

ฟีนอลออกไซด์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon*



นายชัยชาญ ไตรศรีศิลป์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

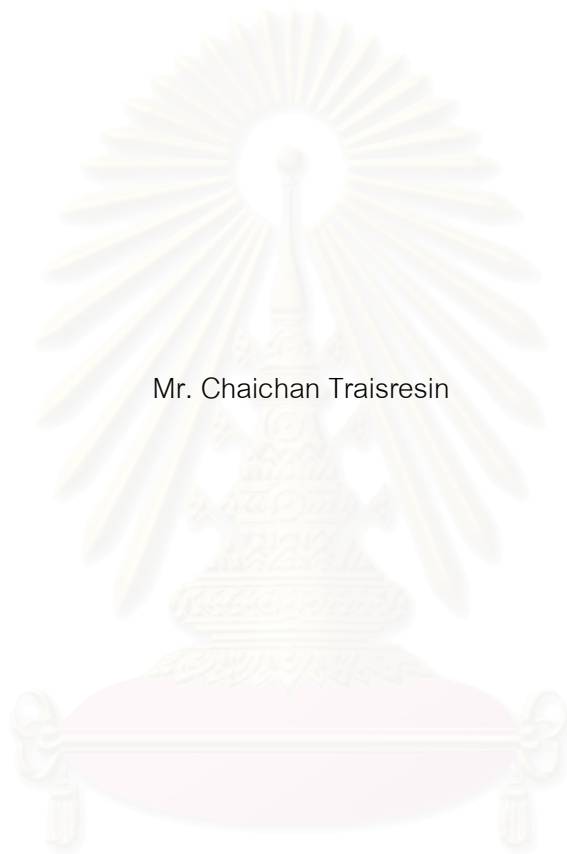
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2911-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHENOLOXIDASE RELATED TO IMMUNE RESPONSE IN BLACK TIGER PRAWN

*Penaeus monodon*



Mr. Chaichan Traisresin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2911-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์                      ฟีนอลออกซีเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกูด้า *Penaeus monodon*

โดย    นายชัยชาญ ไตรศรีศิลป์

สาขาวิชา                                    เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา                          ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)        ดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์วิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ศุภิชัย ตั้งใจตรง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

สภามหาวิทยาลัย  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชัชชาญ ไตรศรีศิลป์: ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (PHENOLOXIDASE RELATED TO IMMUNE RESPONSE IN BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศ. ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ณรงค์ศักดิ์ พวงลาภ 134 หน้า. ISBN 974-17-2911-1.

ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนและแมลง ฟีนอลออกซิเดสจะทำหน้าที่เปลี่ยนสารประกอบฟีนอลเป็นควิโนนิน แล้วจึงเกิดกระบวนการโพลีเมอร์ไรเซชันเป็นเมลานิน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะมีการสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มาบุกรุกได้ ในปัจจุบันมีการนำค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสมาใช้เป็นดัชนีวัดประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน การวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสทางเคมีได้นำมาใช้ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ในกรณีของกุ้งนั้นปัญหาที่พบจากการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสโดยวิธีดังกล่าว คือ ตัวอย่างที่ใช้สูญเสียแอกติวิตีได้ง่ายทำให้ผลที่ได้ไม่น่าเชื่อถือ งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำ 3 วิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี วิธีทางอิมมูโนวิทยา และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล โดยวิธีทางเคมีใช้ L-dihydroxyphenyl alanine(L-DOPA )เป็นสับสเตรต ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุด คือ CAC buffer ที่พีเอช 7-8 การเติมเอนไซม์ทริปซินจะให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสสูงกว่าไม่มีการเติมทริปซิน 6 เท่า การเติมสาร 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone (MBTH) ลงไปในปฏิกิริยาจะช่วยเพิ่มความไวในการวัดได้ถึง 3.5 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีที่ไม่มีการเติม MBTH วิธีการตรวจฟีนอลออกซิเดสทางอิมมูโนวิทยาได้ทำการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีของฟีนอลออกซิเดส ซึ่งในการแยกฟีนอลออกซิเดสจากสารละลาย HLS โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ และวิธี affinity chromatography ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากปริมาณโปรตีนฟีนอลออกซิเดสที่แยกได้น้อยไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ผลิตแอนติบอดี ดังนั้นจึงทำการโคลนและชักนำให้เกิดการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนฟีนอลออกซิเดสด้วยเวกเตอร์ pET17b ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)plysS นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนฟีนอลออกซิเดสไปสร้างแอนติบอดีโดยการฉีดเข้ากระต่าย เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต พบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับฟีนอลออกซิเดสจากกุ้งกุลาดำได้ สำหรับวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลทำโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR เพื่อตรวจหาระดับของการแสดงออกของยีนโปรตีนฟีนอลออกซิเดส ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากการพัฒนาวิธีการตรวจวัดฟีนอลออกซิเดสแล้ว ยังได้มีการนำวิธีการที่พัฒนาได้ทั้ง 3 วิธีดังกล่าวไปทดสอบเบื้องต้นโดยนำไปวัดฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำปกติ และกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งผลที่ได้จากวิธีตรวจวัดทั้ง 3 แบบ ให้ผลสอดคล้องกัน

หลักสูตร.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4272253623: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: PROPHENOLOXIDASE / IMMUNE / *P. monodon*

CHAICHAN TRAISRESIN: PHENOLOXIDASE RELATED TO IMMUNE RESPONSE IN BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*. THESIS ADVISOR: PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: NARONGSAK PUANGLARP, Ph.D., 134 pp. ISBN 974-17-2911-1.

In crustaceans and insects, phenoloxidase (PO) is recognized as a key role in defense mechanisms. It oxidizes phenols to quinones, which subsequently are then polymerized to melanin. This process limits the growth and development of the invading microorganisms. PO activity is now commonly used as an indicator for assessing the immune condition. The chemical assays for PO have been developed in various species. However, in the case of shrimp, a number of problems such as instability of sample, activity loss and self-inactivation of PO have caused unreliable results. The aim of this study is to develop the appropriate technique for detecting the PO activity of *P. monodon*. Three PO detection techniques were conducted. These included the chemical assay, immunological assay and molecular-based method. For chemical assay, the classical L-Dihydroxyphenyl-Alanine (L-DOPA) method was modified. The result showed that CAC buffer, pH 7-8, was the most appropriate reaction buffer. By adding trypsin into the sample, the activity of PO increased 6 times. The application of 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone (MBTH) to the reaction increased the sensitivity of the assay by 3.5 times. In immuno-based technique, polyclonal antibody against PO was produced. Attempts for separating PO from the HLS using native gel electrophoresis and affinity chromatography were failed to deliver sufficient amount of PO for immunization. Therefore, *in vitro* expression of prophenoloxidase (PPO) gene was conducted using the pET17b vector and *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) plysS system. The purified recombinant PPO was immunized into the rabbit. Western blot analysis revealed that the produced antibody could recognize the PO from *P. monodon*. For molecular-based method, semi-quantitative RT-PCR was developed for detecting the transcription level of PPO gene. In addition to the development of detection methods, preliminary test for using these three methods in *P. monodon* was conducted. The PO from normal shrimps and shrimps infected with *Vibrio harveyi* were determined. The results showed the corresponding results from the three methods.

Program.....Biotechnology..... Student's signature.....  
Field of Study.....Biotechnology..... Advisor's signature.....  
Academic year .....2002..... Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และอาจารย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ พวงลาภ ซึ่งให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และให้ความกรุณาในการเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการเขียนวิทยานิพนธ์และดูแลข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.พิบูลจิรวาณิชไพศาล และอาจารย์ ดร.ศิวารุท กลิ่นบุหงา ให้คำปรึกษาแนะแนวทางในการทำาทดลองจนทำให้งานวิจัยของข้าพเจ้าเป็นไปตามจุดประสงค์ด้วยดี

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. สุภิชัย ตั้งใจตรง และผู้ช่วยศาสตราจารย์จันท์เพ็ญ จันท์เจ้า ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจสอบแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นกับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้และ ดร.อุบลศรี เลิศสกุลพาณิช นักวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เวกเตอร์ pET17b และ แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE)plysS สำหรับในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ พี่น้อง และเพื่อนที่หน่วยปฏิบัติการ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้แก่ข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าอยากกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่เป็นทุกสิ่งทุกอย่างในชีวิตของข้าพเจ้าและเป็นกำลังใจที่ดีให้ข้าพเจ้าตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
- ชีววิทยาของกิ้งกูดดำ.....	4
- ระบบภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิต.....	4
- ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์มีกระดูกสันหลัง.....	5
- ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง.....	6
- ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย.....	7
- ระบบโปรตีนออกซิดาซีเดส.....	22
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	27
- สารเคมี.....	27
- เอนไซม์.....	28
- แบคทีเรีย.....	28
- อุปกรณ์.....	29
- สัตว์ทดลอง.....	29
- การเก็บตัวอย่างเลือด และการเตรียมสารละลายเซลล์เม็ดเลือด.....	30
- การวิเคราะห์ระดับของโปรตีนออกซิดาซีเดส.....	30
- การแยกโปรตีนออกซิดาซีเดสจากเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำ.....	33
- การโคลน และการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดาซีเดส.....	34
- การผลิตโพลีโคลอนอลแอนติบอดี.....	42
- การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธีเวสต์เทิร์นบลอต.....	43
- การตรวจสอบปริมาณโปรตีนออกซิดาซีเดสด้วยวิธี ELISA.....	44

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีสด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR.....	44
- เปรียบเทียบโปรตีนออกซิดีสในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำใน สภาวะที่มีเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> และไม่มีเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ในหลอด ทดลอง ( <i>in vitro</i> ).....	45
- เปรียบเทียบโปรตีนออกซิดีสในกุ้งปกติ กับกุ้งที่ได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> .....	46
4. ผลการทดลอง.....	47
- การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกติวิตีของโปรตีนออกซิดีส ทางเคมี.....	47
- การแยกโปรตีนออกซิดีสจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ.....	55
- การโคลน และการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีส.....	60
- ผลการแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์เจล.....	68
- ผลของการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	69
- ผลการทำ ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลที่ผลิตได้.....	72
- ผลการหาปริมาณการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีสด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR.....	76
- ผลการเปรียบเทียบโปรตีนออกซิดีสในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ เต็ม และไม่เต็มเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ในการทดลองแบบ <i>in vitro</i> .....	84
- ผลของการเปรียบเทียบโปรตีนออกซิดีสในกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> กับกุ้งกุลาดำปกติ ในการทดลองแบบ <i>in vivo</i> .....	87
5. อภิปรายผลการทดลอง.....	98
- การวัดแอกติวิตีของโปรตีนออกซิดีสทางเคมี.....	98
- การแยกโปรตีนออกซิดีสจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ.....	99
- การโคลน และการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีส.....	101
- การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	101
- การตรวจวัดการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีสด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR.....	102



สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- การตรวจวัดระดับของโปรตีนออกซิดีสในกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ด้วยวิธีทางเคมี วิธีทางอิมมูโนวิทยา (ELISA) และ	
วัดระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีสด้วยวิธี	
semiquantitative RT-PCR.....	103
6. สรุปผลการทดลอง.....	106
รายการอ้างอิง.....	107
ภาคผนวก.....	120
- ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	121
- ภาคผนวก ข. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง.....	123
- ภาคผนวก ค. กราฟมาตรฐานรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกซิดีส....	130
- ภาคผนวก ง. กราฟมาตรฐานโปรตีน.....	131
- ภาคผนวก จ. แผนผังของเวคเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	132
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	134

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การส่งออกกุ้งไทยเดือนมกราคม – มิถุนายน พ.ศ. 2545 .....	2
2.1 หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครึ่งเตีีียน .....	14
2.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสัตว์ในกลุ่มครึ่งเตีีียน .....	19
2.3 แสดงเลือดตินในครึ่งเตีีียน .....	21
2.4 แสดงโปรตีนฟีนอลออกซีเดสของสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด .....	24
4.1 ผลของพีเอชต่อแอกติวิตีฟีนอลออกซีเดส.....	48
4.2 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสเมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ .....	50
4.3 ผลของแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสเมื่อใช้สารละลายต่างชนิดกัน .....	51
4.4 ผลของการกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสด้วยไซโมแซนเอ .....	52
4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรของโดพาโคมและสารสีชมพูที่เกิดจากการทำ ปฏิกิริยาของฟีนอลออกซีเดสกับ L-DOPA .....	53
4.6 ปริมาณโปรตีนฟีนอลออกซีเดสที่แยกได้จากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ .....	59
4.7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรในการทำ ELISA เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน เป็นแอนติเจน และใช้แอนติบอดีเจือจาง 1 ต่อ 1000 .....	73
4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรในการทำ ELISA เมื่อใช้สารละลาย HLS เป็นแอนติเจน และใช้แอนติบอดีเจือจาง 1 ต่อ 1000 .....	75

## สารบัญรูป

ฎ

รูปที่	หน้า
2.1 เซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำ .....	8
2.2 แสดงระบบโปรตีนออกซิดีสในคริสต์เตเซียน .....	23
3.1 ขั้นตอนการโคลนและการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีส .....	35
4.1 แสดงผลของพีเอชที่มีต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีส .....	49
4.2 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีสเมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0,1,2,3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ .....	50
4.3 ชนิดของสารละลายและไซโมแซนเอตต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีส .....	53
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของสารสี ชมพูเข้มที่เกิดจากโดพาคิวโนโนนทำปฏิกิริยากับ MBTH .....	54
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของโดพา โครม .....	54
4.6 ปฏิริยาของฟีนอลออกซิดีสตามวิธี MBTH assay และวิธี DOPA assay .....	55
4.7 โพลีอะคริลาไมด์แบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ .....	56
4.8 ผลการตรวจสอบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนออกซิดีสด้วยเทคนิคเวสต์ เทิร์นบลอต .....	57
4.9 แสดงโครมาโตแกรมของฟีนอลออกซิดีสจากคอลัมน์บลูเซปฟาโรส .....	58
4.10 แสดงโปรตีนออกซิดีสหลังจากผ่านคอลัมน์บลูเซปฟาโรส บนโพลีอะคริลาไมด์เจล 7.5 เปอร์เซ็นต์แบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ .....	60
4.11 การตรวจสอบขนาดของยีนโปรตีนออกซิดีสบนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ย้อม ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ .....	61
4.12 แสดงผลของโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ puc1 และ puc2 บน 1 เปอร์เซ็นต์อะกา โรสเจล ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ .....	62
4.13 แสดงเอ็กเพรสชันเวกเตอร์ pET17b และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด T-vector ที่มีชิ้นดี เอ็นเอของยีนโปรตีนออกซิดีส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i> และ <i>EcoRI</i> ...	63
4.14 แสดงผลการทำโคโลนีพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์โคลนบน 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล..	64
4.15 แผนภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ T7 ในเอ็กเพรสชันเวกเตอร์ pET17b และ ตำแหน่งของไพรเมอร์ PO2 ในยีนโปรตีนออกซิดีส .....	65
4.16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณโคลน และ เอ็กเพรสชันของเวกเตอร์ pET17b .....	66

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.17 แสดงผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังจากเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนโปรตีน นอลออกซีเดสในเวกเตอร์ pET17b บน 12 เปอร์เซ็นต์โพลีอะคริลาไมด์เจล .....	67
4.18 แสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีนบน 12 เปอร์เซ็นต์โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบเอสดีเอส .....	68
4.19 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ได้จากเลือดกึ่งกลาดำบน 5-20 เปอร์เซ็นต์ กราเดียนท์โพลีอะคริลาไมด์เจล แบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ.....	70
4.20 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนในสารละลาย HLS บน 10 เปอร์เซ็นต์โพลี อะคริลาไมด์เจลแบบเอสดีเอส .....	71
4.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับค่าความเจือจาง ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน .....	72
4.22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับค่าความเจือจาง ของสารละลาย HLS .....	73
4.23 แสดงแบบจำลองการตัดผลผลิตจากโคโลนีพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI....	76
4.24 แสดงผลผลิตโคโลนีพีซีอาร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI .....	77
4.25 แสดงผลผลิต RT-PCR ของคู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 และคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 ที่ ความเข้มข้นต่างๆ กันบน 2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล .....	79
4.26 แสดงผลผลิต RT-PCR ของคู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 และคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 ซึ่ง ทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน บน 2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล .....	80
4.27 แสดงผลผลิต RT-PCR เมื่อใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมต่างกันบน 2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล .....	81
4.28 แสดงผลผลิต RT-PCR ที่ใช้จำนวนรอบต่างๆ กันบน 2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล .....	82
4.29 แสดงผลผลิต RT-PCR บน 2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล เมื่อใช้อาร์เอ็นเอแม่แบบเป็น 10, 100 และ 300 นาโนกรัม.....	83
4.30 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำหลังจากเติมเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมด.....	86
4.31 แสดงปริมาณโปรตีนฟีนอลออกซีเดสของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำหลังจากเติมเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> .....	86
4.32 แสดงปริมาณเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำหลังจากได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> .....	88
4.33 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสหลังจากได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> .....	89
4.34 แสดงปริมาณของโปรตีนฟีนอลออกซีเดสหลังจากได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> .....	90

## สารบัญรูป

ฐ

รูปที่	หน้า
4.35 แสดงปริมาณการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดซีเดสหลังจากได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> .....	92
4.36 semiquantitative RT-PCR ของกุ่มปกติ และกุ่มที่ได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ในการทดลองซ้ำที่ 1.....	93
4.37 semiquantitative RT-PCR ของกุ่มปกติ และกุ่มที่ได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ในการทดลองซ้ำที่ 2.....	94
4.38 semiquantitative RT-PCR ของกุ่มปกติ และกุ่มที่ได้รับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ในการทดลองซ้ำที่ 3.....	95
5.1 ปฏิกริยาการเกิดโดพาโครมจากการทำปฏิกริยาของฟีนอลออกซิดซีเดสกับ L-DOPA.....	96
5.2 ปฏิกริยาของโดพาควินโนนกับ MBTH.....	99



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

กุ้งกุลาดำเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยมีมูลค่าหลายหมื่นล้านบาทต่อปี ประเทศผู้นำเข้าสินค้ากุ้งสดและแช่เยือกแข็งมีกระจายอยู่หลายทวีป ได้แก่ เอเชีย สหรัฐอเมริกา แคนาดา สหภาพยุโรป ออสเตรเลีย จากตารางสถิติการส่งออกกุ้งสดและแช่เยือกแข็งของประเทศไทย ปริมาณและมูลค่าการส่งออกลดน้อยลง (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลประสบปัญหาหลากหลายด้วยกัน เช่น การขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ ปัญหาด้านมลภาวะ และที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ มีการระบาดของโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ไวรัสตัวแดงดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง เป็นต้น

โรคที่พบในกุ้งกุลาดำที่มีสาเหตุมาจากไวรัสมีความรุนแรงมากที่สุดเพราะนอกจากทำให้กุ้งตายอย่างฉับพลันแล้วยังไม่มียารักษาอาการที่เกิดขึ้นได้ ไวรัสที่ก่อโรคในประเทศไทย ได้แก่ baculovirus (MBV), Lymphoid organ virus, Infectious Hematopoietic and Hypodermal Necrosis virus (IHHNV), Hepatopencreatic Parvo-like virus, Yellow head virus (YHV) และ Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) (Flegel และคณะ., 1992) สำหรับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย แกรมลบ ความรุนแรงที่พบขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย เช่น โรค Vibriosis ที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. harveyi* (โรคเรืองแสง), *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (โรคเสี้ยนดำ), *V. splendidus* นอกจากนี้แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ยังเป็นสาเหตุของโรคในกุ้งได้ (Flegel และคณะ, 1992)

ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการป้องกันตนเอง (Defense mechanisms) หรือระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) ของกุ้งกุลาดำจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเป็นพื้นฐานในการควบคุม และแก้ปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ รวมถึงปรับปรุงการเพาะเลี้ยง การจัดการฟาร์ม เพื่อให้กุ้งที่เราเลี้ยงนี้มีความแข็งแรง มีภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคสูงขึ้น



ตารางที่ 1 การส่งออกกุ้งไทย เดือนมกราคม - มิถุนายน 2545

หน่วย : ปริมาณ - เมตริกตัน, มูลค่า - ล้านบาท

ประเทศ/ กลุ่มประเทศ	ม.ค. - มิ.ย. 2544		ม.ค. - มิ.ย. 2545		% ต่างต่าง	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
เอเชีย	48,085.17	18,556.81	37,407.00	12,277.00	-22.21	-33.84
- จีน	4,349.00	1,003.00	1,597.00	298.00	-63.28	-70.29
- ญี่ปุ่น	23,093.00	11,039.36	20,489.00	8,014.00	-11.28	-27.41
- อื่น ๆ	20,643.17	6,514.45	15,321.00	3,965.00	-25.78	-39.14
สหรัฐอเมริกา	45,430.00	19,919.00	42,347.00	15,227.00	-6.79	-23.56
อียู	7,566.00	2,568.78	3,637.00	927.00	-51.93	-63.91
ออสเตรเลีย	3,014.00	1,167.00	2,652.00	748.00	-12.01	-35.90
อื่น ๆ	5,599.70	2,358.15	5,486.00	1,763.00	-2.03	-25.24
<b>รวมทั้งหมด</b>	<b>109,694.87</b>	<b>44,569.74</b>	<b>91,529.00</b>	<b>30,942.00</b>	<b>-16.56</b>	<b>-30.58</b>

ที่มา: กรมศุลกากร

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) ซึ่งเป็นระบบที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอม หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และไม่มีการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน ถึงแม้ว่าจะสัมผัสกับสิ่งที่มีอายุหลายครั้งก็ตาม ระบบภูมิคุ้มกันมีการทำงานร่วมกัน 2 แบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์เม็ดเลือด (cellular immunity) และแบบที่มีการตอบสนองโดยสารน้ำ (humoral immunity) ซึ่งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 แบบนี้จะต้องทำงานร่วมกัน โดยพบว่าการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองนี้มักมี prophenoloxidase activating system เกิดขึ้นด้วยเสมอ ดังนั้น prophenoloxidase activating system จึงมีความสำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมาก ปัจจุบันการวัดระดับของแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ทำได้โดยการวัดทางเคมี ใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็นสารที่มีสีส้มแดง Dopachrome (Smith และ Söderhäll, 1991) แต่ก็ยังไม่มีการยืนยันที่แน่นอนว่า แอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสนี้ ควรอยู่ในระดับใด และกุ้งที่กำลังป่วยกับกุ้งปกติ จะมีปริมาณแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส เหมือนหรือต่างกันอย่างไร ประกอบกับการวัดระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสนี้ ยังไม่มีความแน่นอน และแม่นยำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงวิธีการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออก

ซีเดสทางเคมี และพัฒนาวิธีการวัดปริมาณโปรตีนออกซีเดสทางอิมมูโนวิทยาด้วยวิธี ELISA และปริมาณการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซีเดสในระดับอาร์เอ็นเอ เพื่อให้การตรวจวัดระดับโปรตีนออกซีเดสมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงวิธีการตรวจวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสโดยวิธีทางเคมี ให้มีความสะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำ
2. ผลิตแอนติบอดี เพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับโปรตีนออกซีเดสในกุ้งกุลาดำ
3. ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส ในกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยการทดสอบทางเคมี, วิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยการทำ ELISA และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการทำ semi-quantitative RT-PCR

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงข้อดี และข้อเสียของการตรวจวัดโปรตีนออกซีเดสในแต่ละวิธี
2. ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสกับการติดเชื้อโรคในกุ้งกุลาดำ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ มีชื่อสามัญเป็นภาษาอังกฤษว่า Black Tiger Prawn มีลักษณะทางอนุกรมวิธานเป็นดังนี้

ไฟลัม Arthropoda

คลาส Crustacea

อันดับ Decapoda

วงศ์ Penaeidae

สกุล Penaeus

ชนิด monodon

(Solis, 1988)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798)

ชื่อสามัญ กุ้งกุลาดำ (Black Tiger Prawn)

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดประมาณ 18–25 เซนติเมตร ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขวางที่หลังประมาณ 9 ลายและสีออกน้ำตาล เข้มข้างแถบสีขาว ด้านบนของกริมมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ หนวดยาวไม่มีลายชัดเจน ขาเดินมีสีแดงปนดำ ขาวายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงิน (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534) กุ้งกุลาดำทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี ทนความเค็มในช่วงกว้าง ตั้งแต่ความเค็มต่ำใกล้ศูนย์ ถึงความเค็มสูงสุด 40 ส่วนในพันส่วน (ppt) (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2535)

#### 2. ระบบภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องเผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตรายตลอดเวลา เช่น จุลินทรีย์และเชื้อโรคต่างๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม เพื่อการอยู่รอดสิ่งมีชีวิตต้องมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันขึ้นมา ซึ่งเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตนั้นจะมีการตอบสนองหลายอย่างเกิดขึ้นภายในร่างกาย เพื่อป้องกันตัวเองและกำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมนั้น

ทำให้สิ่งมีชีวิตดำรงชีวิตได้อย่างปกติ ทั้งนี้จะกล่าวถึงระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง

