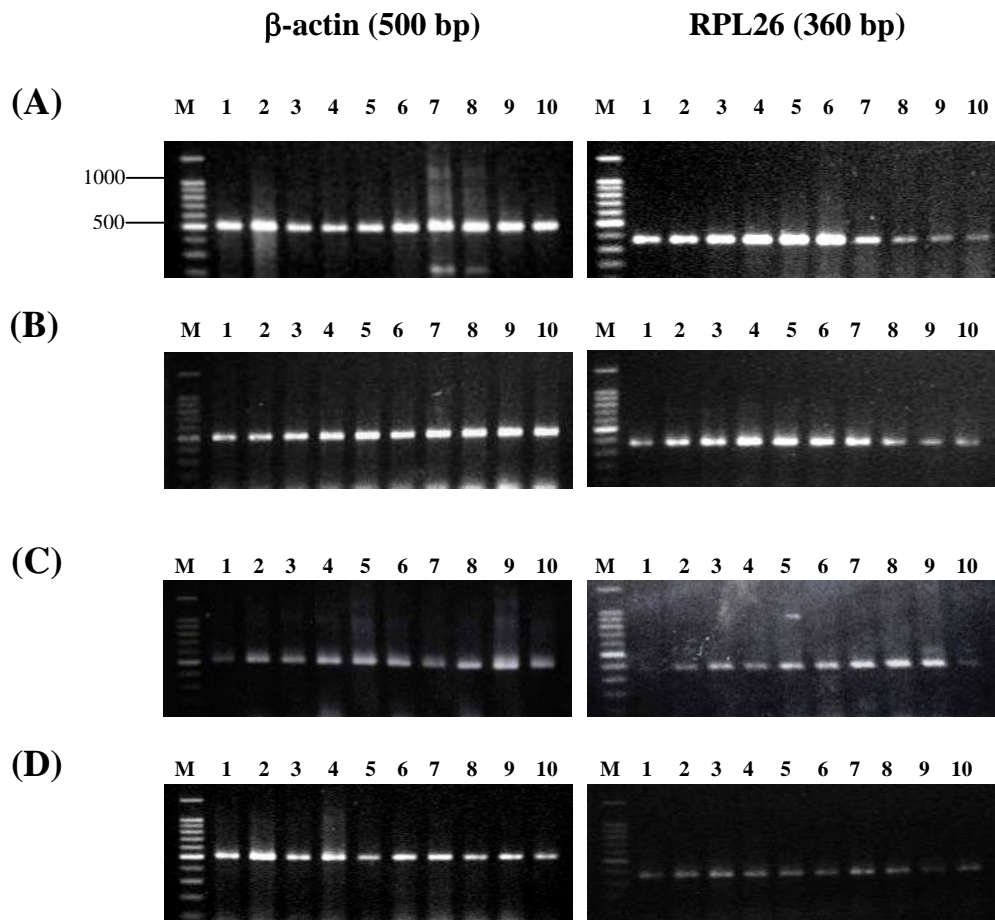


### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

##### 1. การศึกษาผลของสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ต่อการแสดงออกของ ยีน Ribosomal Protein L26 (RPL26)

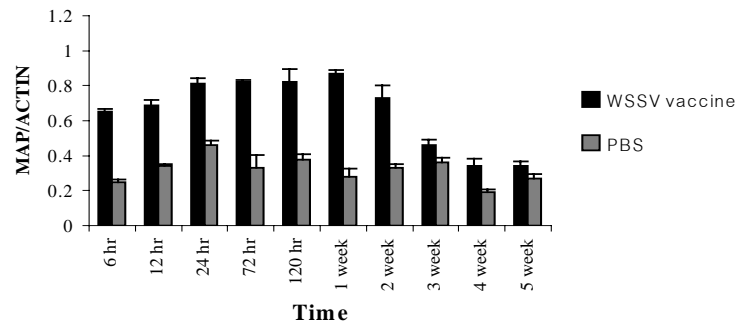
กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ซึ่งได้รับสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อ่อนกำลัง (inactivated WSSV) เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่อ่อนกำลัง (inactivated *V. harveyi*) และ สาร fucoidan โดยวิธีการฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน RPL26 ด้วยวิธี RT-PCR โดยการใช้ยีน  $\beta$ -actin เป็น internal standard พบว่ากลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย inactivated WSSV มีการแสดงออกของยีน RPL26 เพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมง หลังได้รับการกระตุ้น และเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 3 เท่า ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับการกระตุ้นไป 1 สัปดาห์ ระดับการแสดงออกยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมจนถึงสัปดาห์ที่ 2 แล้วจึงค่อย ๆ ลดลงโดยมีระดับการแสดงออกของยีน RPL26 ลดลงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 5 ดังรูปที่ 8(A) และ 9(A) สำหรับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย inactivated *V. harveyi* (IVH) พบการแสดงออกของยีน RPL26 เพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง หลังได้รับการกระตุ้น โดยมีระดับการแสดงออกสูงชันกว่ากลุ่มควบคุมเป็น 3 เท่า ( $p < 0.05$ ) ระดับการแสดงออกยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมจนถึงสัปดาห์ที่ 2 และลดลงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 5 ดังรูปที่ 8(B) และ 9(B) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร fucoidan มีระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และมีระดับการแสดงออกสูงสุดปรากฏที่ 2 สัปดาห์ หลังได้รับการกระตุ้น โดยเพิ่มขึ้นเป็น 4.8 เท่า ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วจึงลดระดับการแสดงออกลงอย่างมากในสัปดาห์ที่ 5 ดังรูปที่ 8(C) และ 9(C)



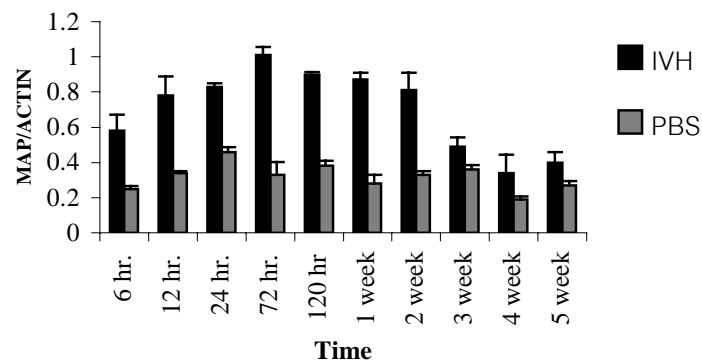
รูปที่ 8 การแสดงออกของยีน RPL26 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย inactivated WSSV (A), IVH (B), fucoidan (C) and PBS (D) โดยใช้การแสดงออกของยีน  $\beta$ -actin เป็น internal control แถว M: 100 bp DNA marker แถว 1-10: แถบดีเอ็นเอจากการทำ RT-PCR ของยีน RPL26 หลังได้รับการฉีดกระตุ้นที่ 6, 12, 24, 72, 120 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ ตามลำดับ (n=3)

