บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	BDH
Acrylamid	Fluka
Ammoniumpersulfate	Fluka
Acetic acid	J.T. Baker
Absolute ethanol	BDH
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Brilliant blue R	Sigma
Bromphenol blue	Fluka
Chloroform	LAB-SCAN
Dithiothreitol (DTT)	USB
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck
Folin ciocalteus′s reagent	CARLO ERBA
Folmaldehyde	Merck
Glucose	Fluka
Glycerol	Fisher
Glycine	BDH
HEPES	Sigma
Hydrochloric acid	Merck
L-Cysteine	Sigma
L-fucose	Sigma
L-glutamine	Sigma

สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (ต่อ)

สารเคมี	**บริษัทที่ผลิต**
Mangnesium sulphate hydrated	CARLO ERBA
Magnesiumchloride-hexahydrat reinst	Merck
Medium 199	GIBCO BRL®
Methanol	LAB-SCAN
N,N′-methylene-bis-acrylamide	Merck
N,N,N′,N′Tetramethylethylene Diamine (TEMED)	Fluka
Nutrient Agar	Difco
Potassium acetate	Merck
Potassium chloride	Fluka
Potassium dihydrogenphosphate	Merck
Potassium sulphate	Merck
Sodium acetate	Merck
Sodium bicarbonate	BDH
Sodium chloride	Lab Scan
Sodium dihydrogen orthophosphate	BDH
Sodium hydrogen carbonate	BDH
Sodium hydroxide pellets	BDH
Sodium Lauryl sulphate	Aps Ajax Finechem
Sulfuric acid	Lab Scan
Triton X-100	USB
Tris base	Promega
Tryptone	Himedia
Yeast extract	USB

1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	Promega
Ampicilin	Sigma
AMV Reverse Transcriptase	Promega
Bam HI	Promega
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP)	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Glutathione sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences
Isopropyl β-D-thiogalacto-pyranosi (IPTG)	USB
Low Molecular Weight Calibration Kit	Amersham Biosciences
Lysozyme	Sigma
QIAprep® Miniprep Kit	QIAGEN
Random primer	Promega
Ribonuclease A	Sigma
Taq DNA polymerase	QIAGEN
TRIzol® reagent	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Promega
100 bp DNA ladder	Promega
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

2. แบคทีเรีย

Escherichia coli สายพันธุ์ Top10 F′ มีลักษณะ Genotype : F′{*lac*I^q*Tn*10(Tet^R)} mcrA△ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lacZ*△M15△ *lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139△ (*ara-leu*)7697 *ga*/U *ga*/K *rps*L(Str^R) *end*A1 *nup*G บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

Escherichia coli สายพันธุ์ BL21 มีลักษณะ Genotype : F^-, *omp*T, *hsd*S_B(r_{B^-},m_{B^-}), *gal*, *dcm* บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

3. **ดีเอ็นเอพาหะ**

pGEM® -T Easy บริษัท Promega

pGEX-4T-1 บริษัท Amersham Biosciences

4. ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้น ๆ (Oligonucleotide primer)

Actin 1 : 5′ CAGATCATGTTYGAGACCTTC 3′

Actin 2 : 5′ GATGTCCACGTCRCACTTCAT 3′

Macro F : 5′ ATTGCATCATCCACCATG 3′

Macro R : 5′ GGGACTTTGTCATCTTCA 3′

Macro FBA : 5′ GGGGATCCATGAAGATCAATAAG 3′

Macro RXH : 5′ CCCTCGAGTAGTTAAGATGAGGTG 3′

5. ตัวอย่างกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

กุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 10-15 กรัม เป็นกุ้งสุขภาพดี ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากฟาร์มใน จังหวัดสงขลา พัทลุง และ ตรัง

6. เชื้อไวรัสและแบคทีเรีย

เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) และ แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. กิจการ ศุภมาตย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ (Aquatic Animal Health Research Center) ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