## 2.1 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ระบบภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองโดย บี- ลิมโฟไซต์ และที – ลิมโฟไซต์ โดยมีการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมแบบฟิงเซลล์อย่างจำเพาะ และมีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม ภูมิคุ้มกันและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกันสามารถจัดแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่คือ

2.1.1 ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ (Natural or Innate Immunity) เป็นระบบป้องกันทั่วไปของร่างกายที่มีการต่อต้านการรุกราน การติดเชื้อต่างๆ ในลักษณะเดียวกันทุกครั้งที่มีการสัมผัส กลไกการป้องกัน ต่อต้าน การรุกรานของสิ่งแปลกปลอมต่างๆ โดยการมีสิ่งกีดขวางการหลังสารต่างๆ ตลอดจนเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการกลืนทำลายและสภาพทางสรีระวิทยาต่างๆ เช่น การเป็นไข้ ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติจะปรากฏอยู่ตลอดเวลาในสัตว์ทั่วไป และมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาวะทางสรีระวิทยา เช่น สภาวะโภชนาการ อายุ และฮอร์โมน กลไกเหล่านี้จะไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ต่างๆ ไม่มีการปรับเปลี่ยนการตอบสนอง ถึงแม้จะเผชิญกับสิ่งที่คุกคามมาหลายๆ ครั้งก็ตาม แนวป้องกันที่สำคัญคือเยื่อเมือก ได้แก่ เยื่อเมือกหนึ่ง เยื่อเมือกทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ เป็นสิ่งที่กีดขวางทางกายภาพต่อต้านการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม การหลั่งสารต่างๆ เช่น กรดในกระเพาะ ไลโซไซม์ในน้ำตา กรดไขมันจากต่อมไขมัน (Sebaceous gland) และโปรตีนต่างๆ ในเลือด ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์และพิษของจุลินทรีย์ต่างๆ ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมสามารถผ่านแนวป้องกันเหล่านี้เข้าสู่ภายในร่างกายได้ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ เช่น แมคโครฟาจและเม็ดเลือดขาวหลายชนิด (Macrophage and polymorphonuclear lymphocytes) จะถูกดึงมายังบริเวณเหล่านั้นเพื่อกลืนกินและทำลายสิ่งที่คุกคามร่างกาย การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่รุกรานนี้อาจก่อให้เกิดการตอบสนองทางสรีระวิทยาที่เรียกว่า อาการอักเสบ (inflammatory response) ซึ่งเป็นอาการบวมแดงและเพิ่มความร้อนในบริเวณที่ได้รับอันตราย อันเกิดเนื่องจากการหดตัวของหลอดเลือดที่นำเลือดออกจากบริเวณนั้นซึ่งจะเกิดขึ้นทันทีที่ได้รับการบาดเจ็บและการเพิ่มการผ่านออกของสารจากหลอดเลือดฝอยในบริเวณนั้น ทำให้ของเหลวและเซลล์ต่างๆ ออกมาคั่งในบริเวณนั้น ทำให้เกิดอาการบวมและเจ็บ การสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่จับกิน (phagocyte) จะถูกดึงจากสารต่างๆ ที่ปล่อยจากจุลินทรีย์ ทำหน้าที่เป็น chemotactic agent เช่น F-meth-Phe และ F-meth-Leu-Phe

ซึ่งเป็นสารที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เซลล์เหล่านี้ก็จะทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคและเนื้อเยื่อที่ตายเป็นผลให้มีการรักษาและอาจก่อให้เกิดแผลเป็นในบริเวณที่ถูกทำลาย อาการอักเสบอาจเกิดขึ้นเองโดยอิสระ หรืออาจรวมกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องได้รับการสัมผัสก็ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อจุลินทรีย์ หรือสิ่งแปลกปลอมที่ฝานวป้องกันเหล่านี้เข้าไปในร่างกายได้ มักจะเจริญหรือก่อให้เกิดอันตรายอย่างรวดเร็ว ร่างกายต้องการระบบการป้องกันที่มีประสิทธิภาพสูงจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมนั้นโดยมีการทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์เองน้อยที่สุด แนวป้องกันนี้ตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องได้รับการสัมผัส

2.1.2 ภูมิคุ้มกันแบบที่ต้องได้รับการสัมผัส (Acquired Immunity or Adaptive Resistance) ภูมิคุ้มกันแบบนี้ปกติจะไม่มีอาการแสดงออก จนกระทั่งได้รับการสัมผัสจากการติดเชื้อหรือปลูกภูมิคุ้มกัน สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ภูมิคุ้มกันแบบนี้สามารถถูกกระตุ้นให้มีการตอบสนองแยกได้เป็นสองทาง คือ

2.1.2.1 การสร้างแอนติบอดีจำเพาะชนิด (Specific antibody) แล้วหลั่งเข้าสู่ระบบเลือดและระบบน้ำเหลืองเรียกว่า humoral immunity (HI)

2.1.2.2 กระตุ้นเม็ดเลือดขาวที่จำเพาะต่อสิ่งกระตุ้นให้ทำลายสิ่งแปลกปลอมเรียกว่า Cell mediated immunity (CMI)

เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีได้แก่ บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) แอนติบอดีเป็นโปรตีนสามารถจับอย่างจำเพาะกับโครงสร้างต่างๆ ที่เรียกว่าแอนติเจน (antigen) เช่นจุลินทรีย์ โดยมีบริเวณที่จำเพาะสำหรับจับกับแอนติเจน (antigen specific binding site) แอนติบอดีเป็นโปรตีนในซีรัมในกลุ่มที่เรียกว่าอิมมูโนโกลบูลิน การตอบสนองแบบพึ่งเซลล์ตอบสนองโดย ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) ที-ลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นมีรีเซพเตอร์ (receptor) คล้ายกับ binding site ของแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2540)

## 2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ ไม่มีการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน เนื่องจากเป็นสัตว์ที่มีระบบเลือดแบบเปิด ดังนั้นจึงมีกลไกในการป้องกันในทันที ซึ่งการตอบสนองเป็นแบบไม่จำเพาะ (non-specific defense) และไม่ต้องการอาศัยการชักนำให้เกิดขึ้น (Johansson และ Söderhäll, 1989; Smith และ Söderhäll, 1983) ประกอบด้วยการแข็งตัว



ของเลือด (coagulation) เพื่อจับสิ่งแปลกปลอมและป้องกันการสูญเสียเลือดในขณะที่เกิดบาดแผลขึ้น โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ได้แก่ การเกิดกระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis) การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) การสร้างโนดูล (nodulation) ส่วนการตอบสนองโดยสารน้ำ ประกอบด้วย agglutinins, lysins และ bactericidins เป็นต้น (Sindermann, 1990) นอกจากนี้ยังมีระบบโปรเฟโนลออกซิเดส (prophenoloxidase system) ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่สำคัญ โดยที่เอนไซม์ และสารต่างๆ ที่อยู่ในระบบโปรเฟโนลออกซิเดสนี้พบอยู่ในเซลล์เม็ดเลือด ช่วยให้การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือดทำงานได้ดีขึ้น (Söderhäll, 1981 และ 1982)

### 2.3 ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน เป็นระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นระบบที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และ ไม่มีการปรับเปลี่ยนการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีถึงแม้ว่าจะสัมผัสกับสิ่งที่มาคุกคามหลายๆ ครั้งก็ตาม ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนมี 2 ระบบ (Lackie, 1980; Ratcliffe และคณะ, 1985; Smith และ Chisholm, 1992) คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์ หรือแบบฟิงพาเซลล์ (cellular immunity) และ แบบที่มีการตอบสนองแบบหลังสาร (humoral immunity) ซึ่งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 แบบนี้จะต้องทำงานร่วมกัน

#### 2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์เม็ดเลือด

เป็นการทำงานโดยเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งมีการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำออกได้เป็น 3 ประเภทหลัก (Van de Braak และคณะ ; 1996, กิจการ และคณะ; 2543) คือ

ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด มีรูปร่างแบนกลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบรูปร่างคล้ายกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว ลักษณะโครงสร้างที่ผิวของเซลล์ไม่พบไมโครวิลไล (microvilli) หรือเท้าเทียม (pseudopodia) อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมสูง ไม่มีแกรนูล ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมครอน (ในกรณีเซลล์กลม) หรือมีขนาดความกว้าง 2.5-3.6 ไมครอน ยาว 6.8-13.9 ไมครอน (ในกรณีที่เซลล์เป็นรูปรี หรือรูปกระสวย) (รูปที่ 2.1)



แกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีนิวเคลียสขนาดเล็ก ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดใหญ่เป็นนจำนวนมา ขนาดของแกรนูลมีขนาดประมาณ 0.7-1.0 ไมครอน ลักษณะการยืดของเท้าเทียม หรือส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) ชนิดนี้เห็นได้ชัดเจน ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมครอน ความยาว 12.2-14.6 ไมครอน และความกว้าง 7.2-7.8 ไมครอน (รูปที่ 2.1)

เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีลักษณะผสมผสานระหว่าง ไฮยาลีน กับ แกรนูลาร์ มีขนาดและจำนวนแกรนูลน้อยกว่าแกรนูลาร์ เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบไมโครวิลไลได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน และยาว 9.0-14.2 ไมครอน (รูปที่ 2.1)



**รูปที่ 2.1** เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ (1) แกรนูลาร์เซลล์ (2),(3) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (4) แกรนูลาร์เซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส และ (5) ไฮยาลีนเซลล์  
ที่มา : Van de Braak และคณะ, 1996

ระบบภูมิคุ้มกันแบบตอบสนองโดยเซลล์เม็ดเลือดนี้ กำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ที่เข้ามาคุกคามโดยกระบวนการกลืนทำลาย แต่ถ้าสิ่งที่เข้ามานั้นมีขนาดใหญ่ หรือจำนวนมากเกินกว่าที่เซลล์เม็ดเลือดจะจับกิน จะมีการรวมกันของเซลล์เม็ดเลือดหลายๆ เซลล์มาล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมนั้นๆ ไว้ เกิดกระบวนการที่เรียกว่า การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม หรือเกิดการสร้างโนดูล เพื่อควบคุมไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายไปในกระแสเลือด (Smith และ Ratcliffe; 1981, Johnson; 1987) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดทำหน้าที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1) ในการเกิดการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือดต้องอาศัยระบบภูมิคุ้มกันที่มีการตอบสนองโดยสารที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือด หรือสารที่มีอยู่ในน้ำเลือด เพื่อช่วยในการจดจำและจับ

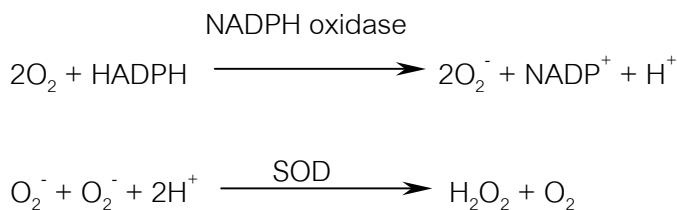
กันได้ของผิวเซลล์เม็ดเลือดกับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม หรือจุลินทรีย์ที่เข้ามาถูกราน (non-self recognition)

### 2.3.1.1 การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

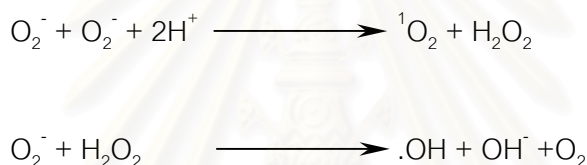
เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังได้รับบาดเจ็บ เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดและป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคผ่านบาดแผล (Johansson และ Söderhäll, 1989) การแข็งตัวของเลือดของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนเป็นการทำงานเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglusminase, TGase) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดมากระตุ้นให้โปรตีน (clotting protein) เกิดปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชัน (polymerisation) ได้ลักษณะเป็นเจลปิดบาดแผลไว้ ซึ่งกระบวนการการแข็งตัวของเลือดนี้ต้องอาศัยแคลเซียมเป็นโคเอนไซม์ (Kopáček และคณะ, 1993; Yeh และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังพบอีกว่ากระบวนการแข็งตัวของเลือดนี้จะเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการสร้างเม็ดสีดำ (melanisation) ที่เกิดขึ้นในระบบโปรฟีโนลออกซีเดส (Ratcliffe และคณะ, 1985; Johansson และ Söderhäll, 1989; Sritunyalucksana และ Söderhäll, 2000)

### 2.3.1.2 กระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซิส

กระบวนการกลืนทำลายเป็นกลไกพื้นฐานที่สำคัญในการทำลายหรือกำจัดสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่รุกรานเข้าไปในร่างกาย (Reade, 1968; McKay และ Jenkin, 1970) ขั้นตอนในการกลืนทำลายจะมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Ratcliffe และคณะ, 1985) โดยขั้นตอนแรกของการเกิดกระบวนการกลืนทำลายได้แก่ การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนเซลล์เมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือด และมีการยื่นไซโตพลาสซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์เป็นซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^-$ ) ด้วย NADPH oxidase ต่อจากนั้น  $O_2^-$  จะถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxidase dismutase; SOD) (Klein, 1982; Pick และ Keisari, 1980) ดังสมการต่อไปนี้



$\text{O}_2^-$  อาจถูกเปลี่ยนเป็น  $\text{H}_2\text{O}_2$  ได้อีกทางหนึ่งโดยการเกิดเองตามธรรมชาติ ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ และได้ซิงเกิลท์ออกซิเจน (singlet oxygen;  $^1\text{O}_2$ ) เป็นผลผลิตร่วมกับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  นอกจากนี้  $\text{O}_2^-$  ยังทำปฏิกิริยาร่วมกับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  เกิดเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical;  $\cdot\text{OH}$ ) (Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



จากปฏิกิริยาข้างต้น  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$  และ  $\cdot\text{OH}$  มีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยวิธีกลืนทำลาย (Adema และคณะ, 1991; Bachère และคณะ, 1995; Klein, 1982; Pick และ Keisari, 1980) แต่เนื่องจาก  $^1\text{O}_2$  และ  $\cdot\text{OH}$  ไม่เสถียร (Klein, 1982) ทำให้  $\text{O}_2^-$  และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  มีบทบาทมากที่สุดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนทำลาย ซึ่งมีผู้รายงานไว้ในหอยทาก (Adema และคณะ, 1991) และกุ้งกุลาดำ (Song และ Hsieh, 1994; Sung และคณะ, 1996)

กระบวนการกลืนทำลายเกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (ตารางที่ 2.1) เช่น ในกุ้งน้ำจืด ไฮยาลินเซลล์ทำหน้าที่กลืนทำลาย (McKay และ Jenkin, 1970; Smith และ Söderhäll, 1983) ส่วนในกุ้งน้ำเค็มสกุลฟิเนียส และกุ้งมังกร เซมิแกรนูลาร์เซลล์ทำหน้าที่ในการกลืนทำลาย (Bachère และคณะ, 1995; Hose และคณะ, 1990; Itami และคณะ, 1998)

เปอร์เซ็นต์ของการเกิดฟาโกไซโตซิสเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือด พบว่ามีค่าตั้งแต่ 1-2% (Paterson และ Swetart, 1974) จนถึง 84% (Itami และคณะ, 1998) ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง วิธีการวิเคราะห์ สิ่งแปลกปลอมที่ใช้

และการกระตุ้นเม็ดเลือด โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกระบวนการกลืนทำลายคือ 22 องศาเซลเซียส (McKay และ Jenkin, 1970)

องค์ประกอบในสารน้ำ (humoral component) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้กระบวนการกลืนทำลายเกิดสูงขึ้น McKay และคณะ (1969) และ McKay และ Jenkin (1970) พบว่าเมื่อปมสิ่งแปลกปลอมด้วยซีรัมของกุ้งน้ำจืด *Parachaeraps bicarinatus* ก่อนนำไปวิเคราะห์กระบวนการกลืนทำลาย จะทำให้กระบวนการกลืนทำลายสูงขึ้น และนอกจากนี้ พบว่าซีรัมประกอบด้วยแอกคลูตินิน (agglutinin) ทำให้สรุปได้ว่าสารในน้ำเลือดที่สามารถทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการกลืนทำลาย หรือที่เรียกว่า อีอพอซินิน (opsonin) คือ แอกคลูตินิน

แอกคลูตินินที่พบในกุ้งมังกร *Homarus americanus* มีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายได้เช่นกัน (Paterson และ Stewart, 1974)

แอกคลูตินินที่เชื่อมต่อกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS-binding agglutinin) เป็นแอกคลูตินินชนิดหนึ่งที่พบว่าเป็นสารกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายในกุ้งสีน้ำตาล *Penaeus californiensis* (Vagas-Albores, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนที่เชื่อมต่อกับบีตา-1, 3-กลูแคน ( $\beta$ -1, 3-glucan binding protein) และโปรตีน 76 kDa ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเลือดกุ้งปกติ สามารถเป็นอีอพอซินิน กระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายได้ (Cerenius และคณะ, 1994; Johansson และ Söderhäll, 1989; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997) สำหรับปู *Carcius manas* จะมีโปรตีน 80 kDa และโปรตีนที่เชื่อมต่อกับบีตา-1, 3-กลูแคนในน้ำเลือด ทำหน้าที่เป็นอีอพอซินินกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลาย (Johansson, 1995) บีตา-1, 3-กลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราพบว่า สามารถกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายได้เช่นกัน (Smith และ Söderhäll, 1983) โดยบีตา-1, 3-กลูแคนจะเพิ่มระดับโปรตีนที่เชื่อมกับบีตา-1, 3-กลูแคนที่ทำหน้าที่เป็นอีอพอซินินในซีรัม (Vagas-Albores, 1995)

กระบวนการกลืนทำลายไม่ได้เกิดเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนเท่านั้น เซลล์ที่อยู่กับที่ (fixed cell) บริเวณเหงือก ที่เรียกว่า nephrocytes ก็สามารถทำหน้าที่กลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ด้วยเช่นกัน (Ratcliffe และคณะ, 1985; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997)

### 2.3.1.3 การสร้างโนดูล (nodule formation)

กรณีที่มีเชื้อโรค และสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ การสร้างโนดูลเป็นกลุ่มก้อนเซลล์รอบๆ สิ่งแปลกปลอมจะเกิดขึ้นเพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายไปทั่วร่างกาย และมักพบการสร้างโนดูลบริเวณเหงือก และตับ (hepatopancreas) (Ratcliffe และคณะ, 1985) พร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ในระบบโปรตีนออกซีเดส (Johansson และ Söderhäll, 1989)

### 2.3.1.4 การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)

การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมจะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) จนเซลล์เม็ดเลือดเซลล์เดียวไม่สามารถกลืนทำลายได้ ต้องอาศัยเซลล์เม็ดเลือดเป็นจำนวนมากมาล้อมห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมไว้ สิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ เช่น พยาธิ เชื้อรา และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ (Ratcliffe และคณะ, 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมได้แก่ เซมิแกรนูลาร์ และแกรนูลาร์เซลล์ (ตารางที่ 2.1) กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ถูกห่อหุ้มจะอาศัยองค์ประกอบในระบบโปรตีนออกซีเดส พร้อมกับการเกิดเม็ดสีดำ (Nappi, 1973; Ratcliffe และคณะ, 1985) และพบว่าโปรตีนขนาด 76 kDa ที่แยกได้จากน้ำเลือดช่วยให้การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้น โดยกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดยึดเกาะสิ่งแปลกปลอมดีขึ้น (Johansson และ Söderhäll, 1989; Smith และ Chisholm, 1992)

## 2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยสารน้ำหรือแบบหลังสาร

ซีรัมของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่พบอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เหมือนสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Lackie, 1980; Ratcliffe และคณะ, 1985; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997) แต่มีองค์ประกอบหลายชนิดที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacteria activity) แอคคลูตินิน (agglutinin) สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factors) โมดูเลเตอร์ (modulators) และสารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factors) องค์ประกอบเหล่านี้เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (Chisholm และ Smith, 1995; McKay และคณะ, 1969; Stewart และ Zwicker, 1972) หรืออาจถูกชักนำให้สร้างขึ้น (Adums, 1991; Evans และคณะ, 1968, 1969a, 1969b; Stewart และ Zwicker, 1972) ซึ่งการถูกชักนำนี้ไม่มีคุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลิน คือ ไม่สามารถจดจำแอนติเจน และตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆ อย่างจำเพาะเจาะจง เมื่อพบแอนติเจนในครั้งต่อไป (Lackie, 1980; Ratcliffe และคณะ, 1985)



### 2.3.2.1 สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย หรือแบคเทอริซิดิน (bactericidin) เป็นสารต้านแบคทีเรียที่รายงานพบในน้ำเลือดกุ้งมังกร (Evans และคณะ, 1968, 1969a, 1969b; Stewart และ Zwicker, 1972; Weinheimer และคณะ, 1969) สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น, ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด มีการศึกษาไม่มากนักในกลุ่มครัสเตเชียน ส่วนใหญ่จะศึกษาในสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น กุ้งมังกร และกุ้งสกุล *Penaeus* เป็นต้น (ตารางที่ 2.2) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถพบได้ทั้งส่วนพลาสมา (Adams, 1991; Destoumieux และคณะ, 1997; Evans และคณะ, 1968, 1969a, 1969b; Stewart และ Zwicker, 1972) ซีรัม (Noga และคณะ, 1996, Stewart และ Zwicker, 1972) และในสารละลาย HLS (hemocyte lysate supernatant) (Chisholm และ Smith, 1995; Destoumieux และคณะ, 1997; Noga และคณะ, 1996)



ตารางที่ 2.1 หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน

บทบาทหน้าที่	ชนิดของครัสเตเชียน	ชนิดเซลล์เม็ดเลือด			อ้างอิง
		ไฮยาลีนเซลล์	เฮมิแกรนูลาร์เซลล์	แกรนูลาร์เซลล์	
การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)	กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	+	-	-	Hose และคณะ (1990)
กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis)	กุ้งน้ำจืด <i>Parachaeraps bicarinatus</i> กุ้งน้ำจืด <i>Astacus astacus</i>	+	-	-	McKay และ Jenkin (1970) Smith และ Söderhäll (1983)
	กุ้ง <i>Penaeus japonicus</i> กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	-	+	+	Bachère และคณะ (1995) Itami และคณะ (1998) Hose และคณะ (1990)
การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)	กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	-	+	+	Hose และคณะ (1990)
ระบบโปรเฟินอลออกซีเดส (prophenoloxidase system)	กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> กุ้งมังกร <i>Nephrops norvegicus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	-	+	+	McKay และ Jenkin (1970) Smith และ Söderhäll (1991) (ในแกรนูล) (ในแกรนูล)

Evans และคณะ (1968, 1969a, 1969b) และ Weinheimer และคณะ (1969) พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน EMB-1 ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งมังกร *Panulirus argus* ที่มีสุขภาพดี ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลิน 0.5% เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เมื่อได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 จะพบแบคทีเรียชนิดนี้ ไตเตอร์สูงขึ้นตามลำดับ แต่แบคทีเรียชนิดนี้จะแสดงความจำเพาะต่อเชื้อเพียงบางชนิด (ตารางที่ 2.2)

Stewart และ Zwicker (1972) พบว่า ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้งมังกร *Homarus americanus* สูงขึ้น เมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ *Pseudomonas perolens* ในรูปเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งแยกได้จากลำไส้กุ้งมังกร และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในกุ้ง แบคทีเรียชนิดที่พบไม่ทนความร้อน และมีฤทธิ์สูงขึ้นเมื่อ pH ลดลงจาก 7.6 เป็น 6.0 (ตารางที่ 2.2)

Chisholm และ Smith (1995) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในครัสเตเชียนหลายชนิด พบว่า ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีฤทธิ์ยับยั้งแต่ไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก โดยที่ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่พบในส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตกไม่ได้เกิดจากฟีนอลออกซิเดสที่พบในเซลล์เม็ดเลือด

Noga และคณะ (1996) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในปูทะเล (*Callinectes sapidus*) พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งในซีรัม และส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน มีฤทธิ์ดีที่ pH ต่ำ (5.2-6.0) ถูกยับยั้งโดยไซโตเดียมคลอไรด์ และไม่ทนความร้อน (ตารางที่ 2.2)

Destoumieux และคณะ (1997) ค้นพบโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพในน้ำเลือดกุ้ง *Penaeus vannamei* และตั้งชื่อว่า penaeidins โปรตีนนี้สามารถสกัดได้ทั้งจากส่วนพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (non lytic activity) สร้างและจัดเก็บอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus vannamei*

ในกุ้งกุลาดำมีผู้รายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรียไม่มากนัก Adams (1991) พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำในส่วนของพลาสมากุ้ง สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ผลิตจาก *V. alginolyticus* ที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อน

Sung และคณะ (1996) พบฤทธิ์ต้าน *E. coli* ในกุ่มกุลาดำสูงขึ้นอย่างรวดเร็วแต่คงอยู่ในช่วงเวลาสั้นๆ เมื่อกระตุ้นด้วยเซลล์ *Vibrio* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ปีตา-กลูแคน และไซโมแซน เอ

#### 2.3.2.2 แอคคกลูตินิน (agglutinin)

แอคคกลูตินินเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของเม็ดเลือดแดงของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (McKay และคณะ, 1969) แบคทีเรีย (Sritunyalucksana, 1995) และโปรโตซัว (Bang, 1962) พบโดยธรรมชาติในน้ำเลือดของคริสต์เตเซียน แอคคกลูตินินนอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้ว ยังมีหน้าที่เป็นอ็อปโซนินกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิสในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ด้วย (McKay และ Jenkin, 1970; Paterson และ Stewart, 1974; Vargas-Albores, 1995)