Figure 8 Expression of ribosomal protein L26 (RPL26) stimulated by inactivated WSSV (A), IVH (B), fucoidan (C) and PBS (D) and the expression of the  $\beta$ -actin gene as an internal control. Lane M; 100 bp DNA marker, lane 1-10: RT-PCR products of the RPL26 after stimulation by intramuscular vaccination 6 h, 12 h, 24 h, 72 h, 120 h, 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks and 5 weeks respectively. n=3

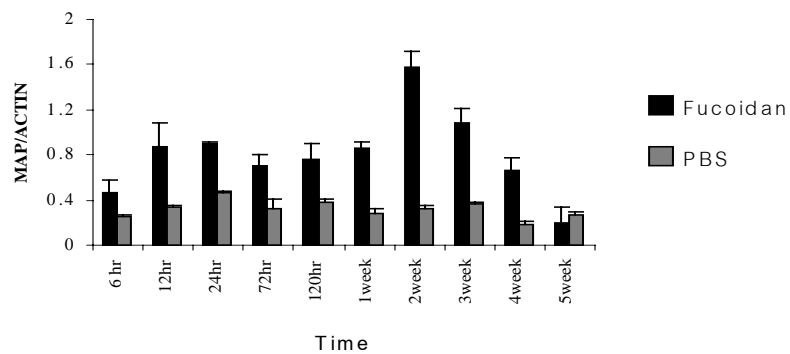
(A)



(B)



(C)

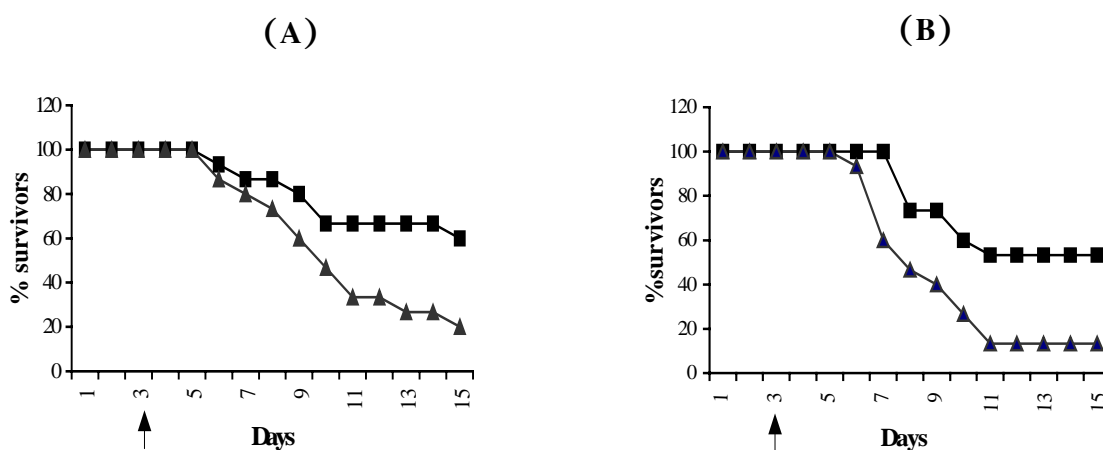


รูปที่ 9 ระดับการแสดงออกของยีน RPL26 (ค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD, จำนวน 3 ซ้ำ) ต่อ ยีน  $\beta$ -actin เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย inactivated WSSV (A) IVH (B) และ fucoidan (C) โดยใช้กลุ่มซึ่งฉีดด้วย PBS เป็นกลุ่มควบคุม

Figure 9 The ratio of expression levels (mean  $\pm$  SD, n=3) of RPL26 Gene to  $\beta$ -actin (internal control) when inactivated WSSV (A), induced with IVH (B), fucoidan (C) and PBS used as control.

## 2. การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH โดยวิธีฉีด

กุ้งกุลาดำ น้ำหนัก 10-15 กรัม ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสาร IVH ปริมาณ 4.5 ไมโครกรัม หลังได้รับการกระตุ้นไป 72 ชั่วโมง จึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ากลุ่มซึ่งได้รับการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $7 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น มีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 60% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 20% ดังรูปที่ 10(A) โดยมีค่า RPS เป็น 50% ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 11 ในขณะที่กลุ่มซึ่งได้รับการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น มีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 53.33% และกลุ่มควบคุมมีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 13.33% ดังรูปที่ 10(B) โดยมีค่า RPS เป็น 46% ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 11



รูปที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสาร IVH และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $7 \times 10^{-6}$  (A) และ  $9 \times 10^{-6}$  (B) ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

Figure 10 Percentage of survivors of shrimps after being injected intramuscularly with IVH and challenged by  $7 \times 10^{-6}$  (A)  $9 \times 10^{-6}$  (B) WSSV. (■, injected with IVH, ▲, injected with PBS, → challenged by WSSV )

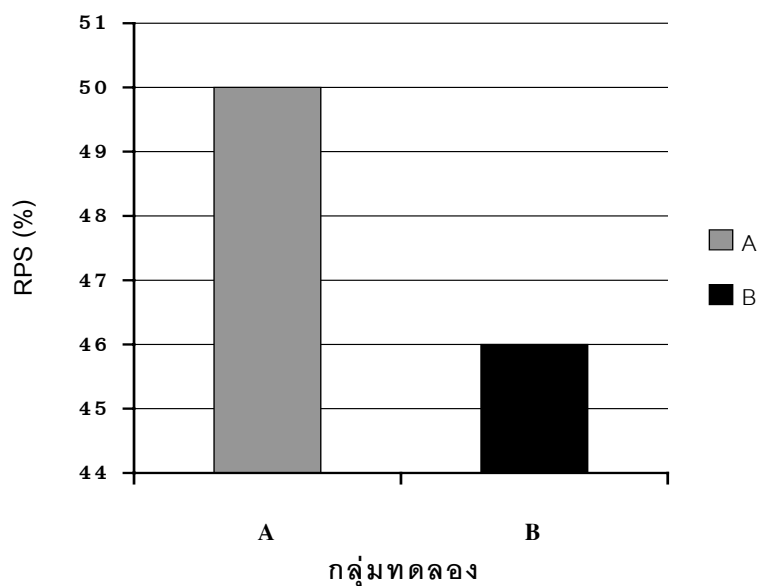
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสาร IVH

Table 4 Percentage of mortality and RPS of shrimp after being injected intramuscularly with IVH and challenged by dilution of WSSV

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
IVH <sup>a</sup>	40	50
PBS <sup>a</sup>	80	
IVH <sup>b</sup>	47	46
PBS <sup>b</sup>	87	

<sup>a</sup> ฉีดด้วยสารละลาย WSSV ความเข้มข้น  $7 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

