Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กุ้งทะเลเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำให้ได้มาซึ่งรายได้แก่เกษตรกร ปัจจุบันนี้การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในฟาร์มเลี้ยงกลายเป็นอาชีพหลักแก่เกษตรกรในหลายจังหวัดของประเทศไทยที่มีเขตแดนติดกับชายทะเล จุดมุ่งหมายหลักของการเลี้ยงกุ้งทะเล คือ ได้ผลผลิตกุ้งที่มีขนาดใหญ่ น้ำหนักตัวมาก และสุขภาพดี เพื่อผลกำไรสูงสุดทางการค้า ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งให้โตไวจึงเป็นหัวใจสำคัญของธุรกิจการเลี้ยงกุ้ง

การเจริญเติบโตของลูกกุ้งกุลาดำหลังจากฟักออกจากไข่ (post-larval growth) ขึ้นอยู่กับการลอกคราบ (molting) กระบวนการลอกคราบ (molting process) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง (structure) และองค์ประกอบทางชีวเคมี (intracellular biochemistry) ในอวัยวะต่างๆ ของกุ้งกุลาดำ เพื่อก่อให้เกิดการหลุดลอกของเปลือกที่ห่อหุ้มลำตัว (cuticle หรือ exoskeleton) และสร้างเปลือกใหม่ขึ้นทดแทน ระยะเวลาระหว่างการหลุดลอกของเปลือกเก่า และการงอกของเปลือกใหม่ เป็นช่วงเวลาที่กุ้งไม่มีเปลือกห่อหุ้ม หรือมี แต่มีความอ่อนนุ่มมาก กุ้งจะอาศัยช่วงจังหวะที่ไม่มีเปลือกนี้ขยายขนาดของลำตัวและเพิ่มน้ำหนัก จนกระทั่งเมื่อเปลือกใหม่สร้างเสร็จสมบูรณ์และแข็งตัวจากการสะสมของเกลือแคลเซียม (calcium salt) เป็นที่เรียบร้อย การเจริญเติบโตในลักษณะดังกล่าวจึงหยุดลงชั่วคราว จนกว่าการลอกคราบครั้งต่อไปเกิดขึ้นกุ้งจึงจะมีการขยายขนาดลำตัวและเพิ่มน้ำหนักอีกเป็นวัฏจักรเช่นนี้ชั่วอายุขัยของกุ้ง ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตภายหลังจากการฟักออกจากไข่ (post-larval stage) จนถึงตัวเต็มวัยของกุ้ง จึงขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งหรือความถี่ของวงจรการลอกคราบ (molting cycle)

ปัจจุบันปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เกิดขึ้นทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศ คือ กุ้งไม่โตเพราะไม่ลอกคราบ หรือ ลอกคราบไม่ออก เนื่องมาจากการติดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (white spots syndrome) ซึ่งปัญหานี้ทำให้เกิดคำถามที่น่าสนใจว่า เชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (white spots syndrome) นี้ไปรบกวนหรือยับยั้งกระบวนการลอกคราบได้อย่างไร ดังนั้นการศึกษาถึงธรรมชาติของกระบวนการลอกคราบและผลกระทบของการติดเชื้อโรคตัวแดงดวงขาวต่อกระบวนการลอกคราบจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะใช้ตอบคำถามดังกล่าว เนื่องจากจะเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยทำให้เกิดความเข้าใจธรรมชาติและกลไกการเกิดของโรคตัวแดงดวงขาว (white spots syndrome) มากขึ้น เพื่อนำไปสู่การหาวิธีการแก้ไขและป้องกันการเกิดโรคนี้ได้ต่อไป ซึ่งที่ผ่านมาในอดีตยังไม่มีรายงานการศึกษาในเรื่องดังกล่าวแต่อย่างใด