เลคติน (Lectin) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต จัดเป็นแอคคกลูตินินชนิดหนึ่ง มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจับกันได้ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกับผิวของสิ่งแปลกปลอม มีคุณสมบัติเป็นอ็อปโซนิน (Ratcliffe และคณะ, 1985) ซึ่งเลคตินในสัตว์กลุ่มคริสต์เตเซียนได้มีการแยกและศึกษาคุณสมบัติบางประการไว้ดังแสดงในตารางที่ 2.3

#### 2.3.2.3 สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factors)

ไซโตไคน์เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่แอนติบอดี สร้างในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยผลิตจากลิมโฟไซต์ มีหน้าที่ช่วยรักษาความสมดุลของเลือดในระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยในการประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับระบบอื่นๆ ในร่างกาย (Smith และ Chisholm, 1992)

สารที่แสดงสมบัติคล้ายไซโตไคน์ในกุ่มได้แก่ โปรตีนขนาด 76 kDa ซึ่งมีหน้าที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิส ช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมขณะเกิดการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (Smith และ Chisholm, 1992) และส่งเสริมการทำงานของระบบโปรตีนออกอกซีเดส โดยช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดชนิดเคมีแกรนูลาร์ และแกรนูลาร์ เกิดดีแกรนูเลชันมากขึ้น ทำให้เอนไซม์ในระบบโปรตีนออกอกซีเดสถูกปล่อยออกมามากขึ้น (Johansson และ Söderhäll, 1989)

#### 2.3.2.4 โมดูเลเตอร์ (modulators)

ตัวควบคุมระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในคริสต์เตียนได้แก่ ตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase inhibitor) และอัลฟาแมคโครโกลบูลิน ( $\alpha$ -macroglobulin) มีหน้าที่ยับยั้งเซอรินโปรตีเอส ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดสให้อยู่ในระดับที่สมดุล (Smith และ Chisholm, 1992)

#### 2.3.2.5 สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factors)

โคแอกกูโลเจน (coagulogen) เป็นโปรตีนในพลาสมาที่มีบทบาทในการป้องกันการสูญเสียเลือดและการป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค (Smith และ Chisholm, 1992)

#### 2.3.2.6 Pattern Recognition Proteins (PRPs)

เนื่องจากว่าสัตว์ในกลุ่มคริสต์เตียนไม่มีการสร้างแอนติบอดี (Immunoglobulin) ดังนั้นจึงต้องมีการผลิตสารบางอย่างเพื่อช่วยในการจดจำและจับกับสิ่งแปลกปลอม หรือจุลินทรีย์ได้ ซึ่งสารที่ว่านี้เราเรียกว่า Pattern Recognition Proteins (PRPs) PRPs มีชื่อเรียกต่างๆ กันตามความสามารถในการจับกับโมเลกุลนั้นๆ ถ้าสามารถจับกับเบต้า-กลูแคน ( $\beta$ -1, 3-glucan) ได้เราก็เรียกว่า  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein ( $\beta$ GBP) และถ้าสามารถจับกับ ไลโปโพลีแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ได้เราก็เรียกว่า lipopolysaccharide binding protein (LPS-binding protein) สามารถพบได้ใน Arthropod หลายชนิด เช่น  $\beta$ GBP พบใน แมลงสาบ *Blaberus craniifer* (Soderhall และคณะ; 1988) หนอนไหม *Bombyx mori* (Ochiai และ Ashida; 1988) และ ใน crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Duvic และ Söderhäll; 1990) ส่วน LPS-binding protein พบใน *Pacifastacus leniusculus* (Kopáček และคณะ; 1993) *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores และคณะ; 1993a) ซึ่งทั้ง  $\beta$ -1, 3-glucan และ lipopolysaccharide นี้ เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์เป็นผลให้เซลล์เม็ดเลือดสามารถจับกับเซลล์จุลินทรีย์หรือผิวของสิ่งแปลกปลอมได้

หลังจากเซลล์เม็ดเลือดจับ หรือสัมผัสกับผิวของจุลินทรีย์แล้ว PRPs ที่จับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์นี้ก็จะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดให้เคลื่อนที่ไปยังจุลินทรีย์เหล่านั้น และเกิดกระบวนการกำจัดหรือทำลายจุลินทรีย์ออกไปจากร่างกาย นอกจากนี้ยังมีการหลั่งเอา เอนไซม์ และโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือดออกมา (degranulation) เช่น

Transglutaminase เพื่อช่วยในกระบวนการการแข็งตัวของเลือด (clotting) สารยับยั้งจุลินทรีย์ PRPs และระบบโปรตีนออกซิเดส เป็นต้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียน

ครัสเตเซียน	แหล่งที่พบฤทธิ์ ต้านแบคทีเรีย	แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง	คุณสมบัติบางประการ			อ้างอิง
			การทนความร้อน	ชักนำด้วย สารกระตุ้น	คุณสมบัติอื่นๆ	
กุ้งมังกร <i>Panulirus argus</i>	พลาสมา	แกรมลบ รูปแท่ง	เสียดสภาพที่ 65°C 20 นาที	+	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่เกิดการรวมกลุ่มกับ แบคทีเรีย</li> <li>- ตอบสนองต่อการกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3</li> <li>- มีความจำเพาะต่อเชื้อเพียงบางส่วน</li> </ul>	Evans และคณะ (1968)  Evans และคณะ (1969)  Weinheimer และคณะ (1969)
กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i>	พลาสมา	แกรมลบ รูปแท่ง	เสียดยวที่ 60°C 20 นาที	+	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ไม่เกิดการรวมกลุ่มกับแบคทีเรีย</li> </ul>	Evans และคณะ (1969a)
กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i>	ซีรัม และ พลาสมา	<i>Pseudomonas perolens</i>	เสียดสภาพที่ 55-65°C	+	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ลดลงจาก 7.6 เป็น 6.0</li> </ul>	Stewart และ Zwicker (1972)
กุ้งกุลาดำ <i>Penaeus monodon</i>	พลาสมา	<i>Vibrio anguillarum</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>E. coli</i>	ไม่มีข้อมูล	+	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีความจำเพาะต่อเชื้อเป็นบางส่วน</li> </ul>	Adums (1991) Sung และคณะ (1996)



ตารางที่ 2.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (ต่อ)

ครัสเตเชียน	แหล่งที่พบฤทธิ์ ต้านแบคทีเรีย	แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง	คุณสมบัติบางประการ			อ้างอิง
			การทน ความร้อน	ชักนำ ด้วยสาร กระตุ้น	คุณสมบัติอื่นๆ	
กุ้งมังกร <i>Panulirus argus</i> กุ้งมังกร <i>Nephrops norvegicus</i> กุ้ง <i>Crangon crangon</i>	HLS	<i>Psychrobacter immobilis</i>	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	- มีฤทธิ์ต้าน แต่ไม่ทำให้เซลล์ แบคทีเรียแตก (non lytic activity)	Chisholm และ Smith (1995)
ปูทะเล <i>Callinectes sapidus</i>	ซีรัม และ HLS	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>E. coli</i>	เสถียรภาพที่ 65-70 °ซ	ไม่มีข้อมูล	- มีฤทธิ์ต้านดีที่ pH 5.2-6.0 - ถูกยับยั้งโดยไฮเดียมคลอไรด์ - เสถียรภาพโดยโปรตีนเอส	Noga และคณะ (1996)
กุ้ง <i>Penaeus vannamei</i>	พลาสมา และ HLS	<i>Micrococcus luteus</i> <i>E. coli</i>	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	- มีฤทธิ์ต้าน แต่ไม่ทำให้เซลล์ แบคทีเรียแตก	Destoumieux และ คณะ (1997)

ที่มา : สมบัติ รักษาพร (2542), HLS (hemocyte lysate supernatants) = ส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดแดง

ตารางที่ 2.3 แสดงเลคตินในครัสเตเชียน

ชนิดครัสเตเชียน	น้ำหนักโมเลกุล / หน่วยย่อย	คุณสมบัติในการจับกับน้ำตาล	อ้างอิง
กิ้งกูดำ <i>Penaeus monodon</i>	420 kDa / 27 kDa	N-acetylneuraminic acid	Ratanapo และ Chulavatnatol (1990)
<i>Cancer antennarius</i>	หน่วยย่อยขนาด 36 kDa	N-acetyl- และ N-glycolyneuraminic acid	Ravindranath และคณะ (1985)
<i>Homarus americanus</i>	2 ชนิด / หน่วยย่อยขนาด 55 kDa	- Sialic acid - N-acetyl-D-galatosamine	Hall และ Rowlands (1974)
<i>Squilla mantis</i>	2 ชนิด / หน่วยย่อยขนาด 193 kDa	- N-acetyl-D-galatosamine - fucose	Amirante และ Basso (1984)
<i>Balanus balanoides</i>	300 kDa	N-acetylneuraminic acid, galacturonic acid, glucuronic acid	Ogata และคณะ (1983)
<i>Megabalanus rosa</i>	1. 330 kDa / 22 kDa 2. 132 kDa / 22 kDa 3. 64 kDa / 16 kDa	galactose	Muramoto และ Kamiya (1986 และ 1989, )

ที่มา : Söderhäll และ Cerenius (1992)

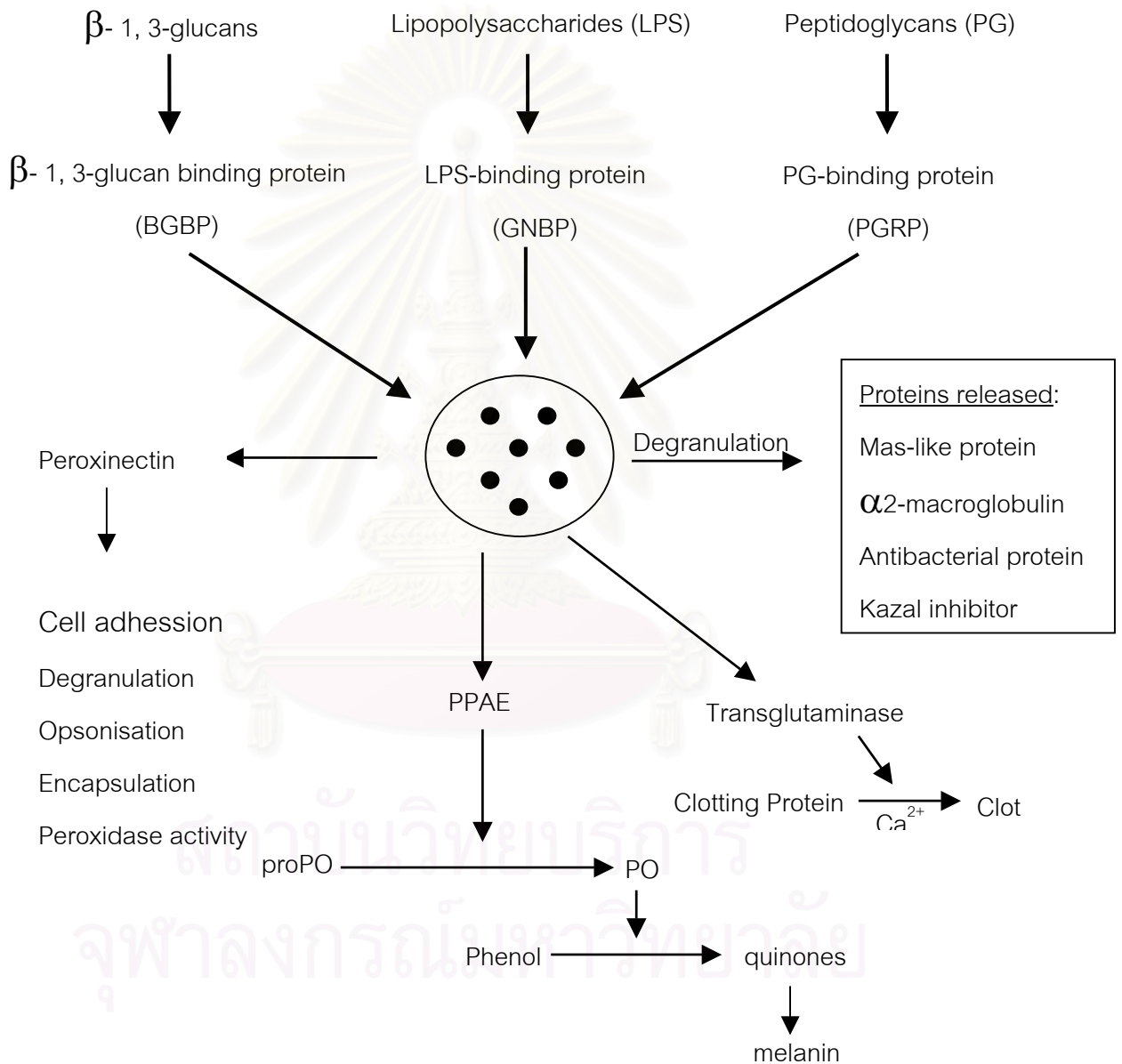
### 2.3.3 ระบบโปรเฟนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system)

กลไกการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดในครัสเตเชียน ได้แก่ กระบวนการกลืนทำลาย การแข็งตัวของเลือด การสร้างโนดูล และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม รวมทั้งกลไกในการทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ เกี่ยวข้องกับสารน้ำที่เป็นผลิตภัณฑ์จากระบบโปรเฟนอลออกซิเดส ซึ่งอยู่ในเซลล์เม็ดเลือด (Söderhäll, 1981, 1982)

ระบบโปรเฟนอลออกซิเดสประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่สำคัญ คือ ฟีนอลออกซิเดส (PO, o-diphenol-oxygen oxidoreductase; E.C. 1.10.3.1) จะอยู่ในรูปของ pro-enzyme ที่เรียกว่า โปรเฟนอลออกซิเดส (proPO) และ เอนไซม์ในกลุ่มเซอรินโปรติเอส โดยจะทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบ (enzyme cascade) เรียกว่า prophenoloxidase system เป็นระบบที่สำคัญมากในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Leonard และคณะ, 1985; Ratcliffe และคณะ, 1984; Söderhäll และคณะ, 1994) โดยจะเป็นระบบที่ชักนำให้เกิดกระบวนการ melanization มีผลทำให้บริเวณบาดแผลมีจุดสีดำของเมลานิน (melanin) เกิดขึ้นที่เปลือก กระบวนการที่สำคัญของระบบนี้จะเริ่มจาก proPO เปลี่ยนเป็น PO โดยอาศัยเอนไซม์กลุ่มเซอรินโปรติเอส (serine – protease) ที่เรียกว่า proPO activating system (PPAE) ที่ถูกหลั่งออกมาพร้อมกับ proPO เมื่อเซลล์เม็ดเลือดเกิดการดีเกรนูลेशन ซึ่ง PPAE นี้จะทำงานได้ต้องอาศัย  $Ca^{2+}$  (Gollas-Galvan และคณะ, 1997) PO ที่ได้จะไปทำปฏิกิริยา hydroxylation ของ phenol และเกิด oxidation ของ o-phenols ได้เป็น quinones ต่อจากนั้นก็เกิด polymerization ของ quinones ได้เป็นเมลานินมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ นอกจากนี้ในกระบวนการเกิด melanization ยังมีสารประเภท reactive oxygen เกิดขึ้นด้วย เช่น superoxide anion และ hydroxyl radical ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ (Söderhäll, 1992; Nappi และคณะ, 1995; Song และ Hsieh, 1994) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

สำหรับการกระตุ้นการทำงานของระบบ Prophenoloxidase Activating System นี้สามารถกระตุ้นได้โดย  $\beta$ -1, 3-glucan (Ashida และคณะ; 1983. Hernandez-Lopez และคณะ, 1996; Vargas-Albores และคณะ, 1993a) ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Ashida และคณะ, 1983; Rowley และ Rahmet, 1990) และ lipopolysaccharide (Söderhäll และ Hall, 1984) แต่ก็มีรายงานไว้ในแมลง *Allogamus auricollis* ว่าระบบโปรเฟนอลออกซิเดสนี้ไม่สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยไซโมแซน ซึ่งเป็น  $\beta$ -1, 3-glucan ชนิดหนึ่ง (Brivio และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า prophenoloxidase system สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในการเกิด

กระบวนการ adhesion encapsulation และกระบวนการกินทำลาย (Johansson และ Söderhäll, 1989; Ratamäki และคณะ, 1991) ซึ่งการกระตุ้นโดยเซลล์จุลินทรีย์นี้ไม่ได้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ แต่เป็นการกระตุ้นการเกิดดีแกรนูเลชัน (degranulation) (Gollas-Galvan และคณะ, 1997)



รูปที่ 2.2 แสดงระบบโปรตีนออกซิดีสในครัสเตเชียน (ดัดแปลงจาก Sritnuyalucksana, 2000)

โปรตีนออกซอกซีเดสได้มีการศึกษาในกุ้งหลายชนิด ได้แก่ กุ้ง *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores และคณะ, 1993a, 1996; Hernández-López และคณะ, 1996; Gollas-Galván และคณะ, 1999) กุ้ง *P. paulensis* (Perazzolo และ Barracco, 1997) กุ้ง *P. stylirostris* (Le Moullac และคณะ, 1997) และ กุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Sritunyalucksana และคณะ, 1999) เอนไซม์ในระบบโปรตีนออกซอกซีเดสอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดชนิดแกรนูโลลาร์ และ เซมิแกรนูโลลาร์ (Vargas-Albores และคณะ, 1993a; Perazzolo และ Barracco, 1997) และ ในกุ้งกุลาดำพบว่า mRNA ของโปรตีนออกซอกซีเดสพบเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดเท่านั้น (Sritunyalucksana และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอดอื่นๆ อีกหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงโปรตีนออกซอกซีเดสของสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด

ชนิด	ชนิดของ proPO	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	อ้างอิง
<b>Crustaceans</b>			
<i>Penaeus monodon</i>	proPO	78.7 <sup>a</sup>	Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 1999
<i>Penaeus californiensis</i>	proPO	114 <sup>b</sup>	Gollas-Galván <i>et al.</i> , 1999
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	proPO	80.7 <sup>a</sup>	Aspán <i>et al.</i> , 1995
		76 <sup>b</sup>	Aspán and Söderhäll, 1991
<b>Insects</b>			
<i>Anopheles gambiae</i>	proPO2	78.1 <sup>a</sup>	Jiang <i>et al.</i> , 1997b
	proPO3	78.7 <sup>a</sup>	Jiang <i>et al.</i> , 1997b
	proPO1	79.3 <sup>a</sup>	Lee <i>et al.</i> , 1998
	proPO4-6	78.1-79.2 <sup>a</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
<i>Armigeres subalbatus</i>	proPO	78.1 <sup>a</sup>	Cho <i>et al.</i> , 1998
<i>Anopheles stephensi</i>	proPO	78.8 <sup>c</sup>	Cui, 1998
		(AF 062034.1)	
<i>Blaberys discoidalis</i>	proPO	76 <sup>b</sup>	Durrant <i>et al.</i> , 1993

ตารางที่ 2.4 แสดงโปรตีนออกซอกซีเดสของสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด (ต่อ)

ชนิด	ชนิดของ proPO	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	อ้างอิง
<i>Bombyx mori</i>	proPO1	78.6 <sup>a</sup>	Kawabata <i>et al.</i> , 1995
	proPO2	80.0 <sup>a</sup>	Kawabata <i>et al.</i> , 1996
		80 <sup>b</sup>	Ashida, 1971
<i>Calliphora vicina</i>	proPO	87 <sup>b</sup>	Naqvi and Karlson, 1979
<i>Drosophila melanogaster</i>	proPOA1	78.9 <sup>a</sup>	Fujimoto <i>et al.</i> , 1995
		78 <sup>b</sup>	Fujimoto <i>et al.</i> , 1993
	proPOA2	77 <sup>b</sup>	Fujimoto <i>et al.</i> , 1993
<i>Galleria mellonella</i>	proPO	80, 83 <sup>b</sup>	Kopáček <i>et al.</i> , 1995
<i>Holotrichia diomphalia</i>	proPO	79 <sup>b</sup>	Kwon <i>et al.</i> , 1997
<i>Hyalophora cecropia</i>	proPO	76 <sup>b</sup>	Andersson <i>et al.</i> , 1989
<i>Hyphantria cunea</i>	proPO1	78.2 <sup>a</sup>	Park <i>et al.</i> , 1997
	proPO2	80.2 <sup>a</sup>	Park <i>et al.</i> , 1997
<i>Manduca sexta</i>	proPO1	78 <sup>a</sup>	Jiang <i>et al.</i> , 1997a
		71, 77 <sup>b</sup>	Aso <i>et al.</i> , 1985
	proPO2	80 <sup>a</sup>	Hall <i>et al.</i> , 1995
		98, 100 <sup>b</sup>	Hall <i>et al.</i> , 1995
<i>Musca domestica</i>	proPO	60 <sup>b</sup>	Hara <i>et al.</i> , 1993
<i>Sarcophaga bullata</i>	proPO1	79.8 <sup>c</sup>	Chase <i>et al.</i> , 1999
		(AF 161260.1)	
	proPO2	79 <sup>c</sup>	Chase <i>et al.</i> , 1999
		(AF 161261.1)	
<i>Tenebrio molitor</i>	proPO1	79.1 <sup>a</sup>	Lee <i>et al.</i> , 1999

ที่มา : Sritunyalucksana และ Söderhäll (2000), <sup>a</sup> น้ำหนักโมเลกุลคำนวณจากลำดับกรดอะมิโน (deduced amino acid), <sup>b</sup> น้ำหนักโมเลกุลจาก SDS-PAGE, <sup>c</sup> รายงานไว้ใน GenBank ตัวเลข



ใน

วงเล็บ คือ accession numbers

## 2.4 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการบ่งชี้ถึงสุขภาพของกิ้ง

โดยทั่วไปในการประเมินถึงว่าสุขภาพกิ้งที่เรากำลังเลี้ยงอยู่เป็นอย่างไรนั้น เกษตรกรสามารถพิจารณาถึงสิ่งต่างๆ ดังต่อไปนี้ อัตราการรอด อัตราการตาย อัตราการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ ปริมาณอาหารในลำไส้ ลักษณะภายนอกของตัวกิ้ง เป็นต้น ส่วนการตรวจโรคติดเชื้อนั้นต้องใช้เทคนิคที่จำเพาะมากขึ้น เช่น การส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตัดเนื้อเยื่อไปตรวจดู (histopathology) การทำ immuno cytochemistry เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติเมื่อเทียบกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังแล้ว ในกิ้งก็ยังไม่มียารักษาที่แน่นอนในการประเมินถึงสุขภาพว่ามีสภาวะเป็นเช่นไร โดยทั่วไปแล้วจะนำเอาความรู้ทางด้านภูมิคุ้มกันในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่ได้มีการศึกษาเป็นอย่างมาก มาใช้เป็นแบบอย่างในการศึกษาถึงระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ความรู้เกี่ยวกับทางด้านโลหิตวิทยา (haematology) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการวินิจฉัยโรคในคน และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยในกิ้งที่ป่วย โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ในเลือด ได้แก่ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (total plasma protein) ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (glucose concentration) ระยะเวลาในการแข็งตัวของเลือด (clotting time) ปริมาณเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte count) แอคติวิตีของโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activity) ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดที่มีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index) และ แอคติวิตีของสารยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial activity) เป็นต้น (Stewart และคณะ, 1969; Hose และคณะ, 1984; Persson และคณะ, 1987; Bachère และคณะ, 1995; Hall และ Van Ham, 1998; Rodriguez และ Le Moullac, 2000) แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้โดยส่วนใหญ่แล้วยังไม่มีความแน่นอนจึงยังไม่มีการพัฒนานำเอาวิธีดังกล่าวมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างเป็นทางการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 สารเคมี

- แอบโซลูท เอทานอล (BDH, England)
- อะกาโรสเจล (FMC Bioproduct, USA)
- ำัน (Agar) (Oxoid, England)
- ยีสต์สกัด (Oxoid, England)
- กรดบอริก (Merck, Germany)
- โบรโมฟินอลบลู (Merck, Germany)
- คลอโรฟอร์ม (Merck, Germany)
- แลมห์ดา ดีเอ็นเอ (λ DNA, Promega Corporation Medison, Wisconsin)
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Promega ,Co., USA)
- 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- เอธิเดียมโบรไมด์ (Sigma Chemical Co., USA)
- เอธิลีน ไดเอมีน เตตราอะซิเตรท (Fluka Chemika, Switzerland)
- ไฟคอลล400 (Sigma Chemical Co., USA)
- กลูโคส (Sigma Chemical Co., USA)
- Tri Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA)
- ไฮโซไพรพานอล (LabScan Asia Co., Thailand)
- เมทานอล (LabScan Asia Co., Thailand)
- ไฮเดียมคลอไรด์ (Sigma Chemical Co., USA)
- ทริปซิน (Merck, Germany)
- น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล (Prep-Gene® DNA Purification Kit, Bio-Rad Laboratories, USA)
- ทริส ( Tris) (USB, Amersham Life Science, England)
- ไฮเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sigma Chemical Co., USA)
- อะคริลาไมด์ (Sigma Chemical Co., USA)
- บิส อะคริลาไมด์ (Promega ,Co., USA)

- แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Sigma Chemical Co., USA)
- ไกลซีน (USB, Amersham Life Science, England)
- เดตราเมธิลเอธิลีนไดอะมีน (Merck, Germany)
- คาโคดีเลท (Sigma Chemical Co., USA)
- L-DOPA (L-dihydroxyphenyl-Alanine) (Sigma Chemical Co., USA)
- 3-เมธิล-2-เบนโซโรอะโซลิโนน ไฮดราโซน (MBTH) (Sigma Chemical Co., USA)
- แอมโมเนียมคาร์บอเนต (Merck, Germany)
- สีย้อมคูแมสซี บริลเลียน บลู อาร์ 250 (Research Organic, USA)
- น้ำยาสำเร็จรูปวัดความเข้มข้นโปรตีน (Bio-Rad, USA)
- โปรตีนมาตรฐานจากไข่ขาว (Bovine Serum Albumin) (Promega, Co., USA)
- โอทอลฟินิลีนไดเอมีน (OPD) (Sigma Chemical Co., USA)
- กรดอะซิติก (Merck, Germany)
- pGEM<sup>®</sup>-T easy vector (Promega, Co., USA)
- pET17b vector (Novagen, USA)
- ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่ใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ (Access RT-PCR System) (Promega, Co., USA)
- ทริปโตน (Oxoid, England)

### 3.2 เอนไซม์

- DyNAzyme<sup>™</sup> II DNA Polymerase (Finnzyme, Finland)
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*, *EcoRI* (Promega, Co., USA)

### 3.3 แบคทีเรีย

- *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA 96 relA1 thi Δ(lac-pro AB) F' (traD 36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>q</sup> lacZΔM15)*)
- *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) *plysS (F' ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>)gal dcm (DE3) plysS (Cm<sup>R</sup>))*

### 3.4 อุปกรณ์

- ออโตเมติกไมโครปีเปต ขนาด P2, P10, P20, P40, P100, P200 และ P1000 (Gilson Medical Electrical S.A., France)
- กล้องถ่ายภาพ Pentax K1000 (Asahi Opt.Co., LTD.)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) (Perkin Elmer, USA)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) (Nuair Class II รุ่น NU-440-300E, USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ( Water bath รุ่น SBS30) (Stuart Scientific, UK)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Milton Roy รุ่น Genesys 5, Germany)
- ชุดโพลีอะคริลามายดีอิเล็กโตรโฟรีซิส รุ่น Mini-PROTEAN<sup>®</sup> II Cell (Bio-Rad, USA)
- เครื่อง UV transilluminator รุ่น M-26 (UVP, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 3K18 (Sigma Osterode and Harz, Germany)
- เครื่องถ่ายโอนโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า รุ่น Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA)
- เครื่องชะโปรตีนออกจากโพลีอะคริลามายด์ เจล รุ่น Electro Eluter 442 (Bio-Rad, USA)
- ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ชนิดแนวนอน รุ่น Sub-Cell GT MINI (Bio-Rad, USA)

### 3.5 สัตว์ทดลอง

กึ่งกุลาดำมีชีวิต น้ำหนักตัว 15-20 กรัม มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการของโรค ลำตัวใส เปลือกแข็งปกติ นำมาเลี้ยงไว้ที่ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงกึ่งกุลาดำในบ่อซีเมนต์ขนาด 0.75x0.75x0.75 ลูกบาศก์เมตร มีระบบหมุนเวียนน้ำ ให้อากาศตลอดเวลา ปล่อยกึ่ง 45-50 ตัว/บ่อ ควบคุมความเค็มของน้ำที่ 10 ส่วนในพันส่วน เลี้ยงไว้ก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ในช่วงของการเลี้ยงให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 3 มื้อ ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน



### 3.6 การเก็บตัวอย่างเลือดและเตรียมสารละลายส่วนไซเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemocytos Lysate: HLS)

เก็บตัวอย่างโดยใช้สารละลายไซเดียมซิเตรท 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) ที่บรรจุในกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร และใช้เข็มเบอร์ 24G นำไปเจาะเลือดกึ่งที่ตำแหน่งโคนขาเดือที่ 4 โดยใช้ อัตราส่วนของเลือดกึ่งต่อสารละลายป้องกันเลือดแข็งตัวเท่ากับ 1 ต่อ 1 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มาละลายในสารละลายคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ (cacodylate buffer, CAC buffer รายละเอียดการเตรียมดูในภาคผนวก ข) pH 7.4 แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยนำไปแช่แข็งแล้วทำให้ละลายทันทีเป็นจำนวน 1 รอบ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ 15,900g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนไซซึ่งเป็น HLS นำมาวิเคราะห์ระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส และปริมาณโปรตีนทันที

### 3.7 การวิเคราะห์ระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

วิเคราะห์หาระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส โดยวัดสีของโดพาโครม (Dopachrome) ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา มีรายละเอียดดังนี้ นำสารละลาย HLS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตรในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม (96 well Microtiterplate) จากนั้นเติมสารละลายทริปซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรทุกช่วง 3 นาที เป็นจำนวน 10 ครั้ง (ดัดแปลงจาก Smith และ Söderhäll, 1991)

แอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรเปลี่ยนแปลงไป 0.001 ต่อ นาที ต่อ มิลลิกรัมของโปรตีน

#### 3.7.1 ผลของทริปซินต่อระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

นำสารละลาย HLS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย CAC buffer pH 7.4 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลายทริปซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในชุดทดลองที่เติมทริปซิน ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่

เติมทริปซินให้เต็มสารละลาย CAC buffer แทนทริปซิน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรทุกช่วง 3 นาที เป็นจำนวน 10 ครั้งนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

### 3.7.2 ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

นำสารละลาย HLS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH ต่างๆ กัน คือ ที่ pH 3-5 ใช้สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 6-7 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ pH 8-11 ใช้สารละลาย Tris-HCl ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลายทริปซินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH นั้นๆ ปริมาตร 130 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรทุกช่วง 3 นาที เป็นจำนวน 10 ครั้งนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

### 3.7.3 ผลของสารละลายชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

นำสารละลาย HLS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาบ่มในสารละลาย Hank Salt Solution ที่มี  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และสารละลาย Hank Salt Solution ที่ไม่มี  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_0$  ตามลำดับ) สารละลาย CAC buffer สารละลายโซเดียมซิเตรต และสารละลาย Tris-HCl โดยที่สารละลายทั้ง 5 ชนิดปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับค่าของ pH ที่เหมาะสมกับการวัดการทำงานของฟีนอลออกซิเดส (จากผลการทดลองหัวข้อ 3.7.2) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลายทริปซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ตามชนิดนั้นๆ ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกช่วง 3 นาที เป็นจำนวน 10 ครั้งนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาระดับแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส



### 3.7.4 ศึกษาผลของไซโมแซนเอ (Zymosan A) ต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

นำสารละลาย HLS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาบ่มในสารละลายไซโมแซน เอ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ สารละลายเติมสารละลาย CAC buffer (กลุ่มควบคุม) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลาย ทริปซิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตรหลังจากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรทุกช่วง 3 นาที เป็นจำนวน 10 ครั้งนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาระดับ แอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

### 3.7.5 การวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสด้วยวิธี MBTH Assay

นำสารละลาย HLS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาบ่มในสารละลาย CAC buffer ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลายทริปซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazone) เข้มข้น 20.7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร สารละลาย CAC buffer ปริมาตร 55 ไมโครลิตร และสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 2.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (ดัดแปลงจาก Winder and Harris, 1991)

### 3.7.6 การหาปริมาณโปรตีน

เติมสารละลาย HLS ปริมาตร 160 ไมโครลิตรในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม เติมน้ำยาทดสอบโปรตีนสำเร็จรูป (BioRad) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 ชั่วโมง (Bradford, 1976) คำนวณปริมาณโปรตีน เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ง)

### 3.8 การแยกฟีนอลออกซิเดสจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

#### 3.8.1 Affinity chromatography

เก็บเลือดกึ่งกลาดำโดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรท 10% เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว ในกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และใช้เข็มเบอร์ 24G ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยมีอัตราส่วนของสารป้องกันเลือดแข็งตัวต่อเลือดกึ่งกลาดำเป็น 1 ต่อ 1 มาเหวี่ยงปั่นด้วยความเร็ว 3,600 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกับน้ำเลือด นำส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์เม็ดเลือดมาปั่นล้าง 1 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกโดยนำไปแช่แข็งแล้วทำให้ละลายทันทีเป็นจำนวน 1 รอบ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,900g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสซึ่งเป็น HLS 500 ไมโครลิตร มาแยกฟีนอลออกซิเดสด้วยวิธีลิวคิตโครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ยาว 11 เซนติเมตร ภายในบรรจุสารตัวกลาง คือ Blue Sepharose ล้างด้วยสารละลาย CAC buffer ที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับบูลเซปฟาโรสคอลัมน์โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง จนมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 1.5 โมลาร์ ใช้ความเร็วในการชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทุกๆ 1 มิลลิลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน และวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

#### 3.8.2 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตโฟรีซิส

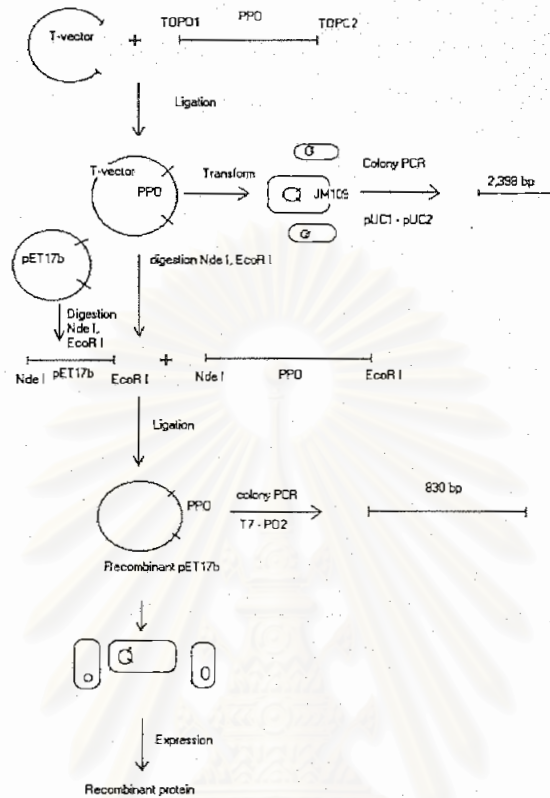
เก็บเลือดกึ่งกลาดำโดยใช้เข็มเบอร์ 24G และกระบอกฉีดยาที่บรรจุสารละลายโซเดียมซิเตรทเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว โดยให้มีอัตราส่วนของสารป้องกันเลือดแข็งตัวต่อเลือดกึ่งกลาดำเป็น 1 ต่อ 1 มาเหวี่ยงปั่นด้วยความเร็ว 3,600g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกับน้ำเลือด นำส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์เม็ดเลือดมาปั่นล้าง 1 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกโดยแช่แข็งแล้วทำให้ละลายทันที 1 รอบ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,900g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสซึ่งเป็น HLS จำนวน 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำเอา HLS มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า

100 โวลต์ เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลโพลีอะครีลาไมด์ที่ได้มาย้อมด้วยสีย้อมคูแมสซีบิลเลียนบูล เพื่อดูแถบของโปรตีนที่แยกได้ และ ย้อมดูแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสโดยนำแผ่นเจลโพลีอะครีลาไมด์มาปมในสารละลายทริปซินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นแช่ในสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ประมาณ 10 นาที ก็จะปรากฏแถบสีดำขึ้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ทำการตัดแถบโปรตีนจากแผ่นเจลโพลีอะครีลาไมด์ที่ย้อมด้วยคูแมสซีบิลเลียนบูล ในตำแหน่งที่ตรงกับแถบสีดำที่ปรากฏขึ้นจากการย้อมด้วยสารละลาย L-DOPA เก็บไว้ใช้เป็นแอนติเจน สำหรับการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่ายต่อไป

### 3.9 การโคลน และ การแสดงออกของยีนโปรฟีนอลออกซิเดส (Cloning and expression of prophenoloxidase gene)

สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง จากนั้นนำเอาอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเพื่อเพิ่มปริมาณของยีนโปรฟีนอลออกซิเดส นำผลผลิตที่ได้ไปทำการแยกด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟรีซิส จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่เราต้องการมาชะออกจากอะกาโรสเจลโดยใช้ Prep-A-Gene DNA purification kit (BioRad) นำเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ชะออกมานั้นมาเชื่อมต่อกับที่เวคเตอร์ (pGEM<sup>®</sup>-T easy, Promega) ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จากนั้นนำมาถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (*E. coli* สายพันธุ์ JM109) เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ทำการแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Eco*RI เพื่อให้ปลายของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเป็น *Nde*I และ *Eco*RI ไว้สำหรับเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ (pET17b, Novagen) จากนั้นนำไปถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ใช้สำหรับศึกษา การแสดงออกของยีน (*E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS) ได้เป็นรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย นำไปชักนำให้เกิดการสร้างโปรฟีนอลออกซิเดส เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี (รูปที่ 3.1)





รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการโคลน และชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซีเดส

### 3.9.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

ทำการเก็บเลือดกึ่งกลาดำโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโซเดียมซิเตรทเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวบรรจุอยู่ในกระบอกฉีดยา โดยอัตราส่วนของสารป้องกันเลือดแข็งตัวต่อเลือดกึ่งกลาดำเป็น 1 ต่อ 1 นำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็ว 3,600g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือด เกล็ดเลือด ละลายส่วนบนทิ้ง นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้ไปเติมสาร Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc.) 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็ว 12,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำเอาสารละลายส่วนบนซึ่งไม่มีสี มาใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติมแอบโซลูทไอโซโพรพานอล (Absolute isopropanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็ว 12,000g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เกล็ดเลือดส่วนบนทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนอาร์

อาร์เอ็นเอ โดยเติมเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ แล้วดูดสารละลายส่วนบนออก ปล่อยให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ระวังอย่าให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งจนเกินไป จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำปริมาตร 25 ไมโครลิตร

### 3.9.2 การวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอวัดได้โดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 1 คือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวมีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และวัดความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอโดยดูค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร ซึ่งควรอยู่ในช่วง 1.6 – 1.9

### 3.9.3 การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนออกซิเดส

ทำการออกแบบไพรเมอร์ของยีนโปรตีนออกซิเดสของกิ้งกูดดำ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รายงานไว้ใน GenBank (AF099741) โดยใช้โปรแกรม Primer premier 5 ได้ดังนี้ ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) คือ 5' TACATATGGCCAATGACCAGCAGCG 3' (TOPO1) และรีเวิร์สไพรเมอร์ (reverse primer) คือ 5' TCAGTTCAATTTCTCTCCCAGAAAC 3' (TOPO2)

เพิ่มปริมาณยีนโปรตีนออกซิเดสจากอาร์เอ็นเอ โดยใช้ Access RT-PCR system (Promega) ในปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ AMV/*Tf* เข้มข้น 1 เท่า dNTPs เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ TOPO1 เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ TOPO2 เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ AMV Reverse Transcriptase ปริมาณ 1 หน่วย (unit) และเอนไซม์ *Tf* DNA polymerase ปริมาณ 1 หน่วย จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) สายแรก

48 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 1 รอบ

ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA สายที่สองและการเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น

94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	}	40 รอบ
60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที		
72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที		

และ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที 1 รอบ

เมื่อทำปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว นำผลผลิตจากการทำอาร์ทีพีซีอาร์ทีที่ได้ไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

### 3.9.4 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยหึ่งผงอะกาโรสเจล ละลายในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นของอะกาโรสเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปหลอมในไมโครเวฟ ตั้งสารละลายอะกาโรสไว้ให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเทในถาดเตรียมเจลที่ปิดขอบด้านปลายทั้งสองด้านด้วยเทปกาว และวางหวีเสียบ (comb) ลงตรงปลายด้านหนึ่งไว้แล้ว เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้ว ดึงหวีเสียบและเทปกาวออก จากนั้นนำถาดเจลที่เตรียมไว้ไปวางในอ่างอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีหลุมอยู่ด้านข้างขอบ เทปบัฟเฟอร์ TAE ลงในอ่างให้ท่วมเจล นำผลผลิตอาร์ทีพีซีอาร์ทีที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีติดตาม (ประกอบด้วยสีบรอมฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์ และไฟคอลล์ 25 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยอดในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ ปิดฝาอ่างแล้วต่อขั้วไฟฟ้า ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80-100 โวลต์ จนกระทั่งสีบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 2 ใน 3 ของความยาวแผ่นอะกาโรสเจล จึงหยุด จากนั้นนำแผ่นอะกาโรสเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วนำอะกาโรสเจลไปแช่ในน้ำ เป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นอะกาโรสเจลมาส่องดูขนาดผลผลิตอาร์ทีพีซีอาร์ที ภายใต้แสงยูวี (UV transilluminator) โดยเปรียบเทียบกับขนาดก๊อบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน



### 3.9.5 การแยกชิ้นดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

ตัดแถบของยีนโปรเฟีนอลออกซิเดส ขนาด 2,072 คู่เบส ที่แยกผ่านอะกาโรสเจลมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาซึ่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาปริมาณของอะกาโรสเจลโดยที่น้ำหนักของอะกาโรสเจล 1 กรัม เท่ากับปริมาณอะกาโรสเจล 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำแถบเจลที่ตัดได้มาแยกยีนโปรเฟีนอลออกซิเดสออกมา โดยใช้ Prep-A-Gene DNA purification kit (BioRad) โดยมีขั้นตอนคือ เติม binding buffer (สารละลายโซเดียมเปอร์คลอเรต) ปริมาตร 3 เท่าของชิ้นอะกาโรสเจล แล้วนำอะกาโรสเจลไปหลอมในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จนกระทั่ง ชิ้นอะกาโรสเจลละลายหมด เติม Prep-A-Gene matrix ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-10 นาที เพื่อให้ cDNA จับกับ matrix จากนั้นนำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็ว 7,000 g นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำล้างส่วนบนทิ้ง นำ matrix ที่ได้มาเติม binding buffer ปริมาตร 25 เท่าของ matrix ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเหวี่ยงปั่นอีกครั้ง เติมน้ำล้างส่วนบนทิ้ง นำตะกอน matrix มาล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 25 เท่าของ matrix ดูดสารละลายส่วนบนออกให้หมด ปล่อยให้ matrix อยู่ที่อุณหภูมิห้อง เติม elution buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งแล้วนำสารละลายส่วนบน ใส่หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.9.6 การเชื่อมต่อยีนโปรเฟีนอลออกซิเดสกับทีเวคเตอร์ (Ligation of prophenoloxidase gene to T-vector)

ใช้ชุดสำเร็จรูป p GEM<sup>®</sup>-T easy (Promega) โดยในหลอดปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x rapid ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เวคเตอร์ (p GEM<sup>®</sup>-T easy vector) 25 นาโนกรัม ชิ้นยีนโปรเฟีนอลออกซิเดส 55 นาโนกรัม และ เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 หน่วย นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้ไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนนำไปเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านต่อไป

### 3.9.7 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli*

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และสายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (LB broth)(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ BL21 (DE3)pLysS ให้เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB

เข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เลี้ยงได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียสจนได้ความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็น 0.4-0.6 แชนเซลล์แบคทีเรียในน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,700g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง กระจายเซลล์แบคทีเรียในสารละลายที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แชนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงปั่นที่ 2,700g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนบนทิ้งให้หมด กระจายเซลล์แบคทีเรียในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่มีกลีเซอรอลเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แชนน้ำแข็ง 10 นาที แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่  $-70$  องศาเซลเซียส

### 3.9.8 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*

นำคอมพิเทนต์เซลล์ที่เตรียมได้ในหัวข้อ 3.9.7 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมนีคอมบีแนนท์พลาสมิด (Recombinant plasmid) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แชนน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 1 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g เป็นเวลา 30 วินาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้เหลืออยู่ประมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (LB Agar plate) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไอพีทีจี (IPTG, isopropyl-thiogalactoside) เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ X-gal เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เลือกรีคอมบีแนนท์โคลน (โคโลนีสีขาว) มาแยกพลาสมิดเพื่อตรวจดูว่าพลาสมิดนั้นๆ ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่

### 3.9.9 การแยกพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย

เชื้อเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเชื้อมา 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมหา

ละลายเชื้ออีก 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g นาน 1 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง กระจายเซลล์แบคทีเรียในสารละลาย GTE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์(ภาคผนวก ข) ที่เตรียมใหม่ ๆ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท pH 4.8 เข้มข้น 3 โมลาร์ ผสมให้เข้ากันดี แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนสีขาวติดมา นำมาสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม 1 ครั้ง จากนั้นนำไปตกตะกอนพลาสติกโดยเติมแอมโซลูทเอทานอลที่แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายพลาสติก ผสมให้เข้ากัน แช่ไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เหวี่ยงปั่นที่ 10,000g เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนบน ล้างตะกอนพลาสติก 2 ครั้งด้วยสารละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนพลาสติกแห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE buffer 50 ไมโครลิตร จากนั้นกำจัดอาร์เอ็นเอ โดยเติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอเอสเอ (RNase A) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายพลาสติกที่ - 20 องศาเซลเซียส

### 3.9.10 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสติก

นำเอาพลาสติกที่แยกได้จากข้อ 3.7.9 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *EcoRI* จากนั้นนำเอาผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบโดยการทำให้เจลอิเล็กโตโฟเรซิส เทียบขนาดของยีน ฟีนอลออกซิเดสที่โคลนได้ กับ  $\lambda$ *Hind III*

### 3.9.11 การเชื่อมต่อนรีคอมบิแนนท์พลาสติก กับ แอ็กเพรสชันเวกเตอร์

นำเวกเตอร์ pET17b (Novagen) มาเตรียมให้มีปลายเป็น *NdeI* และ *EcoRI* โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *EcoRI* แล้วนำไปทำให้เจลอิเล็กโตโฟเรซิส และแยกแอ็กเพรสชันเวกเตอร์ที่มีปลายเป็น *NdeI* และ *EcoRI* ออกจากอะกาโรสเจล จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับรีคอมบิแนนท์พลาสติกที่มีปลายเป็น *NdeI* และ *EcoRI* โดยเอนไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.7.7 หลังจากนั้นทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS โดยนำไปเกลี่ย นำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (LB Agar plate) ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 12 - 16 ชั่วโมง นำโคลนที่ได้มาทำโคโลนี



พีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') และ ไพรเมอร์ PO2 (5' CTTCGGGAGACCCAGACA 3')

3.9.12 การชักนำให้ทรานสเฟอร์แมนท์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีเดี่ยวของทรานสเฟอร์แมนท์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่าความขุ่นเป็น 0.6-1.0 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 12- 16 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g นาน 30 วินาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไป แล้วกระจายเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลและยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจากนั้นถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลและยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีค่าความขุ่นเป็น 0.6 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการเก็บเซลล์แบคทีเรียประมาณ 2 มิลลิลิตร สำหรับเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีส ส่วนที่เหลือในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลาย IPTG เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG เป็น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อชักนำให้ทรานสเฟอร์แมนท์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS มีการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีส จากนั้น นำไปเลี้ยงต่อโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรียโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กระจายเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer ประกอบด้วย สารละลายทริส (Tris) pH 7.5 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ยูเรียเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ สารละลาย EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ สารละลายไลโซไซม์ (lysozyme) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ เซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร Freeze-thaw เป็นจำนวน 4 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส และตะกอนเซลล์ไปทำโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสูญเสียสภาพธรรมชาติ (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) เปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีส

เดส จากนั้นตัดแถบโปรตีนที่ได้เก็บไว้ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี

### 3.10 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

#### 3.10.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากโปรตีนออกอกซิเดสที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือด

กระต่ายที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นกระต่ายพันธุ์ albino เพศผู้ น้ำหนัก 1 กิโลกรัม อายุประมาณ 6 เดือน (ชื่อจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

นำแถบโพลีอะคริลามายด์เจลที่ตัดเก็บไว้ในหัวข้อ 3.8.2 มาบดให้ละเอียดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารคอมพลีท แอดจูแวนท์ (complete Freund' s adjuvant) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีโดยฉีดเข้าไปในบริเวณกล้ามเนื้อสะโพก จากนั้น 1 สัปดาห์ทำการเก็บเลือดกระต่ายบริเวณเส้นเลือดที่ใบหูปริมาณ 2 มิลลิลิตร ไปตรวจสอบแอนติบอดีโดยใช้วิธีเวสเทิร์นบลอต (Western Blotting) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ทำการฉีดกระตุ้นอีกครั้ง แต่เปลี่ยนจากคอมพลีท แอดจูแวนท์ เป็นอินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (incomplete Freund' s adjuvant) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่ายไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000g นาน 10 นาที เก็บส่วนบนซึ่งเป็นซีรัมแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.10.2 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกอกซิเดส

ทำการชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกอกซิเดสออกจากโพลีอะคริลามายด์เจลที่ตัดเก็บไว้ในหัวข้อ 3.7.12 โดยใช้เครื่อง Electro-Eluter รุ่น 422 (BioRad) จากนั้นนำเอารีคอมบิแนนท์โปรตีนออกอกซิเดสที่ได้มาผสมกับคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Complete Freund' s adjuvant) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีโดยฉีดเข้าไปในบริเวณกล้ามเนื้อสะโพก จากนั้น 1 สัปดาห์ทำการเก็บเลือดกระต่ายบริเวณเส้นเลือดที่ใบหูปริมาณ 2 มิลลิลิตร ไปตรวจสอบแอนติบอดีโดยใช้วิธีเวสเทิร์นบลอต (Western Blotting) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ทำการฉีดกระตุ้นอีกครั้ง แต่เปลี่ยนจากคอมพลีท แอดจูแวนท์ เป็นอินคอมพลีท แอดจูแวนท์ (Incomplete Freund' s adjuvant) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่ายไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000g นาน 10 นาที เก็บส่วนบนซึ่งเป็นซีรัมแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.11 การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต (Western Blot)

วิธีการนี้ช่วยในการจำแนกชนิดของโปรตีนหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยถ่ายโอนโปรตีนที่อยู่บนแผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจลลงบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส และติดตามหาโปรตีนที่เราสนใจด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับโปรตีนนั้นๆ

นำตัวอย่างสารละลาย HLS น้ำเลือดกึ่งกลูตาต้า(plasma) และโปรตีนจากทรานสฟอร์มแมนท์แบคทีเรียมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นถ่ายโอนโปรตีนที่แยกได้ลงบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสโดยใช้เครื่อง Mini Trans-Blot Cell (BioRad) แซ่แผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจล เมมเบรนไนโตรเซลลูโลสขนาด 7x8.5 เซนติเมตร กระจาขกรองขนาด 7.5x10.5 เซนติเมตร ในสารละลายทรานสเฟอร์บัฟเฟอร์ (Tris ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ไกลซีนความเข้มข้น 192 มิลลิโมลาร์ เมทานอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมโดเดซิลล์ ซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) นาน 15-30 นาที จากนั้นนำมาวางเรียงกันจากซ้ายไปขวาดังนี้ กระจาขกรอง แผ่นเจล เมมเบรนไนโตรเซลลูโลส กระจาขกรอง โดยระวางอย่าให้ระวางชั้นมีฟองอากาศ จากนั้นนำไปต่อเข้ากับกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้า 350 มิลลิแอมแปร์ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาแล้ว นำแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate-buffered Saline, PBS) นาน 2 นาที แล้วนำเมมเบรนไปแช่ในสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำไปแช่ในแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่เราสนใจซึ่งถูกทำให้เจือจางในสารละลาย BSA 1 ส่วนใน 1000 ส่วน เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แซ่แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสที่เชื่อมกับแอนิเมอร์ออกไซด์ซึ่งถูกทำให้เจือจางในสารละลาย 1% BSA 1 ส่วน ใน 1000 ส่วน เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS ที่มี Tween20 ผสมอยู่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (PBST) 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปแช่ในสารละลายไดอะมิโนเบนซิดีน (Diaminobenzidine, DAB) จนเกิดแถบสีน้ำตาล ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ตรวจสอบบริเวณที่ติดสีน้ำตาลเทียบกับแถบโปรตีนบนแผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจล



### 3.12 การตรวจสอบปริมาณของโปรตีนออกซิดีสด้วยวิธี ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

นำ HLS ปริมาตร 25 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลายไซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 9.6 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาใส่ในแต่ละหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ในหลุมทิ้ง ล้างด้วยสารละลาย PBST ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมสารละลาย 3% BSA ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยสารละลาย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมแอนติบอดีที่เจือจาง 1 ส่วนใน 1000 ส่วนในสารละลาย 1% BSA ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยสารละลาย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่เจือจาง 1 ส่วนใน 1000 ส่วนในสารละลาย 1% BSA ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยสารละลาย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโอทอลฟีนินดีนไดเอมีน (O-Phenylenediamine) เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก เข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

### 3.13 วัดปริมาณการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีสด้วยเทคนิค Semiquantitative RT-PCR

วัดปริมาณยีนโปรตีนออกซิดีส เทียบกับ ยีนแอกตินซึ่งเป็นเฮาส์คิงปีงยีนโดยการทำปฏิกิริยาอาร์ทีพีซีอาร์ในหลอดเดียวกัน ออกแบบไพรเมอร์ของยีนโปรตีนออกซิดีส (AF099741) และยีนแอกติน (AF1100987) ของกุ่มกุลาดำจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank โดยได้ไพรเมอร์สำหรับยีนโปรตีนออกซิดีส ดังนี้ ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ คือ 5' CACGGCAAAGTGAACGAG 3' (PO1) และรีเวิร์สไพรเมอร์ คือ 5' CTCGGGAGACCCAGACA 3' (PO2) ซึ่งให้ผลผลิตจากอาร์ทีพีซีอาร์ 417 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ของยีนแอกติน ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ คือ 5' GGTATCCTCACCCCTCAAGTA 3' (Actin1) และรีเวิร์สไพรเมอร์ คือ 5' AAGAGCGAACCTTCATAGA 3' (Actin2) ซึ่งให้ผลผลิตจากอาร์ทีพีซีอาร์ 327 คู่เบส

การหาอัตราส่วนของไพรเมอร์โปรฟีนอลออกซิเดส และไพรเมอร์แอคติน โดยในปฏิกิริยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ AMV/T# (1x) dNTPs เข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ PO1 และ PO2 เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ actin1 และ actin2 เข้มข้น 0.12 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ AMV Reverse Transcriptase ปริมาณ 1 หน่วย (unit) และเอนไซม์ T# DNA polymerase ปริมาณ 1 หน่วย จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสด้วย เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) สายแรก

48 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 1 รอบ

ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA สายที่สองและการเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น

94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	}	25 รอบ
55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที		
72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที		

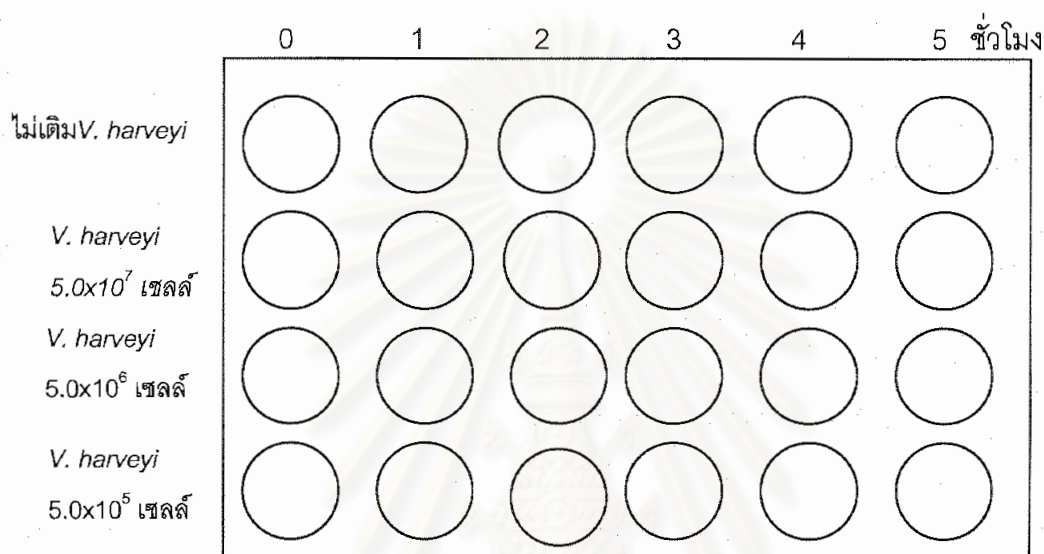
และ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที 1 รอบ

ผลผลิตที่ได้ นำมาตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลโดยใช้ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมเจลอะกาโรสด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อเปรียบเทียบความสว่างของแถบดีเอ็นเอของยีนโปรฟีนอลออกซิเดส และแถบแอคติน

### 3.14 เปรียบเทียบโปรฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในสภาวะที่มีเชื้อ *Vibrio harveyi* และไม่มีเชื้อ *V. harveyi* ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

เติมเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่มีความเข้มข้นเซลล์เม็ดเลือดกุ้งเริ่มต้น  $2.05 \times 10^7$  เซลล์ต่อ มิลลิลิตร ในเพลทเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยง เซลล์ M-199 ปริมาตร หลุมละ 750 ไมโครลิตร (คิดเป็นจำนวนเซลล์เม็ดเลือด  $5.12 \times 10^6$  เซลล์ต่อ หลุม) จากนั้นเติมเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น  $5.0 \times 10^8$ ,  $5.0 \times 10^7$  และ  $5.0 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร (คิดเป็นปริมาณเชื้อ *V. harveyi*  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^6$  และ  $5.0 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม) จากนั้นนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างโดยดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้ว

เติมสารละลาย PBS ที่มี 0.01 เปอร์เซ็นต์ของเฮคตีเอสปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำเอาส่วนใสไปวิเคราะห์แอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส(ตามข้อ 3.7.5) และปริมาณฟีนอลออกซีเดส (ตามข้อ 3.10) ในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ทำ 2 เพลท



รูปที่ 3.2 แผนผังแสดงการเติมตัวอย่างลงไปเ็นเพลทแบบ 24 หลุม

### 3.15 เปรียบเทียบโปรตีนออกซีเดสในกึ่งปกติ กับกึ่งที่ได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi*

เพาะเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีน (ภาคผนวก ก) บนเครื่องเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 12 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของ *V. harveyi* ให้ได้  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นนำไปฉีดกึ่งกุลาดำตัวละ 100 ไมโครลิตร เป็นจำนวน 30 ตัว จากนั้นทำการเก็บเลือดกึ่งกุลาดำที่เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากกึ่งได้รับเชื้อ *V. harveyi* มานับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวมโดยนับบนสไลด์นับเซลล์เม็ดเลือด (hemacytometer) วิเคราะห์หาแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส (ตามข้อ 3.7.5) ปริมาณฟีนอลออกซีเดส (ตามข้อ 3.10) และปริมาณยีนโปรตีนออกซีเดส (ตามข้อ 3.11) เปรียบเทียบกับกึ่งกุลาดำปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ *V. harveyi*



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกติวิตีของฟินอลออกซีเดสทางเคมี

ในการตรวจสอบแอกติวิตีของฟินอลออกซีเดสได้ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมจากตัวแปร 3 ประเภท ได้แก่ ค่าพีเอช ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และปริมาณเอนไซม์ทร립ซิน โดยมีผลการทดลองดังนี้ คือ

##### 4.1.1 ผลการศึกษาผลของพีเอชต่อแอกติวิตีของฟินอลออกซีเดส

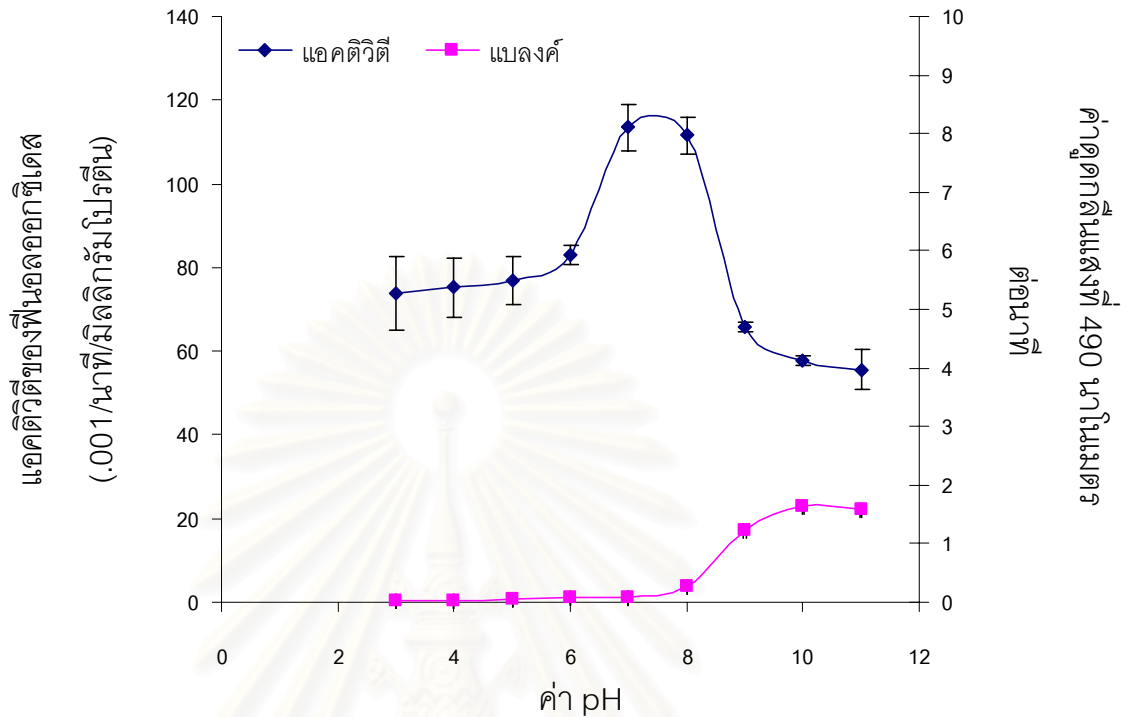
นำสารละลาย HLS ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 1.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาวัดแอกติวิตีของฟินอลออกซีเดสโดยใช้สารละลายที่มี pH 3 – 11 พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการวัด แอกติวิตีของฟินอลออกซีเดส อยู่ในช่วง pH 7 – 8 คือ ให้ค่าแอกติวิตี เท่ากับ 113.51 และ 111.53 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้ยังพบว่า pH ที่สูงกว่า 8 สับสเตรทซึ่งเป็น L-DOPA สามารถเกิดสีได้เองโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ (auto oxidation) ดังแสดงในรูปที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส

ค่า pH	แปลงค์ (mOD <sub>490</sub> ที่เพิ่มขึ้นต่อนาที)	mOD <sub>490</sub> ที่เพิ่ม ขึ้นต่อนาที	แอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส
3	0.030 ± 0.0014	2.757 ± 0.327	73.69 ± 8.84
4	0.020 ± 0.0014	2.803 ± 0.258	75.23 ± 6.97
5	0.040 ± 0.0028	2.883 ± 0.214	76.85 ± 5.78
6	0.070 ± 0.0007	3.143 ± 0.081	83.06 ± 2.18
7	0.080 ± 0.0014	4.280 ± 0.207	113.51 ± 5.58
8	0.260 ± 0.0028	4.387 ± 0.163	111.53 ± 4.39
9	1.230 ± 0.0141	3.663 ± 0.047	65.77 ± 1.28
10	1.630 ± 0.0212	3.770 ± 0.044	57.84 ± 1.18
11	1.570 ± 0.0141	3.627 ± 0.175	55.59 ± 4.73

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ n = 3



รูปที่ 4.1 แสดงผลของพีเอชที่มีต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

#### 4.1.2 ศึกษาผลของเอนไซม์ทริปซินต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

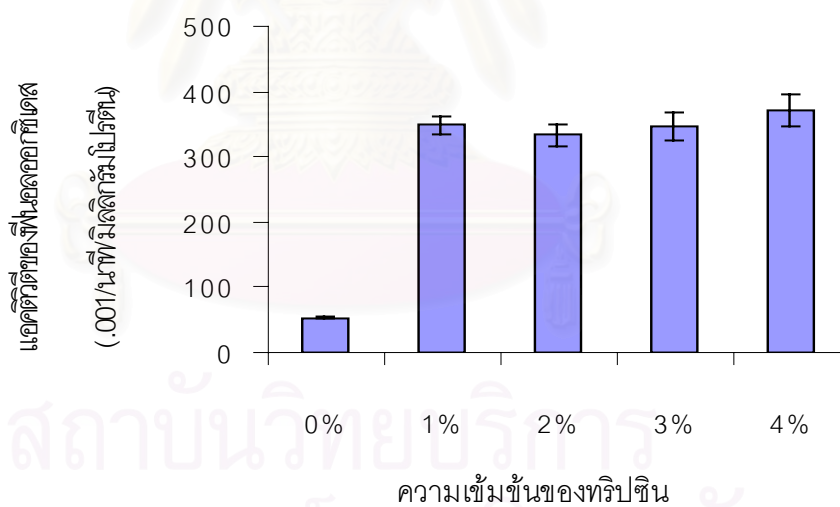
จากการทดลองนำตัวอย่างสารละลาย HLS ที่มีความเข้มข้น 1.957 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส โดยเติมเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4% พบว่าในชุดทดลองที่เติมเอนไซม์ทริปซินมีค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสสูงกว่าในชุดการทดลองที่ไม่เติมเอนไซม์ทริปซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสที่เติมเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2



ตารางที่ 4.2 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส เมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4%

ความเข้มข้นของเอนไซม์ทริปซิน	แอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส
0%	53.654 ± 2.555
1%	348.322 ± 14.528
2%	332.993 ± 17.012
3%	345.767 ± 20.809
4%	370.465 ± 24.639

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ  $n = 3$



รูปที่ 4.2 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสเมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4%

#### 4.1.3 ชนิดของสารละลาย และการกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

นำสารละลาย HLS ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส โดยบ่มใช้สารละลายที่แตกต่างกัน คือ สารละลายแฮงก์ (Hank salt solution) สารละลายไซโตไคน์ 10% สารละลาย PBS สารละลาย Tris-HCl และสารละลาย CAC buffer ที่มีค่า pH เท่ากันคือ 7.5 พบว่าในการทดลองชุดที่เติมเอนไซม์ทริปซินให้ค่าของฟีนอลออกซิเดสสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมเอนไซม์ทริปซินในทุกชนิดของสารละลายที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และสารละลาย CAC buffer ให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส สูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ ทั้งในชุดการทดลองที่เติมเอนไซม์ทริปซิน และชุดที่ไม่เติมเอนไซม์ทริปซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในชุดการทดลองที่ไม่เติมเอนไซม์ทริปซิน สารละลายแฮงก์ที่ไม่มีแมกนีเซียม แคลเซียม ( $H_0$ ) และสารละลาย Tris-HCl ให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส ต่ำกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนในชุดการทดลองที่เติมเอนไซม์ทริปซิน พบว่าสารละลายแฮงก์ที่ไม่มีแมกนีเซียมและแคลเซียมให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสต่ำที่สุดดังแสดงในตารางที่ 4.3 และจากการทดสอบการกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสด้วยไซโมแซนเอในหลอดทดลอง พบว่าไซโมแซนเอ ไม่สามารถกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดสได้ในสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทั้งในแบบที่เติมเอนไซม์ทริปซิน และไม่เติมเอนไซม์ทริปซินดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของแอกติวิตีของฟีนอลออกซิเดส เมื่อใช้สารละลายต่างชนิดกัน

ชนิดของสารละลาย	ไม่เติมเอนไซม์ทริปซิน	เติมเอนไซม์ทริปซิน
$H_0$	17.52 ± 3.19	122.19 ± 15.60
$H_1$	124.57 ± 21.04	237.76 ± 13.74
ไซโตไคน์ 10%	50.05 ± 4.77	357.48 ± 43.34
PBS	44.19 ± 5.46	240.88 ± 8.86
50 mM Tris-HCl	14.95 ± 2.79	441.76 ± 28.84
CAC buffer	269.26 ± 33.27	1392.65 ± 77.12

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ  $n = 3$

ตารางที่ 4.4 ผลของการกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส ด้วยไซโมแซนเอ

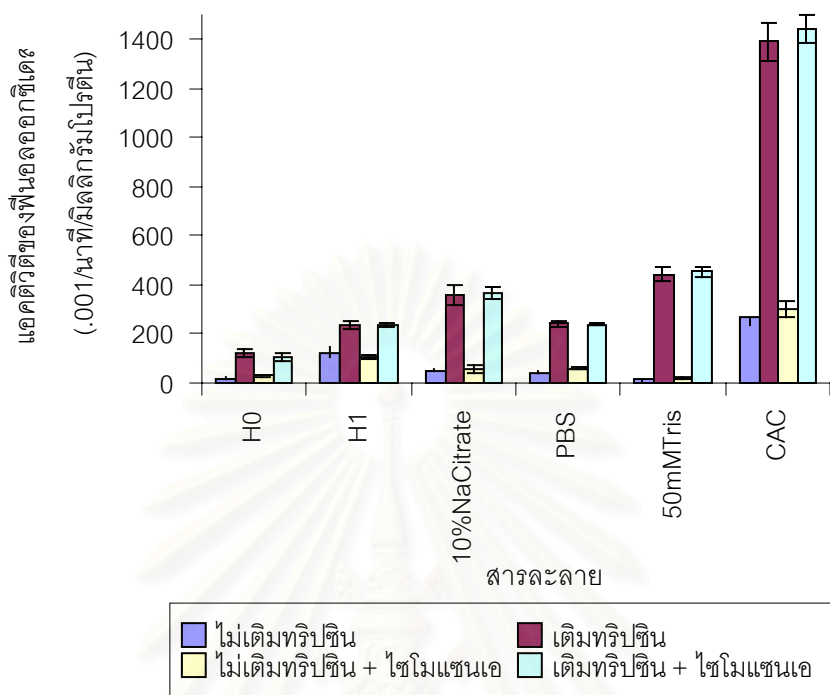
ชนิดของสารละลาย	ไม่เติมเอนไซม์ทริปซิน	เติมเอนไซม์ทริปซิน
H <sub>0</sub>	29.51 ± 4.52	109.74 ± 16.25
H <sub>1</sub>	106.15 ± 4.33	236.68 ± 9.42
ไซเดียมซีเตรต 10%	54.81 ± 14.82	365.83 ± 23.79
PBS	60.58 ± 4.28	238.03 ± 2.85
50 mM Tris-HCl	19.93 ± 4.43	455.60 ± 20.81
CAC buffer	300.46 ± 33.63	1440.80 ± 58.23

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ n = 3

#### 4.1.4 เปรียบเทียบวิธีการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสโดยใช้วิธี Dopachrome assay กับวิธี MBTH assay

ในการเปรียบเทียบวิธีการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสโดยวิธี Dopachrome assay และ MBTH assay โดยใช้สับสเตรท L-DOPA เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ พบว่าผลผลิตที่เกิดจากฟีนอลออกซีเดสทำปฏิกิริยากับ L-DOPA เพียงอย่างเดียวให้สารสีส้มแดงของโดพาโครม (dopachrome) ส่วนวิธี MBTH ให้สารสีชมพูเข้มที่เกิดจากโดพาควิโนน (Dopaquinone) ทำปฏิกิริยากับ MBTH โดย L-DOPA สามารถทำปฏิกิริยากับฟีนอลออกซีเดสได้หมดพอดี ทำให้ได้ผลผลิตเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ด้วย

นำสารละลายโดพาโครม และสารสีชมพูที่มีความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ มาเจือจาง 2 เท่าแบบเป็นลำดับขั้น ให้ได้ความเข้มข้น 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิโมลาร์ นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรได้ดังตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้น (รูปที่ 4.4 และ 4.5) พบว่า วิธี MBTH assay ให้ค่าความไวของการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสสูงกว่าวิธี DOPA ประมาณ 3.5 เท่า โดยดูจากค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเป็น  $2.156 \times 10^{-4}$  และ  $6.12 \times 10^{-5}$  ต่อโมลต่อเซนติเมตร ตามลำดับ

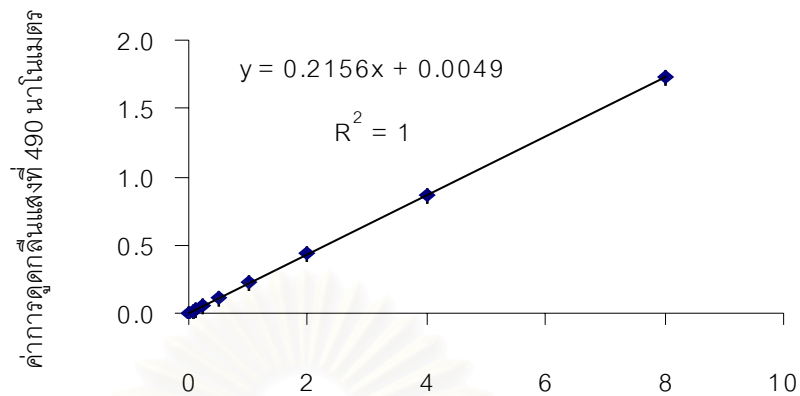


รูปที่ 4.3 ชนิดของสารละลาย และ โซเดียมซิเตรต ต่อ แอคติวิตีของฟีนอลออกซีเดส

ตารางที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ของโดพาโครม และ สารสีชมพู ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของฟีนอลออกซีเดสกับ L-DOPA

