สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บททรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	21
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	22
วัสดุ	22
อุปกรณ์	26
วิธีการ	27
3. ผลการทดลอง	40
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	64
5. ข้อสรุปและเสนอแนะ	68
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก	78
ประวัติผู้เขียน	88

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	โรคติดเชื้อต่าง ๆ ในกุ้งทะเล	4
2.	แสดงกลุ่มของสารที่ใช้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียน	18
3.	ส่วนประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส	38
4.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสาร IVH	44
5.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณต่าง ๆ	48
6.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH	48
7.	เปอร์เซ็นต์การตายและค่า RPS ของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีนลูกผสม	49
8.	การศึกษาความว่องไวของกระบวนการฟาโกไซโตซิส ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ เมื่อได้รับโปรตีน GST และ GST-RPL26 บริสุทธิ์	62

รายการตารางภาคผนวก

ตารางผนวก	หน้า
1. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $7x10^{-6}$ หลังได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH 4.5 ไมโครกรัม/ตัว	79
2. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH 4.5 ไมโครกรัม/ตัว	79
3. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 225 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน	79
4. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน	79
5. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน	80
6. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ จำนวน 1 ครั้ง ในวันที่ 3 หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน	80
7. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ จำนวน 2 ครั้ง ในวันที่ 3 และ 15 หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน	80
8. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน ปริมาณ 4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักกุ้ง	81
9. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน ปริมาณ 16 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักกุ้ง	81
10. อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน ปริมาณ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักกุ้ง	81

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ	3
2.	แสดงอนุภาคของไวรัสตัวแดงดวงขาว และนิวคลีโอแคปสิด จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน	5
3.	การตอบสนองต่อ β-1,3-glucans ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งก่อให้เกิดการสลายแกรนูลปลดปล่อยสารสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน	6
4.	แสดงการเริ่มต้นกระบวนการต่าง ๆ ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยโมเลกุลจดจำ	9
5.	แสดงการทำงานของ peroxinectin ในการทำลายสิ่งแปลกปลอม	10
6.	โครงสร้างและองค์ประกอบของ fucoidan	15
7.	แบบจำลองแสดงโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของอนุภาคของไวรัสตัวแดงดวงขาว	17
8.	การแสดงออกของยีน RPL26 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย inactivated WSSV, IVH, fucoidan และ PBS โดยใช้การแสดงออกของยีน β-actin เป็น internal control	41
9.	ระดับการแสดงออกของยีน RPL26 ต่อยีน β-actin เมื่อฉีดกระตุ้นด้วย inactivated WSSV, IVH และ fucoidan โดยใช้กลุ่มซึ่งฉีดด้วย PBS เป็นกลุ่มควบคุม	42
10.	แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสาร IVH และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $7x10^{-6}$ และ $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น	43
11.	แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสาร IVH และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วย เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $7x10^{-6}$ และ $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น	44
12.	แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 225 300 และ 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น	46

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

13. แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น 47
14. แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้นจำนวน 2 ครั้ง 47
15. แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 225 300 และ 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น 49
16. แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้รับอาหารผสมสาร IVH ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น จำนวน 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง 50
17. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน RPL26 จากการสังเคราะห์โดยวิธี PCR มีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น BamHI และ XhoI วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis 51
18. แสดงแถบดีเอ็นเอของการคัดเลือกโคลนซึ่งมียีน RPL26 บนพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 วิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis 52
19. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GST และ GST-RPL26 ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue 54
20. การวิเคราะห์โปรตีน GST -RPL26 และ GST บริสุทธิ์ ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี เอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue 55
21. แสดงโปรตีน GST และ GST-RPL26 บริสุทธิ์ หลังการกำจัดเอสดีเอสและไดอะไลซิสวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) 56

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue

22. แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้การฉีดด้วยโปรตีนลูกผสม ปริมาณ 4, 16 และ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น 58

23. แสดงค่า relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำ หลังจากได้การฉีดด้วย โปรตีนลูกผสมปริมาณ 4 16 และ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว และทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น $9x10^{-6}$ ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น 60

24. แสดงการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (เม็ดบีดเรืองแสง) ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับโปรตีน กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับโปรตีน GST และกลุ่มซึ่งได้รับโปรตีน GST-RPL26 สังเกตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า 63

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

µl	=	microlitre
µg	=	microgram
%	=	percent
AMV	=	avian myeloblastosis virus
β	=	beta
bp	=	basepair
BSA	=	Bovine serum albumine
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleoside triphosphate
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacitic acid
kb	=	kilobase
kDa	=	kilodalton
LB	=	Luria Bertaini
mg	=	milligram
min	=	minute(s)
ml	=	milliltre
mM	=	millimolar
M	=	Molar
nm	=	nanometer
O.D.	=	optical density
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pH	=	-Log hydrogen ion concentration
RNA	=	ribonucleic acid
RNase A	=	Ribonuclease A

RPS	=	Relative Percent Survival
PCR	=	Reverse transcription polymerase Chain Reaction
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N′,N′-tetramethyl-ethylenediamine

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride acid
U	=	unit (s)
v/v	=	volumn/volumn
w/v	=	weight/volumn
WSSV	=	White spot syndrome virus