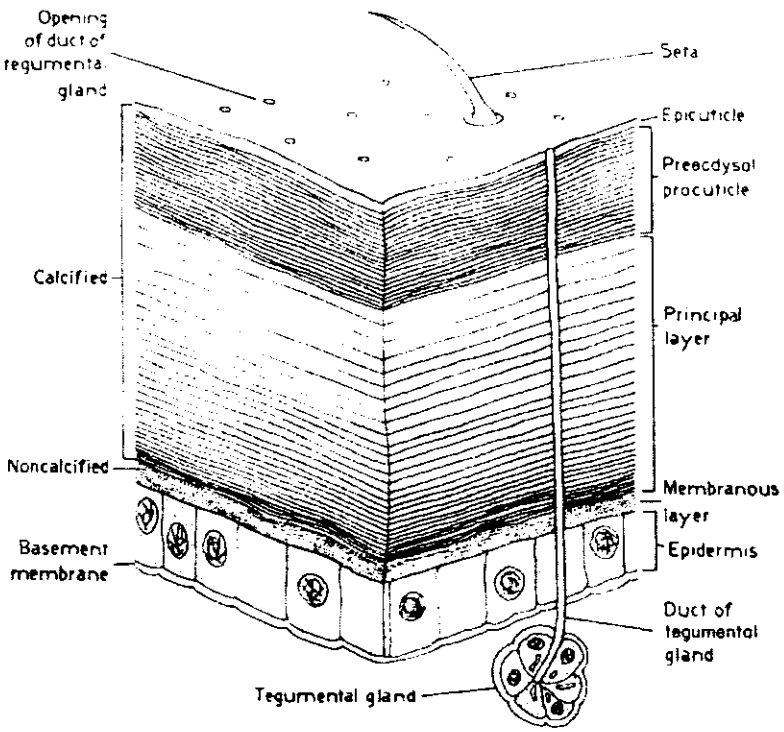
การจะศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงกระบวนการลอกคราบ ก่อนอื่นจะต้องทราบถึงลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของเปลือก และ ขั้นตอนของการลอกคราบของสัตว์ในตระกูล crustacean เสียก่อน เปลือกของสัตว์ในตระกูล crustacean สามารถแบ่งเป็นชั้นต่าง ๆ ได้ดังนี้ คือ (ดูภาพประกอบ)

1. Epicuticle เป็นชั้นบาง ๆ อยู่นอกสุด องค์ประกอบหลักของชั้นนี้ คือ โปรตีน, ไขมัน และเกลือแคลเซียม
2. Procuticle เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากชั้น epicuticle เข้ามาด้านใน องค์ประกอบหลักของชั้นนี้ คือ โปรตีน, ไคติน (chitin) และ เกลือแคลเซียม (ยกเว้นบางบริเวณที่ไม่มีเกลือแคลเซียม) ชั้น procuticle สามารถแบ่งย่อยได้อีก 2 ชั้น คือ

   2.1 ชั้น preecdysial layer ถูกสร้างออกมาในระยะก่อนลอกคราบ (preecdysis)

   2.2 ชั้น postecdysial layer ถูกสร้างออกมาในระยะหลังลอกคราบ (postecdysis) ประกอบด้วยชั้นย่อย ๆ อีก 2 ชั้น คือ

   - principal layer และ
   - membranous layer ซึ่งเป็นชั้นในสุด และอยู่ชิดกับ epidermis ชั้นนี้เป็นชั้นที่ไม่มีเกลือแคลเซียม เป็นส่วนประกอบ



ภาพวาดแสดงโครงสร้างของเปลือกและเนื้อเยื่อผิวหนังของสัตว์ในตระกูล crustacean (ที่มา Bliss, D. E. 1985. The Biology of Crustacea. Vol. 9 Academic press, p. 3)

การเปลี่ยนแปลงของเปลือกสัตว์ในตระกูล crustacean ระหว่างการลอกคราบถูกควบคุมด้วยระบบฮอร์โมน ฮอร์โมนที่มากระตุ้นให้เกิดการลอกคราบ คือ ecdysteroids (ecdysone หรือ molt stimulating hormone) ซึ่งถูกสร้างมาจาก Y-organ ฮอร์โมน ecdysteroids จะถูกควบคุมการทำงาน (ยับยั้ง) โดย molt-inhibiting hormone (MIH) ที่สร้างมาจาก X-organ อีกทีหนึ่ง ทั้ง Y- และ X-organs เป็นกลุ่ม neuroendocrine cells ที่อยู่บริเวณศีรษะต่อกับลำตัว (cephalothoracic region) และก้านตา (eyestalk) ตามลำดับ กล่าวโดยสรุปคือการลอกคราบของสัตว์ในตระกูล crustacean จะเกิดขึ้นเมื่อ MIH หยุดการทำงาน ทำให้ ฮอร์โมน ecdysteroids ไปกระตุ้นให้เกิดการลอกคราบ ขั้นตอนของการลอกคราบแบ่งได้เป็น 3 ระยะ (แบ่งตาม Drach's stages) คือ ระยะก่อนการลอกคราบ (proecdysis, D stage หรือ premolt), ระยะขณะการลอกคราบ (ecdysis หรือ E stage), และ ระยะหลังการลอกคราบ (postecdysis, A-C stage หรือ postmolt)

