

ลักษณะสมบัติของ carcininPm2 จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)
และ LvCrustinA จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

กรกฎาคม 2561

ลักษณะสมบัติของ carcininPm2 จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)
และ LvCrustinA จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

กรกฎาคม 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ลักษณะสมบัติของ carcininPm2 จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)
และ LvCrustinA จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2561

อรรวรรณ เปี้ยพรัตน์. (2561). ลักษณะสมบัติของ *carcininPm2* จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ *LvCrustinA* จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญา
นิพนธ์: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาวรัตน์ ดอนพุดชา.

ครัสตินเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง มีหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อจากจุลชีพต่างๆ โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับครัสตินชนิด 1 (*carcininPm2*) จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และครัสตินชนิดที่ 2 (*LvcrustinA*) ที่ขาดบริเวณที่มีกรดอะมิโน Cysteine อยู่มาก (Cys-rich) จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) งานวิจัยนี้จึงสนใจผลิตโปรตีนลูกผสมของ *carcininPm2* (*rcarcininPm2*) และบริเวณโดเมน WAP ของ *carcininPm2* (*rcarcininPm2_WAP*) และ *LvcrustinA* (*rLvcrustinA*) ในระบบ *Escherichia coli* เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ โดยยีน *carcininPm2*, *caicininPm2_WAP* และ *LvcrustinA* ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 336, 246 และ 519 คู่เบส ตามลำดับ สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 111, 81 และ 172 โมเลกุล ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ พบว่า *rcarcininPm2* (*rcarcininPm2*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio harveyi* 639 และ *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND) แต่ *rcarcininPm2_WAP* ไม่พบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ สำหรับ *rLvcrustinA* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้เมื่อนำ *rcarcininPm2* และ *rcarcininPm2_WAP* ไปทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและกระบวนการเกิด agglutination ผลการทดลองที่ได้พบว่า โปรตีนทั้งสองชนิดไม่สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ agglutination ได้ รวมทั้งเมื่อนำ *rcarcininPm2* ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของไวรัส ตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) ยังพบอีกว่า *rcarcininPm2* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสทั้งสองได้เช่นกัน ดังนั้นทั้ง *caicininPm2* และ *LvcrustinA* น่าจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อการรุกรานของเชื้อแบคทีเรีย

CHARACTERIZATION OF CARCININ $Pm2$ FROM BLACK TIGER SHRIMP

(*Penaeus monodon*) AND LvCRUSTINA FROM WHITELEG SHRIMP

(*Litopenaeus vannamei*)



AN ABSTRACT

BY

ORAWAN PIAPRAD

Presented in Partial Fulfillment of Requirements for the

Master of Education Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

July 2018

Orawan Piaprad. (2018). *Characterization of CarcininPm2 from Black Tiger shrimp (Penaeus monodon) and LvCrustinA from Whiteleg Shrimp (Litopenaeus vannamei)*. Master's thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor: Asst. Prof. Dr. Suchao Donpuksa.

Crustins are antimicrobial peptides that are found in shrimp immune system. Their function is to defend the shrimp against microbial infection. In previous studies, a type-I crustin (carcininPm2) from the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and a new type-II crustin (LvcrustinA) lacking the Cysteine-rich (Cys-rich) region in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) have never been explored. In this study, three recombinant proteins, carcininPm2 (rcarcininPm2) and its WAP domain (rcarcininPm2_WAP) and LvcrustinA (rLvcrustinA), were produced in *Escherichia coli* system in order to determine antimicrobial activities. From the nucleotide and amino acid sequences, the carcininPm2, carcininPm2_WAP and LvcrustinA gene contains an open reading frame of 336, 246 and 519 bps encoding 111, 81 and 172 amino acid residues, respectively. From the results of the antimicrobial activity, the rcarcininPm2 presented growth inhibition against *Vibrio harveyi* 639 and *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND). However, the rcarcininPm2_WAP was not found to have antimicrobial activity. In terms of the antimicrobial activity of the rLvcrustinA, it was active against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. In addition, the binding properties of bacterial membranes, the agglutination activity and antiviral activity against white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) were tested with rcarcininPm2. The results showed that it was not found in these activities. However, the carcininPm2 and the LvcrustinA were probably involved in the shrimp immune system against bacteria.

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

ลักษณะสมบัติของ carcininPm2 จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

และ LvCrustinA จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ของ

อรวรรณ เปี้ยพริต

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

วันที่ เดือน พ.ศ. 2561

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษา

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์ ดอนพุดชา)

(ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์ ดอนพุดชา)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นवलละออ รัตนวิมานวงศ์)



งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัย

จาก

สถาบันส่งเสริมการสนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและการให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์ ดอนพุดชา ประธานกรรมการควบคุมปริญญาานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นवलลอบ รัตนวิมานวงศ์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำเพื่อให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) โดยสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) สำหรับการสนับสนุนทุนการศึกษา

ขอขอบคุณนางสาวสุวิธนา วิเศษนันท์ นักวิจัยในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุชีววิทยา และจีโนมกุ่ม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการช่วยเหลือในการให้คำปรึกษาและแนะนำการทดลองในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณกัลยาณมิตรทุกท่านที่อยู่เคียงข้างกันเสมอมาทั้งในยามทุกข์และสุข คอยให้กำลังใจ และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

ท้ายสุดผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา และสมาชิกครอบครัวทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจตลอดมา คุณค่าและประโยชน์ของปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดามารดา และครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทความรู้ทั้งปวงแก่ผู้วิจัย

อรวรรณ เปี้ยพรัตน์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมาย	5
ความสำคัญของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
ลักษณะทั่วไปของกุ้ง	7
โรคของกุ้ง	9
ภูมิคุ้มกันของกุ้ง	10
เพปไทด์ต้านจุลชีพ	12
ครัสติน	15
3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
อุปกรณ์และสารเคมี	20
การโคลนยีน <i>carcinninPm2</i> ส่วนที่เป็น WAP domain ของ <i>carcinninPm2</i> (<i>carcinninPm2_WAP</i>) จากกุ้งกุลาดำ และ <i>LvCrustinA</i> จากกุ้งขาว	22
การแสดงออกของโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์	25
การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay	27
การทดสอบการจับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย	28
การทดสอบกระบวนการเกิด agglutination ของแบคทีเรีย	29
การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV	29
4 ผลการทดลอง	32
การโคลนยีน <i>carcinninPm2</i> <i>carcinninPm2_WAP</i> และ <i>LvCrustinA</i>	32
การแสดงออกของโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์	39

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4(ต่อ)	
การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay	41
การทดสอบการจับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย	43
การทดสอบกระบวนการเกิด agglutination ของแบคทีเรีย	44
การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV	45
5 สรุปลผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	48
สรุปลผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	51
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก ก	59
ภาคผนวก ข	64
ภาคผนวก ค	66
ประวัติผู้วิจัย	68

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	โปรแกรมสำหรับการโคลนยีน	24
2	โปรแกรมสำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของไวรัส	30



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 มูลค่าการส่งออกของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว	1
2 ลักษณะของครัสตินชนิดที่ 1 – 5	4
3 ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ	8
4 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว	9
5 แบบจำลองการเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์โดย AMP	14
6 องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ	15
7 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ <i>carcininPm1</i> และ <i>carcininPm2</i>	17
8 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ <i>LvcrustinA</i>	18
9 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ <i>carcininPm2</i> และ <i>LvCrustinA</i>	33
10 1.5% agarose gel ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>carcininPm2</i> <i>carcininPm2_WAP</i> และ <i>LvCrustinA</i>	35
11 1.5% agarose gel ของพลาสมิดลูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	36
12 การเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal Omega	37
13 15% SDS-PAGE ของเซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนลูกผสม <i>rcarcininPm2</i> <i>rcarcininPm2_WAP</i> และ <i>rLvCrustinA</i> ด้วย IPTG ณ เวลาต่าง ๆ	39
14 15% SDS-PAGE ของโปรตีนลูกผสม <i>rcarcininPm2</i> <i>rcarcininPm2</i> <i>_WAP</i> และ <i>rLvCrustinA</i> เมื่อถูกทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ แอฟฟิinity Ni-NTA column	40
15 กราฟแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ โปรตีน <i>rcarcininPm2</i> และ <i>rLvCrustinA</i> ด้วยเทคนิค agar diffusion assay โดยแสดงเป็นอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสของฤทธิ์ในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของแบคทีเรียจากโปรตีนเทียบกับยาปฏิชีวนะ	42

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

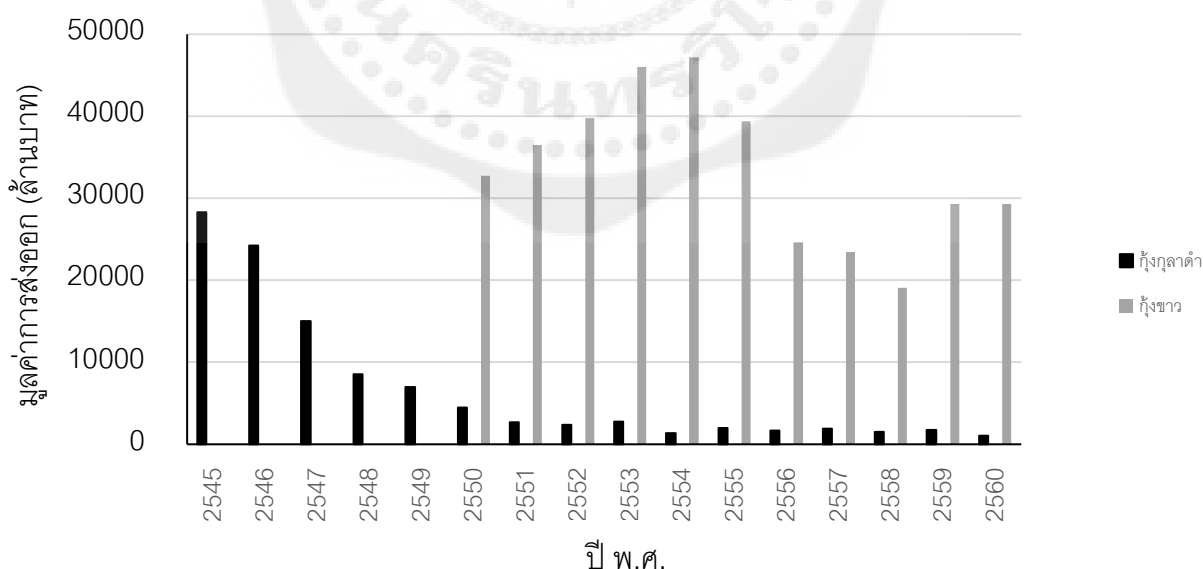
ภาพประกอบ	หน้า
16 western bolt hybridization ของการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียของ rcarcininPm2 และ rcarcininPm2_WAP	43
17 การเกิดกระบวนการ agglutination ของแบคทีเรีย เมื่อป้อนด้วย PBS rcarcininPm2 และ rcarcininPm2_WAP	45
18 15% agarose gel (ก) และกราฟแสดงความสัมพันธ์ของการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และไวรัส YHV ด้วยการบ่มกับ PBS Thioredoxin และ carcininPm2 เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเติมลงในเม็ดเลือดกึ่ง และเก็บเม็ดเลือดกึ่งที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เพื่อดูการแสดงออกของยีน WSV477 (ยีนของ WSSV) และ YHV_GP64 (ยีนของ YHV) เทียบกับ EF-1 α ที่เป็น internal control โดยใช้ RT-PCR แล้วนำผลมาวัดความเข้มของแบน โดยใช้ one-way ANOVA ที่ P < 0.05	46
19 กราฟมาตรของความเข้มข้นของสารละลาย BSA ที่ใช้ในการเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง	67

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กุ้ง เป็นสินค้าส่งออกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว จากภาพประกอบ 1 จะเห็นได้ว่ามูลค่าการส่งออกของกุ้งทั้งสองชนิดลดลงเป็นอย่างมาก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร . 2561: ออนไลน์) เนื่องจากได้มีโรคระบาดแพร่เข้ามาภายในประเทศไทย ส่งผลให้กุ้งเกิดการติดเชื้อและตายในที่สุด เหตุการณ์ในครั้งนั้นส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างมาก เกษตรกรจึงเริ่มหันมาใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคระบาดต่าง ๆ ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีสารตกค้างอยู่ในน้ำและดิน ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมดีดื้อยาเพิ่มขึ้นจนไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคได้ (ชะลอ ลี้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทวีรัชชกุล. 2547: 19; วิณา จิรัตวิรุฒม์กุล. 2550: 26) นอกจากนี้โรคระบาดบางชนิดยังส่งผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ ส่งผลให้ขนาดของกุ้งกุลาดำไม่ได้มาตรฐาน หรือตายก่อนถึงเวลาโตเต็มวัย (อนุชิต ธนะวดี. 2554: 1-3)



ภาพประกอบ 1 มูลค่าการส่งออกของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร . 2561: ออนไลน์)

ดังนั้นปัญหาหลักอย่างหนึ่งของการเพาะเลี้ยงกุ้งคือ การเกิดโรคระบาดในกุ้งที่ทำให้การส่งออกกุ้งลดลง ซึ่งโรคระบาดที่มักพบในการเพาะเลี้ยงกุ้งคือ โรคที่เกิดจากไวรัส เช่น โรคที่เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ทำให้กุ้งมีลักษณะเป็นดวงขาวที่บริเวณเปลือก โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวและส่วนหาง และโรคที่เกิดจากไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus, YHV) กุ้งที่เป็นโรคนี้อาตั่วจะซีด และบริเวณส่วนหัวจะมีสีเหลือง เนื่องจาก hepatopancreas มีสีเข้มขึ้น เพราะ hepatopancreas ถูกทำลายด้วยไวรัส YHV นอกจากนี้มีโรคระบาดที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เช่น โรคแบคทีเรียเรืองแสง เกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ให้สารที่มีแสงสีเขียวแกมเหลือง ทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด เมื่อมีแบคทีเรียชนิดนี้มากเกินไป จะทำให้ hepatopancreas ของกุ้งถูกทำลาย ทำให้ไม่สามารถย่อยและเก็บสารอาหารได้ตามปกติ (ชลอ ลัมสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรัชชกุล. 2547: 197-203) และโรคตายด่วน (early mortality syndrome, EMS) เกิดจาก *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND) ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคได้ ผลให้ hepatopancreas ของกุ้งถูกทำลายอย่างรุนแรง ส่งผลให้กุ้งตายจนกระทั่งหมดบ่อ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2560: ออนไลน์)

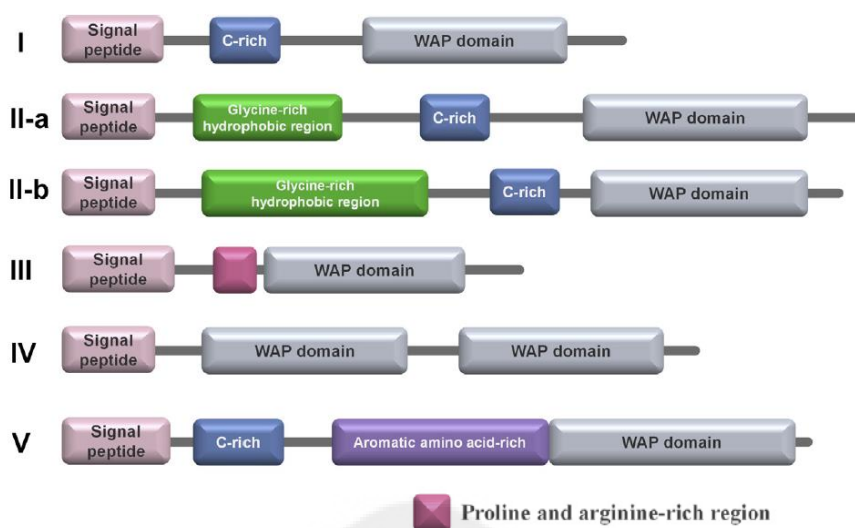
โรคระบาดเหล่านี้ล้วนแล้วแต่ทำให้ปริมาณการเพาะเลี้ยงกุ้งลดลง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาแนวทางแก้ไข ป้องกัน และเพิ่มผลผลิตของกุ้งในไทย ทั้งการศึกษาเรื่องปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงกุ้ง (สิริ เอกมาหาราช. 2548: 1-48) การใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. เพื่อเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้สูงขึ้น (เจริญ เจริญธรรม; และ ชรินทร์ แสงรุ่งเรือง. 2548: 1-28) การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจโรค (อรรคพล วณิกสัมบัน. 2556: 56-59) และอีกแนวทางหนึ่งคือ การศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Tassanakajon; et al. 2013: 954-967)

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจะศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยระบบภูมิคุ้มกันจะทำให้กุ้งสามารถมีชีวิตรอดจากการได้รับเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หรือเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายของกุ้ง โดยระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นแบบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะหรือไม่สามารถจดจำความแตกต่างของเชื้อโรคได้ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การตอบสนองด้วยเซลล์ (cellular response) ประกอบไปด้วยการกินเซลล์แบบฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และการตอบสนองอีกรูปแบบหนึ่งคือ การตอบสนองด้วยสารน้ำ (humoral response) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน เอนไซม์ และสารต่าง ๆ ที่ถูกผลิตขึ้นภายในตัวกุ้ง เช่น AMP (Antimicrobial peptide, AMP)

ต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น พีเนียดิน (penaeidins) ไลโซไซม์ (lysozyme) ครัสติน (crustins) แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (antilipopopolysaccharide factors, ALFs) และสไทลิซิน (stylicins) เป็นต้น (Tassanakajon; et al. 2015: 324–341)

AMP เป็นเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนน้อยกว่า 100 โมเลกุล และพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป จึงมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกับสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากสัตว์กลุ่มนี้จะขาดระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคต่าง ๆ AMP เป็นเพปไทด์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้มีรายงานการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ AMP หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งพบว่า AMP แต่ละชนิดมีอยู่หลายไอโซฟอร์ม โดยแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันไป (Tassanakajon; et al. 2015: 324–341) จากการศึกษา AMP ในกุ้งพบว่า AMP ที่ใช้ยับยั้งสิ่งแปลกปลอมนี้มักจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งได้รับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมซึ่ง AMP แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกัน (Donpuksa; et al. 2014: 95–103; Liu; et al. 2016: 145–153; Yu. & Shi. & Wang. 2016; 30–38)