<sup>b</sup> ฉีดด้วยสารละลาย WSSV ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น



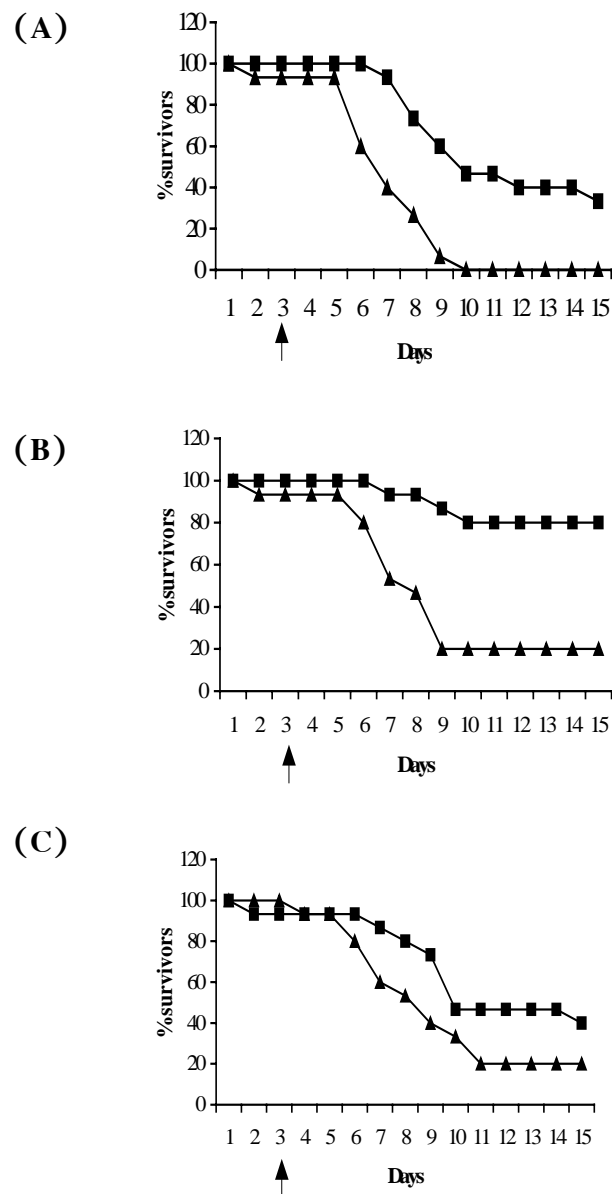
รูปที่ 11 แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสาร IVH และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วย เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $7 \times 10^{-6}$  (A) และ  $9 \times 10^{-6}$  (B) ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

Figure 11 Relative percent survival (RPS) of shrimps after being injected intramuscularly with IVH and challenged by  $7 \times 10^{-6}$  (A)  $9 \times 10^{-6}$  (B) WSSV.

### 3. การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH โดยวิธีกิน

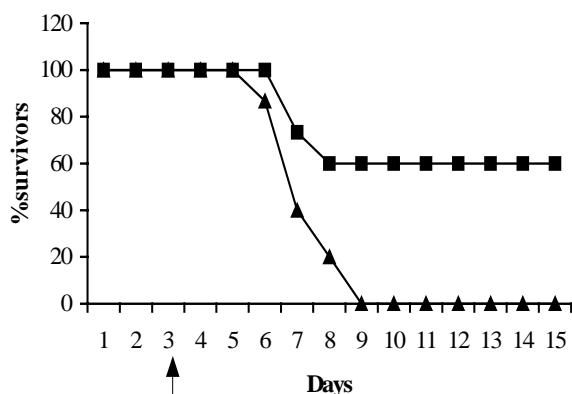
จากการทดลองให้อาหารซึ่งผสมสาร IVH แก่กึ่งกุลาดำปริมาณ 225 300 และ 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน โดยกึ่งจะรับประทานอาหารดังกล่าวตลอดการทดลอง หลังจากกึ่งแต่ละกลุ่มได้รับอาหารไปเป็นระยะเวลา 3 วัน จึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น พบว่ากึ่งมีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 33.33% สำหรับกลุ่มซึ่งได้รับอาหารที่ผสมสาร IVH 225 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน อัตราการมีชีวิตรอดเป็น 80% สำหรับกลุ่มซึ่งได้รับอาหารที่ผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 40% สำหรับกลุ่มซึ่งได้รับอาหารที่ผสมสาร IVH 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับอาหารที่ไม่มีการผสมสาร IVH มีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 0% 20% และ 20% ตามลำดับ ดังรูปที่ 12 โดยมีค่า RPS ในแต่ละกลุ่มเป็น 33% 75% และ 34% ตามลำดับ ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 15

เมื่อทำการทดสอบซ้ำ กลุ่มซึ่งได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น เป็น 60% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 0% ดังรูปที่ 13 โดยมีค่า RPS เป็น 60% ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 16 นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบกับกึ่งกลุ่มซึ่งได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน โดยทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อจำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 จะให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ในวันที่ 3 หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH และ ครั้งที่ 2 จะให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ในวันที่ 15 หลังได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ครั้งที่ 1 พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของกึ่งซึ่งได้รับเชื้อครั้งแรกเป็น 60% ในขณะที่กลุ่มควบคุมเป็น 0% และเมื่อกึ่งซึ่งรอดตายจากการได้รับเชื้อครั้งแรก ได้รับเชื้อซ้ำอีกครั้งพบว่าอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 20% จากปริมาณเริ่มต้น หรือคิดเป็น 33.33% ของกึ่งที่รอดตายจากการได้รับเชื้อครั้งแรก ดังรูปที่ 14 โดยมีค่า RPS เป็น 20% ดังตารางที่ 6 และรูปที่ 16



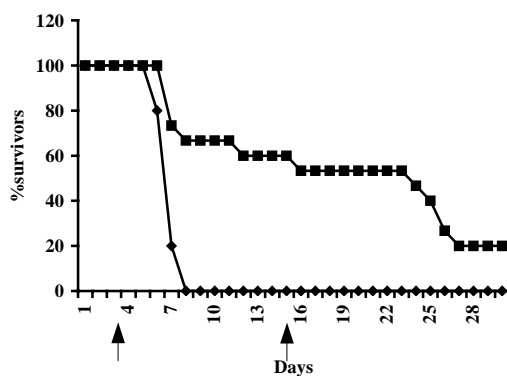
รูปที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 225(A) 300(B) และ 375(C) มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

Figure 12 Percentage of survivor of shrimp weighing of 10-15 g were fed with IVH 200 (A), 300(B) and 375(C) mg/kg body weight/day and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV. (■, fed with IVH, ▲, control, → challenged by WSSV)



รูปที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

Figure 13 Percentage of survivor of shrimp weighing of 10–15 g were fed with IVH 300mg/kg body weight/day and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV. (■, fed with IVH, ▲, control, → challenged by WSSV )