1. ระยะก่อนการลอกคราบ (proecdysis, D stage หรือ premolt) มี 5 ระยะ คือ
   - ระยะ D0 เกิดขึ้นเมื่อฮอร์โมน ecdysteroid มากระตุ้นให้เนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) แยกตัวออกจากเปลือกที่ปกคลุมอยู่ด้านนอก ณ บริเวณแนวรากขน (setae)
   - ระยะ D1 รากขนใหม่จะถูกสร้างขึ้นด้านล่างต่อรากขนที่มีอยู่เดิม
   - ระยะ D2 ชั้นของเปลือกใหม่บางๆ เริ่มถูกสร้างออกมาให้เห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งขณะนี้เปลือกเก่าพร้อมที่จะหลุดลอก
   - ระยะ D3 ชั้น post ecdysial layer ของชั้น procuticle ของเปลือกเก่าจะถูกย่อย พร้อมกับองค์ประกอบทางชีวเคมีในเปลือกเก่า จะถูกดูดซึมกลับ (เป็นไปได้ว่าอาจจะไปสะสมอยู่ใน epidermis)
   - ระยะ D4 เปลือกเก่าแยกปริบริเวณกึ่งกลางลำตัวเป็นแนวยาวตลอดความยาวของลำตัว โดยจะเริ่มที่รอยต่อของศีรษะ (cephalothorax) และลำตัว (abdomen) ขณะเดียวกันเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) มีการขยายตัวใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการเพิ่มปริมาตรของน้ำภายในเนื้อเยื่อ
2. ระยะลอกคราบ (ecdysis หรือ E stage) เป็นระยะที่กุ้งเคลื่อนตัวเองออกจากเปลือกเก่า (exuviae) โดยจะเริ่มที่ศีรษะก่อนแล้วตามด้วยท้อง โดยจะเริ่มจากหลัง(posterior)ก่อน แล้วตามด้วยด้านหน้า (anterior)
3. ระยะหลังการลอกคราบ (postecdysis, A-C stage หรือ postmolt) ระยะนี้ยังแบ่งเป็นระยะย่อยได้ 3 ระยะ คือ ระยะ A, B และ C
   - ระยะ A แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ A1 เป็นระยะที่เริ่มตั้งแต่หลังการลอกคราบเสร็จทันที ระยะนี้กุ้งมีเปลือกใหม่ที่นิ่มมาก และ ระยะ A2 เป็นระยะที่เปลือกอ่อน เริ่มมีการสร้าง principal layer และเริ่มมีการสะสมของเกลือแคลเซียม

- ระยะ B แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ B1 และ B2 เป็นระยะที่ต่อเนื่องมาจากระยะ A เป็นระยะที่รากขน (setae) ในเปลือกอ่อน มีการพัฒนา และ เปลือกใหม่มีความแข็งเพิ่มขึ้น

- ระยะ C แบ่งเป็น 4 ระยะ คือ C1 C2 C3 และ C4 เป็นระยะที่ต่อเนื่องมาจากระยะ B เป็นระยะที่ชั้นต่าง ๆ เปลือกใหม่ถูกสร้างขึ้นมาจนสมบูรณ์ และเปลือกมีความแข็งเต็มที่ กุ้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระยะ C4 ไปจนกว่าฮอร์โมน ecdystroids มากระตุ้นให้เกิดการลอกคราบอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้น ระยะ C4 จึงถูกเรียกเฉพาะว่าเป็นระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ หรือ intermolt