ครัสติน (crustins) เป็นเพปไทด์ชนิดหนึ่งใน AMP มีลักษณะเฉพาะที่ประกอบด้วยบริเวณที่เรียกว่า Whey acidic protein domain (WAP domain) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน Cysteine (Cys) จำนวนมาก โดย WAP domain จะอยู่บริเวณปลาย C ของสายพอลิเพปไทด์ของครัสติน ในปัจจุบันสามารถจำแนกครัสตินได้ 5 ชนิด ดังภาพประกอบ 2 โดยที่ครัสตินทุกชนิดจะมีลักษณะของ WAP domain ที่ปลายคาร์บอกซิลของสายพอลิเพปไทด์ และมีเพปไทด์ที่ส่งสัญญาณ (signal peptide) ซึ่งอยู่บริเวณปลายอะมิโนเหมือนกัน ซึ่งความแตกต่างของครัสตินแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่าง WAP domain และเพปไทด์ส่งสัญญาณ โดยชนิดที่ 1 จะประกอบไปด้วยบริเวณที่มี Cys อยู่มาก (Cys-rich) ชนิดที่ 2 จะมีบริเวณที่มีกรดอะมิโน Glycine อยู่มาก (Gly-rich) และ Cys-rich ในชนิดที่ 3 จะมีบริเวณที่มีกรดอะมิโน Proline (Pro) และ Arginine (Arg) อยู่มาก (Pro and Arg-rich) ส่วนประเภทที่ 4 จะประกอบด้วย WAP domain 2 ตำแหน่ง (double WAP domain) และประเภทที่ 5 จะคล้ายกับประเภทที่ 1 แต่มีกรดอะมิโนที่เป็นวงอะโรมาติกอยู่มาก (aromatic amino-rich) เพิ่มเข้ามาด้วย (Tassanakajon; et al. 2015: 324–341) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ ของครัสติน โดยส่วนมากครัสตินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Smith. 2011: 1403–1408) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยพบว่า ครัสตินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสได้อีกด้วย (Donpuksa; et al. 2014: 95–103)



ภาพประกอบ 2 ลักษณะของครัสตินชนิดที่ 1 – 5 (Tassanakajon; et al. 2013: 954-967)

โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาครัสตินชนิดที่ 1 ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งครัสตินชนิดที่ 1 มักจะพบในปู กุ้ง ลอบสเตอร์ และสามารถยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Tassanakon; et al. 2015: 324–341) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครัสตินในกุ้งเครย์ฟิช (*Pacifastacus leniusculus*) โดยผลการทดลองที่ได้พบว่า ครัสตินชนิดที่ 1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้ (Donpudsa; et al. 2010: 234-238) แต่การศึกษาครัสตินในกุ้งแดง (red swamp crayfish) พบว่าครัสตินชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบคือ *Escherichia coli* ได้ ถึงแม้ว่าฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แกรมลบจะมีฤทธิ์ที่น้อยกว่า (Yu; et al. 2016: 30-38) และกุ้งเรนโบว์ หรือกุ้งก้ามแดง (red claw crayfish) พบว่าความสามารถของ rPcCru ซึ่งเป็นครัสตินชนิดที่ 1 ในกุ้งเรนโบว์สามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *E. coli* ได้ (Liu; et al. 2016: 145-153) แต่อย่างไรก็ตามในกุ้งกุลาดำกลับไม่พบรายงานเกี่ยวกับครัสตินชนิดที่ 1 จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2014 ได้มีนักวิจัยกลุ่มหนึ่งค้นพบครัสตินชนิดที่ 1 จำนวน 2 ไอโซฟอร์มในกุ้งกุลาดำคือ *carcininPm1* และ *carcininPm2* (Donpudsa; et al. 2014: 95–103) อีกด้วย งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ *carcininPm2* ในกุ้งกุลาดำ

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังสนใจที่จะศึกษาครัสตินชนิดที่ 2 ในกุ้งขาวด้วย ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับครัสตินชนิดต่างๆ ในกุ้งขาว ดังนี้ Shockey; et al. (2009: 668-673) ได้ศึกษาการแสดงออกของ *LvABP1* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 2 พบว่า เมื่อฉีด double-stranded RNA (dsRNA) ของยีนนี้เข้าไปแล้ว จะทำให้กุ้งขาวที่ได้รับ dsRNA และ *Vibrio penaeicida* มีอัตราการตายที่สูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การศึกษาของ Visetnan; et al. (2017: 341-348) พบว่า *LvSWD* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จนกระทั่งมีการรายงานของ Li; et al. (2018: 42-49) ได้ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของ *LvcrustinA* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 2 ที่แตกต่างจากยีนครัสตินชนิดที่ 2 อื่น ๆ คือไม่มีบริเวณ Cys-rich ผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อกระตุ้นกุ้งขาวโดยการฉีด *Vibrio parahaemolyticus* และไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าไปภายในตัวกุ้ง ยีนของครัสตินชนิดนี้มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น แสดงว่ายีนนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาบทบาทและหน้าที่ของ *carcininPm2* *carcininPm2_WAP* จากกุ้งกุลาดำ และ *LvCrustinA* จากกุ้งขาว เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาบทบาทของครัสตินต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาวิธีการควบคุมโรคในกุ้งต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาบทบาทและหน้าที่ของครัสติน *carcininPm2* และ WAP domain ของ *carcininPm2* จากกุ้งกุลาดำ ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและไวรัส การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และการเกิดกระบวนการ agglutination รวมทั้งศึกษาบทบาทหน้าที่ของ *LvCrustinA* จากกุ้งขาวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ขอบเขตการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะศึกษาบทบาทและหน้าที่ของครัสติน *carcininPm2* และ WAP domain ของ *carcininPm2* จากกุ้งกุลาดำ ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและไวรัส การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และการเกิดกระบวนการ agglutination รวมทั้งศึกษาบทบาทหน้าที่ของ *LvCrustinA* จากกุ้งขาวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเริ่มจากการโคลนยีน *carcininPm2* และ WAP domain ของ *carcininPm2* จากกุ้งกุลาดำ และ *LvCrustinA* จากกุ้งขาว เข้าไปใน *E. coli* เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสม จากนั้นนำโปรตีนที่ผลิตได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ด้วยวิธี agar diffusion assay สำหรับ *carcininPm2* และบริเวณ WAP domain ของ *carcininPm2* จากกึ่งกลาดำ จะนำไปศึกษาสมบัติการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และการเกิด agglutination และนำเฉพาะ *carcininPm2* การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV

ความสำคัญของการวิจัย

การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำและกึ่งขาวในครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับครีตีน และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพในกึ่งมากขึ้น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมโรคของกึ่งต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ลักษณะทั่วไปของกุ้ง
2. โรคของกุ้ง
3. ภูมิคุ้มกันของกุ้ง
4. AMP
5. ครัสติน

1. ลักษณะทั่วไปของกุ้ง

1.1. ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

1.1.1. อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus Penaeus

Species monodon

1.1.2. ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus monodon* ในประเทศไทยนั้นเรียกได้หลายชื่อเช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งทะเล กุ้งเสือดำนก กุ้งเสื่อ หรือกุ้งลาย มักอาศัยอยู่บริเวณเขตร้อนชื้น น้ำลึก ห่างจากชายฝั่ง แต่ไม่สามารถทนความเค็มสูงได้ มีลักษณะลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขาว 9 ลาย ซึ่งลายที่พาดขวางนั้นจะมีสีน้ำตาลสลับแถบขาว ลักษณะภายนอกของกุ้งกุลาดำ

ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นหัวและอก (Cephalothorax) และส่วนท้อง (Abdomen) โดยที่ส่วนหัวและอกจะมีหนวด 2 คู่ แบ่งเป็นหนวดคู่ยาว 1 คู่ (Antennule) และหนวดคู่สั้น 1 คู่ (antenna) มีระยางค์ที่ใช้ในการกิน (maxilliped) และระยางค์ที่ใช้ในการเดิน (Pereopods) โดยที่ขาเดินคู่แรกเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ (cheliped) เพื่อใช้จับเหยื่อ และระยางค์ที่ส่วนท้องเป็นขาว่ายน้ำ (pleopods) โดยที่คู่สุดท้ายเป็นแพนหาง(uropod) อวัยวะภายในของกุ้งกุลาดำประกอบด้วย เหงือก เป็นอวัยวะสำหรับการหายใจและแลกเปลี่ยนแก๊สกับเลือดที่มาจากหัวใจ ซึ่งหัวใจของกุ้งกุลาดำจะอยู่ถัดจากกระเพาะอาหาร โดยที่บริเวณใต้กระเพาะอาหารจะมี hepatopancreas ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ผลิตน้ำย่อย โดยมีลำไส้เล็กอยู่บริเวณส่วนท้องต่อจากกระเพาะอาหาร



ภาพประกอบ 3 ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ (Indiamart. 2015: ออนไลน์)

1.2. ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

1.2.1. อนุกรมวิธานของกุ้งขาว

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus Penaeus

Species vannamei

1.2.2. ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

กุ้งขาว หรือที่เรียกว่า กุ้งแวนนาไม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus vannamei* ลักษณะโดยทั่วไปคือ เป็นกุ้งที่มีลำตัวสีขาว มี 8 ปล้อง แบ่งเป็นส่วนหัว 1 ปล้อง ส่วนลำตัว 6 ปล้อง และส่วนหาง 1 ปล้อง ส่วนของกรีเป็นสามเหลี่ยมสีแดงอมน้ำตาล เปลือกหุ้มมีสีขาวยอมชมพู ขาเดินมีสีขาว หนวดแดงยาว 2 เส้น และมีขาว่ายน้ำ 5 คู่ (ศรัญญา ปลาอ่อน. 2556: 6-7)



ภาพประกอบ 4 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว (ชัยวุฒิ สุดทองคง. 2561. ออนไลน์)

2. โรคของกุ้ง

2.1. โรคที่เกิดจากไวรัส

2.1.1. โรคตัวแดงดวงขาว

โรคตัวแดงดวงขาว หรือโรคดวงขาวเกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome, WSSV) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีขนาดใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่เป็นวง (dsDNA) (ฝนต้นสกุล. 2550: 8-9) พบว่าไวรัสชนิดนี้มีการแพร่ระบาดในประเทศญี่ปุ่นและจีนในช่วงพ.ศ. 2536 – 2537 และระบาดเข้ามาในประเทศไทยปลายปี พ.ศ. 2537 ซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเป็นอย่างมาก (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547: 197) ลักษณะของโรคนี้จะทำให้กุ้งมีจุดขาวบนเปลือก รยางค์ และผิวหนังในของร่างกาย และยังส่งผลให้กุ้งนั้นมีลักษณะเชิงซึม เฉื่อยชา ลอยตัวอยู่ริมขอบบ่อ เมื่อกุ้งได้รับไวรัสจะกินอาหารได้น้อยลง และมีการตายเพิ่มมากขึ้นจนสังเกตได้ภายใน 2-3 วัน นอกจากนี้ตั้บและตั้บอ่อนยังมีสีแดงอีกด้วย (chou; et al. 1995: 133 – 141)

2.1.2. โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลือง พบครั้งแรกในประเทศไทย พ.ศ. 2536 เกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งไวรัสชนิดนี้เป็นไวรัส RNA สายเดี่ยว (ssRNA) (อภิฤดี สงสุข. 2554: 12-13) สามารถอยู่ในน้ำทะเลมากกว่า 12 ชั่วโมง แต่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคนี้จะมีบริเวณหัวเป็นสีเหลืองซีด (Flegel. 1997: 433 - 442) เนื่องจาก hepatopancreas สีซีดเหลือง เมื่อกุ้งได้รับไวรัสชนิดนี้ในช่วงแรกนั้นกุ้งจะกินอาหารในปริมาณมากแล้วค่อย ๆ หยุดกินจนกระทั่งมีกุ้งเริ่มตาย และตายหมดบ่อภายใน 2 – 3 วัน (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรักษ์ชกุล. 2547: 200)

2.2. โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

2.2.1. โรคแบคทีเรียเรืองแสง

โรคแบคทีเรียเรืองแสงเกิดจากแบคทีเรีย *V. harveyi* แบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมาได้จากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส กุ้งที่ได้รับแบคทีเรียชนิดนี้จะเกยหรือว่ายอยู่ตามขอบบ่อ ซึ่งจะเห็นการเรืองแสงได้ชัดเจนที่บริเวณหัวในเวลากลางคืน เนื่องจาก hepatopancreas ถูกทำลายอย่างรุนแรงส่งผลให้การย่อยอาหารผิดปกติและทำให้กุ้งตาย (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทรรักษ์ชกุล. 2547: 203)

2.2.2. โรคตายด่วน

โรคกุ้งตายด่วน หรือกลุ่มอาการตายด่วน (early mortality syndrome, EMS) หรือเรียกว่ากลุ่มอาการ hepatopancreas ตายเฉียบพลัน เกิดจาก *V. parahaemolyticus* (AHPND) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีพลาสมิดซึ่งประกอบด้วยยีน *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคตายด่วนของกุ้ง (Xiao; et al. 2017: 1-10) โดยการติดเชื้อจะเกิดขึ้นภายใน 20-30 วันหลังจากปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยง เมื่อกุ้งได้รับแบคทีเรียชนิดนี้ hepatopancreas ของกุ้งจะทำลายอย่างรุนแรง ในช่วงแรกกุ้งในบ่อจะไม่แสดงอาการผิดปกติอย่างชัดเจน แต่จะมีการว่ายน้ำแบบซ้าลง กินอาหารได้ลดลง ส่วนของเปลือกนิ่ม และมีสีเข้มขึ้น และหลังจากนั้นจะเริ่มพบกุ้งตายมากขึ้น (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2560: ออนไลน์)

3. ภูมิคุ้มกันของกุ้ง

กุ้งจะใช้ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ โดยใช้เม็ดเลือด (hemocyte) เป็นหลักในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม เม็ดเลือดนั้นสามารถแบ่งได้ 3 ชนิด คือ เซลล์ไฮยาลิน (hyaline cell) เป็นเซลล์ที่ไม่

มีแกรนูโล มีขนาดเล็ก ใช้ในกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เซลล์เซมิแกรนูลาร์ (semi-granular cell) มีแกรนูโลขนาดเล็ก และขนาดของเซลล์ใหญ่กว่าเซลล์ไฮยาไลน์ และเซลล์แกรนูลาร์ (granular cell) เป็นเซลล์ที่มีแกรนูโลจำนวนมาก และเป็นตำแหน่งของระบบโปรเฟโนลออกซิเดส (ProPO system)

เมื่อสิ่งแปลกเข้ามาภายในร่างกาย กิ่งจะใช้โปรตีนในกลุ่มของ PRRs (pattern recognition receptor หรือ pattern recognition proteins) เช่น เลคติน (lectin) เป็นต้น จับกับ pathogen associated molecular patterns (PAMPs) เช่น lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid (LTA), peptidoglycan (PG) และ β -1,3-glycan (BG) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพ โดยที่ PRRs ที่ต่างกันจะส่งสัญญาณผ่านกลไกการตอบสนองที่แตกต่างกัน ผ่านกลไกการตอบสนอง 2 รูปแบบ คือ การใช้เซลล์ในการตอบสนอง (cellular respond) และการใช้สารน้ำในการตอบสนอง (humoral respond) (ศิริขวัญ พลประทีป. 2556: 22-27)

3.1. ระบบภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ในการตอบสนอง

ในการใช้เซลล์ในการตอบสนองนั้น เป็นการที่เซลล์ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยผ่านกระบวนการฟาโกไซโทซิส ซึ่งเป็นกระบวนการทำลายโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดเคลื่อนกินสิ่งแปลกปลอม แล้วปล่อยเอนไซม์ไลโซโซม (lysosomal enzyme) เข้าไปทำลายสิ่งแปลกปลอม แต่ถ้าสิ่งแปลกปะนั้นมีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร จะเกิดกระบวนการการทำลายสิ่งแปลกปลอมผ่านกระบวนการเอนแคปซูลชัน (encapsulation) นอกจากนี้ยังสามารถเกิดกระบวนการ nodule formation ได้อีกด้วย

3.2. ระบบภูมิคุ้มกันแบบใช้สารน้ำในการตอบสนอง

ภายในเซลล์เม็ดเลือดจะเกิดการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เพื่อใช้ในการตอบสนองการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม ซึ่งในการตอบสนองแบบนี้เรียกว่า การตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (humoral response) ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลโซโซมจะถูกปล่อยออกจากเซลล์เม็ดเลือดระหว่างเกิดการฟาโกไซโทซิส หรือเอนแคปซูลชัน นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ ที่เป็นสารน้ำ เช่น โปรเฟโนลออกซิเดส (prophenoloxidase) AMP สารยับยั้งเอนไซม์โปรทีเนส (proteinase inhibitors) เป็นต้น (Tassanakajon; et al. 2013: 954-967)

4. AMP

4.1. ลักษณะทั่วไปของAMP

AMP เป็นเพปไทด์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญสำหรับการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด AMP เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กที่มีกรดอะมิโนจำนวนน้อยกว่า 100 โมเลกุล มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้หลายชนิด และเป็นได้ทั้งโมเลกุลที่มีประจุเป็นบวก (cationic molecules) และประจุลบ (anionic molecules) AMP สามารถทำลายจุลชีพได้โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพ เช่น AMP ที่มีประจุเป็นบวกจะสามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ โดยจับกับ LTA ของแบคทีเรียแกรมบวก หรือจับกับ LPS ของแบคทีเรียแกรมลบ เป็นต้น เนื่องจาก AMP ไม่มีความจำเพาะเจาะจงจึงสามารถทำลายจุลชีพได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ หรือไวรัสบางชนิด AMP ถูกจัดประเภทตามลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้าง เช่น พีเนียดิน (penaeidins) ไลโซไซม์ (lysozyme) ครัสติน (crustins) แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (antilipopolsaccharide factors, ALFs) และสไทลิซิน (stylicins) เป็นต้น (Intorasoot. 2013: 1-19; Tassanakajon; et al. 2011: 639-657)

พีเนียดิน เป็น AMP ที่มีประจุบวกซึ่งมีบริเวณของโดเมนที่มีกรดอะมิโนโพรลีนอยู่มาก (proline-rich domain, PRD) อยู่ที่บริเวณปลายด้านอะมิโน และมีบริเวณของกรดอะมิโนซิสเตอีน 6 โมเลกุล ที่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ 3 พันธะ อยู่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิล โดยพีเนียดินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้พีเนียดินยังมีบทบาทที่เกี่ยวกับไซโตไคน์อีกด้วย (Tassanakajon; et al. 2011: 639-657)

ไลโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ทำให้องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแตกด้วยการทำลายพันธะไกลโคซิดิกที่บริเวณของ peptidoglycan ส่งผลให้แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบตายเนื่องจากถูกทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันจากไวรัสตัวแดงดวงขาวได้อีกด้วย (Tassanakajon; et al. 2011: 639-657)

แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ เป็น AMP ที่มีทั้งชนิดที่เป็นประจุบวก และชนิดที่เป็นประจุลบ ซึ่งแอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยโดเมน LPS-binding ที่มีโครงสร้างของ β -hairpin ที่มีบริเวณอนุรักษ์ของพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งในบริเวณของพันธะไดซัลไฟด์จะมีบริเวณอนุรักษ์ของกลุ่มของกรดอะมิโน Lys และ Arg ซึ่งส่งผลให้แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นชนิดที่เป็นประจุบวก และถ้ามีกลุ่มของกรดอะมิโน Glu และ Asp จะทำให้แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์เป็นชนิดที่เป็นประจุลบ และยัง

มีบริเวณส่วนที่ไม่ละลายน้ำด้วย โดยฤทธิ์ทางชีวภาพของแอนติไลโปพอลิแซกคาไรด์จะขึ้นอยู่กับ การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งแปลกปลอม (Tassanakajon; et al. 2011: 639-657)

สไทลิซิน เป็น AMP ที่ประกอบด้วย PRD ที่บริเวณปลายด้านกรดอะมิโน และ Cys-rich ที่ บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิล โดยสไทลิซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย รวมถึงสามารถทำให้เกิด กระบวนการ agglutination ที่ความเข้มข้นสูงได้ นอกจากนี้สไทลิซินยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของฟังไจอีกด้วย (Tassanakajon; et al. 2011: 639-657)

ครัสติน เป็นหนึ่งใน AMP ที่มีประจุบวก ซึ่งประกอบด้วย WAP domain ที่บริเวณปลายด้าน คาร์บอกซิล และมีเปปไทด์ส่งสัญญาณบริเวณปลายด้านกรดอะมิโน ซึ่งครัสตินสามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของแบคทีเรีย และไวรัสได้ (Tassanakajon; et al. 2011: 639-657)

AMP สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้หลายชนิด เนื่องจาก AMP สามารถจับกับ เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ด้วยแรงทางไฟฟ้า และทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียตายได้ (Torrent; et al. 2011; 5237-5244) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการจับ กับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และการเกิดกระบวนการ agglutination

4.2. การเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์

โดยกลไกในการทำลายแบคทีเรียของ AMP นั้น มี 3 ขั้นตอน โดยขั้นแรกจะเกิดการดึงดูด ระหว่าง AMP กับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (cell attraction) ซึ่งจะอาศัยแรงขั้วไฟฟ้า (electrostatic) เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีองค์ประกอบของสารบนผิวของเซลล์มีประจุลบ จะเกิดการดึงดูดกับ AMP ที่มี ประจุเป็นบวก จากนั้น AMP จะเกิดการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยที่เปปไทด์ด้านจุลชีพจะแทรกตัวผ่านเยื่อ หุ้มเซลล์ไปเกาะกับประจุลบของฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ และในขั้นสุดท้าย AMP จะแทรกตัวผ่าน ชั้นลิพิดไบเลเยอร์ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยที่ AMP จะแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิด เป็นรู แล้วทำให้สารต่าง ๆ จากภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลออกสู่ภายนอกเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียตาย (Intorasoot. 2013: 1-19)

แบบจำลองของการเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์นั้นมี 3 แบบ (Intorasoot. 2013: 1-19; Salwiczek; et al. 2014: 82-90) คือ

1. แบบจำลอง carpet

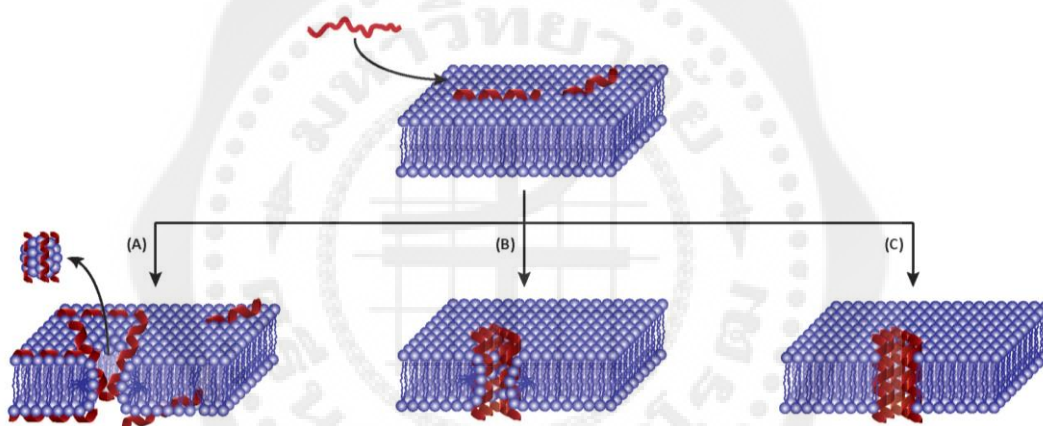
เป็นการเกิดรูที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเกิดจากการที่มี AMP การ สะสมและเรียงตัวขนานกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วเกิดการห่อหุ้มโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ของแบคทีเรียจนมีลักษณะคล้ายกับไมเซลล์ (micelles) และหลุดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์

2. แบบจำลอง barrel-stave

แบบจำลองนี้อาศัยคุณสมบัติความเป็น amphipathicity ของ AMP โดย AMP จะใช้ส่วนของกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำจับกับส่วนนอกของ head group lipid bilayer จากนั้นใช้ส่วนของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย การจำลองตัวนี้อาศัยโครงสร้าง alpha-helix จำนวน 3-11 แห่ง เรียงต่อกันแล้วทำให้เกิดรู

3. แบบจำลอง toroid หรือ wormhole

มีลักษณะคล้ายกับแบบจำลอง barrel stave คือ AMP จับที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้กรดอะมิโนส่วนไม่ชอบน้ำ จากนั้นแทรกส่วนของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำเข้าไป แล้วกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างลิปิดโมโนเลเยอร์ (lipid monolayer) ขึ้น โดยจะมีเปปไทด์ที่แทรกเข้าไปจำนวน 3-6 เปปไทด์ และเกิดเป็นรูเกิดขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพ

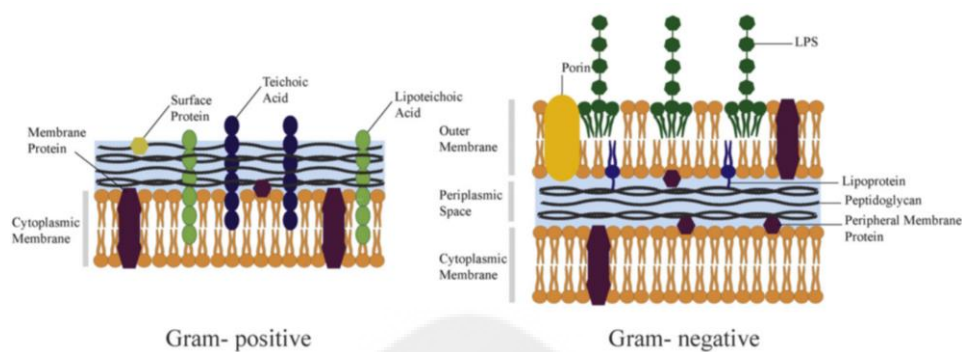


ภาพประกอบ 5 แบบจำลองการเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์โดย AMP (A) แบบจำลอง carpet (B) แบบจำลอง toroid หรือ wormhole (C) แบบจำลอง barrel-stave (Salwiczek; et al. 2014: 82-90)

4.3. การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย

การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียกับ AMP เกิดขึ้นได้เนื่องจากองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นองค์ประกอบที่มีประจุเป็นลบ ซึ่งส่งผลให้ AMP ที่มีประจุเป็นบวกสามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ แต่ความสามารถของ AMP ในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบแตกต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย lipid bilayer 2 ชั้น โดยที่ชั้นนอกจะมีลิโปโพลีแซคคาไรด์ มีชั้น peptidoglycan อยู่ตรงกลาง ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกจะมี lipid bilayer เพียงชั้น

เดี่ยว และชั้นของ peptidoglycan จะหนากว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และยังประกอบด้วย teichoic acids ด้วย (Expand; et al. 2016: 980–987) ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Expand. 2016: 980–987)

4.4. กระบวนการ agglutination

กระบวนการ Agglutination คือ กระบวนการเกาะกลุ่มกันของเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจาก การที่ AMP สามารถเกาะกับแบคทีเรียได้แล้วสามารถทำให้แบคทีเรียเกาะกันเป็นกลุ่ม ซึ่งกระบวนการ นี้จะส่งผลไม่ทำให้แบคทีเรียกระจายตัวไปตำแหน่งอื่น ๆ ได้ (Pulido; et al. 2012: 2378–2385; Liu; et al. 2016: 145-153)

5. ครัสติน

ครัสติน เป็น AMP ที่มีประจุเป็นบวก สามารถพบได้ในสัตว์ประเภทครัสตาเซีย (crustaceans) ซึ่งเป็นสารน้ำที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากครัสตินสามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ครัสตินประกอบไปด้วย WAP domain ที่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิล ของสายพอลิเพปไทด์ โดยที่ WAP domain มีกรดอะมิโนอยู่ 50–60 โมเลกุล ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็น Cys อยู่ 8 โมเลกุล จึงสามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้ 4 พันธะ (four-disulfide core, 4DSC) สามารถ แบ่งครัสตินได้เป็น 5 ชนิด โดยครัสตินแต่ละชนิดจะมีลักษณะที่เหมือนกันคือ มีเพปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) และ WAP domain โดยที่เพปไทด์ส่งสัญญาณ จะทำหน้าที่ในการส่งสารน้ำออกไป นอกเซลล์เพื่อตอบสนองกับสิ่งแปลกปลอม โดยที่ครัสตินแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างที่กรด อะมิโน

ที่อยู่ระหว่างเพปไทด์สังสัญญาณและ WAP domain โดยที่ชนิดที่ 1 จะมีกรดอะมิโน Cys-rich ส่วนชนิดที่ 2 จะแตกต่างกับชนิดที่ 1 คือมีกรดอะมิโนที่เป็น Gly-rich เพิ่มขึ้นมาดังภาพประกอบที่ 1 ส่วนครีตีนชนิดที่ 3 จะมี Pro-rich และ Arg-rich สำหรับครีตีนชนิดที่ 4 ซึ่งเป็นครีตีนที่มี WAP domain 2 บริเวณ หรือเรียกว่า double WAP domain (DWD) (Smith. et al. 2011: 1403-1408; Smith; et al. 2008: 758–772 และครีตีนชนิดที่ 5 ซึ่งคล้ายกับครีตีนชนิดที่ 1 แต่เพิ่มส่วนของ aromatic amino-rich

ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของครีตีนในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวอย่างแพร่หลาย เพื่อหาแนวทางในการควบคุมโรคระบาด ดังนี้

ในปี 2008 Supungul; et al. (2008) พบว่า crustin $Pm1$ เป็นครีตีนชนิดที่ 2 ในกุ้งกุลาดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก คือ *Bacillus megaterium*, *M. luteus*, *S. aureus*, *Streptococcus iniae*, *Aeromonas viridans* และ *Staphylococcus haemolyticus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli*

ในปี ค.ศ. 2009 Vatanavicharn; et al. (2009: 244-252) พบว่า crustin $Pm5$ ในกุ้งกุลาดำเป็นครีตีนชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกที่อวัยวะอิมูโนโอดิต (epipodite) และก้านตา (eye stalks) และเมื่อกุ้งกุลาดำได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนพบว่า การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น และเมื่อผลิตโปรตีนชนิดนี้ในระบบ *E. coli* เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่าโปรตีนนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *M. luteus*, *S. aureus* และ *S. haemolyticus*

ในปี ค.ศ. 2008 Amparyup; & Donpusa; & Tassanakajon. (2008: 1497-1509) พบว่า SWD $Pm1$, SWD $Pm2$ และ SWD $Pm3$ ซึ่งเป็นครีตีนชนิดที่ 3 ของกุ้งกุลาดำที่พบในเซลล์เม็ดเลือดเมื่อฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าไปพบว่า SWD $Pm1$ และ SWD $Pm2$ มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และเมื่อนำโปรตีนลูกผสม SWD $Pm2$ (rSWD $Pm2$) ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *Aerococcus viridans* *B. megaterium* และ *M. luteus* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ นอกจากนี้ โปรตีนนี้ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ subtilisinA ได้

ในปี ค.ศ. 2011 Suthianthong; et al. (2011: 783-790) พบว่า $PmDWD$ จากกุ้งกุลาดำมีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และเมื่อกระตุ้นด้วยการฉีดแบคทีเรีย *V. harveyi* และไวรัสตัวแดงดวง

ชาวเข้าไปในตัวกุ้งพบว่า ยีนชนิดนี้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น และเมื่อนำโปรตีนลูกผสม *PmDWD* (*rPmDWD*) ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพบว่า ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเอนไซม์โปรตีนเนส

ในปี ค.ศ. 2012 Suthianthong; et al. (2012: 977-983) พบว่า *crustinPm1* ซึ่งเป็นครัสตินชนิดที่ 2 ในกุ้งกุลาดำ เมื่อได้นำบางส่วนของยีนนี้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียลดลง

และในปีเดียวกันนี้ Krusong; et al. (2012: 208-215) พบว่า โปรตีน *rcrustinPm1* และ *rcrustinPm7* มีคุณสมบัติในการจับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก คือ *B. megaterium*, *M. luteus*, *S. aureus* และ *S. haemolyticus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia cloacae*, *E. coli* และ *V. harveyi* ได้ และยังมีคุณสมบัติในการจับกับ lipoteichoic acid (LTA) และ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังสามารถทำให้แบคทีเรียเกิด agglutination ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบด้วย

จากการวิจัยของ Donpudsa; et al. (2014: 95 - 103) ได้พบว่า มียีนของครัสตินชนิดที่ 1 ในกุ้งกุลาดำคือ *carcininPm1* และ *carcininPm2* ดังภาพประกอบ 7

Type I

CarcininPm1	MLRLCVMLAVVGAVFSQTYPDPLANIN 27 [REDACTED]ENW[REDACTED]NLSSTTY[REDACTED]CDEHREIDGGRSGK[REDACTED]PATPISQRELDILRDLGDHNLN[REDACTED]CKHDRE[REDACTED]EVGEK[REDACTED]CYAKESQHYRI[REDACTED]GRFSF* 108
CarcininPm2	MRVIVLTLMVAAAASA 16 [REDACTED]RY[REDACTED]KTPDDEAY[REDACTED]C[REDACTED]DGGKEYRNPEDHDGD[REDACTED]PEVRPV[REDACTED]PRFGKNPPDV[REDACTED]PHDGA[REDACTED]PHHSK[REDACTED]CYDV[REDACTED]LGHHTC 88 KLAVFPSYTVIPTITPPTAKPPFNIAIYARNKANRGGKA* 127

ภาพประกอบ 7 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ *carcininPm1* และ *carcininPm2* โดยส่วนที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของเพปไทด์สังสัญญาณ ส่วนต่อมาเป็นส่วนของ Cys-rich (Donpudsa; et al. 2014: 95-103)

ในการศึกษาครัสตินในกุ้งขาว Shockey; et al. (2009: 668-673) พบว่า การแสดงออกของ *LvABP1* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 2 พบว่า เมื่อฉีด double-stranded RNA (dsRNA) ของยีนนี้เข้าไปแล้ว จะทำให้กุ้งขาวที่ได้รับ dsRNA และ *Vibrio penaeicida* มีอัตราการตายที่สูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม

ในปี ค.ศ. 2015 Du; et al. (2015: 478-484) ได้ศึกษา ยีน *Lv-SWDi* พบว่า เป็นครัสตินชนิดที่ 3 ในกุ้งขาว ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อฉีดแบคทีเรีย *V. anguillarum* เข้าไปในตัวกุ้ง และโปรตีนลูกผสม *Lv-SWDi* (*rLv-SWDi*) มีฤทธิ์ในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. megaterium* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *V. anguillarum* และ *P. aeruginosa* นอกจากนี้โปรตีนชนิดนี้ยับยั้งโปรตีนเนสจาก *B. subtilis* ได้อีกด้วย

นอกจากนี้การศึกษาของ Visetnan; et al. (2017: 341-348) พบว่า *LvSWD* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