รูปที่ 14 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น จำนวน 2 ครั้ง

Figure 14 Percentage of survivor of shrimp weighing of 10–15 g were fed with IVH 300mg/kg body weight/day and two challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV. (■, fed with IVH, ▲, control, → challenged by WSSV )



ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณต่าง ๆ

Table 5 Percentage of mortality and RPS of shrimp after fed with IVH and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
IVH <sup>a</sup>	67	33
Control	100	
IVH <sup>b</sup>	20	75
Control	80	
IVH <sup>c</sup>	53	34
Control	80	

<sup>a</sup> ได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 225 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

<sup>b</sup> ได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

<sup>c</sup> ได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

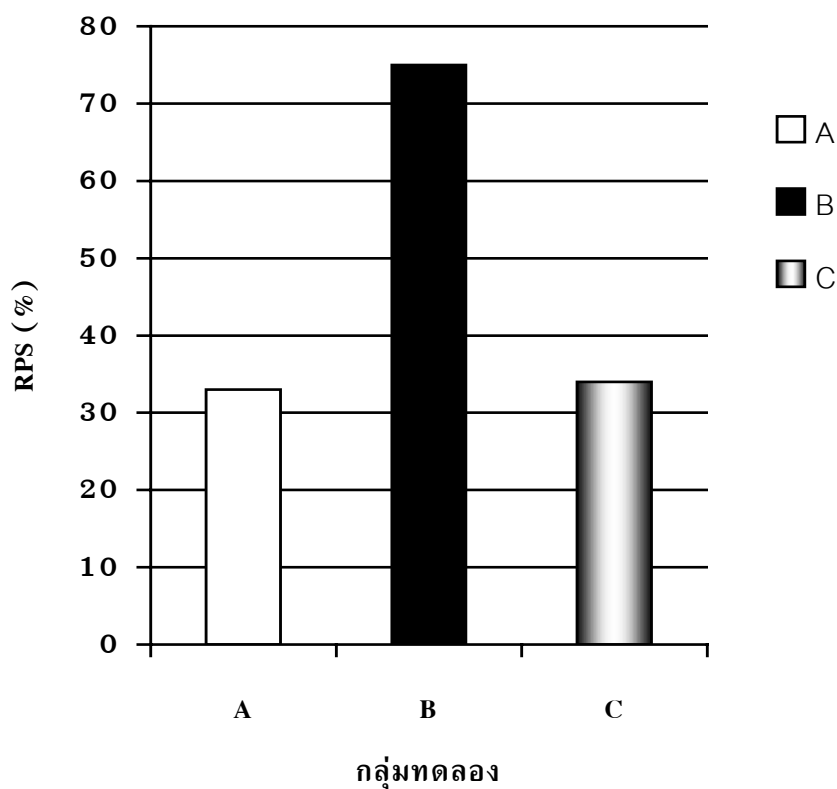
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH

Table 6 Percentage of mortality and RPS of shrimp after fed with IVH and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
IVH <sup>a</sup>	40	60
Control	100	
IVH <sup>b</sup>	80	20
Control	100	

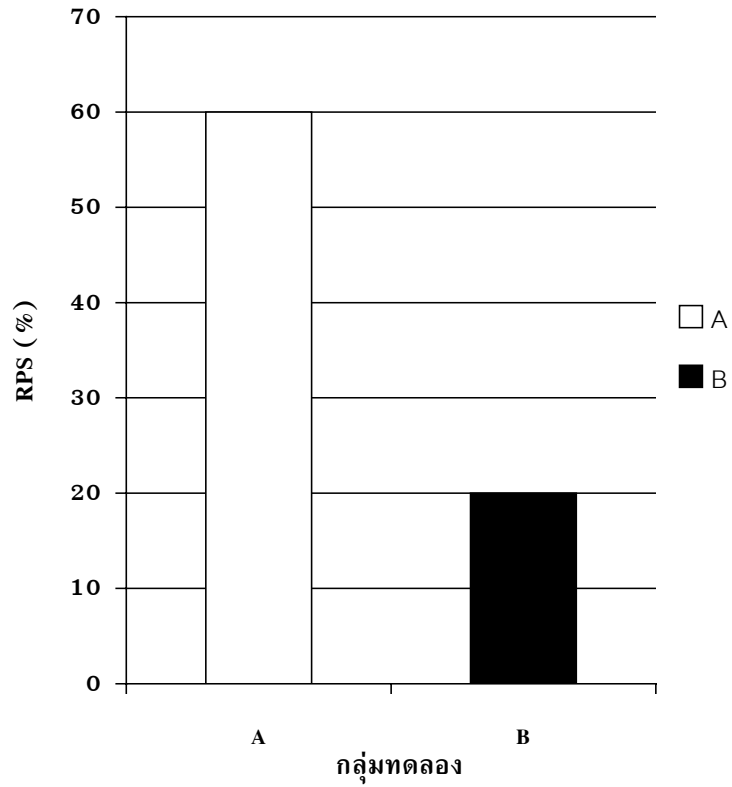
<sup>a</sup> ฉีดด้วยสารละลาย WSSV ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ในวันที่ 3 หลังได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

<sup>b</sup> ฉีดด้วยสารละลาย WSSV ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ในวันที่ 3 และ 15 หลังได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน



รูปที่ 15 แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 225(A) 300(B) และ 375(C) มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

Figure 15 Relative percent survival (RPS) of shrimps after fed with IVH 200(A), 300(B) and 375(C) mg/kg body weight/day and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV.

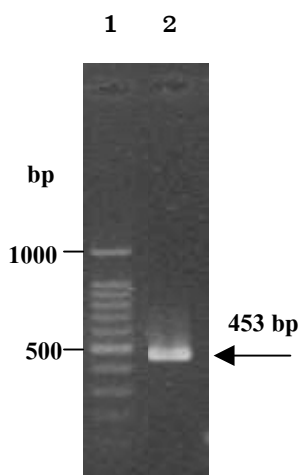


รูปที่ 16 แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น จำนวน 1 ครั้ง (A) และ 2 ครั้ง (B)

Figure 16 Relative percent survival (RPS) of shrimps after fed IVH 300mg/kg body weight/day and one (A) two (B) challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV.

