

3.1 ตามวิธีของ Bradford (1976)

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างด้วยชุดหาโปรตีน (Coomassie plus protein assay reagent kit) จากบริษัท Pierce ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายชุดหาโปรตีน 1 มิลลิลิตร โดยทำควบคู่ไปกับ BSA (bovine serum albumin) จากบริษัท Pierce ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเจือจาง BSA ให้มีปริมาณโปรตีน 2-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

3.2 ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

หาปริมาณโปรตีนโดยทำการเจือจาง BSA ที่เป็นโปรตีนมาตรฐานให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม เติมสารละลายแอลคาไลน์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH: 1% potassium sodium tartrate: 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติม Folin-Phenol (ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (A 650) ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

4. การหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสโดยดัดแปลงวิธีของ Burner (1964) ดังนี้ หาภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสโดยใช้ลามินารินเป็นสับเสตรทในบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เหมาะสม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ เวลาที่เกิดปฏิกิริยา และปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมสารละลาย DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) และต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้ง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเป็นการเร่งปฏิกิริยาให้กลูโคสทำปฏิกิริยากับ 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (A540) นำค่าที่ได้ไปหาแอคทิวิทีของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (D-glucose)

4.1 การหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิที

หาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในสารสกัดตับและซีรัมโดยใช้สารสกัดจากตับของกุ้งแชบ๊วยเจือจาง 1 : 10 เท่าด้วย 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 จากนั้นใช้สารสกัดตับเจือจางที่ปริมาตรต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0- 50 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรแต่ละหลอดให้เป็น 140 ไมโครลิตรด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม นำไปทำปฏิกิริยากับ 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 70 ไมโครลิตร โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 45 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 40 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที เติม 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร วัดค่า A540 ส่วนในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในซีรัมของกุ้งแชบ๊วยซึ่งมีแอคทิวิทีต่ำนั้น ใช้ซีรัมปริมาตรต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-50 ไมโครลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับสารสกัดตับ

4.2 การหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ในการหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในสารสกัดตับและในซีรัม ใช้สารสกัดตับเจือจางปริมาณที่เหมาะสมและซีรัมที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ผสมกับสารผสมปฏิกิริยา บ่มที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}$ซ พร้อมเขย่าที่เวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0-50 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที เติม 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร วัดค่า A540

4.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

นำสารสกัดตับเจือจางหรือซีรัมในปริมาณที่เหมาะสมไปทำปฏิกิริยากับ 4 mg/ml

laminarin ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ กันในช่วง 3-11 โดยช่วง pH 3-6ใช้ 0.1 M sodium acetate ช่วง pH 6-9 ใช้ 0.1 M Tris-HCl และช่วง 9- 11 ใช้ 0.1 M glycine-NaOH แล้วนำไปบ่มให้เกิดปฏิกิริยาตามเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที เติม 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร วัดค่า A540

4.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

นำสารสกัดตับเจือจางและซีรัมในปริมาณที่เหมาะสม ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 4.3 แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 0, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 และ 90 °ซ ในเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที เติม 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร วัดค่า A540

4.5 การหาปริมาณสับเสตรทที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

นำสารสกัดตับเจือจางและซีรัมในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ไปทำปฏิกิริยากับ 4 mg/ml laminarin ปริมาตรต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-50 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 4.3 แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.4 และ 4.2 หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที เติม 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร วัดค่า A540

5. การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

5.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยใช้สารละลาย 5 mM D-glucose ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0 และทำการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมให้มีปริมาณต่างกัน 5 ค่า คือ 100, 200, 300, 400 และ 500 นาโนโมล (nmole)โดยให้มีปริมาตรรวมเป็น 210 ไมโครลิตร แล้วเติม 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร นำลงต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร วัดค่า A540

5.2 การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3- กลูคาเนส

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ตามภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 โดยใช้สารสกัดตับเจือจาง 1 : 10 ปริมาตร 30 ไมโครลิตรหรือ 0.72 มิลลิกรัมในสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 ปริมาตร 150ไมโครลิตร บ่มที่ 60 °ซ นาน 20 นาที ส่วนในซีรัมใช้ซีรัม 30 ไมโครลิตรหรือ 3.6

มิลลิกรัมและทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับสารสกัดตับ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 40 mM DNS ปริมาตร140 ไมโครลิตรและต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที เพื่อเป็นการเร่งปฏิกิริยาให้กลูโคสอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับ DNS ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นบนน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร แล้ววัดค่า A540 ของผลผลิต คือ น้ำตาลกลูโคสที่เข้าทำปฏิกิริยากับ DNS ไปเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส กำหนดให้ค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณ 1 นาโนโมล ของน้ำตาลกลูโคสที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายลามินารินได้ในเวลา 1 นาที

6. การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมโดยใช้ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (*p*NP-NAG) เป็นสับสเตรท ตามวิธีการที่รายงานโดยสุวรรณา ผลใหม่ (2547) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Godknecht และ Honegger (1991) ดังนี้ ใช้สารละลายเอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสมผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 mM *p*NP-NAG ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6 ปริมาตรรวมเป็น 200 ไมโครลิตรบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M Na_2CO_3 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่า A420 ของผลผลิต คือ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น โดยใช้ *p*-nitrophenol ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งกำหนดให้แอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase 1 หน่วย เท่ากับปริมาณ 1 ไมโครโมล (μmole) ของ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 50 °ซ ต่อเวลา 1 นาที

7. การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10x12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร

7.1 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 6-12% ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วน ประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel 3% (5 ml)	Separating gel	
		6% (3 ml)	12% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.5 ml	0.60 ml	1.20 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.63 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.50 ml	1.50 ml
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.82 ml	0.87 ml	0.27 ml

7.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) เตรียมโปรตีนมาตรฐานเหมือนกับการเตรียมสารตัวอย่าง

7.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่าง ปิดกระแสไฟฟ้าแล้วนำเจลไปย้อมสี

7.2 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (6-18%) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	6% (3 ml)	18% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.5 ml	0.60 ml	1.80 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.75 ml	0.75 ml
0.2 M EDTA	50 µl	30 µl	30 µl
10% SDS	50 µl	30 µl	30 µl
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.10 ml	1.56 ml	0.36 ml

7.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู ในกรณีที่ทำ SDS-PAGE สภาพรีดิวซ์ทำโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ดังข้างต้น แต่มี 1% เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) ด้วย จากนั้นต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที

7.2.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ใช้ 0.025 M Tris-0.192 M glycine-0.1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ นำเจลไปย้อมสี

7.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE)

preparative PAGE เป็น nondenaturing PAGE แต่มีการเตรียมเจลให้มีขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 6-12% เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่าง 12 ช่อง จากนั้นผสมสารละลายเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้เติมลงในช่องใส่สารตัวอย่าง แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ จากนั้นตัดเจลตรงกลาง เป็นแถบกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาวตลอดแผ่นเจล นำชิ้นเจลไป

ย้อมด้วยสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 - 4.7% ethanol - 8.5% phosphoric acid) นาน 5-10 นาที เมื่อปรากฏแถบโปรตีนนำไปเทียบกับเจลซึ่งไม่ย้อมแล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบโปรตีนที่ต้องการ แล้วชะโปรตีนนั้นออกจากชิ้นเจล โดยนำชิ้นเจลที่ต้องการใส่ในถุงไดแอไลซ์ (dialysis bag) แล้วนำไปวางตามขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอน ซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ (submarine) เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA เมื่อครบ 18 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดแอไลซ์ (dialyse)ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose

7.4 การย้อมสีโปรตีนแบบซิลเวอร์ (Silver stain)

หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำเจลไปตรึงโปรตีนด้วย 40% เมธานอล(methanol)-10% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลาย 10% เอธานอล (ethanol) -5% กรดน้ำส้ม นาน 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นใช้ชุดย้อมซิลเวอร์ (silver stain kit) ของบริษัท Bio-Rad โดยเติมสารละลายออกซิไดเซอร์ (oxidizer solution) เขย่านาน 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน (deionized water) ครั้งละ 5 นาที จนกระทั่งสีเหลืองในเจลหมดไป จากนั้นแช่เจลในน้ำยาซิลเวอร์ (silver reagent) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดไอออน นาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีวีโลเปอร์ (developer) เขย่าและเปลี่ยนสารละลายเมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ และเมื่อปรากฏแถบของโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% กรดน้ำส้ม