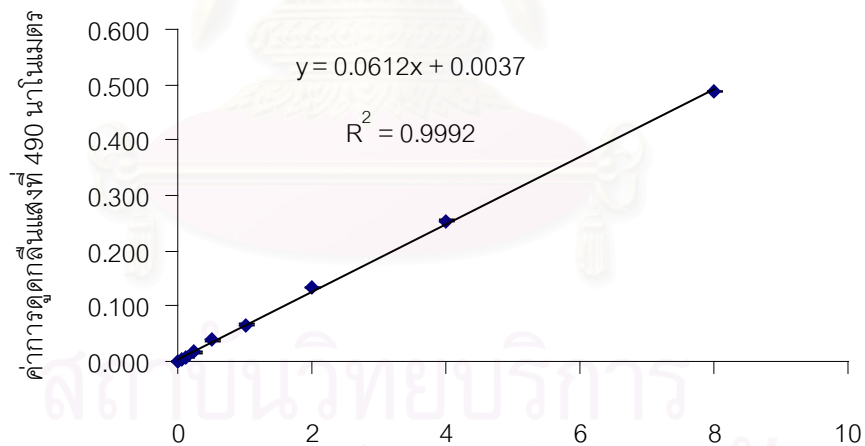
ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	OD <sub>490</sub> ของโดพาโครม	OD <sub>490</sub> ของสารสีชมพู
0.0625	0.004 ± 0.0006	0.017 ± 0.0012
0.125	0.007 ± 0.0012	0.029 ± 0.0006
0.25	0.017 ± 0.0015	0.058 ± 0.0015
0.5	0.038 ± 0.0010	0.113 ± 0.0020
1.0	0.066 ± 0.0015	0.223 ± 0.0010
2.0	0.134 ± 0.0015	0.444 ± 0.0010
4.0	0.254 ± 0.0010	0.871 ± 0.0010
8.0	0.488 ± 0.0010	1.726 ± 0.001

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเมื่อ n = 3



ความเข้มข้นของสารสีชมพูที่เกิดจาก MBTH ทำปฏิกิริยากับ  
ไดพาคิวโนน (มิลลิโมลาร์)

**รูปที่ 4.4** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร กับ ความเข้มข้นของสารสีชมพูเข้มที่เกิดจากไดพาคิวโนนทำปฏิกิริยากับ MBTH

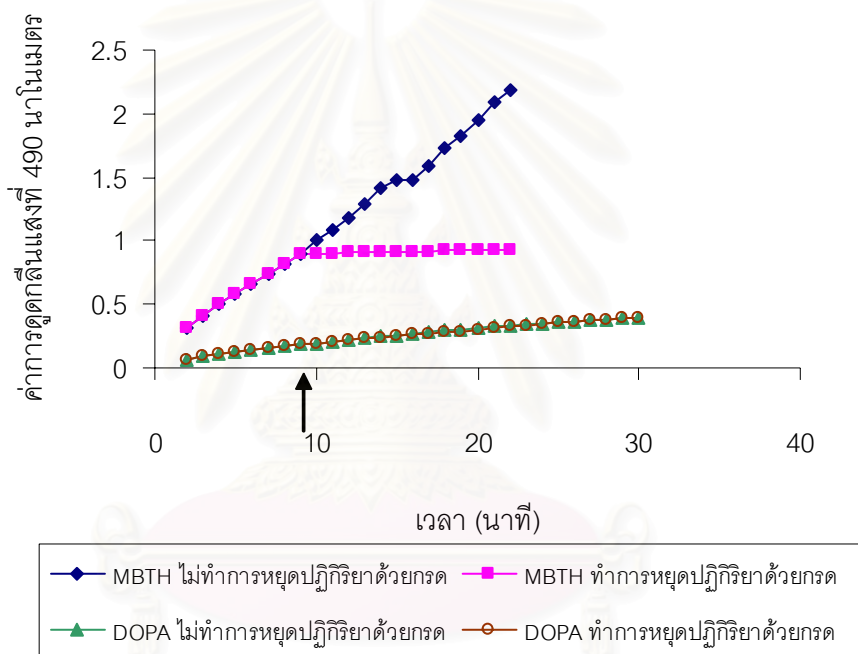


ความเข้มข้นของไดฟาโครม (มิลลิโมลาร์)

**รูปที่ 4.5** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของไดฟาโครม



นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเติมกรดเปอร์คลอริกลงไปในปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ กัน การวัดปฏิกิริยาของฟีนอลออกซีเดสโดยวิธี MBTH assay ค่าการดูดกลืนแสงค่อนข้างคงที่ ซึ่งในปฏิกิริยาที่ไม่ได้เติมกรดเปอร์คลอริกค่าการดูดกลืนแสงยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลาที่ผ่านไป ส่วนวิธี DOPA assay ทั้งในปฏิกิริยาที่เติมและไม่เติมกรดเปอร์คลอริกค่าการดูดกลืนแสงยังคงเพิ่มขึ้นตามเวลา แสดงให้เห็นว่าการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสโดยวิธี MBTH assay สามารถหยุดปฏิกิริยาได้ด้วยกรดเปอร์คลอริก ซึ่งวิธี DOPA assay ไม่สามารถหยุดปฏิกิริยาได้ดังแสดงในรูปที่ 4.6



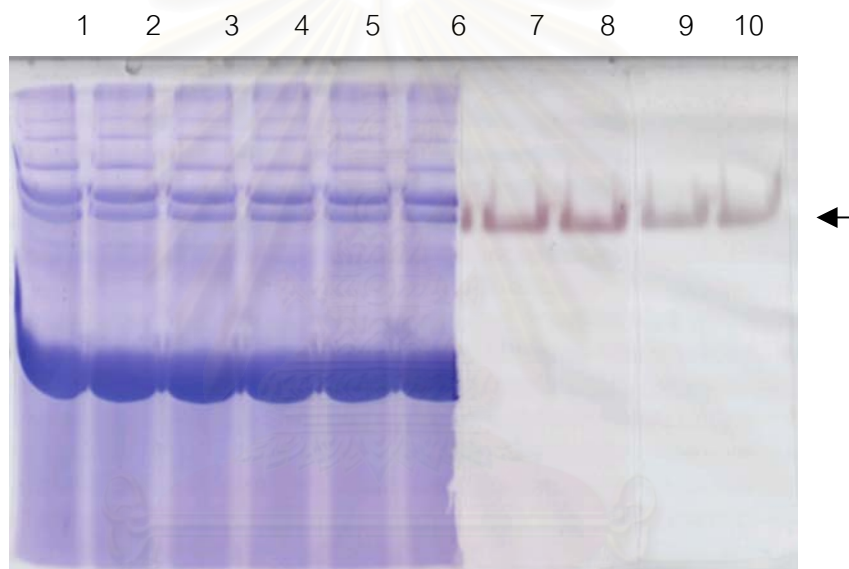
รูปที่ 4.6 ปฏิกิริยาของฟีนอลออกซีเดส ตามวิธี MBTH assay และ วิธี DOPA assay บริเวณลูกศรชี้ คือจุดที่เติมกรดเปอร์คลอริก เพื่อหยุดปฏิกิริยา

#### 4.2 การแยกฟีนอลออกซีเดสจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกุลาดำ

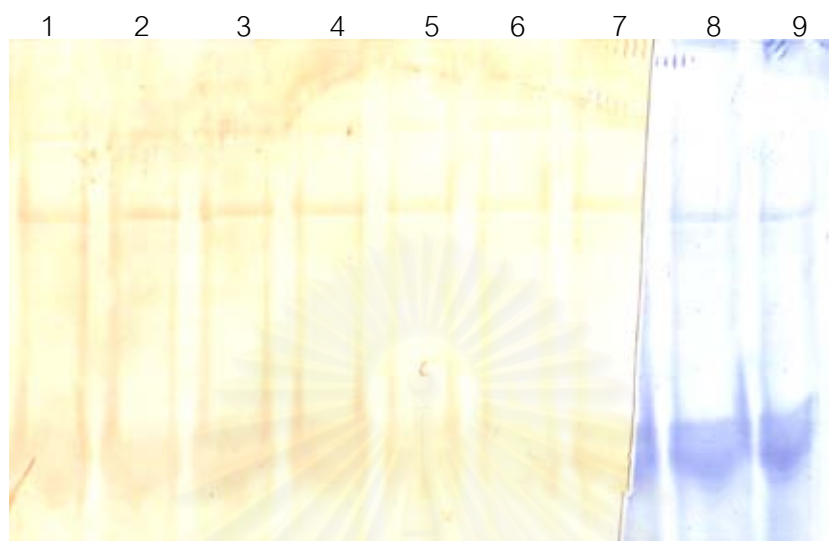
##### 4.2.1 ผลการแยกโปรตีนออกซีเดสโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำเลือดกึ่งกุลาดำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดออกมาแล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก จากนั้นนำเอาสารละลาย HLS มาแยกโปรตีนออกซีเดสด้วยกระแสไฟฟ้าบนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบ native ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำโพลีอะคริลาไมด์เจล

มาย้อมด้วยสีย้อมคูแมสซีบลู และย้อมดูแถบโปรตีนออกซีเดสโดยทำปฏิกิริยากับ L-DOPA พบว่ามีแถบโปรตีนที่เกิดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส (รูปที่ 4.7) จากนั้นทำการตัดแถบโปรตีนตรงบริเวณที่เกิดแอกติวิตีมาบดกับแอดจูแวนท์แล้วฉีดกระตุ้นกระต่ายเป็นจำนวน 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดกระต่ายมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเซลล์เม็ดเลือดแดงออกไป นำเฉพาะส่วนใสซึ่งมีแอนติบอดีอยู่มาตรวจทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดี ปรากฏว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่มีความจำเพาะกับโปรตีนจากสารละลาย HLS (รูปที่ 4.8)



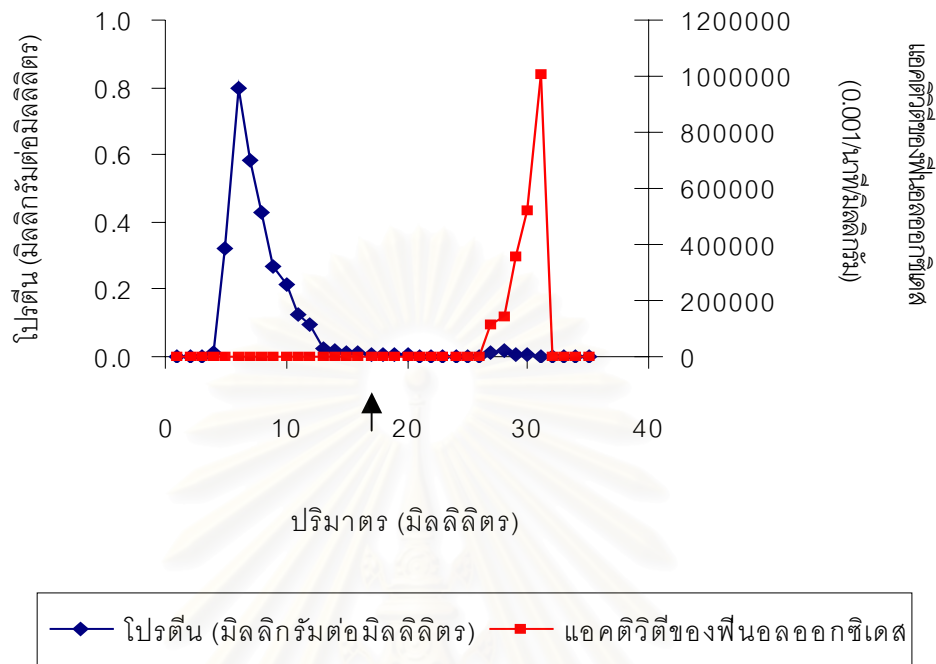
**รูปที่ 4.7** โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ ที่นำมาตัดตรงตำแหน่งบริเวณลูกศรชี้ สำหรับใช้ในการกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี โดยในแต่ละช่องใช้ HLS ปริมาณ 50 ไมโครกรัม ย้อมด้วยสีย้อมคูแมสซีบลู (ช่องที่ 1-6) และย้อมดูแอกติวิตีด้วย L-DOPA (ช่องที่ 7 – 10)



**รูปที่ 4.8** ผลการตรวจสอบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนออกซิดีเนสด้วยเทคนิค เวสเทิร์นบลอต โดยในช่องที่ 1 – 7 ย้อมด้วยแอนติบอดี และ ช่องที่ 8-9 ย้อมด้วย คูแมสซีบิลู

#### 4.2.2 ผลการสกัดแยกโปรตีนออกซิดีเนสโดยวิธี Affinity Chromatography ด้วย คอลัมน์บูลเซปฟาโรส

นำสารละลาย HLS ซึ่งได้จากตัวอย่างเลือดกึ่งกลาดำปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำมาแยก เซลล์เม็ดเลือด แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกในสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มีความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้นเป็น 6.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาแยกโปรตีนออกซิดีเนสโดย ผ่านคอลัมน์บูลเซปฟาโรส แล้วล้างด้วยสารละลาย CAC buffer พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ไม่สามารถ จับกับคอลัมน์บูลเซปฟาโรสได้ และตรวจไม่พบแอกติวิตีของฟีนออกซิดีเนส แต่ตรวจพบแอกติวิตี ของฟีนออกซิดีเนสในสารละลายโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์บูลเซปฟาโรสซึ่งชะออกด้วยสาร ละลาย CAC buffer ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ แสดงดังรูปที่ 4.9



**รูปที่ 4.9** แสดงโครมาโตแกรมของฟีนอลออกซีเดสจากคอลัมน์บลูเซปฟาไรส ตรงครีคือ เริ่มชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์บลูเซปฟาไรสด้วยสารละลาย CAC buffer+ โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์บลูเซปฟาไรส หลอดละ 1 มิลลิลิตร

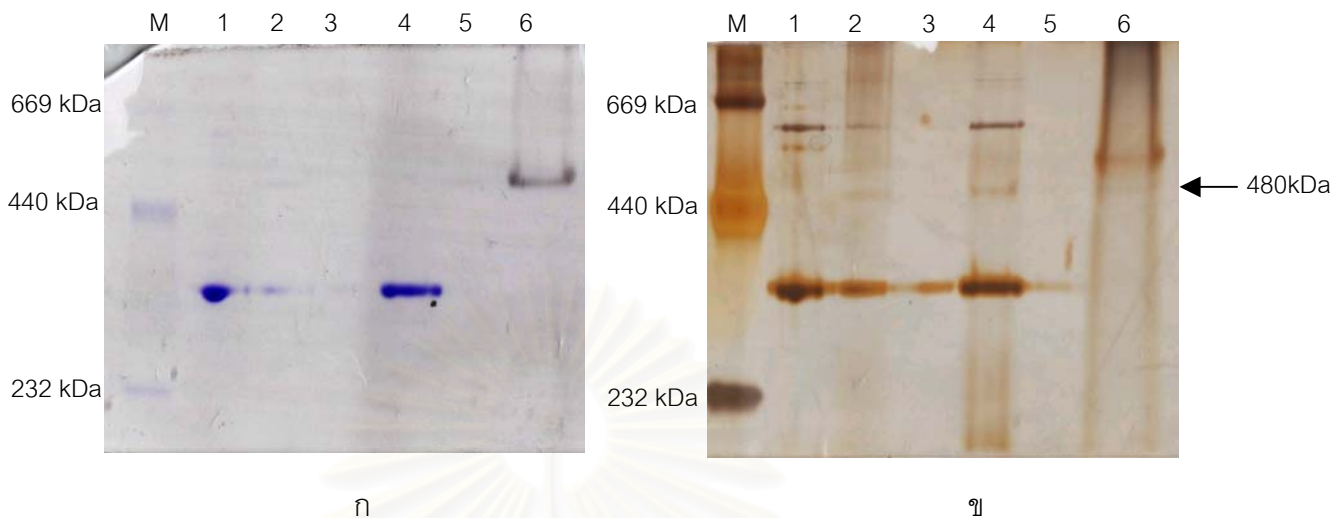
เมื่อนำสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์บลูเซปฟาไรสมาหาแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสพบว่ามีความแอกติวิตี 285,000 หน่วย ในขณะที่ HLS ก่อนนำมาแยกด้วยคอลัมน์บลูเซปฟาไรส มีแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส 2,413 หน่วย และ โปรตีนฟีนอลออกซีเดสที่แยกได้มีปริมาณ 0.05 มิลลิกรัม มีแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสคิดเป็น 5.61 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแอกติวิตีเริ่มต้นดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณโปรตีนออกซิดอกซีเดสที่แยกได้จากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น โปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม)	OD <sub>490</sub>	แอกติวิตี ของฟีนอล ออกซิดอกซีเดส	ปริมาณแอกติวิตี (เปอร์เซ็นต์)
HLS	0.5	6.63	3.315	0.32	2413	100
บลูเชปฟาโรส	5	0.01	0.05	0.057	285000	5.61

นำโปรตีนจากหลอดที่ 6 และ 31 ซึ่งเป็นโปรตีนจากคอลัมน์บลูเชปฟาโรส ในยอดแรก และยอดที่ 2 ของโครมาโตแกรมตามลำดับ มาเปรียบเทียบกับโปรตีนจากน้ำเลือด และสารละลาย HLS โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ พบว่าโปรตีนที่ได้จากหลอดที่ 6 ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำเลือด และโปรตีนที่ได้จากหลอดที่ 31 โปรตีนที่ตรวจพบแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดอกซีเดสมีขนาดโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน (kDa) ดังรูปที่ 4.10





**รูปที่ 4.10** แสดงโปรตีนออกซิดีเอสหลังจากผ่านคอลัมน์โบลูเซปฟาโรส บนโพลีอะครีลาไมด์เจล 7.5% แบบไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ นำมาย้อมด้วยแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีเอสด้วย L-DOPA และย้อมด้วยสีย้อมคูแมสซีบลู (ก) ย้อมด้วยซิลเวอร์ (ข) ใช้ปริมาณโปรตีน 2 ไมโครกรัม ต่อช่อง

ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน (Thyroglobulin 669 kDa, Ferritin 440 kDa, Catalase 232 kDa, Lactate dehydrogenase 140 kDa และ BSA 66 kDa)

ช่องที่ 1 = น้ำเลือดกึ่ง

ช่องที่ 2 = สารละลาย HLS

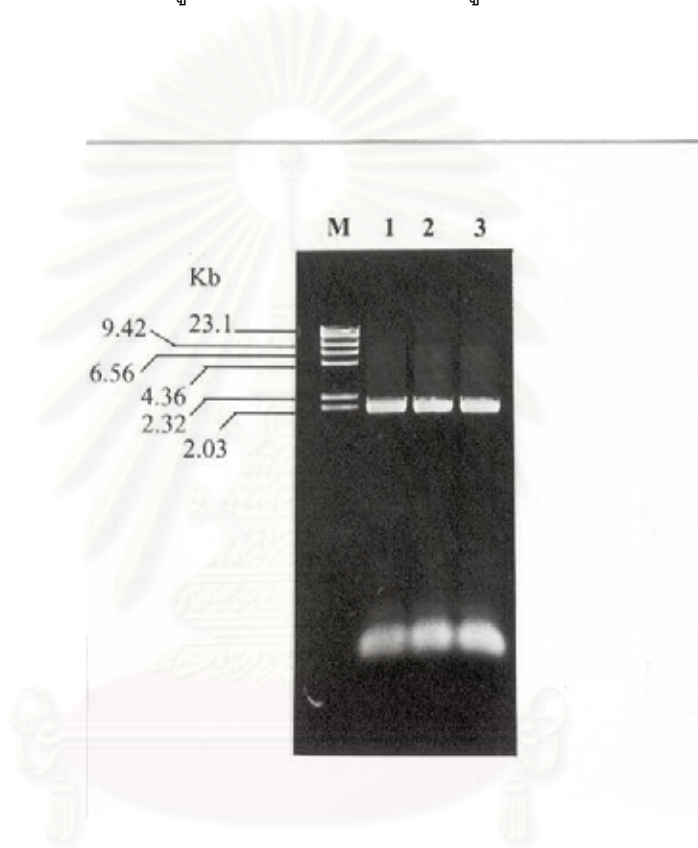
ช่องที่ 4 = โปรตีนจากสารละลาย HLS ที่ไม่จับคอลัมน์

ช่องที่ 6 = โปรตีนจากสารละลาย HLS ที่จับกับคอลัมน์

#### 4.3 การโคลน และการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีเอส

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกุลาดำนำมาตรวจสอบปริมาณคุณภาพโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร เป็น 1.4 – 2.0 เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนออกซิดีเอสโดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ TOPO1 และ TOPO2 ตามที่ได้ออกแบบไว้จากจุดเริ่มต้น (start codon) ถึงจุดสิ้นสุด (stop codon) ในการแปลรหัสของยีนโปรตีนออกซิดีเอส จากการตรวจสอบขนาดโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ผลผลิตจาก RT-PCR ขนาด 2,072 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.11 เมื่อชะผลผลิตจาก RT-PCR ออกจากอะกาโรสเจลแล้ว นำขึ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมกับ

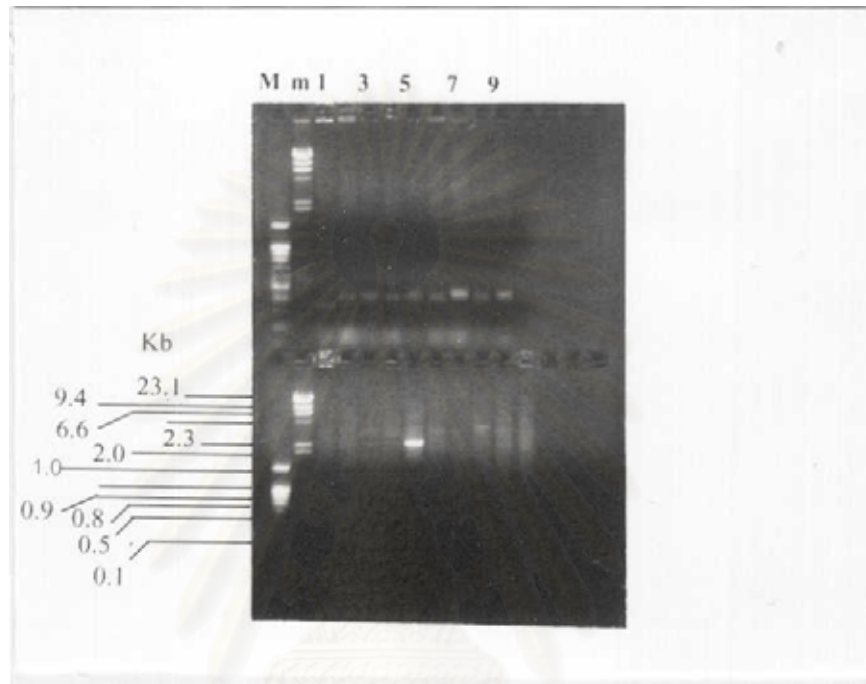
T- vector และชักนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนจากโคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 แล้วนำไปทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ puc1 และ puc2 ซึ่งจำเพาะกับ T-vector ได้ผลผลิตจากโคลนนิ่งพีซีอาร์ ขนาด 2,398 คู่เบส ซึ่งรวมกับส่วนของ T-vector 326 คู่เบส จากการทดสอบ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 เป็นจำนวน 26 โคลนนิ่ง พบว่าได้รีคอมบิแนนท์โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2,072 คู่เบส จำนวน 1 โคลนนิ่ง ดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.11 การตรวจสอบขนาดของยีนโปรตีนออกซีเดสบนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์  
ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ HindIII

ช่องที่ 1 – 4 = ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอจาก RT-PCR

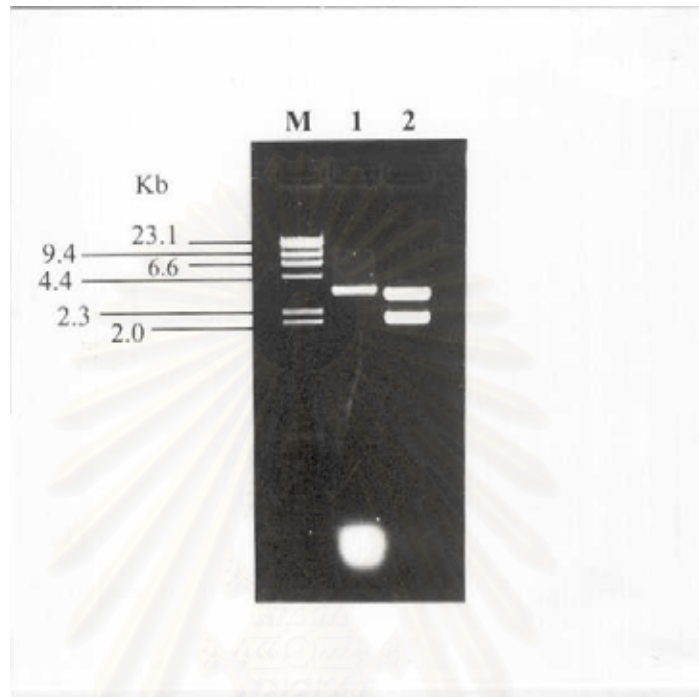


รูปที่ 4.12 แสดงผลของโคลนนี่พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ puc1 และ puc2 บน 1% อะกาโรสเจล  
 ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