อุปกรณ์

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์สำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น 2200 C SCS (บริษัท Precisa)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 (บริษัท Mettler Toledo)
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (บริษัท Labline)
เครื่องวัดพีเอชรุ่น Cyberscan 1000 (บริษัท Eutech Cybernectics)
เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุณอุณหภูมิได้ รุ่น RC 5B (บริษัท Sorvall)
เครื่องหมุนเหวี่ยงรุ่น Biofuge pico (บริษัท Sorvall)
ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (บริษัท Heraeus)
ตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส (บริษัท Sanyo)
ตู้แช่เย็น -70 องศาเซลเซียส (บริษัท Sanyo)
หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA-300 MII (บริษัท Hirayama)
ตู้อบเครื่องแก้ว (บริษัท Labline)
เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (บริษัท Bio Rad)
ตู้ปราศจากเชื้อ Larminar flow (บริษัท Neurair)
เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น TouchDown (บริษัท HYBAID)
เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น1000/500 (บริษัท Bio Rad)
เครื่องดูดความชื้นระบบสุญญากาศ รุ่น B-169 (บริษัท Buchi)
เครื่องบันทึกแผนภาพดีเอ็นเอ (Gel Documentation system) (บริษัท Gibco BRL)
เครื่องตรวจสอบโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟรีซิส (บริษัท ATTO)
กล้องจุลทรรศน์ (บริษัท Olympus)
เครื่อง Freeze dry (บริษัท Labconco)
เครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator)
เครื่อง Homogenizer รุ่น S-205 (บริษัท Ikeda Scientific)
ตู้ดูดควัน (บริษัท Major)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท Memmert)

วิธีการ

1. การศึกษาผลของสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ต่อการแสดงออกของยีน Ribosomal Protein L26 (RPL26)

1.1 การเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*)

กุ้งกุลาดำปราศจากโรคติดเชื้อ อายุ 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 10-15 กรัม ตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) นำมาเลี้ยงในถังที่ให้อากาศตลอดเวลา เลี้ยงในน้ำทะเลที่ควบคุมความเค็มให้คงที่ที่ 15 ส่วนในพันส่วน ให้อาหารเม็ด 6% ของน้ำหนักตัวต่อวัน ทุก 8 ชั่วโมง ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน พักกุ้งไว้ประมาณ 5-7 วันก่อนการทดลอง เพื่อลดสภาพความเครียดจากการขนส่งและปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

1.2 การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ตัดเหงือก หัวใจ และขาว่ายน้ำของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) บดให้ละเอียดในอาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 ซึ่งประกอบด้วย 1% (w/v) M-199, 1.88 M NaCl, 0.66 M $CaCl_2.2H_2O$, 0.1 M L-glutamine, 9.14 mM Hepes, 10% (v/v) salt mixture (0.05 M KCl, 0.12M $MgSO_4.7H_2O$, 0.16 M $MgCl_2.6H_2O$, 3.12 mM $NaH_2PO_4.\ 2H_2O$, pH 7.3-7.6) ในอัตราส่วนน้ำหนักเนื้อเยื่อกุ้ง 1 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000xg นาน 20 นาที ทิ้งตะกอน นำส่วนใสมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 8,000xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองส่วนใสที่ได้ด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายไวรัสที่ได้ไปทดสอบความรุนแรง โดยการหาอัตราความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% ในระยะเวลา 3-5 วัน และเก็บสารละลายไวรัสที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

1.3 การเตรียมสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง

1.3.1 การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อ่อนกำลัง (inactivated WSSV)

เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวนำมาทำให้อ่อนกำลังโดยเติม Formalin ให้เป็น 0.5% (v/v) ในสารละลายไวรัส บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กำจัด Formalin ออกโดยการหมุนเหวี่ยง 3 ครั้งที่ 20,000xg ครั้งละ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนกลับใน phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตรเท่ากับสารละลายไวรัสเริ่มต้น (Namikoshi *et al*., 2003) เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

1.3.2 การเตรียมสาร Fucoidan จากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Sargassum polycystum*)

นำผงสาหร่ายสีน้ำตาลแห้ง จำนวน 100 กรัม มาสกัด 3 ครั้ง ด้วย 0.1 N HCl ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาทำให้แห้งด้วยกระบวนการ lyophilization นำไปหาปริมาณ fucose ตามวิธีของ Winzler (1971) โดยใช้สารที่สกัดได้ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ H_2SO_4 : H_2O อัตราส่วน 6:1 (v/v) ที่เย็น 4.5 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที ต้มในน้ำเดือด 3 นาที ทำให้เย็นทันที เติม cystein reagent 0.1 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60-120 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 396 นาโนเมตร และ 430 นาโนเมตร แล้วนำค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองความยาวคลื่น (OD_{430}-OD_{396}) มาหาค่าความเข้มข้นของ fucose โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานใช้ L-fucose เป็น standard นำปริมาณ fucose ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของ fucoidan (Doner and Whistler, 1993) โดยคำนวณจากความสัมพันธ์ ดังนี้