และในปี ค.ศ. 2018 มีการรายงานของ Li; et al. (2018: 42-49) ได้ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของ *LvcrustinA* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 2 พบว่า เมื่อกระตุ้นกุ้งขาวโดยการฉีด *Vibrio parahaemolyticus* และไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าไปภายในตัวกุ้ง ยีนของครัสตินชนิดนี้มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น แสดงว่ายีนนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของยีน *LvcrustinA* ในกุ้งขาว

```

1                               M L R V L L L
1  gtctctcttccagtcgcccggagttgccttctccgctgtgaacgtccactttacaataattttatcacgATGCTGAGAGTGCCTGCTG
8  C L A A G S T L A Q N T N S T N Q G N T R I F G L G N L L S
91  TGCCTGGCGGGGGTCCGACCTCGCCAGAACCAACAGCACCAACCAAGGAAACACTGTATCTTCGGTCTGGAAACCTCTCTCG
38  G L T G N R P N R P F N G G F N Q G G F N P G F N Q G G F N
181 GGCTTGACTGGAAACCGACCAACAGACCTTCAACGGAGGCTTCAACAGGAGGCTTCAACCCCGGTTCAACAGGCGGCTTCAAC
68  Q G G F N Q G G F N Q G G F N Q G G F G Q L G N F V G G L A
271 CAGGGAGTTTCAACAGGAGGCTTCAACAGGAGGTTTCAACAGGAGGCTTGGACAGCTCGTAACTTCGCTCGGTGACTCGCT
98  A G I L G Q S G F R P P F N Q G G F N Q F K P G R C P A V R
361 GCGGCATCTCGGCAATCAGGCTTCCGACTCCCTTCAACCAAGGAGGCTTCAACAGGAGGCTTCAACAGGAGGCTTGGCCCCGGGTGCGA
128 P Q C P N T R F G R P Q V C F N D F A C A G S D K C C F D T
451 CCCCAGTGTCCGAAACCGAGTTTGGCAGGCTCAGGTTTCTTCAACAGCTTCGCTGCGCGGGTTCGGACAGTGTCTGCTGCACCC
158 C L G E R V C K P I S N F G K *
541 TGCTCGGCGAACCGGTGTGCAAAACCAATCTCCAATTTGGGAAGTGAatttctcatttggttatcttttttaagtgtgtgtgctega
631 aaatacagttttatgtatttgagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

ภาพประกอบ 8 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ *LvcrustinA* โดยส่วนที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของเพปไทด์ส่งสัญญาณ ส่วนต่อมาเป็นส่วนของ Gly-rich และส่วนมีแถบสีเทาเข้มจะเป็นส่วนของ WAP domain (Li; et al. 2018: 42-49)

ในงานวิจัยครั้งนี้สนใจที่จะศึกษาสมบัติของ *carcininPm2* และส่วนของ WAP domain ซึ่งเป็นครัสตินชนิดที่ 1 จากกุ้งกุลาดำ และ *LvcrustinA* ซึ่งเป็นครัสตินชนิดที่ 2 จากกุ้งขาว ในการยับยั้ง

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียและไวรัส การจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และความสามารถในการทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มด้วยกระบวนการเกิด agglutination



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยเรื่อง ลักษณะสมบัติของ *carcininPm2* จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การโคลนยีน *carcininPm2* และบริเวณ WAP domain ของ *carcininPm2* (*carcininPm2_WAP*) จากกุ้งกุลาดำ และ *LvCrustinA* จากกุ้งขาว
2. การผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli* และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์
3. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay
4. การทดสอบการจับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย
5. การทดสอบกระบวนการเกิด agglutination ของแบคทีเรีย
6. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมี

- 1.1. ชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit) บริษัท Favorgen Biotech Corp ประเทศไต้หวัน
- 1.2. ชุดเพิ่มปริมาณ DNA (RBC taq DNA Polymerase) บริษัท RCBioscience ประเทศไต้หวัน
- 1.3. ชุดเชื่อมต่อยีนที่สนใจกับเวกเตอร์ (T4 DNA ligase) บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.4. ชุดสกัด total RNA (FavorPrep™ Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit) บริษัท FAVORGEN ประเทศเกาหลี
- 1.5. ชุดสร้าง cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)) บริษัท ThermoFisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.6. ชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit) บริษัท Favorgen, Biotech Corp ประเทศไต้หวัน

1.7. ชุดสกัดพลาสมิด (FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit) บริษัท Favorgen, Biotech Corp ประเทศไต้หวัน

1.8. nickel-nitrilotriacetate acid (Ni-NTA) agarose column บริษัท GE Healthcare ประเทศสวีเดน

1.9. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth (TSB) บริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย

1.10. อาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitz L15

1.11. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.12. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.13. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.14. Isopropyl β -D-1 -thiogalactopyranoside (IPTG) บริษัท Gold Biotechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.15. ยาปฏิชีวนะ ampicillin บริษัท Gold Biotechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.16. ยาปฏิชีวนะ carbenicillin บริษัท Caisson Labs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.17. Yeast Extract Poder บริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย

1.18. Peptone บริษัท BD Biosciences ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.19. Tris บริษัท Vivantis ประเทศมาเลเซีย

1.20. Glycine บริษัท VWR ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. เครื่องมือ

2.1. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น V-3T-0811 ยี่ห้อ Microtech ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2. เครื่องปั่นเหวี่ยง แบบความคมอุณหภูมิจำกัด รุ่น UNIVERSAL320R ยี่ห้อ Hettich ประเทศเยอรมัน

2.3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง รุ่น UV-1200 ยี่ห้อ MAPADA ประเทศจีน

2.4. เครื่อง thermal cycler ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T-100™ ประเทศสิงคโปร์

2.5. หม้อน้ำแช่แข็งโรคอัตโนมัติ รุ่น GI54TW บริษัท upmarketing

2.6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น ZHWY-100H ยี่ห้อ ZHICHEN ประเทศจีน

2.7. ไมโครปีเปต รุ่น NPX2-2 Nichipet EX II Series Nichipet EX ยี่ห้อ NICHIRYO ประเทศญี่ปุ่น

2.8. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CX31 ยี่ห้อ OLYMPUS ประเทศญี่ปุ่น

3. จุลชีพ

3.1. *B. subtilis*

3.2. *M. luteus*

3.3. *S. aureus*

3.4. *Bacillus megaterium*

3.5. *Escherichia coli* 363

3.6. *Escherichia coli* BL21(DE3)

3.7. *Escherichia coli* NiCo21(DE3)

3.8. *V. harveyi* 639

3.9. *V. parahelyticus*

3.10. *V. parahaelyticus* (AHPND)

3.11. *Klebsiella pneumoniae*

3.12. WSSV

3.13. YHV

4. โปรแกรม

4.1. โปรแกรม signalP

4.2. โปรแกรม Clustal Omega

4.3. โปรแกรม image Lab

วิธีการทดลอง

1. การโคลนยีน *carcininPm2* และ *carcininPm2_WAP* ของกึ่งกุลาดำ และยีน *LvCrustunA* จากกุ้งขาว เข้าสู่เวกเตอร์ เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบของ *E. coli*

1.1. การออกแบบไพรเมอร์

ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในงานวิจัยชิ้นนี้นั้น ทำได้โดยการนำ ลำดับเบสของยีน *carcininPm2* และ *carcininPm2_WAP* ของกึ่งกุลาดำ ยีน *LvCrustunA* จากกุ้งขาว

ไปวิเคราะห์เพปไทด์ส่งสัญญาณด้วยโปรแกรม SignalP เนื่องจากในงานวิจัยนี้จะไม่เพิ่มปริมาณของยีนในส่วนของเพปไทด์ส่งสัญญาณ โดยไพรเมอร์ Forward จะเพิ่มกรดอะมิโนฮิสทีดีน 6 โมเลกุล (6×His-tag) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ และไพรเมอร์ reverse จะเพิ่มส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นรหัสหยุดเข้าไปด้วย

1.2. การเพิ่มปริมาณยีน *carcininPm2* และ *carcininPm2_WAP* ของกิ้งกูดดำ ยีน *LvCrustinA* จากกิ้งขาว

ในงานวิจัยนี้จะทำการโคลนยีน *carcininPm2* และ *LvCrustinA* โดยการเก็บเลือดกิ้งด้วยสารละลายโซเดียมซิติเรตความเข้มข้น 10% โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำมาสกัด total RNA ด้วยชุดสกัด total RNA แล้วสร้าง cDNA ด้วยชุดสร้าง cDNA โดยใช้ cDNA ที่ได้เป็น template ในการเพิ่มจำนวนยีนด้วยกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะกับยีน *carcininPm2* (ใช้ไพรเมอร์คู่ *carcininPm2F* และ *carcininPm2R*) *carcininPm2_WAP* (ใช้ไพรเมอร์คู่ *carcininPm2_WAPF* และ *carcininPm2R*) และ *LvCrustinA* ใช้ไพรเมอร์คู่ *LvCrustinAF* และ *LvCrustinAR*) ดังตาราง 1 โดย *carcininPm2* และ *carcininPm2_WAP* จะมีการเติมลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* ที่ปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ สำหรับ *LvCrustinA* มีการเติมลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XhoI* ที่ปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ นอกจากนี้บริเวณปลายด้านกรดอะมิโนของไพรเมอร์ชนิด Forward จะมีส่วนที่เป็น 6×His-tag เพื่อใช้ในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์อีกด้วย

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ DNA ซึ่งปริมาตรรวมในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 50 μ l ประกอบด้วยสารผสมดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ dNTP ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mM forward และ reverse primer ที่ความเข้มข้นสุดท้ายอย่างละ 0.2 μ M, RBC tag DNA polymerase จำนวน 1.25 units น้ำปราศจากไอออน (Deionized water หรือ DI water) และ cDNA ของกิ้งกูดดำและกิ้งขาว จากนั้นนำสารผสมไปบ่มที่ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำไปบ่มในสภาวะที่กำหนดอีก 30 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ บ่มที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที, บ่มที่ 50 °C เป็นเวลา 30 วินาที และบ่มที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาทีสำหรับ *carcininPm2* และ *carcininPm2_WAP* และ 45 วินาที สำหรับ *LvCrustinA* ตามลำดับ จากนั้นจึงบ่มที่ 72 °C ต่ออีก 10 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % agarose gel ในการวิเคราะห์ โดยตรวจสอบผลที่ได้จากด้วยเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต

ตาราง 1 ไพร์เมอร์สำหรับการโคลนยีน

ไพร์เมอร์	ชนิดของไพร์เมอร์	ลำดับเบส(5'-3')	วัตถุประสงค์การใช้งาน
carcininPm2F	forward	TTAACCATGGGCCATCAT CATCATCATCATTGCCGTT ACTACTGCAAG	ใช้ในการโคลน เพื่อผลิต โปรตีน <i>carcininPm2</i>
carcininPm2R	reverse	ATATCTCGAGCTAAGCTTT TCCTCCTCGATTGCGC	ใช้ในการโคลนเพื่อผลิต โปรตีน <i>carcininPm2</i> และ <i>carcininPm2_WAP</i>
carcininPm2_W APF	forward	TTAACCATGGGCCATCAT CATCATCATCATTGCCCT GAGGTTGCCCCGTC	ใช้ในการโคลน เพื่อผลิต โปรตีน <i>carcininPm2_WAP</i>
LvCrustinAF	forward	AATTGATATCCATCATCAT CATCATCATCAGAACACC AACAGCACC	ใช้ในการโคลน เพื่อผลิต โปรตีน <i>LvCrustinA</i>
LvCrustinAR	reverse	TATACTCGAGTCACTTCC CAAAATTGGAG	ใช้ในการโคลน เพื่อผลิต โปรตีน <i>LvCrustinA</i>

1.3. การเชื่อมชิ้นยีนที่สนใจกับเวกเตอร์

การเชื่อมชิ้นยีนที่สนใจกับเวกเตอร์ ทำได้โดยการสกัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่สนใจออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยตัดชิ้นส่วนของเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อไปทำให้บริสุทธิ์ เมื่อได้ยีนที่บริสุทธิ์แล้วไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อโคลนใส่เข้าไปใน pVR500 vector (ดัดแปลงมาจาก pET32 โดยตัดส่วนที่เป็น 6×His-tag ออก ซึ่งอธิบายไว้ใน Donpuksa et al. (2009). โดยปฏิกิริยาที่ใช้ในการตัดยีนและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีปริมาตรรวมเท่ากับ 20 µl ซึ่งประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์ PCR หรือ pVR500 vector เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ และน้ำปราศจากไอออน โดยบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วทำให้ส่วนของยีน และ pVR500

ที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมีความบริสุทธิ์ด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ ก่อนนำทั้งสองส่วนไปเชื่อมต่อกัน

ในการเชื่อมต่อระหว่างชิ้นยีนที่สนใจในกับเวกเตอร์นั้น ปริมาตรรวมในปฏิกิริยาในการนำยีนที่สนใจเชื่อมต่อกับ pVR500 vector นั้น เท่ากับ 20 μ l ประกอบด้วย ยีนที่สนใจ pVR500 vector สารละลายบัฟเฟอร์ และ T4 DNA ligase บ่มที่ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ก่อนนำผลิตภัณฑ์ที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-blue ที่เตรียมอยู่ในรูป competent cell ด้วยการกระตุ้นด้วยความร้อนที่ 42.5°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB 1 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำให้เชื้อกระจายบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB และ 100 μ g/ μ l ampicillin แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวไปเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนประกอบของ 100 μ g/ μ l ampicillin ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัดพลาสมิด จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ไปบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit สารละลายบัฟเฟอร์ และน้ำปราศจากไอออน แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5 % agarose gel ในการวิเคราะห์ โดยตรวจสอบผลที่ได้จากด้วยเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต

1.4. การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

เมื่อได้พลาสมิดลูกผสมแล้ว นำพลาสมิดลูกผสมไปตรวจสอบลำดับเบส โดยการส่งไปตรวจสอบที่บริษัท U2Bio จากนั้นนำผลลำดับเบสที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบลำดับเบสฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal Omega

2. การแสดงออกของโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

2.1. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่าง ๆ

ในการผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli* ทำได้โดยการนำพลาสมิดลูกผสมของ *carcininPm2* (*rcarcininPm2*) และ *carcininPm2_WAP* (*rcarcininPm2_WAP*) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่อยู่ในรูป competent cell และพลาสมิดลูกผสมของ *LvcrustinA* (*rLvCrustinA*) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ NiCo21(DE3) ด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยความร้อนที่ 42.5°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แล้วไปเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำให้แบคทีเรียกระจายบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB และ 100 μ g/ μ l ampicillin เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

จากนั้นนำเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ส่วนผสมของยาปฏิชีวนะซึ่งมี 100 µg/µl ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้ว นำมาเจือจาง 100 เท่า และเขย่าที่ 37°C จนกระทั่งค่า optical density ที่ 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) มี ค่าอยู่ในช่วง 0.6 – 0.8 แล้วจึงเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM สำหรับผลิตโปรตีน ลูกผสมของ *carcininPm2* (*rcarcininPm2*) และ *carcininPm2_WAP* (*rcarcininPm2_WAP*) และเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 mM สำหรับผลิตโปรตีนลูกผสมของ *LvcrustinA* (*rLvCrustinA*) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน แล้วเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 0, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่าง ๆ โดยปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C จากนั้นละลายด้วย PBS แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณ โปรตีนด้วย 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แล้ว ย้อมสารถละลาย comessie เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารถละลาย destain จนแผ่นเจลใส

2.2. การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 5000 rpm เป็น เวลา 15 นาที ที่ 4°C เพื่อแยกส่วนของสารถละลาย และตะกอน โดยนำตะกอนไปละลายด้วย PBS ก่อน นำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมสารถละลาย comessie เป็น เวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารถละลาย destain จนแผ่นเจลใส

2.3. การละลายของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

เมื่อพบว่า *rcarcininPm2* และ *rcarcininPm2_WAP* อยู่ในรูปของสารถละลาย ส่วน *rLvcrustinA* อยู่ในสภาพของตะกอน จึงนำตะกอนมาละลายด้วยสารถละลายคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ pH 10 ที่มีความเข้มข้น 0.1 M ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเพื่อเก็บเฉพาะ สารถละลายด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วน ที่เป็นสารถละลายและตะกอนไปตรวจสอบอีกครั้งด้วย 15% SDS-PAGE ก่อนนำสารถละลายที่ได้ไปทำ ให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) ชนิด Ni-NTA column

2.4. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

เมื่อทราบเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรตีน โดยที่เวลาที่เหมาะสม *rcarcininPm2* และ *rcarcininPm2_WAP* คือ 2 ชั่วโมง และสำหรับ *rLvCrustinA* คือ 1 ชั่วโมง และ การละลายของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียแล้ว จึงเลี้ยงเซลล์ของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด ลูกผสมในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น เพื่อนำไปผลิตโปรตีนสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เมื่อ ได้ตะกอนเซลล์ของรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียแล้วนำละลายด้วย PBS แล้วไปทำให้เซลล์แตก จากนั้นนำ

ตะกอนหลังจากทำให้เซลล์แตกของ rLvCrustinA ไปละลายด้วยสารละลายคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ pH 10 ที่มีความเข้มข้น 0.1 M แล้วไปปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนของสารละลายไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column สำหรับ rcarcininPm2 และ rcarcininPm2_WAP เนื่องจากโปรตีนถูกผสมทั้งสองชนิดนี้อยู่ในรูปของสารละลาย จึงพร้อมที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้

ในการทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ โดยใช้ Ni-NTA agarose column นั้น ทำได้โดยการเติมสารละลายโปรตีนลงในคอลัมน์ แล้วเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (flow through) แล้วล้างโปรตีนที่ไม่ใช่ส่วนที่สนใจด้วย washing buffer (imidazole ใน PBS เข้มข้น 20 mM) แล้วเก็บส่วนของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ จากนั้นทำการชะโปรตีนออกคอลัมน์ด้วยสารละลาย elution buffer (imidazole ใน PBS เข้มข้น 300 mM) แล้วทำการเปลี่ยนสารละลายของโปรตีนเป็น PBS ด้วยการไดอะไลซิส (dialysis) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมสารละลาย comassie เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย destain จนแผ่นเจลใส

2.5. การวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford

ในการวัดความเข้มข้นของโปรตีนนั้น ทำได้โดยการนำโปรตีน 10 µl ไปเติมสารละลาย Bradford 200 µl แล้วบ่มเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย BSA เป็นสารมาตรฐาน

3. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay

ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดัดแปลงวิธีจาก Dupudsa; (2014: 95-103 โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด คือ *B. subtilis*, *B. Megaterium*, *M. luteus* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ 5 ชนิด คือ *E. coli*, *V. harveyi*, *V. parahelyticus*, *V. parahelyticus* (AHPND) และ *K. pneumoniae* ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ยกเว้นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C แล้วจึงนำไปวัดค่า OD₆₀₀ แล้วเจือจางเชื้อแต่ละชนิดด้วย 1%(w/v) agarose gel ใน PBS โดยให้เชื้อแต่ละชนิดมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1 ให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ml จากนั้นรอจนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วเจาะหลุมกว้างประมาณ 0.3 cm เพื่อเติมโปรตีนความเข้มข้นต่าง ๆ ลงหลุม ๆ ละ 120 µl โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 3 nmol ampicillin สำหรับการทดสอบกับแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *B. subtilis*, *B. Megaterium*, *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli*, และ *K. pneumoniae* และ 3 nmol carbenicillin สำหรับการทดสอบกับแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *V. harveyi*, *V. parahelyticus*, *V.*

parahelyticus (AHPND) และ PBS เป็น positive และ negative control ตามลำดับ แล้วบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เรียกว่าการวัดบริเวณใส (clear zone) โดยรายงานผลในรูปแบบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เกิดจากโปรตีนต่อยาปฏิชีวนะ

4. การทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียของครัสติน

4.1. การทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย

ในการทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Krusong; et al. (2012: 208-215) โดยมีการทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *V. harveyi* 393 และ *V. parahaemolyticus* AHPNS ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ 30°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียมาเลี้ยงมาเจือจาง 100 เท่า แล้วเลี้ยงจนให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.6 แล้วเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง 6000×g เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 4 ml ล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมโปรตีนจำนวน 250 µM ปริมาตร 250 µl จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง 6000×g เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของสารละลายและตะกอน โดยนำตะกอนเซลล์ไปล้างอีก 3 ครั้งด้วย PBS แล้วเติม PBS ให้มีปริมาตร 250 ml ก่อนนำไปตรวจสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียด้วย 15% SDS-PAGE ที่ย้อมสารละลาย comessie เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย destain จนแผ่นเจลใส และ western blot hybridization

4.2. การตรวจสอบการทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียด้วยวิธี western bolt hybridization

ในการตรวจสอบด้วย western blot hybridization นั้น โดยในการตรวจสอบในงานวิจัยนี้ ได้ใช้ชุดตรวจสอบ HisDetector™ Nickel-AP หลังจากนำสารละลายแต่ละส่วนไปรันด้วย 15% SDS-PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่ nitrocellulose membrane ด้วยเครื่อง bolting ที่ 100 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการเรียงแผ่น support ที่แช่สารละลาย transfer เป็นเวลา 30 นาที ลงบนเครื่อง แล้วนำ nitrocellulose membrane ที่ผ่านการแช่เมทานอลแล้ววางลงบนแผ่นซับพอร์ท จากนั้นนำแผ่นเจล 15% SDS-PAGE วางลงบน nitrocellulose membrane แล้วปิดทับด้วยแผ่น support อีกครั้ง เมื่อทำการย้ายโปรตีนแล้วให้นำแผ่นเมมเบรนไปบ่มใน Detector™ Block เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม

Nickel-AP ลงไป โดยการเจือจาง 5000 เท่า แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายผสมของ NBT/BCIP ทิ้งไว้ 5 นาที จนสังเกตเห็นแถบสีม่วง แล้วล้างน้ำประมาณ 3-4 ครั้ง

5. การทดสอบกระบวนการเกิด agglutination ของแบคทีเรีย

5.1. การทดสอบการเกิดกระบวนการ agglutination ของแบคทีเรีย

ในการทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Liu; et al. (2016: 145-153) แกรมบวก 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *V. harveyi* 363 และ *V. parahaemolyticus* (AHPND) เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก และ TSB สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ จากนั้นนำแบคทีเรียมาเลี้ยงใหม่ ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.8 เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง 6000×g เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 ml ล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมโปรตีนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 µM โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น ปริมาตร 100 µl เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจสอบการเกิด agglutination ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย

5.2. การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย

ในการย้อมสีแกรมของแบคทีเรียนั้น ทำได้โดยการนำสารละลาย 5 µl หยดลงบนแผ่นสไลด์ แล้วในลูบในการสเมียร์เชื้อ จากนั้นนำสไลด์ไปผ่านไฟ 1-2 ครั้งเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียติดบนแผ่นสไลด์ วางทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นหยดสารละลายคริสตัลไวโอเล็ตลงบนแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนลงบนแผ่นสไลด์เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายเอทานอล 95% จนสีของสารละลายไอโอดีนหมด แล้วหยดสารละลายซาฟานินบนแผ่นสไลด์เป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ แล้วทิ้งไว้จนแห้งก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

6. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสด้วยโดยใช้ primary cell culture

6.1. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสด้วยโดยใช้ primary cell culture

เก็บเลือดกึ่งโดยใช้ Alsever's Solution แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800 g เป็นเวลา 4 นาที ที่ 4°C แล้วนำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดมาละลายด้วยอาหาร L15 แล้วนำไปนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเติมเม็ดเลือดกึ่ง 1×10^6 เซลล์/400 µl/หลุม แล้วนำไปบ่มที่ 28°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะเพลท จากนั้นบ่มไวรัส WSSV หรือ YHV จำนวน 1.75×10^5 copies กับโปรตีนเป็นเวลา 15 นาที โดยเทียบกับ Thioredoxin และ PBS แล้วปรับปริมาตรด้วย PBS ให้เป็น 120 µl แล้วเติมสารผสมลงในเพลท 100 µl แล้วบ่มที่ 28°C เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

จากนั้นสกัด total RNA ด้วยชุด kit สกัด total RNA (a FavorPrep™ Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen)) แล้วสร้าง cDNA ด้วยชุด kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)) แล้วใช้ cDNA ที่ได้เป็น template ในกระบวนการ RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน WSV477 ของไวรัส WSSV และ GP_64HV ของไวรัส YHV เทียบกับยีน EF- α 1 เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV

6.2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนของไวรัสด้วย RT-PCR

โดยใช้ไพรเมอร์ดังตาราง 2 โดยปริมาตรรวมในปฏิกิริยา RT-PCR การเพิ่มปริมาณยีน WSV477, YHV_GP64 และ EF-1 α เท่ากับ 25 μ l ประกอบด้วยสารผสมดังนี้ 1 \times Buffer, 0.12 mM dNTP, forward และ reverse primer อย่างละ 0.2 μ M, 1.25 units RBC tag DNA polymerase, cDNA และน้ำปราศจากไอออน (Deionized water หรือ DI water) จากนั้นนำสารผสมไปบ่มที่ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำไปบ่มในสภาวะที่กำหนดอีก 36 รอบ สำหรับ WSV477, 40 รอบ สำหรับ YHV_GP64 และ 25 รอบ สำหรับ EF ซึ่งในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 บ่มที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นที่ 2 บ่มที่ 50 °C สำหรับ WSV477, บ่มที่ 60 °C สำหรับ YHV_GP64 และบ่มที่ 52 °C สำหรับ EF-1 α เป็นเวลา 45 วินาที และบ่มที่ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยโปรแกรม image lab

ตาราง 2 ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนของไวรัส WSSV และ YHV

ไพรเมอร์	ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับเบส(5'-3')	วัตถุประสงค์การใช้งาน
WSV477_RT-F	forward	ATGTATATCTTCGTCGAA G	ใช้ในการตรวจสอบ การแสดงออกของ ยีนของไวรัส WSSV
WSV477_RT-R	reverse	TTATAAGAAATGTACAAT CC	ใช้ในการตรวจสอบ การแสดงออกของ ยีนของไวรัส WSSV
GP_64YHVF	forward	CATGGATCGTTTGGCTTT CGTTC	ใช้ในการตรวจสอบ การแสดงออกของ ยีนของไวรัส YHV

ตาราง 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับเบส(5'-3')	วัตถุประสงค์การใช้งาน
GP64_YHVR	reverse	TCACTATTACTCCAGTTAT CA	ใช้ในการตรวจสอบ การแสดงออกของ ยีนของไวรัส YHV
EF-F	forward	GGTGCTGGACAAGCTGA AGGC	ใช้ เป็น internal control ใน การ ตรวจสอบ การ แสดงออกของไวรัส
EF-R	reverse	CGTTCCGGTGATCATGTT CTTGATG	ใช้ เป็น internal control ใน ก ตรวจสอบ ก แสดงออกของไว

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ครัสตินเป็นเพปไทด์ด้านจุลชีพซึ่งเป็นโมเลกุลในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยในกุ้งกุลาดำได้มีการศึกษาเกี่ยวกับครัสตินมากมาย แต่ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับครัสตินชนิดที่ 1 ในกุ้งกุลาดำ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2014 Donpusa, et al. (2004: 95-103) ได้ค้นพบครัสตินชนิดที่ 1 จำนวน 2 ไอโซฟอร์ม คือ *carcininPm1* และ *carcininPm2* นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2018 มีการรายงานของ Li, et al. (2018: 42-49) ได้มีการค้นพบยีน *LvCrustinA* จากกุ้งขาว ซึ่งเป็นครัสตินชนิดที่ 2 แต่ขาดบริเวณของ Cys-rich ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ *carcininPm2* และ *LvCrustinA* โดยการโคลนยีนของ *carcininPm2* *carcininPm2_WAP* และ *LvCrustinA* และผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบของ *E.coli* จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพของโปรตีนทั้งสาม รวมทั้งนำ *carcininPm2* ไปทดสอบความสามารถในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ฤทธิ์การเกิด agglutination และความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV

1. การโคลนยีน *carcininPm2* *carcininPm2_WAP* และ *LvCrustinA*

ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนทั้งสาม พบว่า *carcininPm2*, *carcininPm2_WAP* และ *LvCrustinA* เป็นครัสตินที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 336 คู่เบส 246 คู่เบส และ 519 คู่เบส (ภาพประกอบ 9) สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 111 โมเลกุล 81 โมเลกุล และ 172 โมเลกุล ซึ่งมีมวลโมเลกุล 12.28 kDa, 8.78 kDa และ 18.02 kDa และมีค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) เท่ากับ 7.63, 9.03 และ 9.72 ตามลำดับ เมื่อใช้โปรแกรม SignalP 4.1 Server ในการทำนายบริเวณเพปไทด์ส่งสัญญาณของยีน *carcininPm2* และ *LvCrustinA* พบว่า *carcininPm2* มีบริเวณของเพปไทด์ส่งสัญญาณตั้งแต่กรดอะมิโนตัวที่ 1 (เมไทโอนีน หรือ Met หรือ M) ถึงกรดอะมิโนตัวที่ 16 (อะลานีน หรือ Ala หรือ A) ที่บริเวณปลายด้านกรดอะมิโน และเพปไทด์ส่งสัญญาณของ *LvCrustinA* ตั้งแต่กรดอะมิโนตัวที่ 1 (เมไทโอนีน หรือ Met หรือ M) ถึงกรดอะมิโนตัวที่ 16 (อะลานีน หรือ Ala หรือ A) ที่บริเวณปลายด้านกรดอะมิโน นอกจากนี้ระหว่างเพปไทด์ส่งสัญญาณและโดเมน WAP ของ

carcinin*Pm2* เป็นบริเวณ Cys-rich ดังภาพประกอบ 9 (ก) จึงสามารถบอกได้ว่า carcinin*Pm2* เป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 1 และ *LvCrustinA* มีบริเวณ Gly-rich ดังภาพประกอบ 9 (ข) จึงสามารถบอกได้ว่า *LvCrustinA* เป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 2 แต่อย่างไรก็ตาม *LvCrustinA* มีความแตกต่างจากครัสตินชนิดที่ 2 ไอโซฟอร์มอื่น ๆ คือ ไม่พบบริเวณ Cys-rich ดังนั้นโครงสร้างโดเมนของ *LvCrustinA* จึงประกอบด้วยเพปไทด์สังสัญญาณ Gly-rich และโดเมน WAP ตามลำดับ

(ก)