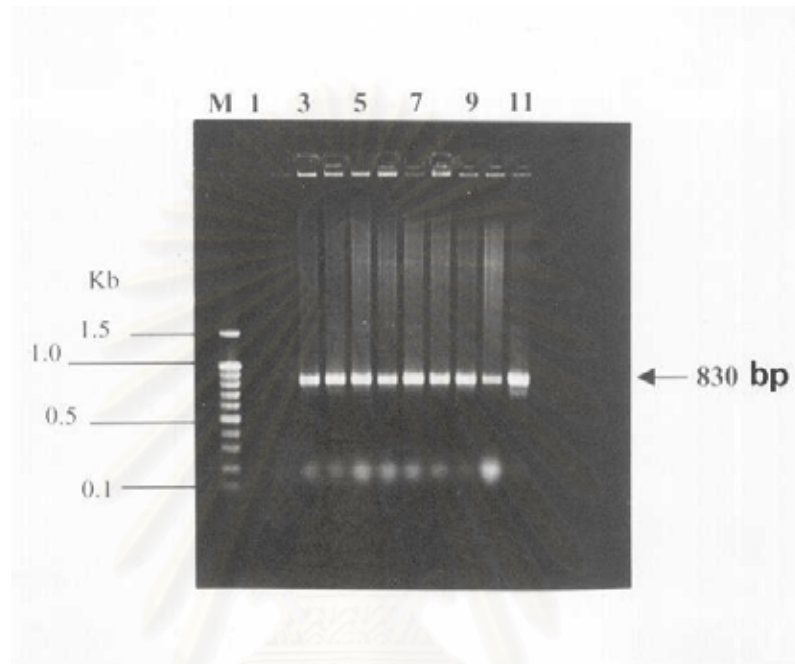
ช่องที่ M (บน และ ล่าง) = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

ช่องที่ m (บน และ ล่าง) = ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ HindIII

ช่องที่ 1-10 (บน และ ล่าง) = ผลผลิตจากการทำโคลนนี่พีซีอาร์



รูปที่ 4.13 แสดงอิเล็กโทรโฟรีซิสของเวกเตอร์ pET17b (ช่องที่ 1) และ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด T-vector ที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนออกซิดอกซีเดส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *EcoRI* (ช่องที่ 2) โดยมี  $\lambda$  *HindIII* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (ช่องที่ M) บน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล



**รูปที่ 4.14** แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของรีคอมบิแนนท์โคลน บน 1% อะกาโรสเจล

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

ช่องที่ 2 – 11 = รีคอมบิแนนท์โคลน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



นำรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้ไปสกัดพลาสมิด นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และเอ็กเพรสชันเวกเตอร์ pET17b ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Eco*RI แล้วนำไปตรวจสอบความถูกต้องของขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งพบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอยีนโปรตีนออกซิเดส (รูปที่ 4.13) นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีปลายเป็น *Nde*I และ *Eco*RI มาเชื่อมต่อกับเอ็กเพรสชันเวกเตอร์ pET17b แล้วชักนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS จากนั้นทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่ได้โดยทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ T7 และไพรเมอร์ PO2 ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 830 คู่เบส (รูปที่ 4.14) ซึ่งไพรเมอร์ T7 จับตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 333 ถึง 349 ของเวกเตอร์ pET17b ห่างจากจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I อยู่ 82 คู่เบส และไพรเมอร์ PO2 เป็นไพรเมอร์ที่จับได้กับยีนโปรตีนออกซิเดสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 753 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 จากนั้นเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนมาสกัดพลาสมิด และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนออกซิเดสเข้ากันได้พอดีกับ open reading frame ของเวกเตอร์ pET17b (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.15 แผนภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ T7 ในเอ็กเพรสชันเวกเตอร์ pET17b และตำแหน่งของไพรเมอร์ PO2 ในยีนโปรตีนออกซิเดส

นำรีคอมบิแนนท์โคลนมาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แล้วเหนี่ยวนำให้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยสารละลาย IPTG เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาด 73 kDa ซึ่งเมื่อเทียบเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำระหว่าง 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง พบว่าที่เวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ 3 ชั่วโมง ได้ผลผลิตรีคอมบิแนนท์สูงกว่าการเหนี่ยวนำที่ 1 ชั่วโมง (รูปที่ 4.17)

**T7 promoter** →

BglII  
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA

rbs

ACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA

NdeI      NheI      T7. Tag

CAT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT  
M A S M T G G Q Q M G  
CGG GAT TCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA  
R D S S L V P S S D P L

EcoRI

GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA TTC  
V T A A S V L E F

n

TTTNNNTNACTCACAGGCCNTCCTTTAGAAAAATTNCCTTTAACTTTAA

**TOP01**

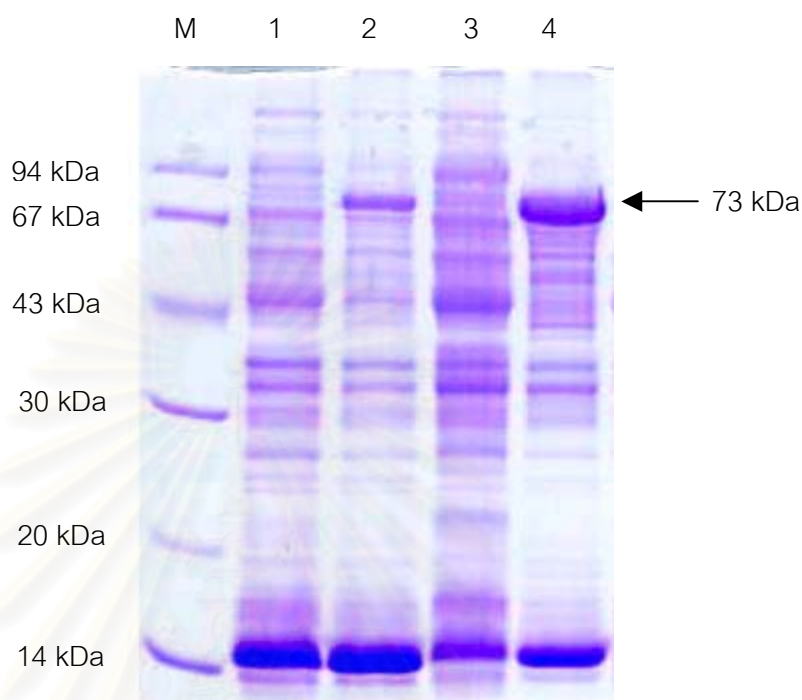
rbs      NdeI

GAAGGAGATATACAT **ATG GCC AAT GAC CAG CAG CGT** CTT  
M A N D Q Q R L  
CTG TAC CTG TTT GAA CTT CCT CAG GAG GAT ATT CAA  
L Y L F E L P Q E D I Q  
GCC CCC AGG GGA GGT GGC TCT GTC CTC TTC AAG CTC  
A P R G G G S V L F K L  
GAGAGCGATGAGGCGCCCCCTTCCGTGGCCACNAGGGTAGGAGTCTCCC  
CCTCTGTCAACCTGCCTGTGCCAGAGCGGAAGGACGTTACTGTCAGGA  
TCTCGGCACCTTGCCACCTCGGTCCCAAGGGATCTGCCTTCTCTTTCTT  
CATCGCGTCTCATCGCAAAGCCCGCCAGGGGATTTGGGGGAATTTCTT  
CATGAAANACNAGCGGGGCCCGAGGNNCTTAATGCAAGNTTGCCGCCNC  
CCGTNCCCCGGNAAAAGGGNAACCNANACCCTTTTTTTTTGGAATACCCC  
AAATTTTN

ข

**รูปที่ 4.16** ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณ cloning และ expression ของเวกเตอร์ pET17b (n)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนออกซิดีส (ข)



**รูปที่ 4.17** แสดงผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังจากเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดอกซีเตสในเวกเตอร์ pET17b บน 12 % โพลีอะคริลาไมด์เจล

ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน (Phosphorylase b 94 kDa, BSA 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa, Carbonic anhydrase 30 kDa, Trypsin inhibitor 20 kDa,  $\alpha$  Lactalbumin 14 kDa)

ช่องที่ 1 = โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

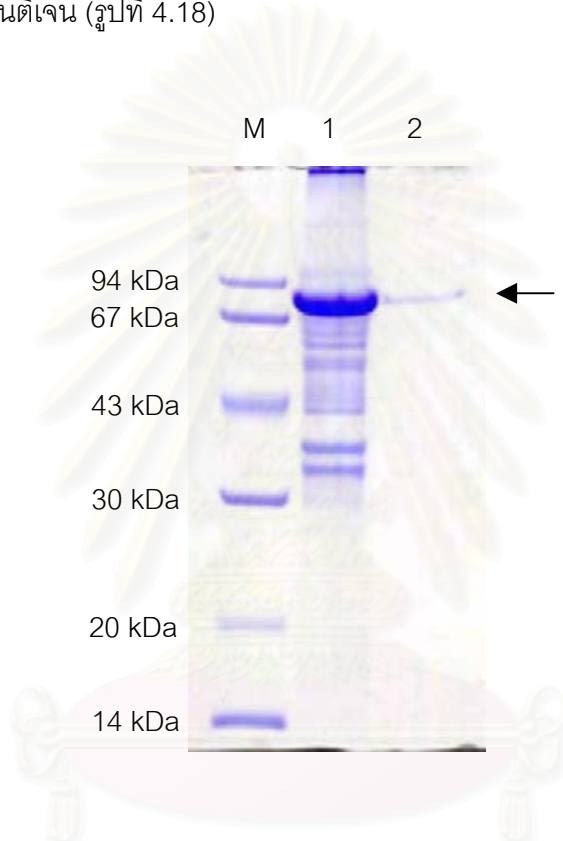
ช่องที่ 2 = โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS หลังจากเหนี่ยวนำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ช่องที่ 3 = โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 4 = โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS หลังจากเหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

#### 4.4 ผลการแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากโพลีอะคริลาไมด์เจล

หลังจากชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากโพลีอะคริลาไมด์เจลด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง Electro-Eluter รุ่น 422 (BioRad) แล้วนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำให้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเอสดีเอส พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกออกมาได้มีความบริสุทธิ์พอที่จะนำไปใช้เป็นแอนติเจน (รูปที่ 4.18)



**รูปที่ 4.18** แสดงรีคอมบิแนนท์โปรตีน บน 12% โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบเอสดีเอส

ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน(Phosphorylase b 94 kDa, BSA 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa, Carbonic anhydrase 30 kDa, Trypsin inhibitor 20 kDa,  $\alpha$  Lactalbumin 14 kDa)

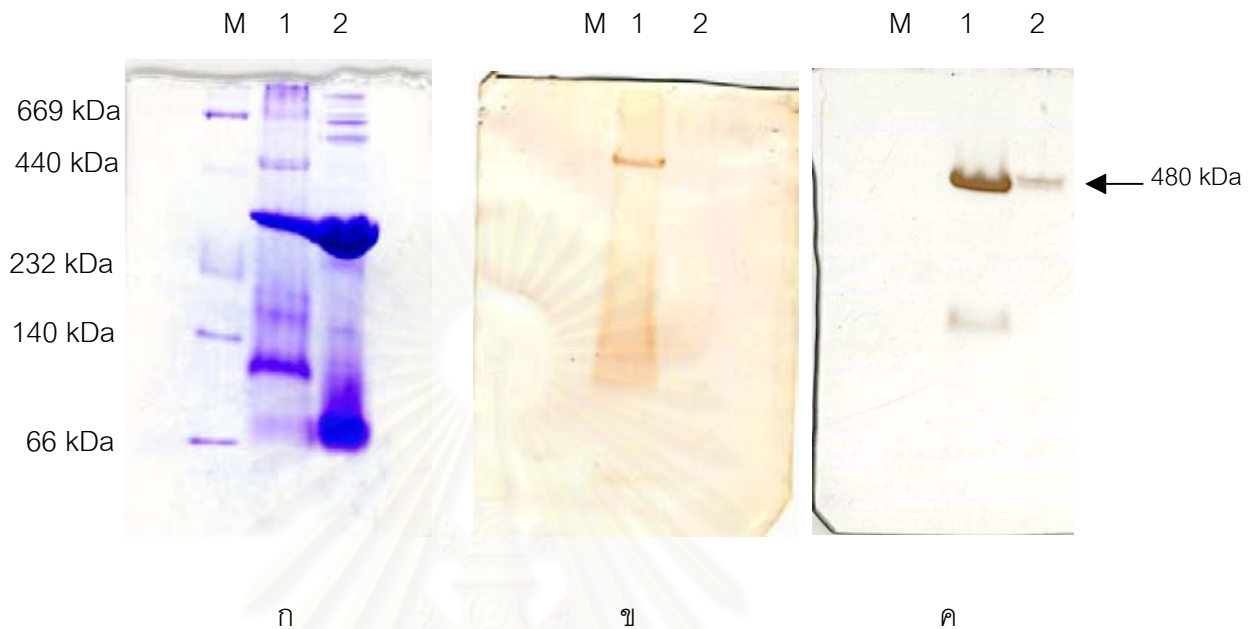
ช่องที่ 1 = โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS หลังจากเหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 2 = รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ชะออกจากโพลีอะคริลาไมด์เจล

#### 4.5 ผลของการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากรีคอมบิแนนท์โปรตีน

หลังจากฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นจำนวน 2 ครั้ง แล้วเก็บเลือดกระต่ายมาตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี ต่อ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นกระต่าย และตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนออกซิดีสในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งโดยการทำให้เซลล์บด พบว่า แอนติบอดีที่ได้สามารถจับได้กับแถบโปรตีนขนาด 480 กิโลดาลตันจาก HLS ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตรงกับตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยากับ L-DOPA บนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ แสดงว่ามีความจำเพาะต่อโปรตีนออกซิดีสในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกูดำ ในขณะที่ไม่สามารถตรวจวัดได้จากโปรตีนที่มาจากน้ำเลือด (รูปที่ 4.19) และเมื่อตรวจสอบบนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบเอสดีเอส พบว่าแอนติบอดียังคงมีความจำเพาะกับโปรตีนจากสารละลาย HLS ถึงแม้ว่าสูญเสียสภาพธรรมชาติไปแล้วก็ตาม (รูปที่ 4.20)



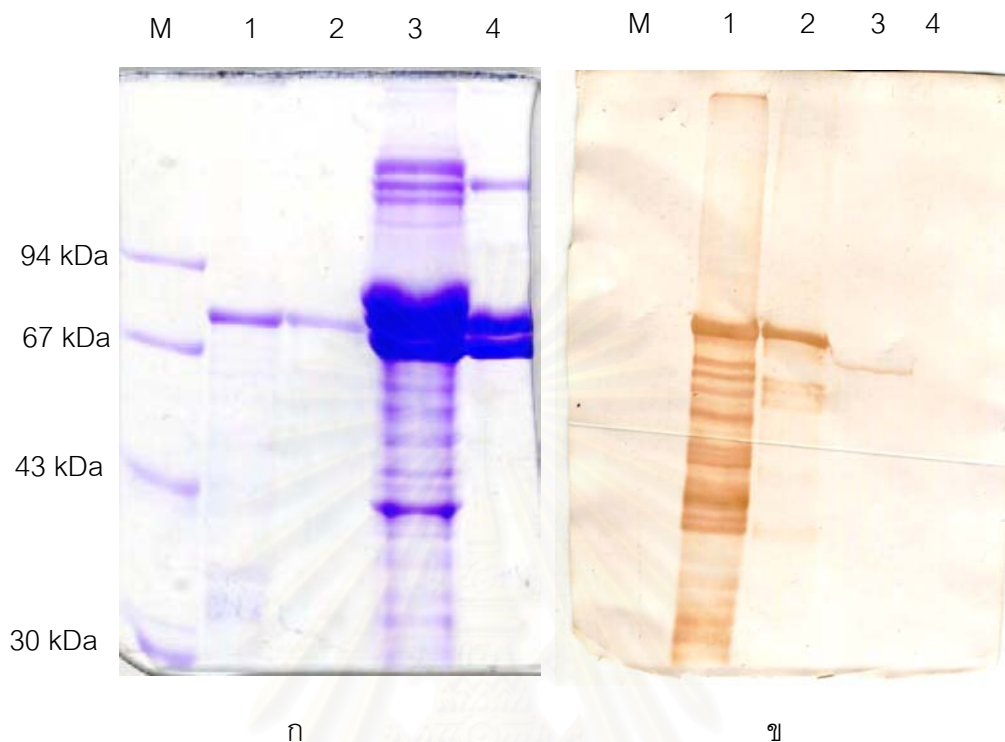


**รูปที่ 4.19** แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ได้จากเลือดกึ่งกุลาดำ บนกราฟาเดียนท์ โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบ โปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ (ก) ย้อมด้วยสีคูแมสซี บลู (ข) ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยการทำให้เวสเทอร์นบลอต และ (ค) ย้อมดูแอกติวิตีของ ฟีนอลออกซิเดสด้วย L-DOPA

ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน (Thyroglobulin 669 kDa, Ferritin 440 kDa, Catalase 232 kDa, Lactate dehydrogenase 140 kDa และ BSA 66 kDa)

ช่องที่ 1 = สารละลาย HLS

ช่องที่ 2 = น้ำเลือด



**รูปที่ 4.20** แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนในสารละลาย HLS บน 10 % โพลีอะครีลาไมด์เจลแบบ เอสดีเอส ย้อมดูแถบโปรตีนด้วยคูแมสซีบลู (ก) และแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสที่ตรวจสอบความจำเพาะกับแอนติบอดี (ข)

ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน (Phosphorylase b 94 kDa, BSA 67 kDa, Ovalbumin 43 kDa, Carbonic anhydase 30 kDa, Trypsin inhibitor 20 kDa,  $\alpha$  Lactalbumin 14 kDa)

ช่องที่ 1 = โปรตีนทั้งหมดที่ได้จากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS

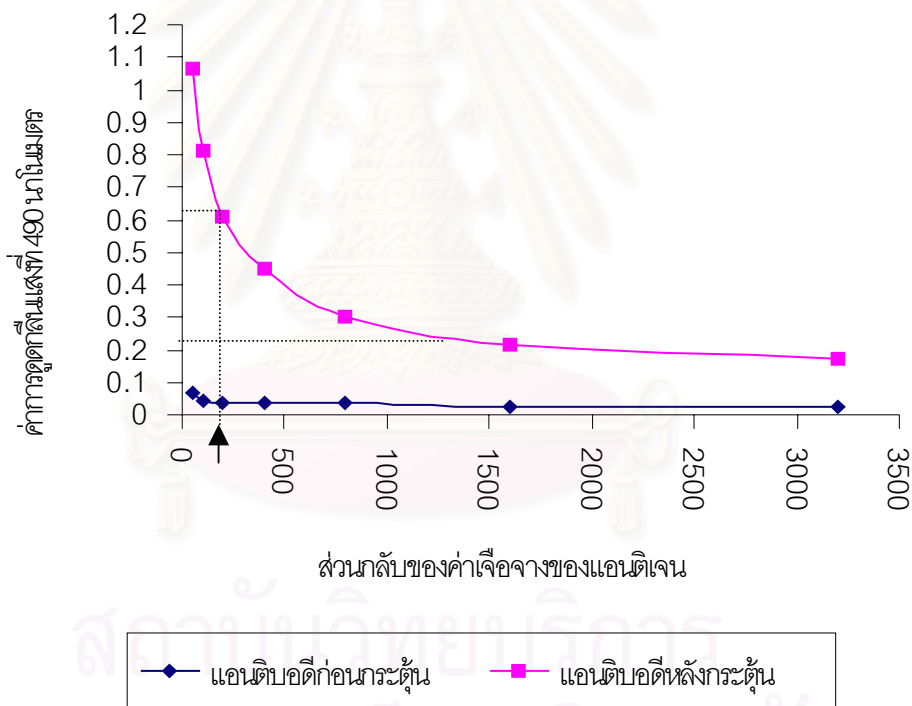
ช่องที่ 2 = โปรตีนขนาด 72 kDa ที่แยกได้จากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS

ช่องที่ 3 = สารละลาย HLS

ช่องที่ 4 = น้ำเลือด

#### 4.6 ผลการทำ ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลที่ผลิตได้

เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นแอนติเจนในการเคลือบหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท พบว่า แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายหลังฉีดกระตุ้นให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร สูงกว่าแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายก่อนฉีดกระตุ้นในทุกๆ ค่าความเจือจางของรีคอมบิแนนท์โปรตีน และ Base line ของเส้นโค้งของแอนติบอดีหลังฉีดกระตุ้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรเท่ากับ 0.21 ดังนั้นค่าไตเตอร์ของแอนติเจนเท่ากับค่าการเจือจางที่ 1 ต่อ 200 หรือ 13.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.21) ซึ่งเป็นค่าความเจือจางสูงสุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร เท่ากับ 0.61 (ตารางที่ 4.7) เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเจือจางเท่ากับ 1 ต่อ 1,000



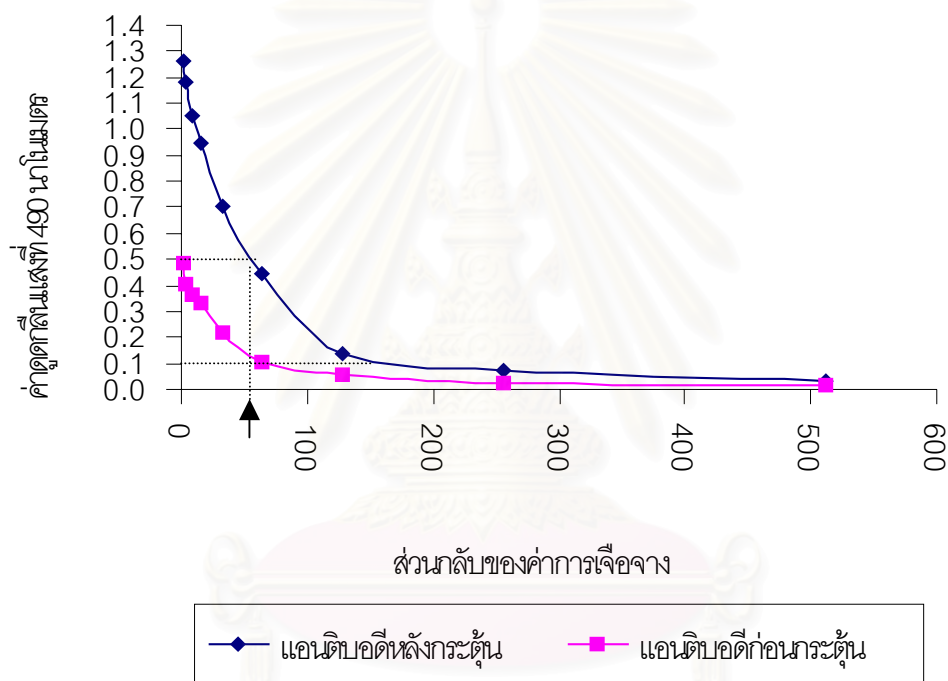
รูปที่ 4.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร กับ ค่าความเจือจางของรีคอมบิแนนท์โปรตีน และ การอ่านค่าไตเตอร์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยตรงครี่ คือ ค่าความเจือจางสูงสุดของของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร สูงกว่า base line 0.4

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ในการทำ ELISA เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นแอนติเจน และใช้แอนติบอดีเจือจาง 1 ต่อ 1000

	การเจือจางของรีคอมบิแนนท์โปรตีน										
	1:50	1:100	1:200	1:400	1: 800	1:1,600	1:3,200	1:6,400	1:12,800	1:25,600	1:51,200
	(55.14) <sup>a</sup>	(27.57)	(13.79)	(6.89)	(3.45)	(1.72)	(0.86)	(0.43)	(0.22)	(0.11)	(0.05)
แอนติบอดีจากกระต่าย	0.074	0.047	0.043	0.041	0.043	0.031	0.025	0.023	0.025	0.025	0.027
ก่อนกระตุ้นด้วย	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
รีคอมบิแนนท์โปรตีน	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003
แอนติบอดีจากกระต่าย	1.063	0.810	0.610	0.451	0.300	0.214	0.170	0.188	0.179	0.102	0.090
หลังกระตุ้นด้วย	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
รีคอมบิแนนท์โปรตีน	0.006	0.011	0.004	0.045	0.012	0.006	0.014	0.009	0.018	0.026	0.019

<sup>a</sup> ความเข้มข้นโปรตีน หน่วยเป็น นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ n = 2

เมื่อใช้สารละลาย HLS ที่มีความเข้มข้น 0.915 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นแอนติเจนในการเคลือบหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท พบว่า แอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายหลังฉีดกระตุ้นให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร สูงกว่าแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายก่อนฉีดกระตุ้นในทุกๆ ค่าความเจือจางของสารละลาย HLS และ Base line ของเส้นโค้งของแอนติบอดีหลังฉีดกระตุ้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรเท่ากับ 0.10 ดังนั้นค่าไตเตอร์ของสารละลาย HLS เท่ากับค่าการเจือจางที่ 1 ต่อ 50 หรือ 18.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.21 และตารางที่ 4.8) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย HLS ที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร เท่ากับ 0.50 เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเจือจางเท่ากับ 1 ต่อ 1,000



**รูปที่ 4.22** แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร กับ ค่าความเจือจางของสารละลาย HLS และ การอ่านค่าไตเตอร์ของ HLS โดยตรงสรีรที่ คือ ค่าความเจือจางสูงสุดของสารละลาย HLS ที่นำมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนออกซีเดสที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร สูงกว่า base line 0.4



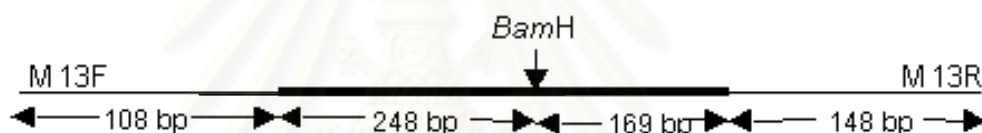
**ตารางที่ 4.8** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ในการทำ ELISA เมื่อใช้สารละลาย HLS เป็นแอนติเจน และใช้แอนติบอดีเจือจาง 1 ต่อ 1000