ปริมาณ fucoidan = 1.75 X ปริมาณ fucose ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.3.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่อ่อนกำลัง (inactivated *V. harveyi*)

เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) ที่มี 2% NaCl ให้ได้ OD_{600} ระหว่าง 0.4-0.6 หมุนเหวี่ยงที่ 10,000xg ทิ้งน้ำเลี้ยงเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วย PBS เติม 0.1% Thimerosal บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mowat and Rewyemamu, 1997) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants)

กุ้งกุลาดำน้ำหนักตัว 10-15 กรัม ทำการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว ฉีดสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเข้าสู่กล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ดังนี้

กลุ่มที่ 1 PBS (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 inactivated WSSV ความเข้มข้น $1x10^{-2}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ประยุกต์จาก Namikoshi และคณะ (2003)

กลุ่มที่ 3 inactivated *V. harveyi* ความเข้มข้น 0.045 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประยุกต์จาก Mowat และ Rewyemamu (1997)

กลุ่มที่ 4 fucoidan ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประยุกต์จาก Chotigeat และคณะ (2004)

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน RPL26 ในเลือดกุ้งภายหลังการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ที่ 6, 12, 24, 72, 120 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ โดยใช้กุ้งในแต่ละช่วงเวลากลุ่มละ 3 ตัว

1.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน RPL26

1.5.1 การเตรียม Total RNA

เจาะเลือดกุ้งจากข้อ 1.4 มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม TRIzol reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม chloroform 0.2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 12,000xg ที่ 2-8 องศาเซลเซียส 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาตกตะกอน RNA โดยเติม isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 12,000xg ที่ 2-8 องศาเซลเซียส 10 นาที ได้ตะกอนใสติดอยู่ที่ก้น หลอดล้างตะกอนด้วย 75% ethanol นำตะกอนไปทำให้แห้ง ละลายตะกอนโดยน้ำปราศจาก RNase แล้วนำไปหาปริมาณและคุณภาพของ RNA โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร

1.5.2 การทำ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ของยีน RPL26 โดยใช้ยีน β-actin เป็น internal standard ประยุกต์จาก Goidin และคณะ (2001)

ใช้ total RNA 4 ไมโครกรัม นำมาทำ Reverse Transcription (RT) โดยใช้ random primer 500 นาโนกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และบ่มบนน้ำแข็งอีก 5 นาที เติมสารสำหรับทำ RT ประกอบด้วย 0.6 mM dNTP, RT buffer, 0.2 U AMV และน้ำปราศจาก RNase ปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 100 นาโนกรัม cDNA , 0.4 μM ของแต่ละ primer, 0.2 mM ของแต่ละ dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1%TritonX-100, 1.5 mM $MgCl_2$ และ 2.5 U Taq DNA polymerase ทำ PCR โดยใช้สภาวะ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ และกำหนด primer สำหรับยีน RPL26 จากโคลน pCR 154 (เอื้อมนัส, 2545) และ primer สำหรับ β-actin ดังนี้

5′ primer (Macro F): 5′ ATTGCATCATCCACCATG 3′

3′ primer (Macro R): 5′ GGGACTTTGTCATCTTCA 3′

5′ primer (Actin 1) : 5′ CAGATCATGTTYGAGACCTTC 3′

3′ primer (Actin 2) : 5′ GATGTCCACGTCRCACTTCAT 3′

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.8% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide และเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ Gel Documentation system และ 1D image analysis software (Gibco BRL, USA) เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของข้อมูลและวิเคราะห์ความแตกต่างโดยการใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับ inactivated *V. harveyi* (IVH)