จะเห็นว่าตลอดกระบวนการลอกคราบ นอกจากเปลือกที่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญแล้ว เนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ตั้งอยู่ใกล้ชิด และมีความสัมพันธ์กับเปลือกมากที่สุด ก็เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญทั้งทางด้านโครงสร้าง (structures) และองค์ประกอบทางชีวเคมี (intracellular biochemistry) โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อผิวหนัง ซึ่งเป็นแบบไดนามิค (dynamic changes) คือมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาของวงจรการลอกคราบ ดังนั้นเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) จึงน่าจะเป็นโครงสร้างที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเปลือกกุ้งระหว่างการลอกคราบ เป็นไปได้ว่า ในระยะก่อนลอกคราบ เนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) น่าจะมี receptors ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ ecdysteroids hormone ที่มากระตุ้นให้เนื้อเยื่อผิวหนังแยกตัวออกจากเปลือก น่าจะเป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่หลั่ง enzymes ออกมาย่อยเปลือกเก่า พร้อมกับเป็นแหล่งสะสมโปรตีนและเกลือแคลเซียมที่ถูกดูดซึมกลับจากเปลือกเก่า และน่าจะมีบทบาทในการหลั่งโปรตีนออกมาเพื่อเป็นเปลือกใหม่ นอกจากนี้เนื้อเยื่อผิวหนังยังน่าจะเป็นแหล่งสะสมน้ำและเกลือแร่ในระยะลอกคราบอีกด้วย สำหรับในระยะหลังลอกคราบ เนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) น่าจะมีบทบาทในการขยายขนาดของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังเพื่อเพิ่มน้ำหนักและขนาดของลำตัวก่อนที่จะมีการแข็งตัวของเปลือก และน่าจะมีบทบาทในการหลั่งเกลือแคลเซียมเข้าสู่เปลือกที่สร้างขึ้นมาใหม่ เพื่อให้เกิดการแข็งตัวของเปลือกใหม่

สมมุติฐานดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญมากต่อการควบคุมการลอกคราบ และมีการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านโครงสร้าง (structures) และ องค์ประกอบทางชีวเคมี (intracellular biochemistry) ภายในเนื้อเยื่ออยู่ตลอดเวลาของวงจรการลอกคราบ อย่างไรก็ดีจนถึงปัจจุบันสมมุติฐานดังกล่าวไม่เคยถูกหยิบยกให้เห็นความสำคัญ และยังไม่เคยได้รับการพิสูจน์เผยแพร่ ทั้งๆที่เป็นประเด็นที่มีความจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงและพัฒนาคุณภาพของสัตว์ในตระกูล crustacean กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ในตระกูล crustacean และเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยอย่างมหาศาล ความรู้เกี่ยวกับการลอกคราบของกุ้งกุลาดำที่มีอยู่แล้วในอดีตยังไม่เพียงพอต่อการอธิบายถึงกระบวนการลอกคราบ และกลไกการควบคุมการลอกคราบของกุ้งกุลาดำให้เข้าใจได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในโครงสร้างที่สำคัญ เช่น เนื้อเยื่อผิว

หนัง ทั้งนี้ความรู้พื้นฐานที่มีอยู่ขณะนี้ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในปู ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นทำความเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการลอกคราบ และกลไกการควบคุมการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ โดยการศึกษาครั้งนี้จะเน้นทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ไปพร้อมกันกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้าง (cell morphology และ ultrastructures) ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ การศึกษา protein expression ในโครงการนี้จะกระทำโดยใช้ 2D SDS-PAGE เพื่อทำการแยกโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ใน เนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ออกมาให้เห็นเป็นจุดโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งจะทำให้เข้าใจภาพรวมของการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด (overviews of protein expression) ในเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ของกุ้งกุลาดำในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ แล้วนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อหา โปรตีน หรือ สารพันธุกรรม (gene) ในเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ที่มีความสำคัญต่อการลอกคราบ และ การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ยิ่งไปกว่านี้ผลการศึกษาครั้งนี้จะถูกนำไปใช้ศึกษาต่อเนื่องถึงผลกระทบของการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spots syndrome) ต่อกระบวนการลอกคราบ และ กลไกการลอกคราบ (ซึ่งหมายรวมถึงผลกระทบต่อ cell morphology, cell ultra-structures, protein expression และ องค์ประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ ในแต่ละระยะของการลอกคราบ) ในลำดับต่อไปอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ (cell morphology and ultra-structures) ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) หลังการลอกคราบ (postmolt) และระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ของกุ้งกุลาดำ