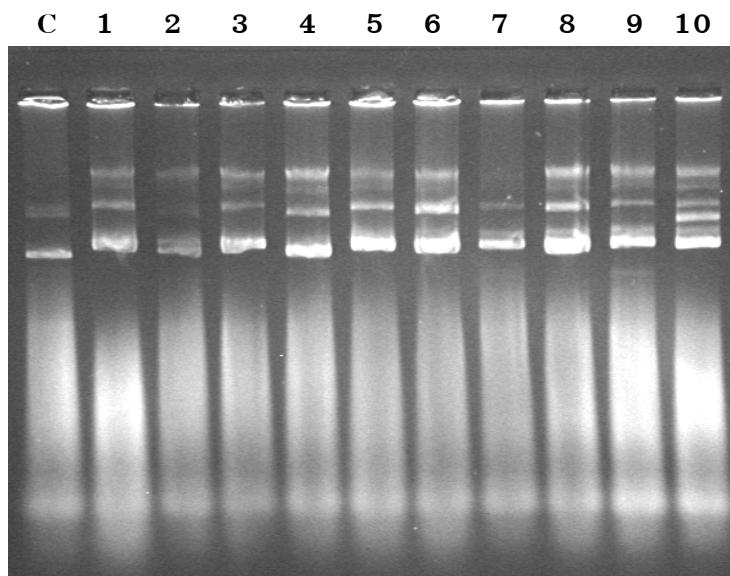
#### 4. การเตรียมดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

จากการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ยีน RPL26 โดยใช้ primer MacroFBA และ MacroRXH ได้ชิ้นยีนขนาดประมาณ 453 bp ซึ่งมีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น BamHI และ XhoI ดังรูปที่ 17 ทำการเชื่อมยีน RPL26 เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 F' ย่อยยีน RPL26 ออกจากพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ XhoI ทำการเชื่อมยีน RPL26 เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 F' เมื่อคัดเลือกโคลนแบบสุ่ม ดังรูปที่ 15 พบโคลนซึ่งมียีน RPL26 จำนวน 9 โคลน จาก 10 โคลน ดังรูปที่ 18 และเมื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน RPL26 บนพลาสมิดเวกเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 F' โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของธนาคารยีนพบว่ามีความเหมือนกับยีน RPL26 (Accession no. AY680836) (ภาคผนวก ข) ทำการย้ายดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อใช้ในการเตรียมโปรตีน RPL 26 ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 17 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน RPL26 จากการสังเคราะห์โดยวิธี PCR มีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น BamHI และ XhoI วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis แถวที่ 1 : 100 bp DNA ladder แถวที่ 2 แถบดีเอ็นเอยีน RPL26

Figure 17 Electrophoresis in a 1.5% agarose gel of RPL26 (PCR product) containing restriction site of BamHI and XhoI. Lane 1: 100 bp DNA ladder  
Lane 2: PCR product of RPL26



รูปที่ 18 แสดงแถบดีเอ็นเอของการคัดเลือกโคลนซึ่งมียีน RPL26 บนพลาสมิดเวกเตอร์ pGEX-4T-1 วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis  
 แถวที่ C: พลาสมิด pGEX-4T-1 (Control)  
 แถวที่ 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10: แถบดีเอ็นเอของโคลน pGEX- RPL26  
 แถวที่ 4: แถบดีเอ็นเอของโคลน pGEX-4T-1 (ไม่มียีน RPL26)

Figure 18 Electrophoresis in a 1.5% agarose gel of transformant.

Lane C: pGEX-4T-1 (Control)

Lane 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10: pGEX- RPL26

Lane 4: pGEX-4T-1

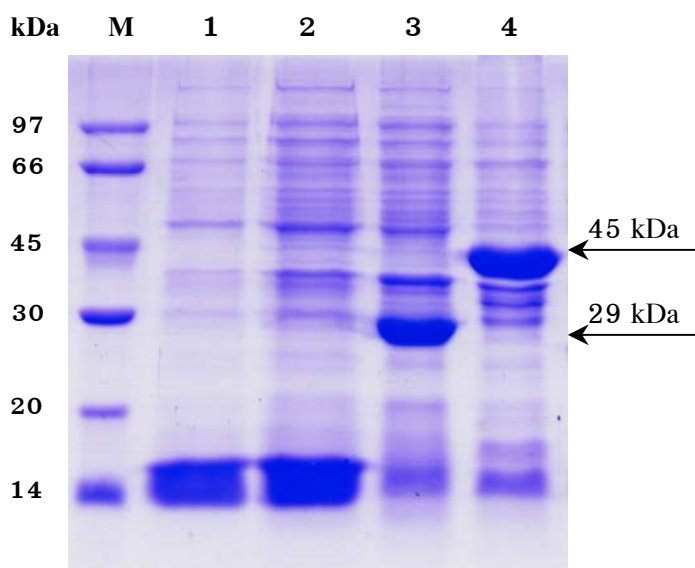
## 5. การเตรียมโปรตีนลูกผสม RPL26 จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

### 5.1 การกระตุ้นการสร้างโปรตีน GST และ GST-RPL26

การกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-RPL26 จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้โปรตีน GST ที่สร้างจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pGEX ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าโปรตีน GST-RPL26 ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน โดยเป็นน้ำหนักของโปรตีน GST ประมาณ 29 กิโลดาลตัน และเป็นน้ำหนักของโปรตีน RPL26 ประมาณ 16 กิโลดาลตัน ดังรูปที่ 19 โปรตีนที่ผลิตได้ในรูปของโปรตีนรวม (total protein) นำไปทำการไตอะไลซิสในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการป้องกันโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งก่าดำต่อไป

### 5.2 การทำบริสุทธิ์ โปรตีน GST และ GST-RPL26

โปรตีน GST-RPL26 และ GST ที่ได้จากการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกจากข้างต้น นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการการจับแบบจำเพาะ (affinity) ระหว่าง glutathione sepharose (ligand) กับโปรตีน glutathione s-transferase (GST) ซึ่งภายหลังจากการชะโปรตีนออกมาจะได้โปรตีนบริสุทธิ์ ดังรูปที่ 20 โปรตีนหลังการทำบริสุทธิ์นำมากำจัด SDS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ elution buffer โดยการแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง SDS แล้วนำไปหมუნเหวี่ยงให้เกิดการแยกชั้นระหว่าง SDS กับสารละลายโปรตีน นำส่วนของสารละลายโปรตีนที่ได้มาไตอะไลซิสที่อุณหภูมิห้องอีกครั้งเพื่อกำจัด SDS ส่วนที่ตกค้าง จากนั้นจึงนำไปไตอะไลซิสในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 21 โดยได้ความเข้มข้นของโปรตีน GST-RPL26 และ GST บริสุทธิ์ หลังการไตอะไลซิสแล้ว เท่ากับ 0.96 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ 1.26 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จะนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิสในขั้นตอนต่อไป