```

1 TCATAGAGAA CATCAACGCT AAAAATGCGC GTGATCGTCC TAACGCTGAT GGTGGCGGCG
      M R V I V L T L M V A A
61 GCGGGCTCAG CTTGCCGTTA CTA CTGCAAG ACTCCCGACG ATGAGGCTTA CTGCTGCGAC
      A A S A C R Y Y C K T P D D E A Y C C D
121 GGCGGGAAAAG AGTACAGAAA TCCCGAAGAT CACGACGGCG ACTGCCCTGA GGTTCGCCCC
      G G K E Y R N P E D H D G D C P E V R P
181 GTCTGCCCGC GCTTCGGCAA AAACCGGCC GATGTGTGCC CTCACGACGG CGCCTGCCCA
      V C P R F G K N P P D V C P H D G A C P
241 CACCACTCCA AGTGCTGCTA CGATGTCTGC CTGGGCCACC ACACCTGCAA GCTGGCTGTC
      H H S K C C Y D V C L G H H T C K L A V
301 TTCCCTCAT ACACCGTGAT CCCACGATC ACCCCCCGA CCGCAAAGCC TCCATTCAAC
      F P S Y T V I P T I T P P T A K P P F N
361 ATTGCAATCT ACGCGAGAAA TAAGGCGAAT CGAGGAGGAA AAGCTTAGGC GCGCTTTGTT
      I A I Y A R N K A N R G G K A -
421 GTTGTTTGTG TATGTGTTG CAAATGATTT TTATTTGATA GAAATACAGA AAAACC

```

(ข)