2.1 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย IVH โดยวิธีฉีด

กุ้งกุลาดำน้ำหนัก 10-15 กรัม แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว โดยแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 5 ตัว (n=3) โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ฉีดด้วย IVH ความเข้มข้น 0.045 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ฉีดด้วย PBS ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากฉีดกระตุ้นไป 72 ชั่วโมง ทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้น $7x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ซึ่งเป็นอัตราความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% ในระยะเวลา 3-5 วัน และความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น ซึ่งเป็นอัตราความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตายมากกว่า 50% ในระยะเวลา 3-5 วัน โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 ฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้น $7x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 4 ฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น บันทึกอัตราการตายของกุ้งแต่ละกลุ่มเป็นระยะเวลา 15 วัน เปรียบเทียบอัตราการมีชีวิตรอดโดยใช้ค่า relative percent survival (RPS) (Amend, 1981) โดยคำนวณจากความสัมพันธ์ดังนี้

RPS = (1-เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดทดลอง/เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดควบคุม) x 100

2.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย IVH โดยวิธีกิน ประยุกต์จาก Itami และ Takahashi (1991)

กุ้งกุลาดำน้ำหนัก 10-15 กรัม แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว โดยแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 5 ตัว (n=3) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 225 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน
กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน
กลุ่มที่ 3 ได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน
กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมได้รับอาหารซึ่งไม่ผสม IVH
หลังจากได้รับอาหารของแต่ละกลุ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน ทดสอบความสามารถ

ในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น บันทึกอัตราการตายของกุ้งแต่ละกลุ่มเป็นระยะเวลา 15 วัน โดยกุ้งแต่ละกลุ่มได้รับอาหารซึ่งผสม IVH ต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลอง เปรียบเทียบอัตราการมีชีวิตรอดโดยใช้ค่า RPS

2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย IVH โดยวิธีกิน และทดสอบการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจำนวน **1 และ 2 ครั้ง**

กุ้งกุลาดำน้ำหนัก 10-15 กรัม แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว โดยแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 5 ตัว (n=3) กลุ่มที่ 1 และ 2 ได้รับอาหารผสม IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ผลในการป้องกันโรคได้ดีที่สุดจากการทดลองในข้อ 2.2 กลุ่มที่ 3 และ 4 กลุ่มควบคุมได้รับอาหารซึ่งไม่ผสม IVH ทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น หลังจากได้รับอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน ในกลุ่มที่ 1 และ 3 สำหรับกลุ่มที่ 2 และ 4 ทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว หลังจากได้รับอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 15 วัน บันทึกอัตราการตายของกุ้งแต่ละกลุ่มเป็นระยะเวลา 15 วัน โดยกุ้งแต่ละกลุ่มได้รับอาหารซึ่งผสม IVH ต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลอง เปรียบเทียบอัตราการมีชีวิตรอดโดยใช้ค่า RPS

3. การเตรียมดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

3.1 การสกัดดีเอ็นจากแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากโคลน pCR154 ซึ่งมียีน RPL26 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertaini (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย kanamycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาละลายด้วยสารละลาย I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เติมสารละลาย II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็ง 5 นาที เติมสารละลาย III (5 M potassium acetate, glacial acetic acid) บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ของส่วนใสที่ได้ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนไปทำให้แห้ง และละลาย

ตะกอนด้วยน้ำ 30 ไมโครลิตร นำไปหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร

3.2 การทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ยีน RPL26 ที่มีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น BamHI กับ XhoI

นำดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากโคลน pCR154 ตามวิธีการในข้อ 3.1 ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม มาทำ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 0.4 ไมโครกรัม ของ primer Macro FBA และ Macro RXH, 0.2 mM ของแต่ละ dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% TritonX-100, 15 mM $MgCl_2$ และ 2.5 U Taq DNA polymerase โดยกำหนด primer สำหรับยีน RPL26 ดังนี้

5′ primer (Macro FBA): 5′ GGG GAT CCA TGA AGA TCA ATA AG 3′

3′ primer (Macro RXH): 5’ CCC TCG AGT TAA GAT GAG GTG 3′

ทำ PCR โดยใช้สภาวะ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนว30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis

3.3 การเชื่อมยีน RPL26 เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′

นำยีน RPL26 ที่ได้มาตกตะกอนใน 3 M Sodium acetate ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายรวมทั้งหมด และ Absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่า ของสารละลายรวมทั้งหมด บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ −20 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนไปทำให้แห้ง ละลายตะกอนในน้ำปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปหาปริมาณดีเอ็นเอ ใช้ดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม เชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pGEM®-T Easy (Promega, USA) ปริมาณ 25 นาโนกรัม โดยใช้เอนไซม์ Ligase 0.3 U ทำปฏิกิริยาใน Ligation buffer บนน้ำแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 โดยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicilin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนี

เดี่ยวแบบสุ่มมาจำนวน 20 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Ampicilin 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 3.1 และละลายตะกอนด้วยน้ำ 30 ไมโครลิตร สารละลายดีเอ็นเอที่ได้นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 200 นาโนกรัม แล้วทำ PCR ตามส่วนประกอบของปฏิกิริยาในข้อ 1.5.2

3.4 การเชื่อมยีน RPL26 เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′

นำดีเอ็นเอจากโคลนที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี PCR แล้วปรากฏชิ้นยีน RPL26 และพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Sweden) ที่สกัดโดยวิธีการตามข้อ 3.1 มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI โดยใช้ดีเอ็นเอ 10 ไมโครกรัม 1X buffer H และ BamHI 0.5 U ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการย่อยของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ด้วย 1.5% Agarose gel eletrophoresis นำดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บ่มในน้ำแข็ง 5 นาที ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่ย่อยด้วย BamHI แล้วด้วย 3 M Sodium acetate ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรสารละลายรวมทั้งหมดของปฏิกิริยา เติม Absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2.5 เท่า ของปริมาตรสารละลายรวมทั้งหมด เก็บที่อุณหภูมิ −20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอน แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่เย็น หมุนเวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอน แล้วทำให้แห้ง นำไปย่อยอีกครั้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI 0.5 U ใน 1X buffer D ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ XhoI ด้วย 1.5% Agarose gel eletrophoresis นำพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ที่ย่อยด้วย BamHI และ XhoI แล้วมาทำการตกตะกอนตามวิธีการในข้อ 3.3 สำหรับยีน RPL26 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ XhoI แล้วนำมาแยกบน 1.2% Agarose gel eletrophoresis แล้วตัดเจลบริเวณที่เป็นยีน RPL26 มาแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยการใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) โดยเติม Membrane Binding Solution 10 ไมโครลิตร/เจล น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเจลที่ละลายหมดเติมลงใน SV mini column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้าง SV mini column ด้วย Membrane Wash Solution (ซึ่งมี 95% ethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที ย้าย SV mini column ไปยังหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้น้ำซึ่งปราศจาก Nuclease ชะส่วน

กลางของ SV mini column บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอของยีน RPL26 ที่ทำบริสุทธิ์แล้วปริมาณ 600 นาโนกรัม เชื่อมเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T ปริมาณ 300 นาโนกรัม โดยใช้เอนไซม์ Ligase 0.03 U ทำปฏิกิริยาใน 1X Ligation buffer ผสมให้เข้ากันบนน้ำแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสม pGEX- RPL26 บ่มกับ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′ บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที บ่มบนน้ำแข็งทันที 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicilin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวแบบสุ่มมาจำนวน 20 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Ampicilin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 3.1 ทำการตรวจสอบยีนโดยวิธีการ PCR ตามวิธีการในข้อ 1.5.2

3.5 การทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์เพื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน RPL26 บนพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′

นำเชื้อแบคทีเรียจากโคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามีดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicilin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIA prep® Spin Miniprep Kit โดยละลายตะกอนด้วยสารละลาย P1 buffer 250 ไมโครลิตร เติมสารละลาย P2 buffer 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย N3 buffer 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000xg เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย PB buffer 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000xg เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย PE buffer 750 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000xg เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัด ethanol ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ใส่หลอดใหม่ ชะดีเอ็นเอออกด้วยน้ำ 30 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000xg เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำไปหาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง ABI PRISM 377 DNA sequencer

(Version 3.2) และ ABI PRISM BigDye Terminator kit เปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลของธนาคารยีน

3.6 การย้ายดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21

นำดีเอ็นเอลูกผสม pGEX- RPL26 บ่มกับ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ BL21 บนน้ำแข็ง 30 นาที ทำการ heat shock ตามวิธีการในข้อ 3.4 และทำการคัดเลือกโคโลนีแบบสุ่มมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบยีน RPL26 โดยวิธี PCR ตามวิธีการในข้อ 1.5.2 ทำการเก็บโคลนซึ่งได้ตรวจสอบยีน RPL26 แล้วเพื่อใช้ในการผลิตโปรตีน RPL26 ในขั้นตอนต่อไป