2.2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในภาพรวม (overview of protein expression) ของเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) หลังการลอกคราบ (postmolt) และระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ของกุ้งกุลาดำ

2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน (identification of the proteins) ในเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกตลอดการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ

3 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมและคัดเลือกกุ้งกุลาดำในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt), หลังการลอกคราบ (postmolt) และระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt)

1 ชั่งน้ำหนัก และ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (gross appearance) ของกุ้งกุลาดำไม่จำกัดเพศ ขนาด 15 กรัม (โดยประมาณ) ในระยะ ก่อนการลอกคราบ (premolt) หลังการลอกคราบ (postmolt) และ ระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt) ในบ่อเลี้ยงธรรมชาติ

2 สังเกต และ จดบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของกุ้งกุลาดำ และระยะเวลาที่ใช้ในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) และ หลังการลอกคราบ (postmolt) โดยใช้ตาเปล่าและ stereomicroscope

3 ทำการศึกษา ดังข้อ 2 เป็นเวลาประมาณ 3 cycles ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือนกุ้งตัวอย่างจะต้องอยู่ในระยะต่างๆ ดังนี้ คือ

- ระยะก่อนการลอกคราบ (Late premolt, stage D2): เก็บกุ้งเมื่อเปลือกเก่าของกุ้งแยกตัวออกจากเนื้อเยื่อผิวหนังชัดเจน และเริ่มมีการสร้างเปลือกใหม่
- ระยะหลังการลอกคราบ (Early postmolt, stage A-B): เก็บกุ้งหลังการลอกคราบทันที (ภายใน 1 ชั่วโมง) และเปลือกใหม่ของกุ้งยังอ่อนนิ่มอยู่
- ระยะระหว่างการลอกคราบ (Intermolt, stage C): เก็บกุ้งหลังการลอกคราบเมื่อเปลือกใหม่ของกุ้งแข็งแล้ว

3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ (cell morphology and ultrastructures) ของ เนื้อเยื่อผิวหนังในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt), หลังการลอกคราบ (postmolt) และระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ของกุ้งกุลาดำ

1 นำกุ้งกุลาดำที่อยู่ในระยะต่าง ๆ ดัง ข้อ 3.1 มาจำนวนอย่างละ 5-6 ตัว ทำการชั่งน้ำหนัก พร้อมจดบันทึก

2 แช่กุ้งทั้งตัวเพื่อ fix เนื้อเยื่อ ด้วย Davidson's fixative เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) และเปลือก (exoskeleton) บริเวณลำตัวของกุ้งจะถูกซำแหละ (dissect) ด้วย ใบมีดกรรไกรปลายแหลมขนาดเล็ก และ ปากคีบ (forceps) ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด ประมาณ 0.5 x 0.5 x

0.5 ซ.ม. ก่อนจะทำการ dehydration, clearing, infiltration และ embedding ในขี้ผึ้ง (paraffin), ตัด sections, และ ย้อมสี ด้วย Hematoxylin and Eosin เพื่อทำการศึกษา cell morphology ของเซลล์ผิวหนังของกุ้ง ด้วย light microscope (LM)

3 ในกุ้งชุดเดียวกัน ก่อนการดำเนินการในข้อ 2 คัดเนื้อเยื่อผิวหนังบางส่วนของกุ้ง fix ใน 2.5% glutaraldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 1% Osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ uranyl acetate เป็นเวลา 20 นาที, dehydrate ด้วย alcohol ความเข้มข้นขนาดต่างๆจาก 50% - 100%, infiltration ด้วย propylene oxide และ araldite plastic, และ embedding ใน araldite plastic ด้วย อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 1 วัน, อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 2 วัน, และ อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2-3 วัน, หลังจากนั้นจึงสามารถนำตัวอย่างมาตัด semi-thin sections ด้วยมีดแก้ว และ ultra-thin sections ด้วย ultra-microtome, และ ย้อมสี ด้วย 5% Uranyl acetate และ 1% Lead nitrate เพื่อทำการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ (ultrastructures) ของเนื้อเยื่อผิวหนังของกุ้งด้วย transmission electron microscope (TEM)