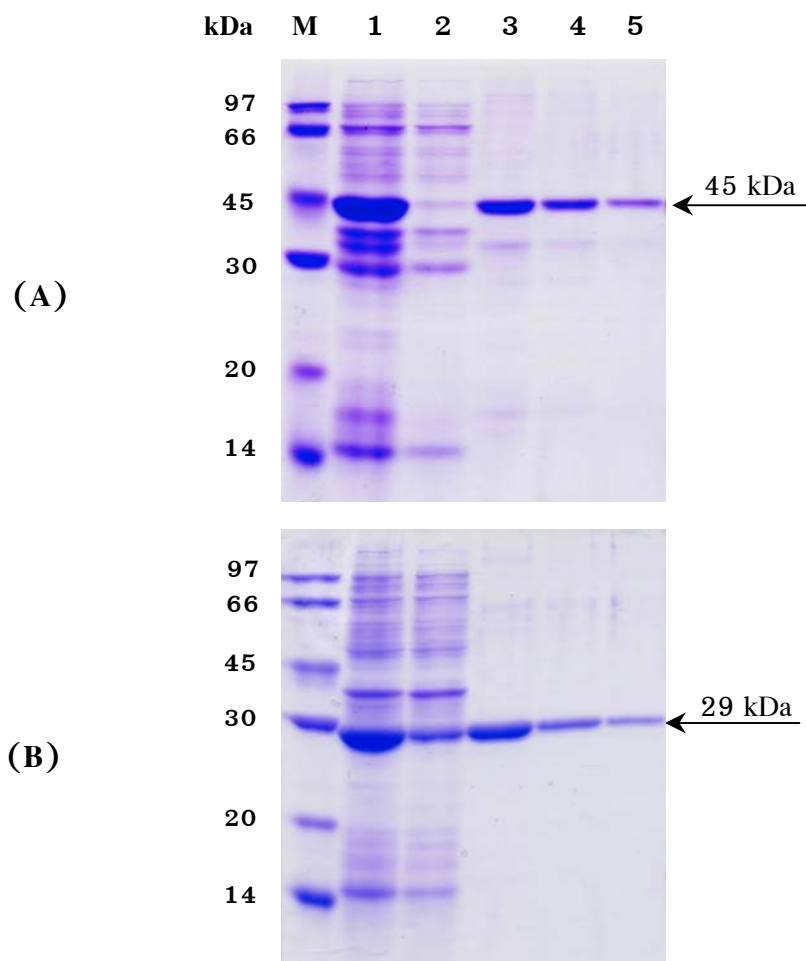


รูปที่ 19 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST และ GST-RPL26 ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี เอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue

- แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน
- แถวที่ 1 โปรตีนก่อนการชักนำการสร้างโปรตีน โคลน pGEX
- แถวที่ 2 โปรตีนก่อนการชักนำการสร้างโปรตีน โคลน pGEX-RPL26
- แถวที่ 3 โปรตีนหลังการชักนำการสร้างโปรตีน โคลน pGEX
- แถวที่ 4 โปรตีนหลังการชักนำการสร้างโปรตีน โคลน pGEX-RPL26

Figure 19 Coomassie stained SDS-PAGE gel (12%) of GST and GST-RPL26 proteins expression in *E. coli* (BL21)

- Lane M: Low molecular weight standard marker
- Lane 1: non-expression of GST protein from clone pGEX
- Lane 2: non-expression of GST-RPL26 protein from clone pGEX-RPL26
- Lane 3: GST protein expression from clone pGEX
- Lane 4: GST-RPL26 protein expression from clone pGEX-RPL26



รูปที่ 20 การวิเคราะห์โปรตีน GST -RPL26(A) และ GST (B) บริสุทธิ์ ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี เอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 โปรตีนก่อนการทำบริสุทธิ์

แถวที่ 2 โปรตีนส่วนที่ไม่จับกับ bead

แถวที่ 3-5 โปรตีนบริสุทธิ์ที่ถูกชะออกจากการจับกับ bead ( $E_1$ - $E_3$ )

Figure 20 Coomassie stained SDS-PAGE gel (12%) of purified GST (A) and GST-RPL26 (B) proteins

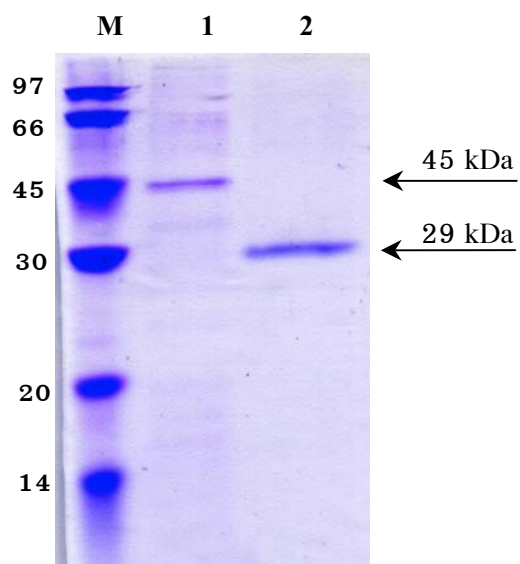
Lane M: Low molecular weight standard marker

Lane 1: total proteins

Lane 2: proteins non-bind bead



Lane 3: purified protein (eluant fraction no. 1-3)



รูปที่ 21 แสดงโปรตีน GST และ GST-RPL26 บริสุทธิ์ หลังการกำจัดเอสดีเอสและไดอะไลซิส วิเคราะห์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี เอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue

- แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน
- แถวที่ 1 โปรตีน GST-RPL26 (45 kDa)
- แถวที่ 2 โปรตีน GST (29 kDa)

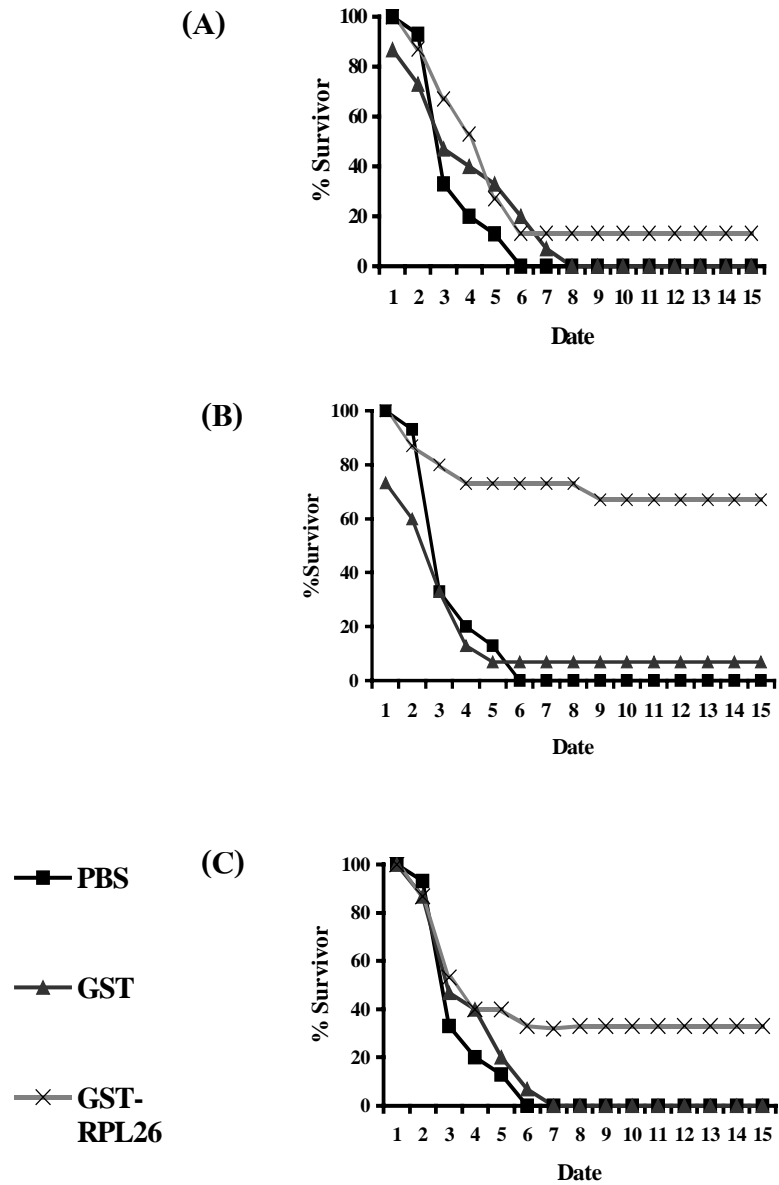
Figure 21 Coomassie stained SDS-PAGE gel (12%) of purified GST and GST-RPL26 proteins after removed SDS and dialysis