4. การเตรียมโปรตีน RPL26 จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-RPL26 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

4.1 การกระตุ้นการสร้างโปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

นำดีเอ็นเอลูกผสม pGEX- RPL26 ในแบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertaini (LB) ที่มี ampicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 50 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ประมาณ 0.4-0.6 จึงกระตุ้นแบคทีเรียให้มีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 0.1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyronositol) บ่มเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็งก่อนจะนำไปสกัดโปรตีน นำเซลล์แบคทีเรียละลายในสารละลาย lysis buffer (50 mM Na_2PO_4, pH 8.0, 300 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยต้องทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสและตะกอนเซลล์แยกออกจากกัน ที่อุณหภูมิ -20 องศา

เซลเซียส หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟเรซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

4.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

เตรียมสารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างโดยการเจือจางเป็น 1:100 จากสารละลายโปรตีนเริ่มต้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย A ประกอบด้วย Copper tartrate carbonate solution (0.1% (w/v) $CuSO_4.5H_2O$, 2% (w/v) $NaCO_3$, 1% (w/v) Sodium tartrate) ; 5% SDS (w/v) และ 0.8 M NaOH อัตราส่วน 1:2:1 ตามลำดับ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B ประกอบด้วย 2 N Folin ciocateus's reagent และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:5 ตามลำดับ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ BSA

4.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟเรซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970)

ผสมสารละลายโปรตีนกับสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) β-mercaptoethanol และ 0.1% (w/v) Bromophenol blue) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วางบนน้ำแข็งทันที เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 12% ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3 เทส่วนผสมของ separating gel ปริมาตร 3 ใน 4 ของความสูงของแผ่นกระจก ใช้น้ำกลั่นเติมบนผิวหน้าเจลเพื่อปรับผิวหน้าเจลเรียบ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดการโพลีเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์ 30 นาที เทน้ำกลั่นทิ้งและซับให้แห้ง เทส่วนผสมของ stacking gel ลงระหว่างแผ่นกระจกจนเต็ม เสียบหวีลงไประหว่างแผ่นกระจก อย่าให้เกิดฟองอากาศ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ดึงหวีออก ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างในช่องเจลและตกแต่งช่องเจลให้เรียบร้อย ถอด spacer ออก นำเจลประกอบกับเครื่องสำหรับทำอิเล็คโตรโฟเรซิส ใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่างลงในแต่ละช่องของเจล ใช้ Tris-glycine buffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 192 mM Glycine และ 0.1% (w/v) SDS) สำหรับการทำอิเล็คโตรโฟเรซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถอดแผ่นกระจกออกจากเครื่องสำหรับทำอิเล็คโตรโฟเรซิส แกะเจลออกจากแผ่นกระจกและนำไปย้อมด้วยสี Coomassie blue (0.2% (w/v) Coomassie blue R-250; 50% methanol และ 7% acetic acid) วางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย destain 1

(50% (v/v) methanol และ 7.5% acetic acid) 1 ชั่วโมง และ destain 2 (5% (v/v) methanol และ 7.5% acetic acid) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

Table 3 Components for polyacrylamide gel (SDS-PAGE)

ส่วนประกอบ	Separating gel 12% (5ml)	Stacking gel 4% (3 ml)
30%Acrylamide-bisacrylamide	2.0	0.5
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.3	-
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.38
10% SDS	0.05	0.03
10% APS	0.05	0.03
TEMED	0.002	0.003
Distill water	1.7	2.1
Total	5	3

4.4 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Glutathione sepharose 4 Fast Flow

นำสารละลายโปรตีนจากข้อ 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 50% Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Bioscience, Sweden) 100 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสออกและล้างเม็ดเจลด้วย PBS หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 30 วินาที ในการล้างแต่ละครั้งทำการบ่มบนเครื่องเขย่าครั้งละ 5 นาที ทำซ้ำขั้นตอนการล้าง 20 ครั้ง ทำการชะโปรตีนออกจากเม็ดเจลด้วยสารละลาย elution buffer (5% SDS, 6.8 M Tris-HCl) 3 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE นำสารละลายโปรตีนที่ได้มากำจัด SDS โดยนำไปบ่มบนน้ำแข็ง 30 นาที จนเกิดการจับกันเป็นตะกอนขาวขุ่นของ SDS นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่าง SDS กับสารละลายโปรตีน ดูดส่วนในใส่หลอดใหม่ ทำซ้ำขั้นตอนเดิมอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ใส่ในถุงสำหรับไดอะไลซิส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 12 กิโลดาลตัน นำไปไดอะไลซิสกับ PBS, pH 7.4 บนเครื่องเขย่าที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เปลี่ยน PBS อีกครั้ง แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

5. ทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน RPL26 ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*)

5.1 ทดสอบการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับโปรตีนลูกผสม RPL26 ประยุกต์จาก Witteveldt และคณะ (2004)

กุ้งกุลาดำน้ำหนัก 10-15 กรัม แบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว โดยแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 5 ตัว (n=3) และทุกกลุ่มได้รับการฉีดสารตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ดังนี้

กลุ่มที่ 1 PBS เป็นกลุ่มควบคุม
กลุ่มที่ 2 โปรตีน GST ปริมาณ 4 ไมโครกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม
กลุ่มที่ 3 โปรตีน GST ปริมาณ 16 ไมโครกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม
กลุ่มที่ 4 โปรตีน GST ปริมาณ 32 ไมโครกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม
กลุ่มที่ 5 โปรตีน GST-RPL26 ปริมาณ 4 ไมโครกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม
กลุ่มที่ 6 โปรตีน GST-RPL26 ปริมาณ 16 ไมโครกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม
กลุ่มที่ 7 โปรตีน GST-RPL26 ปริมาณ 32 ไมโครกรัม/น้ำหนักกุ้ง 1 กรัม

หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น 9×10^{-6} ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น บันทึกอัตราการตายของกุ้งแต่ละกลุ่มเป็นระยะเวลา 15 วัน เปรียบเทียบอัตราการมีชีวิตรอดโดยใช้ค่า RPS

5.2 การศึกษาความว่องไวของฟาโกไซโทซิส (Phagocytic activity) ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับโปรตีนลูกผสม RPL26 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประยุกต์จาก Itami และคณะ (1994 อ้างโดย Rengpipat *et al.*, 2000)

5.2.1 การเตรียมเม็ดเลือดกุ้งและเม็ดพลาสติกเรืองแสง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งกุลาดำ โดยเจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ KC-199, pH 7.4 เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส ตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายเม็ดเลือดใน K-199 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเตรียมเม็ดพลาสติกเรืองแสง (fluorescence latex bead) โดยการใช้เม็ดพลาสติกเรืองแสง (Polyscience) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.98 ไมครอน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ K-199 pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เม็ดพลาสติกกระจายดี ล้างด้วย K-199 3 ครั้ง นำมานับจำนวนโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ และคำนวณ

ปริมาณเม็ดพลาสติกเป็นจำนวนเม็ด/มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 เม็ด/มิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

5.2.2 การศึกษากระบวนการฟาโกไซโตซิส

ใช้เซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับเม็ดพลาสติกเรืองแสง 100 ไมโครลิตร (10^8 เม็ดต่อมิลลิลิตร) และโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์แล้วแต่ละความเข้มข้น (เจือจางใน K199) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ได้แก่ โปรตีน GST และ GST-RPL26 ความเข้มข้น 0.01 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มส่วนผสมทั้งสามชนิดบนสไลด์ ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย 0.125% glutaryldehyde เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดกับสไลด์ออกด้วย PBS และย้อมเซลล์เม็ดเลือดด้วย Wright stain เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 200 เซลล์ และคำนวณค่า Phagocytic index (PI), %Phagocytosis และจำนวนเม็ด bead ที่ถูกกินต่อหนึ่งเซลล์ (Average number of the bread ingested per cell, ABPC) ดังนี้

PI = (จำนวนเม็ดพลาสติกที่ถูกกินต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต) X (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดพลาสติกต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต) X 100

%Phagocytosis = (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดพลาสติกต่อจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต) X 100

ABPC = (จำนวนเม็ดพลาสติกที่ถูกกินต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดพลาสติก)

เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของข้อมูลและวิเคราะห์ความแตกต่างโดยการใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%