4 ทำซ้ำดังข้อ 1-3 อีก 2 ครั้งใน molting cycle ถัดไปอีก 2 cycles

3.3 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในภาพรวม (overview of protein expression) ของเนื้อเยื่อผิวหนังในระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) หลังการลอกคราบ (postmolt) และระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) ของกุ้งกุลาดำ

1 นำกุ้งกุลาดำที่อยู่ในระยะต่างๆ ดัง ข้อ 3.1 มาจำนวนอย่างละ 3 ตัว และ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้กุ้งสลบ (inactive)

2 เนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ทั้งตัวของกุ้งจะถูกชำแหละ (dissect) ด้วย ใบมีด, กรรไกรปลายแหลมขนาดเล็ก และ ปากคีบ (forceps) และแช่ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

3 บดเนื้อเยื่อให้เป็นผงด้วย mortar and pastel technique

4 นำผงเนื้อเยื่อที่บดได้เก็บใน eppendorf tubes ขนาด 1.5 มล. และทำการสกัดโปรตีนด้วย IEF Sample buffer ตามด้วย freeze-thaw technique ก่อนจะทำการปั่น (centrifugation) ที่ 4 °ซ

5 ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จาก epidermis ในระยะต่างๆ ด้วยวิธี Bradford assay

6 นำโปรตีนตัวอย่างจาก epidermis ทั้ง 3 ระยะ มาในปริมาณเท่าๆ กัน และทำการแยกโปรตีนมิติที่ 1 (first dimension) ในหลอดวุ้น (IEF tube gel) ตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง

7 นำหลอดวุ้นที่ได้มาทำการแยกโปรตีนมิติที่ 2 (second dimension) ในแผ่นวุ้น (slab gel) ขนาด 8.6 x 6.8 ซ.ม. (mini gel) ตามขนาดโมเลกุลของโปรตีน (molecular weight) โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

8 ย้อมสีแผ่นวุ้นด้วย silver nitrate เพื่อย้อมโปรตีนที่แยกได้

9 นำแผ่นวุ้นที่ย้อมด้วย silver nitrate แล้วมา scan ด้วย gel scanner และเก็บภาพถ่ายจุดโปรตีน (protein spots) ในรูปของ tiff files

10 เปรียบเทียบภาพถ่ายจุดโปรตีน (protein spots) จากตัวอย่างทั้ง 3 ระยะเพื่อหาว่าการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละระยะมีความแตกต่างกันอย่างไร

11 ทำซ้ำดังข้อ 1-10 อีก 2 ครั้งใน molting cycle ถัดไปอีก 2 cycles

3.4 การตรวจหาคุณสมบัติของโปรตีน (identification of the proteins) ในเนื้อเยื่อผิวหนัง (epidermis) ที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออก ตลอดการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ

1 นำแผ่นวุ้นที่ย้อมด้วย silver nitrate แล้วมาตรวจดูด้วยตาเปล่า และทำการคัดเลือกเฉพาะจุดโปรตีน (protein spots) ที่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน

2 ตัดจุดโปรตีน (protein spots) ที่ต้องการจากแผ่นวุ้นด้วยมีดปลายแหลม

3 เก็บจุดโปรตีน (protein spots) ที่ได้ใน eppendorf tubes

4 นำจุดโปรตีน (protein spots) ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วย Speed-Vacuum

5 ย่อยจุดโปรตีนแห้ง (dried gel spots) ที่ได้จากข้อ 4 ด้วย trypsin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 37 °ซ เพื่อให้ได้ peptides สั้นๆ

6 ทำการสกัด peptides ด้วย acetonitrite และ trifluoroacetic acid และ centrifuge

7 นำ supernatants มา mix รวมกับ matrix (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, acetonitrite, ethanol และ trifluoroacetic acid) และ adrenocorticotropic hormone ก่อนที่จะนำไปตรวจหา peptide mass fingerprint ด้วย MALDI mass spectrometer

8 นำ peptide mass fingerprint ที่ได้ไปสืบหา (matching) ชื่อโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของโลก (global 2D-gel database)

3.5 การจดทะเบียนโปรตีนในฐานข้อมูลโลก (global 2D-gel database)