- Lane M: Low molecular weight standard marker
- Lane 1: GST-RPL26 protein (45 kDa)
- Lane 2: GST protein (29 kDa)

## 6. การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน RPL 26 ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดำ (*P. monodon*)

### 6.1 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูดำเมื่อได้รับโปรตีนลูกผสม RPL26

จากการทดลองให้โปรตีนลูกผสม GST-RPL26 โดยให้ในลักษณะโปรตีนรวม (total proteins) ซึ่งผ่านการทำไดอะไลซิสแล้วที่ความเข้มข้น 4, 16 และ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว โดยวิธีฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อของกิ้งกูดำ น้ำหนัก 10-15 กรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยโปรตีน GST ที่ความเข้มข้น 4, 16 และ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัวเช่นกัน และกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วย PBS, pH 7.4 โดยภายหลังจากการฉีดสารในแต่ละกลุ่ม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงนำกิ้งมาฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น และบันทึกอัตราการมีชีวิตรอดเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่ากลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน GST-RPL 26 ความเข้มข้น 4, 16 และ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว มีอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ 13%, 67% และ 33% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับโปรตีน GST ความเข้มข้น 4, 16 และ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว และกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับโปรตีน มีอัตราการมีชีวิตรอดเป็น 0%, 7%, 0% และ 0% ตามลำดับ ดังรูปที่ 22 โดยมีค่า RPS ในแต่ละกลุ่มเป็น 13% 64% และ 33% ตามลำดับ ดังตารางที่ 7 และรูปที่ 23



รูปที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้การฉีดด้วยโปรตีนลูกผสม ปริมาณ 4(A) 16(B) และ 32(C) ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

Figure 22 Percentage of survivor of shrimp weighing of 10-15 g were injected with recombinant protein 4(A), 16(B) and 32(C)  $\mu\text{g/g}$  body weight and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV.

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนลูกผสม

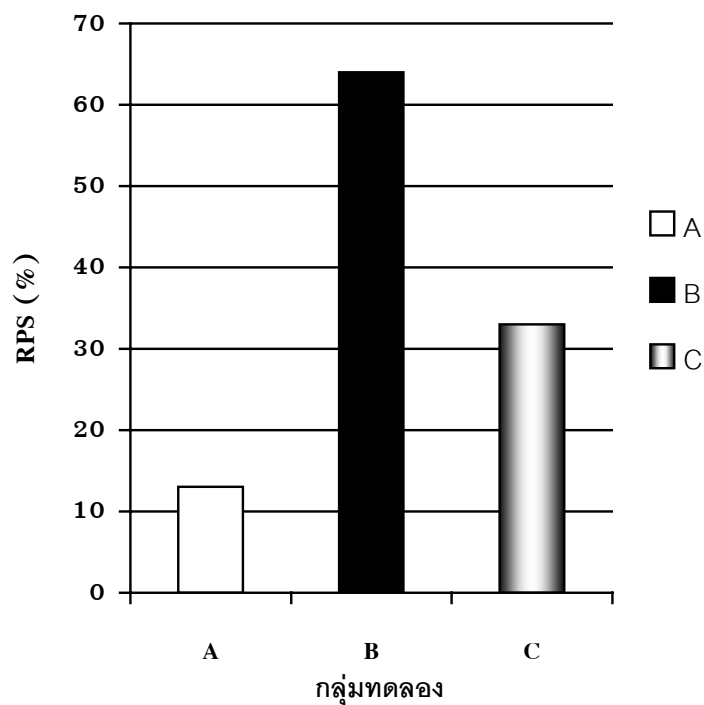
Table 7 Percentage of mortality and RPS of shrimp after intramuscular injection with recombinant protein and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV.

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม	RPS (%)
GST-RPL26 <sup>a</sup>	87	13
GST <sup>a</sup>	100	
PBS	100	
GST-RPL26 <sup>b</sup>	33	64
GST <sup>b</sup>	93	
PBS	100	
GST-RPL26 <sup>c</sup>	67	33
GST <sup>c</sup>	100	
PBS	100	

<sup>a</sup> ฉีดด้วยสารละลายโปรตีนรวม (total protein) ปริมาณ 4 ไมโครกรัม

<sup>b</sup> ฉีดด้วยสารละลายโปรตีนรวม (total protein) ปริมาณ 16 ไมโครกรัม

<sup>c</sup> ฉีดด้วยสารละลายโปรตีนรวม (total protein) ปริมาณ 32 ไมโครกรัม



รูปที่ 23 แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้การฉีดด้วยโปรตีน  
 ลูกลมสมปริมาณ 4(A) 16(B) และ 32(C) ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว และทดสอบ  
 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดง  
 ดวงขาวความเข้มข้น  $9 \times 10^{-6}$  ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

Figure 23 Relative percent survival (RPS) of shrimps injected with recombinant protein 4  
 (A), 16(B) and 32(C)  $\mu\text{g/g}$  body weight and challenged by  $9 \times 10^{-6}$  WSSV.