```

1 GTCTCTCCTT CCAGTGCCGG AGTTGCCTTC CTCCGCTGTG AACGTCCACT CTTACAAAAT
61 TTTATCACGA TGCTGAGAGT GCTGTGCTG TGCCTGGCCG CGGGGTCGAC CCTCGCCCAG
      M L R V L L L C L A A G S T L A Q
121 AACACCAACA GCACCAACCA AGGAAACACT CGTATCTTCG GTCTGGGAAA CCTCTCTCG
      N T N S T N Q G N T R I F G L G N L L S
181 GGCTTGACTG GGAACCGACC CAACAGACCC TTCAACGGAG GCTTCAACCA GGGAGGCTTC
      G L T G N R P N R P F N G G F N Q G G F
241 AACCCCGGGT TCAACCAGGG CGGCTTCAAC CAGGGAGGTT TCAACCAGGG AGGCTTCAAC
      N P G F N Q G G F N Q G G F N Q G G F N
301 CAGGGAGGTT TCAACCAGGG AGGCTTCGGA CAGCTCGGTA ACTTCGTCGG TGGACTCGCT
      Q G G F N Q G G F G Q L G N F V G G L A
361 GCGGGCATCC TCGGCCAATC AGGCTTCCGA CCTCCCTTCA ACCAAGGAGG CTTCAACCAG
      A G I L G Q S G F R P P F N Q G G F N Q
421 TTCAAGCCAG GTCGTTGCCC CGCGGTGCGA CCCCAGTGTC CGAACACGAG GTTTGGCAGG
      F K P G R C P A V R P Q C P N T R F G R
481 CCTCAGGTTT GCTTCAACGA CTTCGCCTGC GCGGGTTCGG ACAAGTGCTG CTTCGACACC
      P Q V C F N D F A C A G S D K C C F D T
541 TGCTCTCGCG AACGCGTGTG CAAACCCATC TCCAATTTTG GGAAGTGAAT TTCTCATTTG
      C L G E R V C K P I S N F G K -
601 TTATCTTTTT TTTAATGTGT GTGTGCTCGA AAATACAGTT TTATGTATTT GAGAAAAAAA
661 AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAA

```

ภาพประกอบ 9 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของ *carcininPm2* (ก) และ *LvCrustinA* (ข) โดยตัวหนาเป็นส่วนของเพปไทด์ส่งสัญญาณ ส่วนต่อมาเป็นบริเวณของ Cys-rich สำหรับ *carcininPm2* และบริเวณของ Gly-rich สำหรับ *LvCrustinA* และส่วนที่ขีดเส้นใต้จะเป็นส่วนของ WAP domain

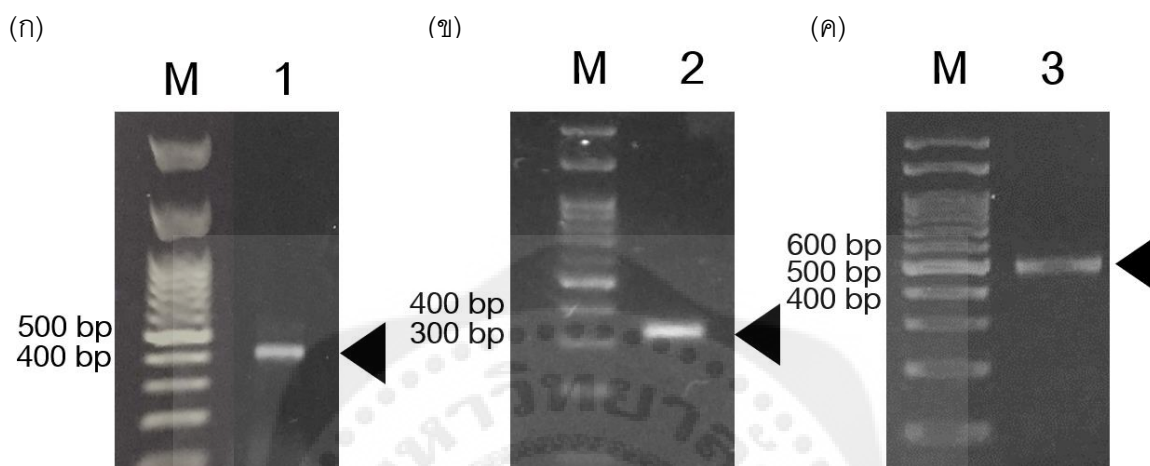
1.1. การออกแบบไพรเมอร์

การโคลนยีน *carcininPm2*, *carcininPm2_WAP* และ *LvCrustinA* จะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะไม่มียีนของเพปไทด์ส่งสัญญาณในการโคลนยีน ในการออกแบบไพรเมอร์นั้น สำหรับยีน *carcininPm2* และ *carcininPm2_WAP* ไพรเมอร์ที่เป็น forward จะมีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* เพื่อใช้ในการโคลน และ 6×His-tag เพื่อใช้ในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดยที่ไพรเมอร์ชนิด forward ของยีน *carcininPm2* จะเริ่มที่เบสดำแหน่งที่ 73 – 90 สำหรับ *carcininPm2_WAP* เริ่มตำแหน่งที่ 163 – 183 ของยีน *carcininPm2* และไพรเมอร์ชนิด reverse จะมีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* รวมทั้งรหัสหยุดการแปลรหัสพันธุกรรมไปเป็นกรดอะมิโน และจะเริ่มที่เบสดำแหน่งที่ 385 - 405 สำหรับไพรเมอร์ของ *LvCrustinA* ชนิด forward จะมีเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อใช้ในการโคลน และ 6×His-tag เพื่อใช้ในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์เช่นกัน และเริ่มที่เบสดำแหน่งที่ 108 -125 ส่วนไพรเมอร์ชนิด reverse จะมีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* พร้อมกับรหัสหยุดการแปลรหัสพันธุกรรมไปเป็นกรดอะมิโน และเริ่มที่เบสดำแหน่งที่ 569 – 585

1.2. การโคลนยีน *carcininPm2* *carcininPm2_WAP* และ *LvCrustinA* เข้าสู่เวกเตอร์ pVR500

หลังจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนนั้น ๆ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *carcininPm2* จากกุ้งกุลาดำมีขนาด 418 คู่เบส (ภาพประกอบ 10(ก)) แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ และเวกเตอร์ pVR500 ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* หลังจากนั้นไปเชื่อมต่อกันระหว่าง *carcininPm2* และเวกเตอร์ pVR500 เข้าด้วยกัน จะได้พลาสมิดลูกผสม pVR500_ *carcininPm2* จากนั้นนำไปเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *carcininPm2_WAP* โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 331 คู่เบส (ภาพประกอบ 10(ข)) แล้วจึงนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* ก่อนจะเชื่อมกับเวกเตอร์ pVR500 จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pVR500_ *carcininPm2_WAP* สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *LvCrustinA* ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 538 คู่เบส

(ภาพประกอบ 10(ค)) แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *Xhd* ก่อนนำไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pVR500 จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pVR500_ *LvCrustinA* ดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 1.5% agarose gel ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *carcininPm2* (ก) *carcininPm2_WAP* (ข) และ *LvCrustinA* (ค) โดย

M คือ ขนาดของ DNA มาตรฐาน

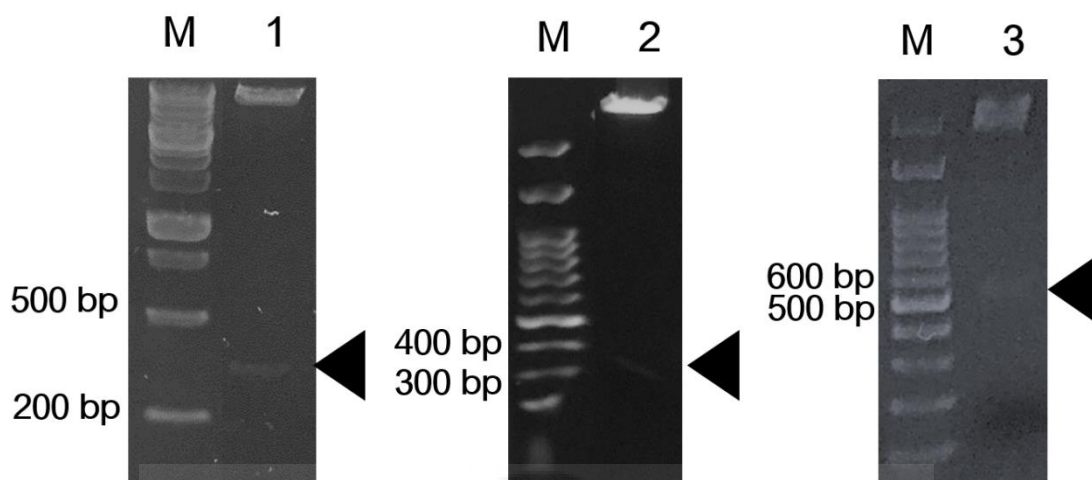
แถวที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *carcininPm2*

แถวที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *carcininPm2_WAP*

แถวที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *LvCrustinA*

1.3. การตรวจสอบความถูกต้องของยีน

ก่อนนำพลาสมิดลูกผสมส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พลาสมิดลูกผสมจะถูกนำไปป่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนที่สนใจ ดังภาพประกอบ 11 โดยทั้ง pVR500_ *carcininPm2* pVR500_ *carcininPm2_WAP* และ pVR500_ *LvCrustinA* เมื่อถูกตัดด้วย *Ncd/Xhd* *Ncd/Xhd* และ *EcoRI/Xhd* จะให้ชิ้นส่วนของยีนที่มีขนาดถูกต้องตามที่ได้โคลนยีนเข้าไปใน pVR500



ภาพประกอบ 11 1.5% agarose gel ของพลาสมิดลูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย

M คือ ขนาดของ DNA มาตรฐาน

แถวที่ 1 คือ pVR500_carcinin*Pm2* ที่ตัดด้วย *Ncd* และ *Xhd*

แถวที่ 2 คือ pVR500_carcinin*Pm2*_WAP ที่ตัดด้วย *Ncd* และ *Xhd*

แถวที่ 3 คือ pVR500_*LvCrustinA* ที่ตัดด้วย *EcoRI* และ *Xhd*

จากนั้นจึงได้นำพลาสมิดลูกผสมทั้ง 3 ไปส่งหาลำดับเบส นำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ไปการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของยีนทั้ง 3 ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ซึ่งจะเห็นได้ว่า ลำดับเบสของยีน *carcininPm2* มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีนในฐานข้อมูลคิดเป็น 99.11% ซึ่งเมื่อนำไปแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า มีความเหมือนคิดเป็น 98.20% (ภาพประกอบ 12(ก)) ส่วนเบสของยีน *carcininPm2*_WAP มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนคิดเป็น 98.78% และ 97.53% ตามลำดับ (ภาพประกอบ 12(ข)) สำหรับเบสของยีน *LvCrustinA* มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนคิดเป็น 96.17% และ 96.15% ตามลำดับ (ภาพประกอบ 12(ค)) ดังภาพประกอบ

(၈)	carcininPm2.database	TGCCGTTACTACTGCAAGACTCCCACGATGAGGCTTACTGCTGCGACGGCGGAAAGAG	60
	carcininPm2	TGCCGTTACTACTGCAAGACCCCGACGATGAGGCTTACTGCTGCGACGGCGGAAAGAA	60

	carcininPm2.database	TACAGAAATCCCGAAGATCACGACGGCGACTGCCCTGAGGTTGCCCCGTGCCCCGCGC	120
	carcininPm2	TACAGAAATCCCGAAGATCACGACGGCGACTGCCCTGAGGTTGCCCCGTGCCCCGCGC	120

	carcininPm2.database	TTCGGCAAAAACCCGCCGATGTGTGCCCTACGACGGCGCTGCCACACCACTCCAAG	180
	carcininPm2	TTCGGCAAAAACCCGCCGATGTGTGCCCTACGACGGCGCTGCCACACCACTCCAAG	180

	carcininPm2.database	TGCTGCTACGATGTCTGCCTGGCCACACACTGCAAGCTGGCTGTCTTCCCCTCATA	240
	carcininPm2	TGCTGCTACGATGTCTGCCTGGCCACACACTGCAAGCTGGCTGTCTTCCCCTCATA	240

	carcininPm2.database	ACCGTGATCCCCACGATCACCCCGACGGCAAGCCTCCATTCAACATTGCAATCTAC	300
	carcininPm2	ACCGTGATCCCCACGATCACCCCGACGGCAAGCCTCCATTCAACATTGCAATCTAC	300

carcininPm2.database	GCGAGAAATAAGCGAATCGAGGAGGAAAAGCTTAG	336	
carcininPm2	GCGAGAAATAAGCGAATCGAGGAGGAAAAGCTTAG	336	

carcinPm2.database(amino)	CRYYCKTPDDEAYCCDGGKEYRNPEDHGDGCEVRPVCPRFGKNPPDVCPHDGACPHRSK	60	
carcinPm2(amino)	CRYYCKTPDDEAYCCDGGKEYRNPEDHGDGCEVRPVCPRFGKNPPDVCPHDGACPHRSK	60	

carcinPm2.database(amino)	CCYDVLGHHTCKLAVFSPSYTVIPTITPPTAKPPFNIAIYARNKANRGGKA	111	
carcinPm2(amino)	CCYDVLGHHTCKLAVFSPSYTVIPTITPPTAKPPFNIAIYARNKANRGGKA	111	

(၉)	carcininPm2WAP.database	TGCCCTGAGGTTGCCCCGTGCGCCGCTTGGCAAAAACCCGCCGATGTGTGCCCT	60
	carcininPm2WAP	TGCCCTGAGGTTGCCCCGTGCGCCGCTTGGCAAAAACCCGCCGATGTGTGCCCT	60

	carcininPm2WAP.database	CACGACGGCGCTGCCACACCACTCCAAGTGTGCTACGATGTCTGCCTGGGCCACCAC	120
	carcininPm2WAP	CACGACGGCGCTGCCACACCACTCCAAGTGTGCTACGATGTCTGCCTGGGCCACCAC	120

	carcininPm2WAP.database	ACCTGCAAGCTGGCTGTCTTCCCCTCATAACCGTGATCCCCACGATCACCCCGGACC	180
	carcininPm2WAP	ACCTGCAAGCTGGCTGTCTTCCCCTCATAACCGTGATCCCCACGATCACCCCGGACC	180

	carcininPm2WAP.database	GCAAAGCCTCCATTCAACATTGCAATCTACGCGAGAAATAAGCGAATCGAGGAGGAAAA	240
	carcininPm2WAP	GCAAAGCCTCCATTCAACATTGCAATCTACGCGAGAAATAAGCGAATCGAGGAGGAAAA	240

	carcininPm2WAP.database	GCTTAG	246
	carcininPm2WAP	GCTTAG	246

carcininPm2WAP.database(amino)	CPEVRPVCPRFGKNPPDVCPHDGACPHRSKCCYDVLGHHTCKLAVFSPSYTVIPTITPPT	60	
carcininPm2WAP.(amino)	CPEVRPVCPRFGKNPPDVCPHDGACPHRSKCCYDVLGHHTCKLAVFSPSYTVIPTITPPT	60	

carcininPm2WAP.database(amino)	AKPPFNIAIYARNKANRGGKA	81	
carcininPm2WAP.(amino)	AKPPFNIAIYARNKANRGGKA	81	

(ค)

LvcrustinA.database LvcrustinA	CAGAACCAACAGCACCAACCAAGGAAACACTCGTATCTTCGGTCTGGGAAACCTCCTC CAGAACCAACAGCACCAACCAAGGAAACACTCGTATCTTCGGTCTGGGAAACCTCCTC *****	60 60
LvcrustinA.database LvcrustinA	TCGGGCTTGACTGGGAACCGACCCAACAGACCCTTCAACGGAGGCTTCAACAGGGAGGC TCGGGCTTGACTGGGAACCGACCCAACAGACCCTTCAACGGAGGCTTCAACAGGGAGGC *****	120 120
LvcrustinA.database LvcrustinA	TTCAACCCCGGTTCAACAGGGCGGCTTCAACAGGGAGGTTTCAACAGGGAGGCTTC TTCAACAGGGAGGCTTCAACCAAGGCTTCAA--TCCCAGGTTCAACAGGGCGGCTTC ***** ** * * * ***** ** *****	180 177
LvcrustinA.database LvcrustinA	AACAGGGAGGTTTCAACAGGGAGGCTTCGGACAGCTCGGTAACCTCGTCGGTGGACTC AACAGGGAGGTTTCAACAGGGAGGCTTCGGACAGCTCGGTAACCTCGTCGGTGGACTC *****	240 237
LvcrustinA.database LvcrustinA	GCTGCGGGCATCCTCGGCAATCAGGCTTCGGACCTCCCTTCAACCAAGGAGGCTTCAAC GCTGCGGGCATCCTCGGCAATCAGGCTTCGGACCTCCCTTCAACCAAGGAGGCTTCAAC *****	300 297
LvcrustinA.database LvcrustinA	CAGTTCAAGCCAGGTCGTTGCCCGCGGTGCGACCCAGTGTCCGAACACGAGGTTTGGC CAGTTCAAGCCAGGTCGTTGCCCGCGGTGCGACCCAGTGTCCGAACACGAGGTTTGGC *****	360 357
LvcrustinA.database LvcrustinA	AGGCCTCAGGTTTGTCTCAACGACTTCGCTGCGCGGGTTCGGACAAGTGTCTTCGAC AGGCCTCAGGTTTGTCTCAACGACTTCGCTGCGCGGGTTCGGACAAGTGTCTTCGAC *****	420 417
LvcrustinA.database LvcrustinA	ACCTGTCTCGGCGAACGCGTGTGCAAAACCATCTCCAATTTGGGAAGTGA ACCTGTCTCGGCGAACGCGTGTGCAAAACCATCTCCAATTTGGGAAGTGA *****	471 468
LvcrustinA.database(amino) LvcrustinA(amino)	QNTNSTNQGNTRIFGLGNLLSGLTGNRPNRPFNGGFNQGGFNPGFNQGGFNQGGFNQGGF QNTNSTNQGNTRIFGLGNLLSGLTGNRPNRPFNGGFNQGGFNPGFNQGGFN-PGFNQGGF ***** * : ** *****	60 59
LvcrustinA.database(amino) LvcrustinA(amino)	NQGGFNQGGFGQLGNFVGGLAAGILGQSGFRPPFNQGGFNQFKPGRCPAVRPQCPNTRFG NQGGFNQGGFGQLGNFVGGLAAGILGQSGFRPPFNQGGFNQFKPGRCPAVRPQCPNTRFG *****	120 119
LvcrustinA.database(amino) LvcrustinA(amino)	RPQVCFNDFACAGSDKCCFDTCGERVCKPISNFGK RPQVCFNDFACAGSDKCCFDTCGERVCKPISNFGK *****	156 155

ภาพประกอบ 12 การเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal Omega โดย

(ก) การเปรียบเทียบลำดับเบส (carcinin*Pm2*) และลำดับกรดอะมิโน (carcinin*Pm2* (amino))

ของ carcinin*Pm2* กับลำดับเบส (carcinin*Pm2*.database) และลำดับกรดอะมิโน (carcinin*Pm2*.database(amino)) ของฐานข้อมูล

(ข) การเปรียบเทียบลำดับเบส (carcinin*Pm2*WAP) และลำดับกรดอะมิโน (carcinin*Pm2*WAP

(amino)) ของ carcinin*Pm2*_WAP กับลำดับเบส (carcinin*Pm2*WAP.database) และลำดับกรดอะมิโน (carcinin*Pm2*WAP.database(amino)) ของฐานข้อมูล

(ค) การเปรียบเทียบลำดับเบส (LvCrustinA) และลำดับกรดอะมิโน (LvCrustinA(amino)) ของ

LvCrustinA กับลำดับเบส (LvCrustinA.database) และลำดับกรดอะมิโน

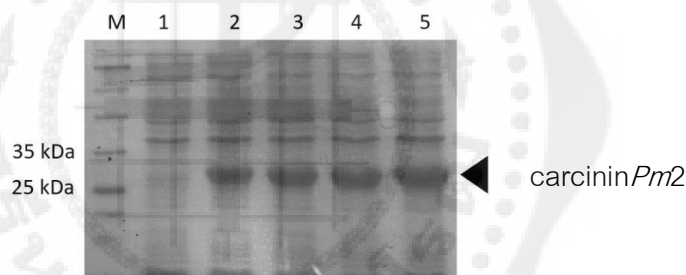
(LvCrustinA.database(amino)) ของฐานข้อมูล

2. การแสดงออกของโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

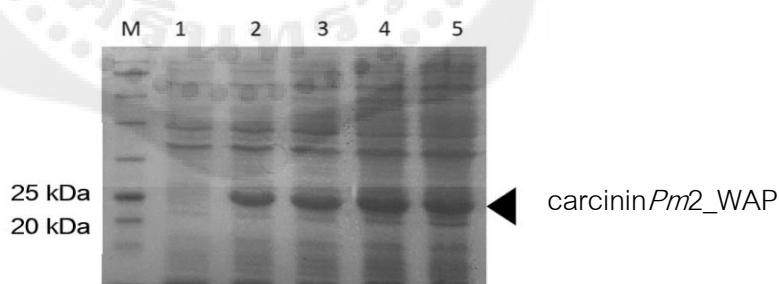