1 ถ้าโปรตีนที่กำลังศึกษาเป็นโปรตีนใหม่ที่ยังไม่เคยมีการจดทะเบียนไว้ในฐานข้อมูลของโลก (global 2D-gel database) จะทำการจดทะเบียนเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในฐานข้อมูลของโลก (global 2D-gel database) ต่อไป

4 แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่ 1

เดือนที่ 1 สั่งซื้อวัสดุวิทยาศาสตร์

ศึกษาระยะเวลาของวงจรการลอกคราบ

เดือนที่ 2 ศึกษาระยะเวลาของวงจรการลอกคราบ (ต่อ)

เดือนที่ 3 เก็บกุ้งตัวอย่างในระยะต่าง ๆ จากบ่อเลี้ยง ครั้งที่ 1

เดือนที่ 4 เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา cell morphology ของ epidermis ด้วย วิธี histochemistry

เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา ultrastructure ของ epidermis ด้วยวิธี TEM

เดือนที่ 5 เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา cell morphology ของ epidermis ด้วย วิธี histochemistry (ต่อ)

เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา ultrastructure ของ epidermis ด้วยวิธี TEM (ต่อ)

เดือนที่ 6 รายงานความก้าวหน้า ครั้งที่ 1 และ นำส่ง สกว.*

เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา cell morphology ของ epidermis ด้วย วิธี histochemistry (ต่อ)

เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา ultrastructure ของ epidermis ด้วยวิธี TEM (ต่อ)

เดือนที่ 7 ศึกษา cell morphology ของ epidermis ด้วย วิธี histochemistry (ต่อ)

ศึกษา ultrastructure ของ epidermis ด้วยวิธี TEM (ต่อจนถึงเดือนที่12)

เดือนที่ 8 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 1

เดือนที่ 9 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 1 (ต่อ)

เดือนที่ 10 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 1 (ต่อ)

เดือนที่ 11 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 1 (ต่อ)

เดือนที่ 12 นำกุ้งมาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงชั่วคราวในห้องปฏิบัติการเพื่อเก็บกุ้งตัวอย่างในระยะต่าง ๆ ครั้งที่ 3 และ ตรวจสอบระยะต่าง ๆ ของกุ้งด้วยวิธี histochemistry

รายงานความก้าวหน้า ครั้งที่ 2 และ นำส่ง สกว.*

ปีที่ 2

เดือนที่ 13 ตรวจสอบระยะต่าง ๆ ของกุ้งด้วยวิธี histochemistry จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 (ต่อ)

เดือนที่ 14 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 2

เดือนที่ 15 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 2 (ต่อ)

เดือนที่ 16 เก็บกุ้งตัวอย่างในระยะต่าง ๆ ครั้งที่ 4 และ ตรวจสอบระยะต่าง ๆ ของกุ้งด้วยวิธี histochemistry

เดือนที่ 17 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 3

เตรียม gel spots และ ส่งตรวจ peptide fingerprinting

เดือนที่ 18 ศึกษา protein expression ด้วยวิธี 2D SDS-PAGE ครั้งที่ 3 (ต่อ)

เดือนที่ 19 เตรียม dried gel spots และส่งไปตรวจ peptide fingerprinting ครั้งที่ 2

เดือนที่ 20 เตรียม dried gel spots และส่งไปตรวจ peptide fingerprinting ครั้งที่ 2 (ต่อ)

Database search

เดือนที่ 21 เตรียม dried gel spots และส่งไปตรวจ peptide fingerprinting ครั้งที่ 3

Database search

เดือนที่ 22 เตรียม dried gel spots และส่งไปตรวจ peptide fingerprinting ครั้งที่ 3 (ต่อ)

Database search (ต่อ)

เดือนที่ 23 Database search (ต่อ)

เดือนที่ 24 จัดทำรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ และ นำส่ง สกว.*

ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Morphological changes of epidermal tissue during molting cycle of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Aquaculture (impact factor ปี 2001 คือ 1.536)

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Changes in protein expression of epidermal tissue during molting cycle of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) : Proteomics approach

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Proteomics (เป็นวารสารใหม่ยังไม่มีข้อมูล impact factor ปี 2001)

5 **งบประมาณโครงการ** 480,000 บาท