7.5 การหาแถบโปรตีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ใน Nondenaturing PAGE

นำสารละลายเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เข้มข้นไปทำ nondenaturing PAGE หลังจากนั้นตัดแผ่นเจลออกเป็น 2 ส่วน นำส่วนแรกไปย้อมสีโปรตีนด้วยสารละลาย Bradford นาน 5-10 นาที เมื่อปรากฏแถบโปรตีนนำไปเทียบกับเจลซึ่งไม่ย้อมแล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบโปรตีนที่ต้องการ ตามวิธีการข้อ 7.3 นำเจลแต่ละชิ้นบดใน 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 $^{\circ}$ซ นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 5 จากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าโปรตีนแถบใดเป็นเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนส

8. การทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์

เนื่องจากเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในซีรัมพบปริมาณน้อยมากจึงเลือกทำบริสุทธิ์จากสารสกัดตับซึ่งมีมากกว่า และจากการหาภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับและในซีรัมคล้ายคลึงกันมากจึงอาจเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน

8.1 โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารสกัดตับปริมาตร 45 มิลลิลิตร (284.4 มิลลิกรัม) ที่เตรียมได้จากขั้นตอนข้อ 2 ที่ผ่านการไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF) นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ มาตกตะกอนด้วย 70 % เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) คนตลอดเวลา เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ 4 °ซ แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ นาน 1 ชั่วโมง เก็บตะกอนไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ TBS ให้ได้ปริมาตรน้อยที่สุด ดูดใส่ถุงไดแอไลซ์แล้วนำไปไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำไปหาแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีนและนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

8.2 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เตรียม DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.6 x 9 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซิน (resin) เป็น 50 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ ด้วย 0.2 M sodium citrate-0.2% Triton X-100 (Wallace, 1965) แล้วปรับคอลัมน์ให้สมดุลย์ (equilibrate) ด้วย TB (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดตับที่มีปริมาณโปรตีน 94.62 มิลลิกรัม ที่ผ่านการไดแอไลซ์ด้วยบัฟเฟอร์ TB-PMSF แล้วล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกล้างออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ล้างคอลัมน์จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง (linear gradient) ในช่วง 0-0.5 M ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม (75 มิลลิลิตร + 75 มิลลิลิตร) จากนั้นชะต่อในทำนองเดิมด้วย 0.5-1.0 M NaCl (75 มิลลิลิตร + 75 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิม และเก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดไปวัดค่า A280 หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) และหาแอคทิวิที ทำการรวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นทำให้เข้มข้นในถุงไดแอไลซ์ด้วย CM-cellulose จนสารละลายในถุงไดแอไลซ์เหลือเพียงเล็กน้อย นำไปไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำไปหาแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีนและทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE และแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR

8.3 โดยคอลัมน์ Superdex 200 HR

ล้างและปรับคอลัมน์ Superdex 200 HR (1 x 40 เซนติเมตร) ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 24 มิลลิลิตร ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC (fast protein liquid chromatography) ซึ่งปรับคอลัมน์ให้สมดุลย์ก่อนด้วย TB แล้วเติมสารละลายเอนไซม์เข้มข้นปริมาตร 500 ไมโครลิตร (13.97 มิลลิกรัม) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์

ทำการรวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิทีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น แล้วไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE และนำสารละลายที่ได้ไปแยกต่อด้วยการทำ preparative PAGE

8.4 โดย Preparative PAGE

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่แยกได้จากคอลัมน์ Superdex 200 HR ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (492 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ตามวิธีการข้อ 7.3 โดยตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งทราบได้จากการทดลองในวิธีการข้อ 6.6 จากนั้นทำการชะเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ออกจากชิ้นเจล โดยนำชิ้นเจลที่ต้องการใส่ในถุงไดแอไลซ์ แล้วนำไปวางตามขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอน ซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA เมื่อครบ 18 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดแอไลซ์ ทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีน หาแอคทิวิทีและทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยวิธี nondenaturing PAGE

9. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนส บริสุทธิ์

9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE

หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ใน SDS-PAGE ตามวิธีการข้อ 7.2 โดยการทำควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ myosin (M_r 203,646) β-galactosidase (M_r 116,134) BSA (M_r 92,266) ovalbumin (M_r 50,400) carbonic anhydrase (M_r 36,800) soybean trypsin inhibitor (M_r 28,920) lysozyme (M_r 20,081) และ aprotinin (M_r 6,936) หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสและย้อมโปรตีนแล้ว วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่า R_f ไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนสได้

9.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน

หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยใช้คอลัมน์ Superdex 200 HR (1 x 40 เซนติเมตร) ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 24 มิลลิลิตร ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง FPLC ซึ่งปรับคอลัมน์ให้สมดุลย์ก่อนด้วย TB แล้วเติมสารละลายเอนไซม์เข้มข้นปริมาตร 500 ไมโครลิตร บลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, M_r 2,000,000) $K_2Cr_2O_7$ (M_r 294) และโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ เฟอร์ริติน (ferritin, M_r 440,000) คาทาเลส (catalase, M_r 232,000) อัลโดเลส (aldolase, M_r 158,000) และ BSA (M_r 67,000) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจล (void volumn, V_o) จากค่าปริมาตรชะของบลูเด็กซ์แตรนที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และปริมาตรทั้งหมด (total volumn, V_t) ของคอลัมน์จากค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A 280 หาปริมาตรชะ (elution volumn, V_e) ของแต่ละโปรตีน แล้วคำนวณหาค่า distribution coefficient (K_{av}) ของโปรตีนแต่ละชนิดจากสมการ

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

นำค่าที่ได้เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน และคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

9.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ ในสารผสมปฏิกิริยาตามวิธีการข้อ 5 ที่อุณหภูมิ 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 และ 90 °ซ นาน 15 นาที แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 5

9.4 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ในสารผสมปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH แตกต่างกันในช่วง 3-11 โดยใช้ 0.1 M sodium acetate ในช่วง pH 3-6 0.1 M Tris-HCl ในช่วง pH 6-9 และ 0.1 M glycine-NaOH ในช่วง pH 9-11 แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 5

9.5 การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

นำเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 40, 45, 50, 55,

60, 70 และ 80 °ซ นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปหาแอคทิวิตี ตามวิธีการข้อ 5 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ซึ่งเก็บไว้ที่ 0 °ซ

9.6 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสต่อสับสเตรท โดยใช้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำปฏิกิริยากับลามินารินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 7.0 mg/ml จากนั้นนำไปทดลองต่อตามวิธีการข้อ 5 แล้วคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า 1/V และ1/[S]

10. การศึกษาระดับแอคทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ต่อการฉีดแบคทีเรียหรือไวรัส

ศึกษาผลของการฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรียและไวรัสต่อไปนี้ที่มีต่อระดับแอคทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ได้แก่แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* แบบ active และ inactive แบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคกุ้ง *E. coli* และ *V. cholerae* และไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (WSSV) โดยทำการฉีดจุลชีพเหล่านี้ในกุ้งที่คัดขนาดเท่า ๆ กัน ด้วยปริมาณเซลล์จุลชีพเท่ากัน โดยใช้ปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ระดับเลคตินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (จากวิทยานิพนธ์ปริญญาโทของนางสาวปิ่นนภา ลิ่มพานิชที่กำลังดำเนินการ) เป็นตัวกำหนดปริมาณเชื้ออื่น ๆ

10.1 การเตรียมแบคทีเรีย

10.1.1 *V. harveyi*

แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดลองคือ *V. harveyi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tryptic soy agar ที่มี 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารเหลว (tryptic soy broth, TSB) เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นำเชื้อไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ หรือเลี้ยงบน tryptic soy agar ที่มี 1.5 % NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) นำไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตะกอนสามครั้ง และเตรียมแบคทีเรียในน้ำเกลือให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.6-2.0 หน่วย นับจำนวนโคโลนี (colony) ให้อยู่ในช่วง $5x10^{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ฉีดกุ้งต่อไป

ทำให้ *V. harveyi* inactive โดยนำสารแขวนลอย *V. harveyi* active ที่มีปริมาณเชื้อ $5x10^{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่

อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วแขวนลอยตะกอนแบคทีเรียใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4-0.15 M NaCl (TBS) ที่มี 0.1% thimerosal บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ค้างคืนและทำการล้างตะกอนแบคทีเรียในน้ำเกลือและละลายกลับให้มีปริมาตรเท่ากับเริ่มต้น เก็บไว้ที่ 4 °ซ เพื่อใช้ฉีดกุ้งต่อไป

10.1.2 *V. cholerae*

แบคทีเรีย *V. cholera*e ที่ใช้ในการทดลอง ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 14-16 ชั่วโมง แล้วทำต่อเช่นเดียวกับ *V. harveyi* ที่ active

10.1.3 *E. coli*

แบคทีเรีย *E.coli* ที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB หรือ Luria-Bertani ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 14-16 ชั่วโมง แล้วทำต่อเช่นเดียวกับ *V. harveyi* ที่ active

10.2 การเตรียมไวรัส WSSV

WSSV ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งมีวิธีการเตรียม stock WSSV โดยดัดแปลงจากกิจการ ศุภมาตย์และคณะ (2542) คือ ตัดเอาเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก หัวใจ ผิวใต้เปลือกและต่อมน้ำเหลืองของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV มาบดให้ละเอียดใน TBS ในอัตราส่วน 1: 2 (น้ำหนักเนื้อเยื่อ: ปริมาตร TBS) แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บสารละลายส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอนเพื่อกำจัดแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนออกไป แล้วเก็บ WSSV ไว้ที่ -70 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้

WSSV ที่ใช้ฉีดกุ้งเตรียมโดยเจือจางเชื้อ WSSV จากที่กล่าวข้างต้นให้มีความเข้มข้น $1x10^{-3}$ เท่าใน TBS เก็บไว้ที่ 4 °ซ เพื่อใช้ฉีดกุ้งต่อไป

10.3 การวัดระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในกุ้งที่ฉีดด้วยจุลชีพชนิดต่าง ๆ

เลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในถังพลาสติคกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกุ้งดังนี้ ล้างถังฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อปริมาตรประมาณครึ่งถัง ลงในถัง ให้อากาศตลอด เวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วนำกุ้งตัวผู้ที่คัดขนาดใกล้เคียงกันซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 30-40 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 4-5 ตัว โดยให้อาหารทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถังประมาณ 1 สัปดาห์ โดยสังเกตว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* (จากข้อ 10.1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นชุดควบคุม

ฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ เก็บฮีโมลิมฟ์ของกุ้งก่อนการฉีด (เวลา 0 ชั่วโมง) และของกุ้งหลังการฉีดทุก ๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบ 12 ชั่วโมง ดูดฮีโมลิมฟ์และเก็บตับเตรียมเป็นสารสกัด แล้ววัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดตับ เปรียบเทียบระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อและชุดควบคุม รวมทั้งนำตับของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม ไปทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธีตรวจสอบการเรืองแสงของเชื้อในที่มืดโดยดัดแปลงวิธีของ Jiravanichpaisal และ Miyazaki (1994) ซึ่งทำโดยชั่งน้ำหนักตับ 0.1 กรัม นำไปบดและเจือจางในสารละลาย 1.5% NaCl ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) ที่มี 1.5% NaCl แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นดูการเรืองแสงสีเขียวของเชื้อในที่มืด

สำหรับเชื้อชนิดอื่น ๆ คือ *V. harveyi* แบบ inactive, *V. cholera*e และ *E. coli* ทำเช่นเดียวกับ *V. harveyi* แบบ *active* คือฉีดเชื้อปริมาณ $5x10^9$ เซลล์ ส่วนเชื้อ WSSV ใช้ปริมาณ $1x10^{-5}$ เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ เก็บฮีโมลิมฟ์ของกุ้งก่อนการฉีด (เวลา 0 ชั่วโมง) และของกุ้งหลังการฉีดทุก ๆ 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบ 12 ชั่วโมงดูดฮีโมลิมฟ์และเก็บตับเตรียมเป็นสารสกัดแล้ววัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดตับเปรียบเทียบระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ทั้งสองชนิดของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อและชุดควบคุม

10.3 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในข้อ 10.2 โดยใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (T-Test) จากโปรแกรม Simple Interactive Statistical Analysis (SISA) (Steel and Torrie, 1980)