2.1. การแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่าง ๆ

การผลิตโปรตีนหลอมผสมเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางจุลชีพต่างๆ โดย pVR500_carcininPm2 และ pVR500_carcininPm2_WAP ได้ถูกนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และ pVR500_LvCrustinA ได้ถูกนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NiCo21(DE3) โดยถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียา ampicillin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 µg/ml ที่ 37°C ซึ่งหลังจากเติม IPTG แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 15% SDS-PAGE พบว่า rcarcininPm2 และ rcarcininPm2_WAP มีขนาด 24.72 kDa และ 21.22 kDa ตามลำดับ ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 6.44 และ 7.91 มีการแสดงออกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ดังภาพประกอบ 13(ก) และ (ข) ส่วนโปรตีนหลอมผสม rLvCrustinA นี้มีขนาด 28.83 kDa ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 8.37 และมีการแสดงออกของโปรตีนหลอมผสมตั้งแต่ 1 ชั่วโมง ดังภาพประกอบ 13(ค) ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนคล้ายกับว่าจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

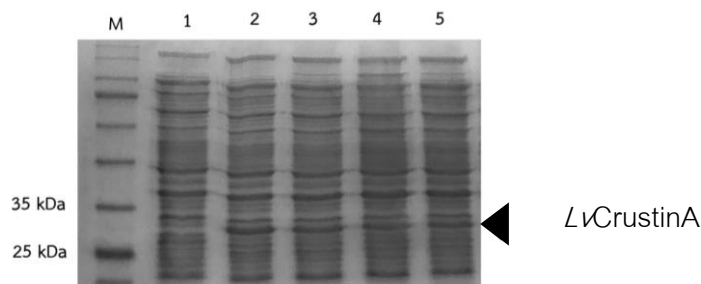
(ก)



(ข)

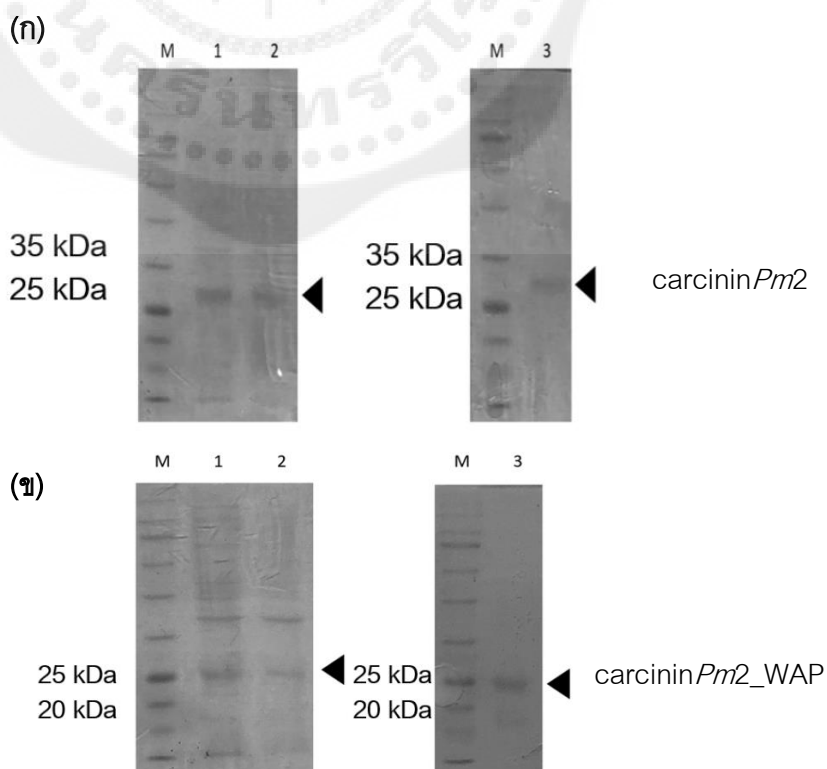


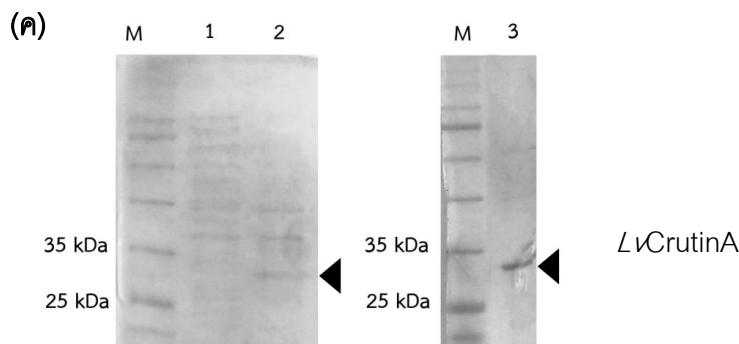
(ค)



ภาพประกอบ 13 15% SDS-PAGE ของเซลล์แบคทีเรียที่ถูกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนลูกผสม rcarcinin*Pm2* (ก) rcarcinin*Pm2*_WAP (ข) และ r*LvCrustinA* (ค) ด้วย IPTG ณ เวลาต่างๆ โดย แถว M คือ โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1-5 คือ เซลล์แบคทีเรียที่ถูกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG ที่เวลา 0 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากนั้นจึงนำเฉพาะเซลล์แบคทีเรียลูกผสมที่ถูกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีน ณ เวลาที่เหมาะสมด้วยการเติม IPTG ซึ่ง rcarcinin*Pm2* rcarcinin*Pm2*_WAP และ r*LvCrustinA* เลือกใช้ที่เวลา 2 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ไปทำให้เซลล์แตก เพื่อตรวจสอบสภาพของโปรตีนว่า อยู่ในรูปของสารละลายหรือตะกอนด้วย 15% SDS-PAGE ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่า rcarcinin*Pm2* และ rcarcinin*Pm2*_WAP อยู่ในรูปของสารละลาย (ภาพประกอบ 14(ก) และ (ข)) และ r*LvCrustinA* อยู่ในรูปของตะกอน (ภาพประกอบ 14(ค)) จึงได้นำตะกอนของ r*LvCrustinA* ที่ได้ไปละลายด้วยสารละลายคาร์บอนเตตริเฟออร์ pH 10 ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE อีกครั้ง ได้ผลดังภาพประกอบ 14 นั้นคือได้โปรตีนลูกผสมทั้ง 3 มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และสามารถนำโปรตีนลูกผสมที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป





ภาพประกอบ 14 15% SDS-PAGE ของโปรตีนลูกผสม rcarcinin*Pm2* (ก) rcarcinin*Pm2*_WAP

(ข) และ r*CrustinA* (ค) เมื่อถูกทำให้เซลล์แตกที่เรียกด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column โดยที่

แถว M คือ โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 1 คือ ส่วนของสารละลายหลังจากที่ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง sonicator

แถวที่ 2 คือ ส่วนของตะกอนหลังจากที่ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง sonicator

แถวที่ 3 คือโปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column

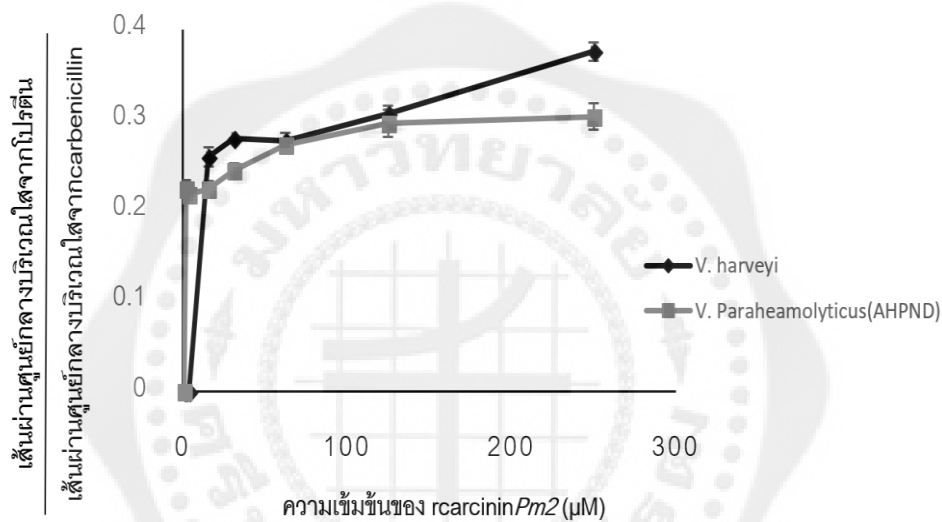
3. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ของโปรตีนลูกผสมทั้ง 3 นั้น ได้มีการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด คือ *B. Megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *M. luteus* และแบคทีเรียแกรมลบ 5 ชนิด คือ *E. coli* 363, *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus* (AHPND) *V. harveyi* 639 และ *K. pneumoniae* โดยใช้ ยาปฏิชีวนะ ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกับโปรตีนลูกผสม ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีนั้นวัดได้จากเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของโปรตีนลูกผสม และยาปฏิชีวนะ

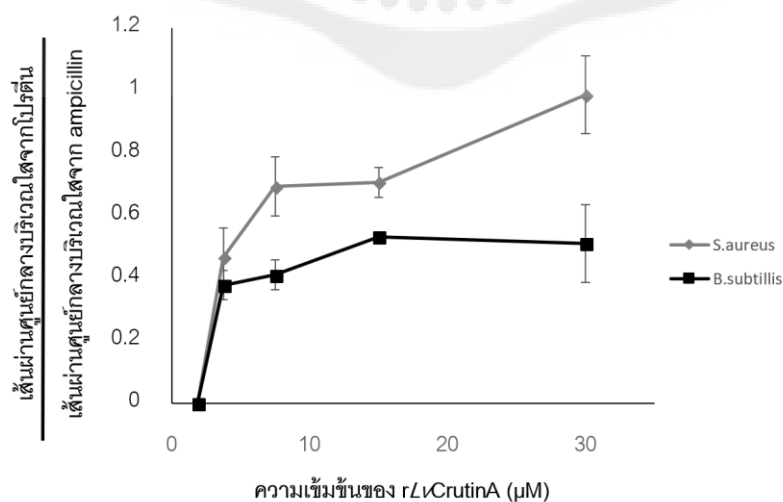
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ rcarcinin*Pm2* พบว่า rcarcinin*Pm2* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *V. parahaemolyticus* (AHPND) และ *V. harveyi* 639 เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจาก rcarcinin*Pm2* กับ 3 nmol carbenicillin พบว่า เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นด้วย ดังประกอบ 15(ก) ส่วน rcarcinin*Pm2*_WAP ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ rLvCrustinA พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* เมื่อ นำข้อมูลมาสร้างกราฟเป็นอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจาก rLvCrustinA กับ 3 nmol ampicillin พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้น ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นด้วย ดังภาพประกอบ 15(ข) ซึ่งโปรตีน rLvCrustinA มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *B. subtilis*

(ก)



(ข)



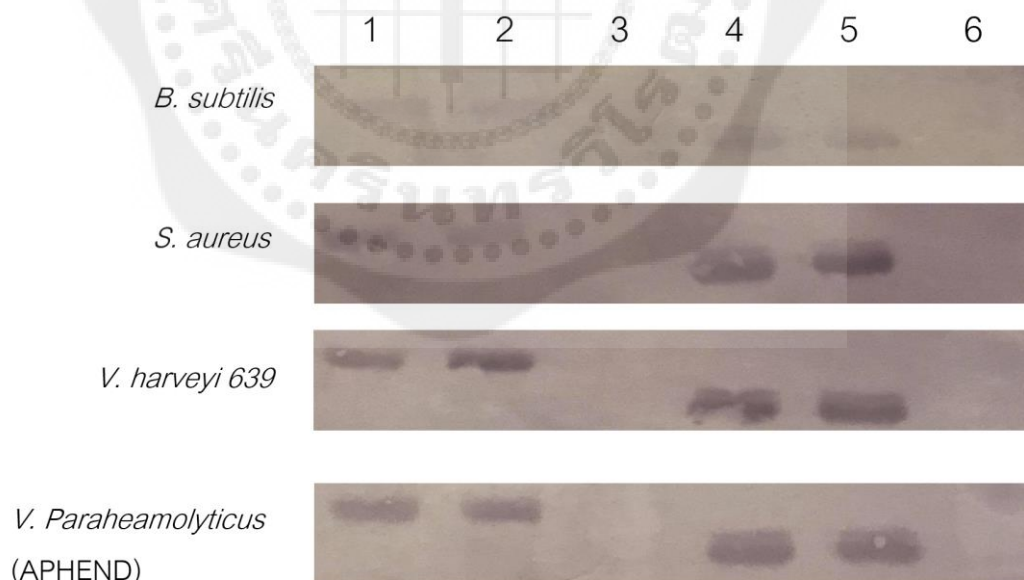
ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของโปรตีน rcarininPm2 และ rLvCrustinA ด้วยเทคนิค agar diffusion assay โดยแสดงเป็นอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากโปรตีนเทียบกับยาปฏิชีวนะ

(ก) การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย rcarininPm2

(ข) การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย LvCrustinA

4. การทดสอบการจับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย

ในการทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* AHPND โดยเซลล์แบคทีเรียจะถูกบ่มกับ rcarininPm2 หรือ rcarininPm2_WAP จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนของตะกอนของเซลล์แบคทีเรียออกจากส่วนของสารละลาย แล้วนำตะกอนและส่วนของสารละลายไปวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE และ western blot hybridization พบว่า rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP ไม่สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบได้ ดังภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 western bolt hybridization ของการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียของ rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP โดยแถวที่ 1 คือ rcarininPm2

แถวที่ 2 คือ ส่วนของสารละลายหลังจากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียที่ป่มกับโปรตีน rcarininPm2 ออกไป

แถวที่ 3 คือ ส่วนของตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ป่มกับโปรตีน rcarininPm2 หลังจากการปั่นเหวี่ยงเอาส่วนของสารละลายออกไป

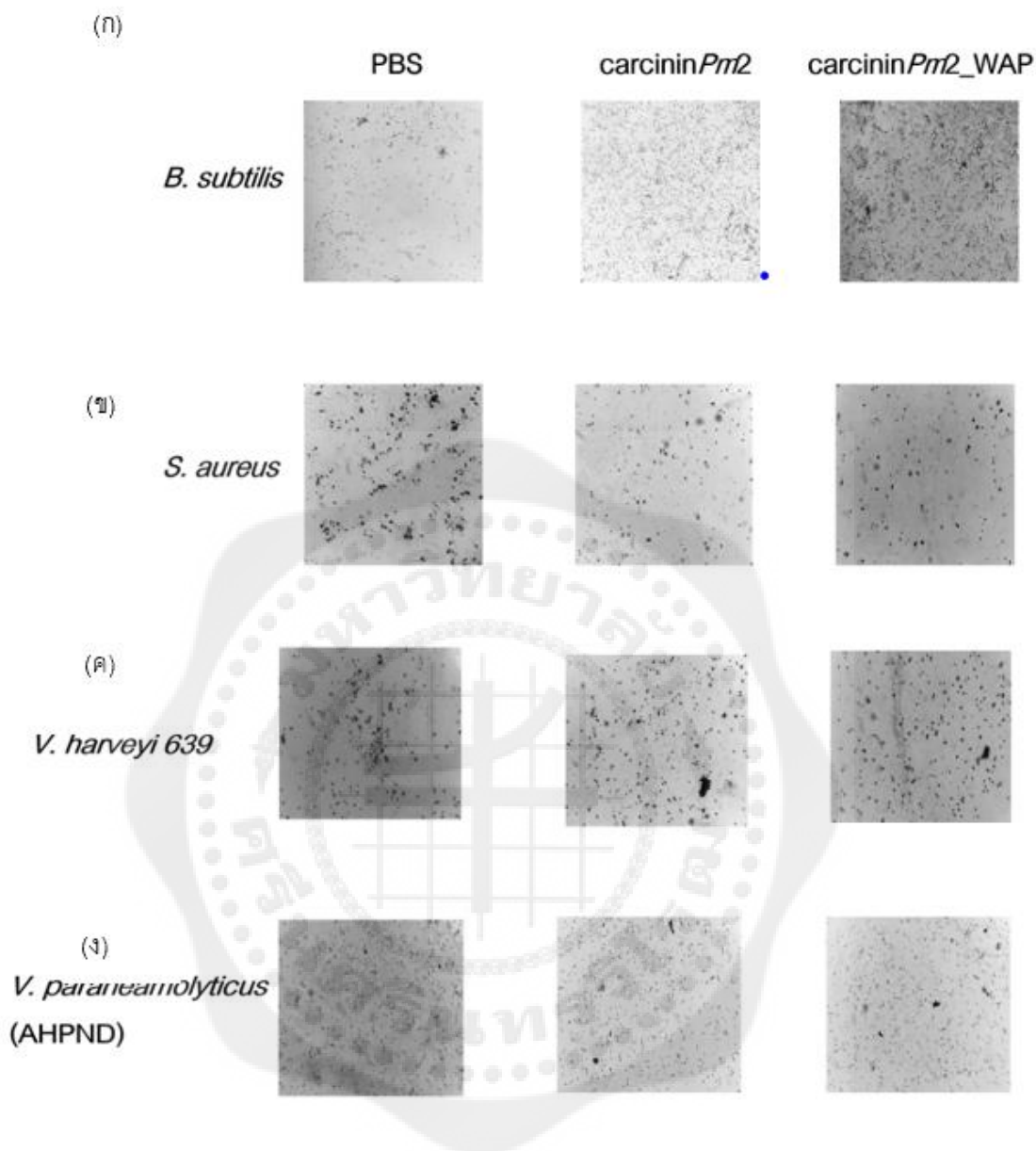
แถวที่ 4 คือ rcarininPm2_WAP

แถวที่ 5 คือ ส่วนของสารละลายหลังจากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียที่ป่มกับโปรตีน rcarininPm2_WAP ออกไป

แถวที่ 6 คือ ส่วนของตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ป่มกับโปรตีน rcarininPm2_WAP หลังจากการปั่นเหวี่ยงเอาส่วนของสารละลายออกไป

5. การทดสอบกระบวนการเกิด agglutination ของแบคทีเรีย

ในการทดสอบการเกิด agglutination ของแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* AHPND โดยแบคทีเรียจะถูกป่มด้วย rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP ก่อนจะนำไปตรวจสอบการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP ไม่สามารถทำให้แบคทีเรียเกิดกระบวนการ agglutination ดังภาพประกอบ 17

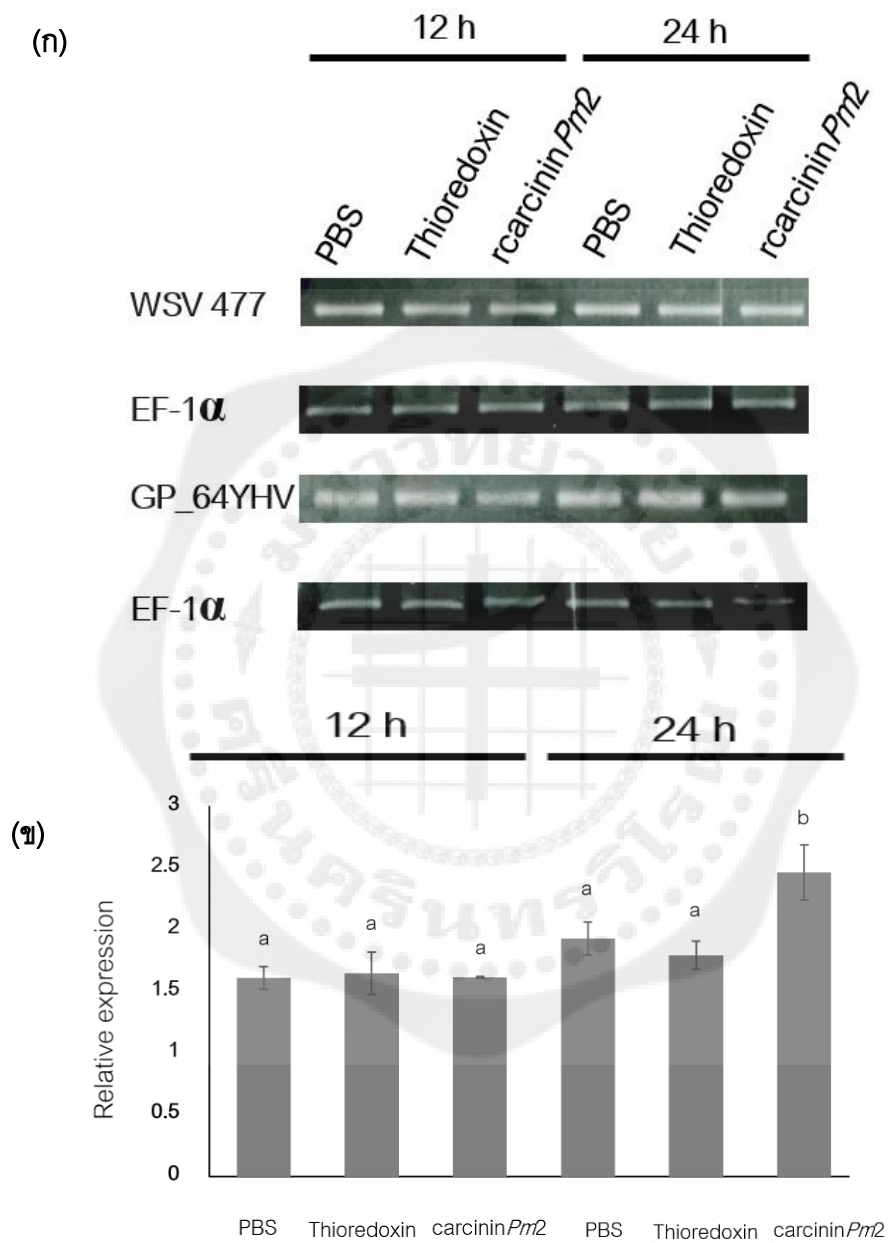


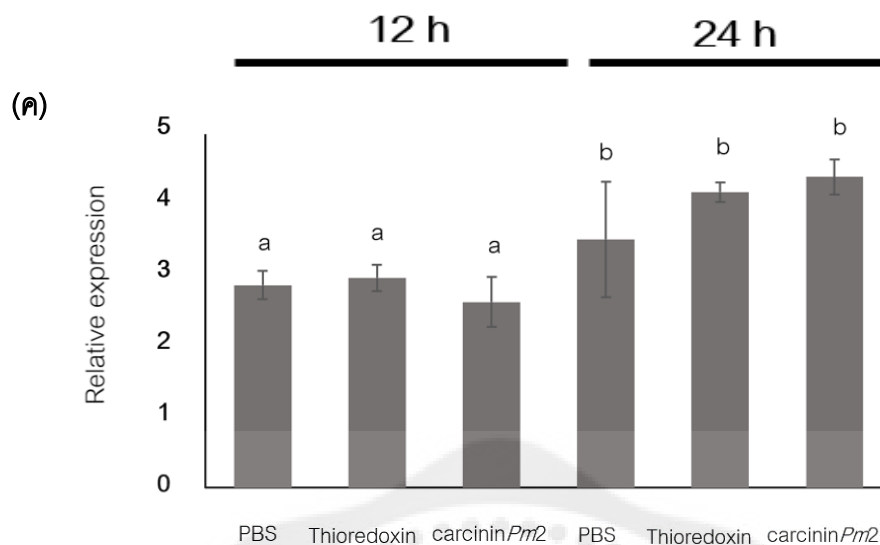
ภาพประกอบ 17 การเกิดกระบวนการ agglutination ของแบคทีเรีย เมื่อป่มด้วย PBS rcarcininPm2 และ rcarcininPm2_WAP

6. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV

การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และ YHV ด้วยการใส่เซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง โดยในการทดสอบครั้งนี้ไวรัส WSSV และ YHV จะถูกป่มด้วย rcarcininPm2 แล้วเติมลงเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง จากนั้น RNA ทั้งหมดถูกสกัดที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เพื่อสังเคราะห์ cDNA แล้วนำไปตรวจทดสอบการแสดงออกของยีน *EF-1 α* (ยีนมาตรฐานของกุ้ง), *WSV477* (ยีนของ WSSV)

และ GP₆₄YHV (ยีนของ YHV) พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 การแบ่งตัวของไวรัสไม่มีการลด เมื่อเทียบกับ การเติม PBS และ Thioredoxin





ภาพประกอบ 18 15% agarose gel (ก) และกราฟแสดงความสัมพันธ์ (ข และ ค) การยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส WSSV และไวรัส YHV ด้วยการบ่มกับ PBS Thioredoxin และ carcininPm2 เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเติมลงในเม็ดเลือดกึ่ง และเก็บเม็ดเลือดกึ่งที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เพื่อดูการแสดงออกของยีน *WSV477* (ยีนของ WSSV) และ *YHV_GP64* (ยีนของ YHV) เทียบกับ *EF-1 α* ที่เป็น internal control โดยใช้ RT-PCR แล้วนำผลมาวัดความเข้มของแบน ซึ่งรายงานผลโดยใช้ค่าความเข้มของแบนเทียบของยีนของไวรัสกับยีน *EF-1 α* โดยใช้ค่าทางสถิติในการวิเคราะห์ที่ $P < 0.05$

(ก) ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *WSV 477* *YHV_GP64* และ *EF-1 α* ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

(ข) การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *WSV 477* กับ *EF-1 α* ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

(ค) การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *YHV_GP64* กับ *EF-1 α* ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สินค้าส่งออกที่สำคัญของไทยอย่างหนึ่งคือ กุ้ง แต่กลับพบปัญหาต่าง ๆ เกี่ยวกับโรคระบาด ทำให้มูลค่าการส่งออกลดลง ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาแนวทางป้องกันโรคระบาดต่าง ๆ จึงเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยแนวทางหนึ่งในการหาแนวทางคือ การศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิดจึงไม่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในตัวกุ้ง (Tassanakajon; et al. 2013: 954-967)

เพปไทด์ต้านจุลชีพ เป็นเพปไทด์กลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ไวรัส หรือเชื้อราได้ ซึ่งครีستินเป็นหนึ่งในเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีลักษณะเฉพาะคือบริเวณที่เรียกว่า WAP domain ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็น Cys อยู่ 8 โมเลกุล โดย WAP domain จะอยู่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิลของสายพอลิเพปไทด์ และส่วนของเพปไทด์สังสัญญาณที่บริเวณปลายด้านกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์ สามารถแบ่งออกได้ 5 ชนิดตามความแตกต่างของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณระหว่าง WAP domain และเพปไทด์สังสัญญาณ (Smith; et al. 2008: 758-772; Tassanakajon; et al. 2015: 324-341)

เนื่องจากการศึกษาของ Donpudsa; et al. (2014: 95-103) ได้มีการค้นพบครีستินชนิดที่ 1 ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับครีستินชนิดนี้ นอกจากนี้ Li; et al. (2018: 42-49) ได้มีการรายงานยีน LvCrustinA จากกุ้งขาวซึ่งเป็นครีستินชนิดที่ 2 แต่ยีนนี้มีความแตกต่างจากครีستินชนิดที่ 2 อื่น ๆ เนื่องจากขาดบริเวณของ Cys-rich และครีستินชนิดนี้จากกุ้งขาวมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งขาวได้รับ *V. parahaemolyticus* และไวรัสตัวแดงดวงขาว แสดงว่า ยีนนี้น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของ *carcininPm2* และ *LvCrustinA* รวมไปถึง *carcininPm2_WAP*

ในการวิเคราะห์ยีน *carcininPm2* เป็นครีستินชนิดที่ 1 เนื่องจากมีบริเวณของ Cys-rich อยู่ระหว่าง WAP domain และเพปไทด์สังสัญญาณ ส่วน *LvCrustinA* เป็นครีستินชนิดที่ 2 แต่จะแตกต่างกับครีستินชนิดที่ 2 ทั่วไปคือ จะมีเฉพาะบริเวณของ Gly-rich และไม่มีบริเวณของ Cys-rich