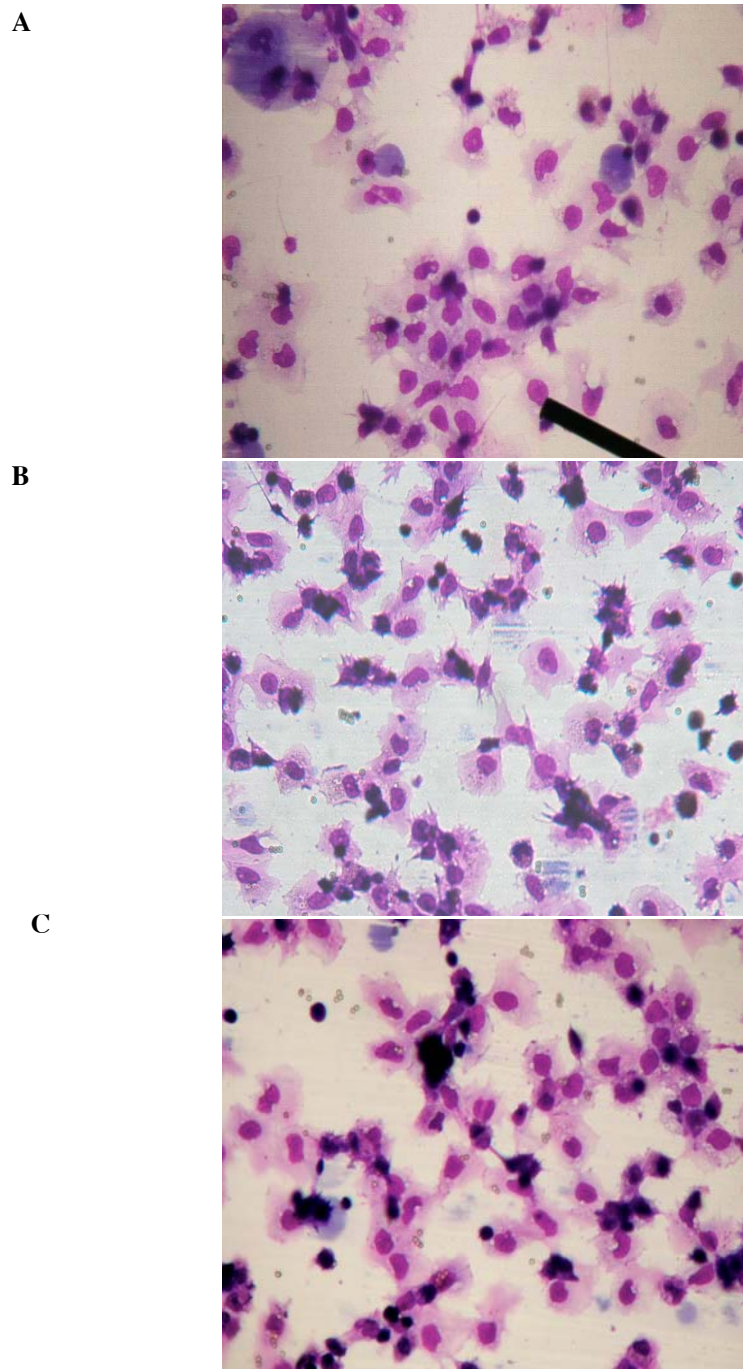
## 6.2 การศึกษาความว่องไวของฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis activity) ของเม็ดเลือดกึ่ง กุลาดำเมื่อได้รับโปรตีนลูกผสม RPL26 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการเตรียมโปรตีนลูกผสม GST-RPL26 และ GST บริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยทำการเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่งมาจำนวน 5 กลุ่มตัวอย่าง ( $n=5$ ) ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างมาจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกุลาดำจำนวนจำนวน 5 ตัว รวมกัน ซึ่งจากการบ่มโปรตีนที่ปริมาณต่าง ๆ กันจำนวน 3 ความเข้มข้น พบว่า ค่า Phagocytic index (PI) ของกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับโปรตีนเลยเป็น  $4.80 \pm 2.75$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับโปรตีน GST ปริมาณ 0.01, 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัม มีค่า PI เฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม เท่ากับ  $5.51 \pm 2.33$ ,  $9.26 \pm 3.19$  และ  $10.13 \pm 1.58$  ตามลำดับ สำหรับกลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน GST-RPL26 ปริมาณ 0.01, 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัม มีค่า PI เฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม เท่ากับ  $21.70 \pm 2.18$ ,  $14.29 \pm 4.08$  และ  $20.10 \pm 5.43$  ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า %Phagocytosis ของกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับโปรตีนเลยเป็น  $18.1 \pm 5.74$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับโปรตีน GST ปริมาณ 0.01, 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัม มีค่า %Phagocytosis เฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม เท่ากับ  $19.0 \pm 4.56$ ,  $25.9 \pm 4.46$  และ  $26.1 \pm 1.00$  ตามลำดับ สำหรับกลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน GST-RPL26 ปริมาณ 0.01, 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัม มีค่า %Phagocytosis เฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม เท่ากับ  $38.6 \pm 1.15$ ,  $30.7 \pm 5.42$  และ  $36.0 \pm 6.25$  ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับค่า ABPC ของแต่ละกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงดังตารางที่ 8 และลักษณะการเกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (เม็ดบีดเรืองแสง) แสดงดังรูปที่ 24

ตารางที่ 8 การศึกษาความว่องไวของกระบวนการฟาโกไซโตซิส ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ  
เมื่อได้รับโปรตีน GST และ GST-RPL26 บริสุทธิ์

Table 8 Phagocytic activity of shrimp haemocytes induced with purified GST and GST-RPL26 Proteins

ชนิดโปรตีน	ปริมาณ (ไมโครกรัม)	PI (Mean $\pm$ SD)	% Phagocytosis (Mean $\pm$ SD)	ABPC (Mean $\pm$ SD)
GST-RPL26	0.01	21.70 $\pm$ 2.18	38.6 $\pm$ 1.15	1.45 $\pm$ 0.09
GST-RPL26	0.05	14.29 $\pm$ 4.08	30.7 $\pm$ 5.42	1.52 $\pm$ 0.23
GST-RPL26	0.10	20.10 $\pm$ 5.43	36.0 $\pm$ 6.25	1.55 $\pm$ 0.20
GST	0.01	5.51 $\pm$ 2.33	19.0 $\pm$ 4.56	1.52 $\pm$ 0.19
GST	0.05	9.26 $\pm$ 3.19	25.9 $\pm$ 4.46	1.39 $\pm$ 0.17
GST	0.10	10.13 $\pm$ 1.58	26.1 $\pm$ 1.00	1.49 $\pm$ 0.21
control	-	4.80 $\pm$ 2.75	18.1 $\pm$ 5.74	1.42 $\pm$ 0.02



รูปที่ 24 แสดงการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (เม็ดบีดเรืองแสง) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับโปรตีน (A) กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับโปรตีน GST (B) และกลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน GST-RPL26 สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

Figure 24 Phagocytosis of shrimp haemocytes induced with non-purified protein (A) purified GST (B) and purified GST-RPL26 (C) proteins