ในการผลิตโปรตีน *rcarcininPm2*, *rcarcininPm2_WAP* และ *rLvCrustinA* ในระบบ *E. coli* พบว่า *rcarcininPm2* และ *rcarcininPm2_WAP* สามารถถูกผลิตได้ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

และมีการแสดงออกตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 1 rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP มีขนาด 24.72 kDa และ 21.22 kDa ตามลำดับ นอกจากนี้รูปแบบของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียอยู่ในรูปของสารละลาย เนื่องจากได้มีการเพิ่มบริเวณของ Thioredoxin เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีน ซึ่งทำให้โปรตีนมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย สำหรับการผลิตโปรตีน rLvCrustinA นั้น ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ NiCo21(DE3) เนื่องจากผู้วิจัยได้ทดลองการผลิตโปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถทำให้ยีน LvCrustinA ของกุ้งขาวนี้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ และการแสดงออกของ rLvCrustinA มีการแสดงออกที่ช่วงเวลาที่ 1 และการแสดงออกลดลงเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากโปรตีนอาจจะไม่มีความเสถียร ผู้วิจัยจึงได้เพิ่มบริเวณของ Thioredoxin เข้าไปเพื่อเพิ่มความเสถียรของ rLvCrustinA ซึ่งทำให้ขนาดของโปรตีนเท่ากับ 28.83 kDa นอกจากนี้โปรตีนนี้ยังอยู่ในรูปของตะกอนจึงต้องละลายด้วย carbonate buffer pH 10 ก่อนนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ เนื่องจากค่า pI ของ rLvCrustinA เท่ากับ 8.37 เมื่อละลายด้วย PBS อาจจะทำให้เกิดการตะกอนได้ จึงต้องละลายด้วย carbonate buffer pH 10 นอกจากนี้ในการทำโปรตีนทั้งสามให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) ชนิด Ni-NTA column เนื่องจากผู้วิจัยได้เพิ่มบริเวณของ 6×His tag เข้าไปเพื่อให้โปรตีนสามารถจับกับ Nickel ในคอลัมน์นี้ได้ ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่า carcininPm2 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ 2 ชนิด คือ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* AHPND และ LvCrustinA สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* ส่วน carcininPm2_WAP ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า โดยส่วนใหญ่แล้วครัสตินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก แต่ครัสตินบางชนิดพบว่ามีฤทธิ์การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบด้วย จากการรายงานของครัสตินชนิดที่ 1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้ (Donpuksa; et al. 2010: 234-238) แต่การศึกษาครัสตินชนิดที่ 1 ในกุ้งเรนโบว์ หรือกุ้งก้ามแดง (red claw crayfish) พบว่าความสามารถของ rPcCru ซึ่งเป็นครัสตินชนิดที่ 1 ในกุ้งเรนโบว์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Liu; et al. 2016: 145-153)

การทดสอบการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย พบว่า rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP ไม่สามารถจับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ถึงแม้ว่าครัสตินจะเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวกที่สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ด้วยแรงทางไฟฟ้า แต่ความสามารถในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบแตกต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบของเยื่อหุ้ม

เซลล์ที่แตกต่างกัน (Expand; et al. 2016: 980-987) และโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP ไม่สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ การที่ครัสตินสามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ครัสตินอาจจะทำให้เกิดกระบวนการ agglutination ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งกระบวนการนี้จะส่งผลไม่ทำให้แบคทีเรียกระจายตัวไปตำแหน่งอื่น ๆ ได้ ทำให้ตำแหน่งอื่น ๆ ของร่างกายไม่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมกระบวนการหนึ่ง (Pulido; et al. 2012: 2378-2385; Liu; et al. 2016: 145-153) ในการทดสอบกระบวนการ agglutination ของ carcininPm2 และ carcininPm2_WAP พบว่า ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ agglutination ได้ เนื่องจาก rcarininPm2 และ rcarininPm2_WAP ไม่สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ถึงแม้ว่า ได้มีการศึกษาของ Krusong; et al. (2012) พบว่า rcrustinPm1 และ rcrustinPm7 มีคุณสมบัติในการจับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก คือ *B. megaterium*, *M. luteus*, *S. aureus* และ *S. haemolyticus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. cloacae*, *E. coli* และ *V. harveyi* ได้ และยังสามารถทำให้แบคทีเรียเกิด agglutination ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ แต่ครัสตินชนิดนี้ยังไม่สามารถทำให้แบคทีเรียบางชนิดเกิดกระบวนการเกิดนี้ได้เช่นกัน

สำหรับการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธี primary cell culture โดยตรวจสอบจากการแสดงออกของยีน WSV477 และ YHV_GP64 เทียบกับ EF- α 1 พบว่าการแสดงออกของยีนจากไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลืองที่ถูกบ่มกับ carcininPm2 ไม่มีความแตกต่างกับการแสดงออกของยีนของไวรัสที่ถูกบ่มด้วย PBS และ Thioredoxin แสดงว่า carcininPm2 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลือง

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมี

1.1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB เหลว ปริมาตรรวม 1 ลิตร

- NaCl 10 g
- Peptone 10 g
- Yeast extract 5 g

1.2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แข็ง

- Agar 15 g ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB เหลว 1 ลิตร

1.3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TBS เหลว ปริมาตรรวม 1 ลิตร

- TSB 30 g
- NaCl 30 g

1.4. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB แข็ง

- Agar 15 g ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB เหลว 1 ลิตร

1.5. การเตรียม 10×PBS (pH 7.4) 1000 ml

- NaCl 80 g
- KCl 2 g
- Na₂HPO₄ 14.4 g
- KH₂PO₄ 2.4 g

2. การวิเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.1. การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1.1. สารละลาย 10×TBE Buffer ปริมาตรรวม 1 ลิตร

- Tris 108.0 g
- Boric acid 35.0 g
- EDTA 7.44 g

2.2. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรฟอเรซิส

2.2.1. การเตรียม 1.5% Agarose gel

- ชั่ง Agarose gel 0.3 g
- ใส่ตัวทำละลาย 1×TBE 20 ml
- นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agarose gel ละลายหมด
- ย้อมเจลโดยใช้ Eco dry 1µl
- เทในกระบะที่มีหัวสำหรับทำให้เกิดหลุมเสียบอยู่ โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
- รอให้เจลแข็ง แล้วดึงหัวออก

2.2.2. การหยอดสารตัวอย่าง

- วางเจลลงบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยนำด้านที่มีหลุมไว้ทางด้านประจุลบ
- เท 1×TBE ให้ท่วมเจล
- ผสมตัวอย่างกับ 6× DNA loading dry ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อ

6×loading dry DNA เท่ากับ 5 : 1 แล้วหยอดลงในหลุมในเจล

- ต่อเครื่องกับเครื่องจ่ายไฟ โดยตั้งค่าเป็น 100 V เป็นเวลา 20 นาที
- ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอุตราไวโอเล็ต

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน

3.1. การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.1. การเตรียม 10× SDS running buffer ปริมาตรรวม 1 ลิตร

- Tris Base 30 g
- SDS 10 g
- Glycine 144 g

3.1.2. การเตรียมสารละลาย coomassie gel stain ปริมาตรรวม 1 ลิตร

- Coomessie Blue 1 g
- methanol 450 ml
- glacial acetic acid 100 ml
- H₂O 450 ml

3.1.3. การเตรียมสารละลาย coomassie gel destain ปริมาตรรวม 1 ลิตร

- methanol 450 ml
- glacial acetic acid 100 ml
- H₂O 450 ml

3.1.4. การเตรียม transfer buffer pH 9.2 สำหรับ western bolt

- Tris pH 9.2 1.164 g
- Glycine 0.586 g
- Methanol 40.0 ml
- ปรบั H₂O 200 ml

3.1.5. การเตรียม Detection สำหรับ western bolt

- 1 M 1,000 µl
- 4 M NaCl 375 µl
- 100 mM MgCl₂ 100 µl
- NBT 52.5 µl
- BCIP 67.5 µl
- ปรบัปริมาตรด้วยน้ำ เป็น 10 ml

3.2. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.2.1. เตรียม 15% SDS PAGE ตามจำนวนที่ต้องการวิเคราะห์ โดย 1 แผ่นมีปริมาตรเท่ากับ 5 ml สามารถเตรียมได้ดังนี้

	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml
- H ₂ O	1.1 ml	2.3 ml	3.4 ml	5.7 ml
- 30% acrylamide mix	2.5 ml	5.0 ml	7.5 ml	10.0 ml
- 1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml	2.5 ml	3.8 ml	5.0 ml
- 10% SDS	0.05 ml	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
- 10% APS	0.05 ml	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
- TEMED	0.002 ml	0.004 ml	0.006 ml	0.008 ml

3.2.2. เตรียม Stacking Gel ตามจำนวนที่ต้องการวิเคราะห์ โดย 1 แผ่นมีปริมาตรเท่ากับ 1 ml สามารถเตรียมได้ดังนี้

	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml
- H ₂ O	0.68 ml	1.4 ml	2.1 ml	2.7 ml
- 30% acrylamide mix	0.17 ml	0.33 ml	0.5 ml	0.67 ml
- 1.5 M Tris (pH 6.8)	0.13 ml	0.25 ml	0.38 ml	0.5 ml
- 10% SDS	0.01 ml	0.02 ml	0.03 ml	0.04 ml
- 10% APS	0.01 ml	0.02 ml	0.03 ml	0.04 ml
- TEMED	0.001 ml	0.002 ml	0.003 ml	0.004 ml

3.2.3. รวมน้ำเจลาตินแข็ง จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับเครื่องรันโปรตีน

3.2.4. เติมน้ำ 1×SDS running buffer ใหม่ลงในช่องระหว่างแผ่นเจลด้านใน แล้วหยอดโปรตีนผสมกับ loading dry แล้วลงไปหลอดหลอดละ 20 µl

3.2.5. ตั้งค่าเครื่องโดยแผ่นเจล 1 แผ่นต่อ 25 mA เป็นเวลา 60 นาที

3.2.6. ย้อมสีด้วย Coomassie blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.7. ล้างสีด้วย destain จนแผ่นเจลใส



ภาคผนวก ข

การเตรียม competent cell

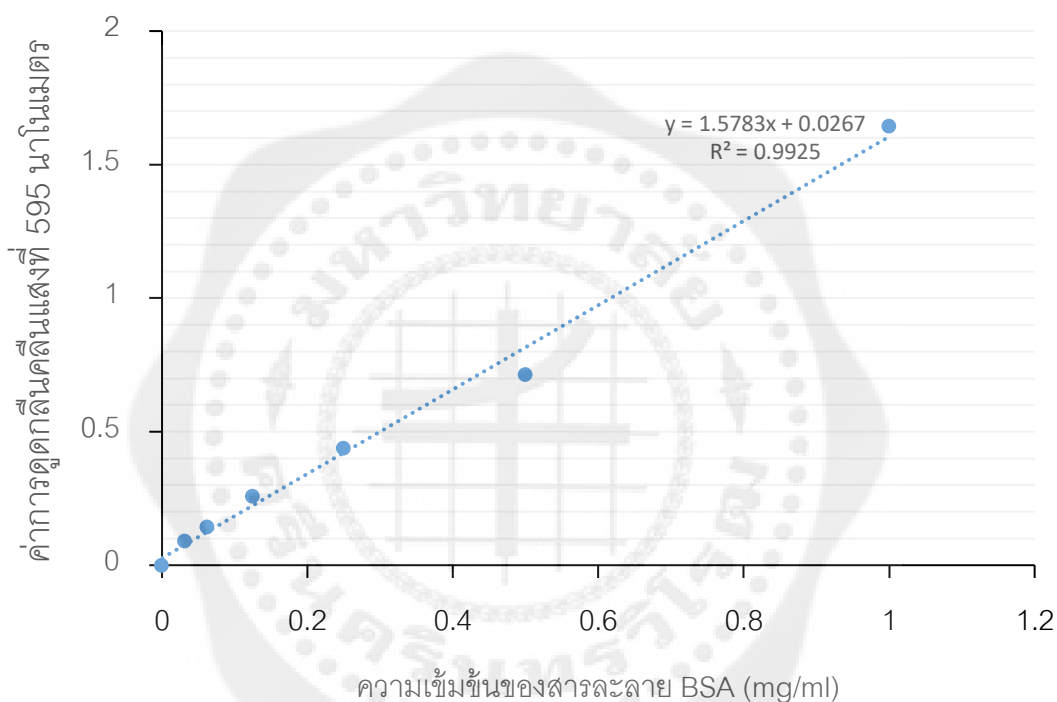
1. นำโคโคโคนี้เดี่ยวของแบคทีเรียที่ต้องการทำให้อยู่ในรูป competent cell ลงอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แล้วเลี้ยงไว้ที่ 37°C เป็นเวลา ประมาณ 16-18 ชั่วโมง
2. นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาเจือจาง 100 เท่า ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แล้ว แล้วเลี้ยงไว้ที่ 37°C เป็นเวลา จนกระทั่งค่า OD_{600} มีค่าประมาณ 0.4
3. นำหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้ววางไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
4. นำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
5. เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน แล้วเติมสารผสมของ 0.02 M MgCl_2 และ 0.02 M CaCl_2 จากนั้นทำให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกับสารละลายด้วยปิเปต แล้ววางไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
6. เก็บเฉพาะส่วนของตะกอนมาเติมสารผสมของ 0.1 M CaCl_2 และ 15% glycerol ที่เย็น จากนั้นทำให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกับสารละลายด้วยปิเปต
7. แบ่ง competent cell ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ หลอดละ 100 μl
8. เก็บที่ -80°C



ภาคผนวก ค

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับโปรตีน

1. เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0 mg/ml, 0.03125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml และ 1 mg/ml
2. เติมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในเพลต ความเข้มข้นละ 10 μ l
3. เติมสารละลาย Bradford 200 μ l แล้วบ่มเป็นเวลา 5 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 595 นาโนเมตร แล้วนำไปสร้างกราฟ



ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของสารละลาย BSA ที่ใช้ในการเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวอรรวรรณ เปี้ยพรัตน์
วันเดือนปีเกิด	9 กรกฎาคม 2535
สถานที่เกิด	สมุทรปราการ
สถานที่อยู่	704 หมู่ที่ 8 ต.บางปูใหม่ อ.เมือง สมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ 10280
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2553	ระดับมัธยมศึกษา จาก โรงเรียนสตรีสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ
พ.ศ. 2558	กศ.บ. (วิทยาศาสตร์-เคมี) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2561	กศ.ม. (เคมี) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