	การเจือจางของสายละลาย HLS									
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
	(457.50) <sup>a</sup>	(228.75)	(114.38)	(57.19)	(28.59)	(14.30)	(7.15)	(3.57)	(1.79)	0.89
แอนติบอดีจากกระต่าย	0.482	0.403	0.367	0.332	0.222	0.108	0.061	0.026	0.019	0.016
ก่อนกระตุ้นด้วย	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
รีคอมบิแนนท์โปรตีน	0.037	0.022	0.042	0.037	0.034	0.003	0.049	0.006	0.006	0.001
แอนติบอดีจากกระต่าย	1.261	1.180	1.049	0.945	0.703	0.445	0.141	0.076	0.033	0.032
หลังกระตุ้นด้วย	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
รีคอมบิแนนท์โปรตีน	0.093	0.047	0.016	0.002	0.002	0.010	0.003	0.021	0.011	0.002

<sup>a</sup> ความเข้มข้นโปรตีน หน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ n = 2

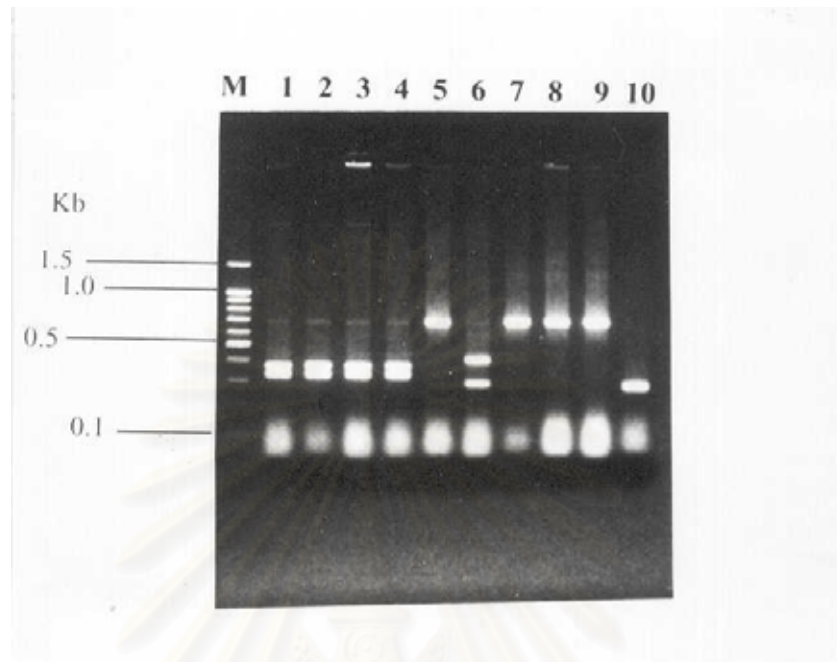
#### 4.7 การหาปริมาณการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซีเดสด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR

ทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PO1 และ PO2 ได้ผลผลิตจาก RT-PCR ขนาด 417 คู่เบส (รูปที่ 4.25) จากนั้นชะออกจากอะกาโรสเจลแล้วนำไปเชื่อมต่อกับ T-vector แล้วชักนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนจากโคโลนีของ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ไปทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R ซึ่งจำเพาะกับ T-vector ได้ผลผลิตจากโคลนนิ่งพีซีอาร์ขนาด 673 คู่เบส ซึ่งรวมกับส่วนของ T-vector 256 คู่เบส นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ได้เป็น 2 รูปแบบ คือ ขึ้นดีเอ็นเอ ขนาด 277 คู่เบส และ 396 คู่เบส กับ ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 317 คู่เบส และ 356 คู่เบส (รูปที่ 4.23 และรูปที่ 4.24)



รูปที่ 4.23 แสดงแบบจำลองการตัดผลผลิตจากโคลนนิ่งพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

จากนั้นนำโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ที่ตรวจสอบจนแน่ใจแล้วว่า มีขึ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนออกซีเดส มาสกัดพลาสมิด และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนออกซีเดสที่รายงานไว้ใน GenBank พบว่ามีความคล้ายกันมาก แสดงว่าไพรเมอร์ PO1 และ PO2 ที่ออกแบบมาใช้ได้



รูปที่ 4.24 แสดงผลผลิตโคโลนีพีซีอาร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)

ช่องที่ 1 – 4 = ผลผลิตโคโลนีพีซีอาร์ที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI  
ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 317 และ 356 คู่เบส

ช่องที่ 5 และ 7-9 = ผลผลิตโคโลนีพีซีอาร์ที่ไม่ได้ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ  
*Bam*HI

ช่องที่ 6 = ผลผลิตโคโลนีพีซีอาร์ที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI  
ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 277 และ 396 คู่เบส

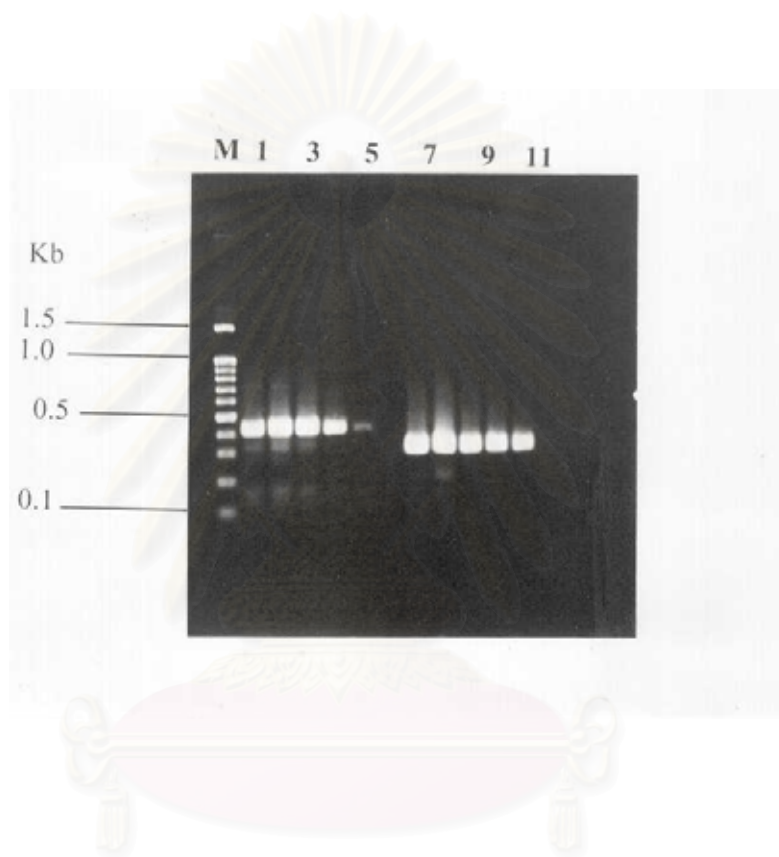
ช่องที่ 10 = ผลผลิตโคโลนีพีซีอาร์ที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไป

เมื่อทำการทดสอบค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ semiquantitative RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 และคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 417 คู่เบส และ 327 คู่เบส ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่เป็น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ พบว่าแถบดีเอ็นเอของแอดตินมีความเข้มข้นมากกว่าแถบดีเอ็นเอของโปรตีนอลออกซีเดสที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์เท่ากัน แสดงให้เห็นว่ายีนแอดตินมี copy number สูงกว่ายีนโปรตีนอลออกซีเดส (รูปที่ 4.25) จากนั้นจึงปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ทั้งคู่ใหม่โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 และคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 ในหลอดเดียวกันโดยใช้ความเข้มข้นของคู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 เท่ากับ 1.0 ไมโครโมลาร์ แต่ใช้ความเข้มข้นของคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 เท่ากับ 0.04 0.08 0.12 และ 0.16 ไมโครโมลาร์ พบว่า ความเข้มข้นของคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 เท่ากับ 0.12 ไมโครโมลาร์ ให้ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอของแอดตินและแถบดีเอ็นเอของโปรตีนอลออกซีเดสใกล้เคียงกันมากที่สุด (รูปที่ 4.26) ดังนั้น จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของคู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 เป็น 1.0 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นของคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 เป็น 0.12 ไมโครโมลาร์ ในการทำ RT-PCR

ในการทดสอบค่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมสำหรับทำ RT-PCR โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียม 1.5 มิลลิโมลาร์ แถบดีเอ็นเอของแอดตินและโปรตีนอลออกซีเดสที่ทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกันมีความเข้มข้นใกล้เคียงกันกับแถบดีเอ็นเอของแอดตินและโปรตีนอลออกซีเดสที่ทำปฏิกิริยาแบบแยกหลอดกัน (รูปที่ 4.27) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์

เมื่อเปรียบเทียบการใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ RT-PCR ที่ 20 25 30 และ 35 รอบ พบว่าจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการหาปริมาณของยีนโปรตีนอลออกซีเดส เปรียบเทียบกับยีนแอดตินด้วยเทคนิค semiquantitative RT-PCR คือ 25 รอบ เนื่องจากว่าปริมาณของดีเอ็นเออยู่ในช่วง log phase ของปฏิกิริยา ดูได้จากความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอของโปรตีนอลออกซีเดส และแอดติน ที่ 30 รอบ มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมากกว่า ที่ 25 รอบ แต่ที่ 30 และ 35 รอบ มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอเท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 4.28

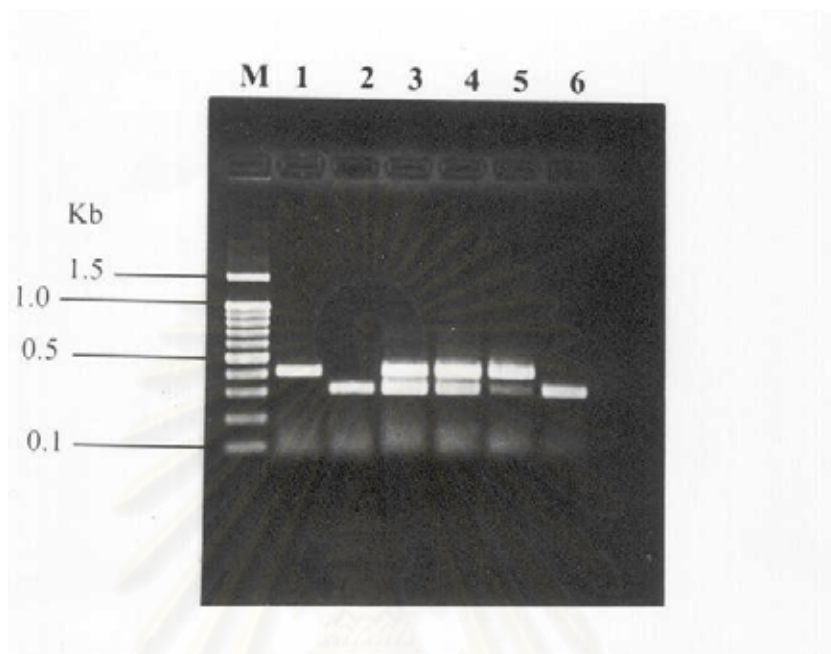
เมื่อทดลองใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอแม่พิมพ์ 10, 100 และ 300 นาโนกรัม ในการทำ RT-PCR พบว่าที่ปริมาณอาร์เอ็นเอ 10 นาโนกรัมก็สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนออกซิดีเอสซึ่งเป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่จางมาก แต่ที่ปริมาณอาร์เอ็นเอ 100 นาโนกรัม และ 300 นาโนกรัม สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนออกซิดีเอสชัดเจนมาก (รูปที่ 4.29)



**รูปที่ 4.25** แสดงผลผลิต RT-PCR ของคู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 (ช่องที่ 2 – 6) และ คู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 (ช่องที่ 8 – 11) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน บน 2 % อะกาโรสเจล

ช่องที่ M	= ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)
ช่องที่ 1 และ 7	= ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1.0 ไมโครโมลาร์
ช่องที่ 2 และ 8	= ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.8 ไมโครโมลาร์
ช่องที่ 3 และ 9	= ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.6 ไมโครโมลาร์
ช่องที่ 4 และ 10	= ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์
ช่องที่ 5 และ 11	= ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์





**รูปที่ 4.26** แสดงผลผลิต RT-PCR ของคู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 และคู่ไพรเมอร์ actin1, actin2

ซึ่งทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน บน 2 % อะกาโรสเจล

ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)

ช่องที่ 1 = ไพรเมอร์ PO1, PO2 เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์

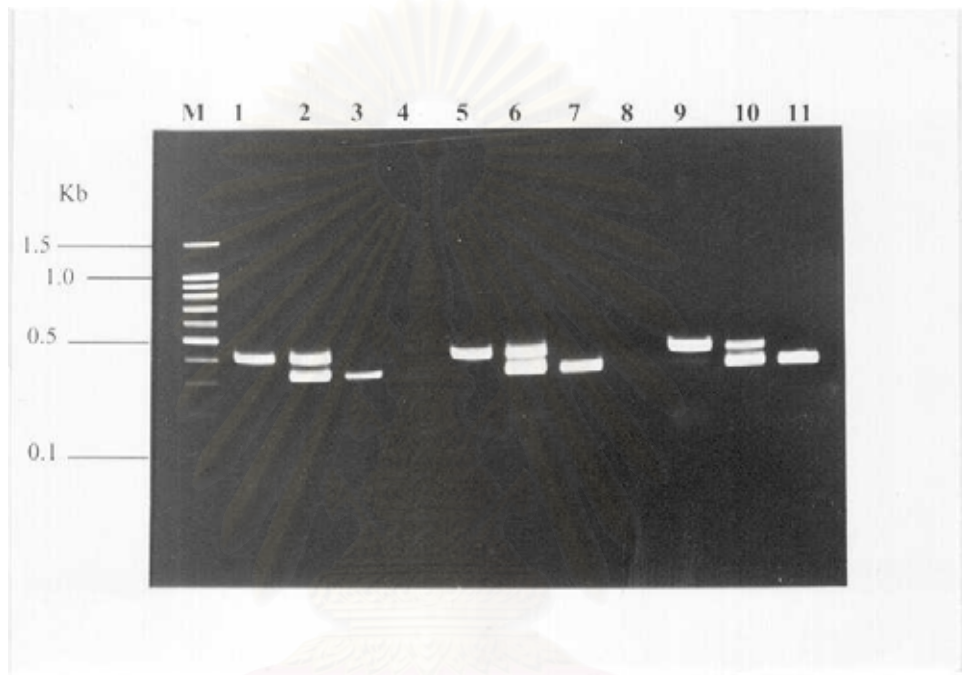
ช่องที่ 2 = ไพรเมอร์ PO1, PO2 เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ + ไพรเมอร์ actin1, actin2  
เข้มข้น 0.16 ไมโครโมลาร์

ช่องที่ 3 = ไพรเมอร์ PO1, PO2 เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ + ไพรเมอร์ actin1, actin2  
เข้มข้น 0.12 ไมโครโมลาร์

ช่องที่ 4 = ไพรเมอร์ PO1, PO2 เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ + ไพรเมอร์ actin1, actin2  
เข้มข้น 0.08 ไมโครโมลาร์

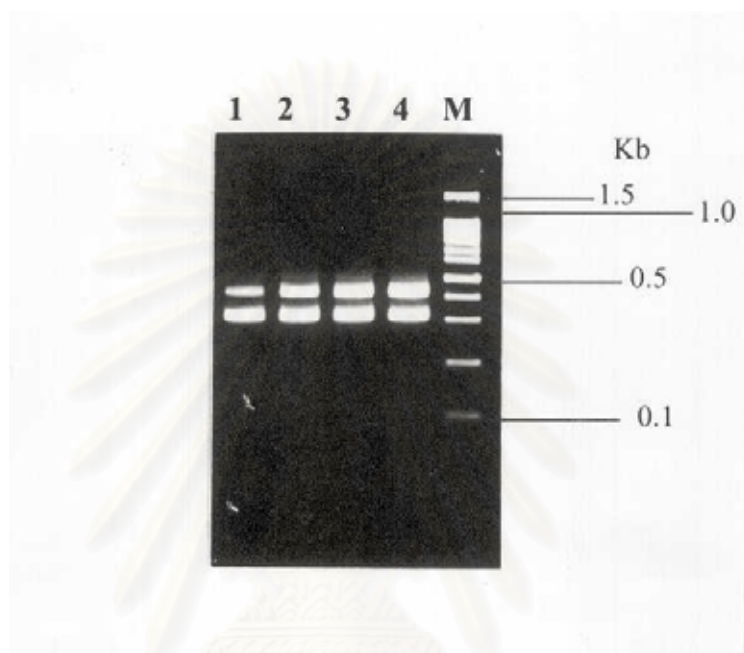
ช่องที่ 5 = ไพรเมอร์ PO1, PO2 เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ + ไพรเมอร์ actin1, actin2  
เข้มข้น 0.04 ไมโครโมลาร์

ช่องที่ 6 = ไพรเมอร์ actin1, actin2 เข้มข้น 0.16 ไมโครโมลาร์



**รูปที่ 4.27** แสดงผลผลิต RT-PCR เมื่อใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมต่างกัน บน 2 % อะกาโรส เจล โดยที่ ช่องที่ 1, 5 และ 9 ใช้คู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 ช่องที่ 2, 6 และ 10 ใช้คู่ไพรเมอร์ PO1, PO2 + คู่ไพรเมอร์ actin1, actin2 ช่องที่ 3,7 และ 11 ใช้คู่ไพรเมอร์ actin1,actin2

ช่องที่ M	=	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)
ช่องที่ 1 – 3	=	ความเข้มข้นแมกนีเซียม 1.0 มิลลิโมลาร์
ช่องที่ 5 – 7	=	ความเข้มข้นแมกนีเซียม 1.5 มิลลิโมลาร์
ช่องที่ 9 – 11	=	ความเข้มข้นแมกนีเซียม 2.0 มิลลิโมลาร์



**รูปที่ 4.28** แสดงผลผลิต RT-PCR ที่ใช้จำนวนรอบต่างๆ กัน บน 2 % อะกาโรสเจล

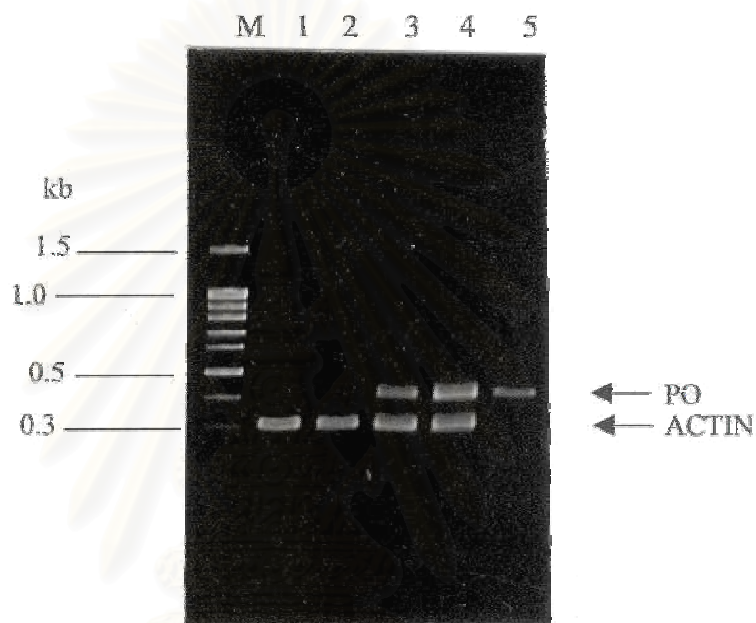
ช่องที่ 1 = 20 รอบ

ช่องที่ 2 = 25 รอบ

ช่องที่ 3 = 30 รอบ

ช่องที่ 4 = 35 รอบ

ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)



**รูปที่ 4.29** แสดงผลผลิต RT-PCR บน 2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล เมื่อใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอแม่แบบเป็น 10, 100 และ 300 นาโนกรัม

- |           |   |   |
|-----------|---|---|
| ช่อง M    | = | ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)                             |
| ช่องที่ 1 | = | คูปิพรเมอร์ actin อย่างเดียว, อาร์เอ็นเอ 50 นาโนกรัม        |
| ช่องที่ 2 | = | คูปิพรเมอร์ actin และคูปิพรเมอร์PO, อาร์เอ็นเอ 10 นาโนกรัม  |
| ช่องที่ 3 | = | คูปิพรเมอร์ actin และคูปิพรเมอร์PO, อาร์เอ็นเอ 100 นาโนกรัม |
| ช่องที่ 4 | = | คูปิพรเมอร์ actin และคูปิพรเมอร์PO, อาร์เอ็นเอ 300 นาโนกรัม |
| ช่องที่ 5 | = | คูปิพรเมอร์ PO อย่างเดียว, อาร์เอ็นเอ 50 นาโนกรัม           |

#### 4.8 ผลของการเปรียบเทียบโปรตีนออกซีเดสในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลูตาต้าที่เต็ม และไม่เต็มเชื้อ *Vibrio harveyi* ในการทดลองแบบ *in vitro*

จากการทดลองนำเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลูตาต้าจำนวน  $5.12 \times 10^6$  เซลล์ มาเติมเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ  $5.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^6$  และ  $5.0 \times 10^7$  เซลล์ คิดเป็นอัตราส่วนของเซลล์เม็ดเลือดต่อจำนวน *V. harveyi* 10 ต่อ 1, 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 10 ตามลำดับ แล้วทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงหลังจากเติมเชื้อ *V. harveyi* มาหาแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส และปริมาณของฟีนอลออกซีเดส เทียบกับเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่ไม่ได้เติมเชื้อ *V. harveyi* พบว่าเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลูตาต้าที่เต็ม และไม่เต็มเชื้อ *V. harveyi* มีแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส และปริมาณโปรตีนออกซีเดสในช่วงเวลาที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในช่วงเวลาที่ 5 การทดลองที่เติมเชื้อ *V. harveyi* จำนวน  $5.0 \times 10^7$  เซลล์ มีแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส และปริมาณโปรตีนออกซีเดสของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลูตาต้าต่ำกว่าเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่ไม่ได้เติมเชื้อ *V. harveyi* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 4.9, 4.10 และรูปที่ 4.30, 4.31)

**ตารางที่ 4.9** แสดงค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสในเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกลูตาต้า (0.001/นาฬิกา/มิลลิกรัมของโปรตีน) หลังจากเติมเชื้อ *Vibrio harveyi* เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

	เวลาหลังจากเติมเชื้อ <i>V. harveyi</i> (ชั่วโมง)					
	0	1	2	3	4	5
ไม่เติมเชื้อ <i>V. harveyi</i>	2332.96	3134.00	2952.28	2394.11	2334.82	2222.01
	± 741.30	± 391.53	± 697.58	± 617.53	± 855.20	± 208.35
<i>V. harveyi</i> 5.0×10 <sup>5</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	2578.42	1881.54	2075.00	3553.19	1943.09	2330.58
	± 150.63	± 146.74	± 106.07	± 873.89	± 33.80	± 491.08
<i>V. harveyi</i> 5.0×10 <sup>6</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	1600.51	2459.22	2333.67	2399.77	1879.07	1365.59
	± 136.98	± 1172.56	± 142.99	± 822.50	± 126.13	± 540.21
<i>V.harveyi</i> 5.0×10 <sup>7</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	1913.04	3069.02	1608.17	2088.56	1901.06	694.21
	± 553.39	± 921.94	± 780.41	± 596.65	± 281.34	± 92.32

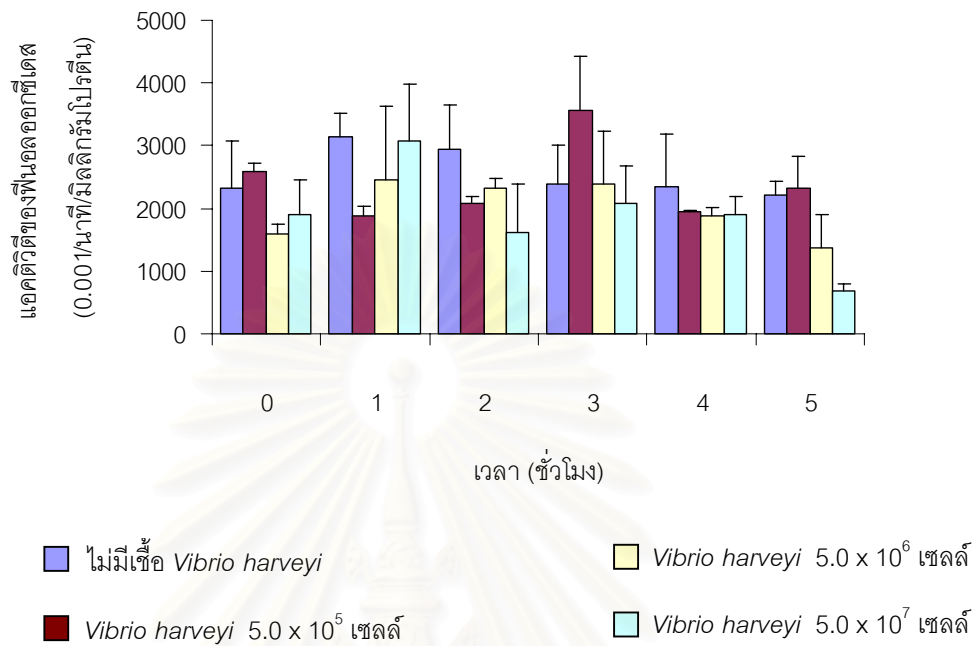
ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ n = 2



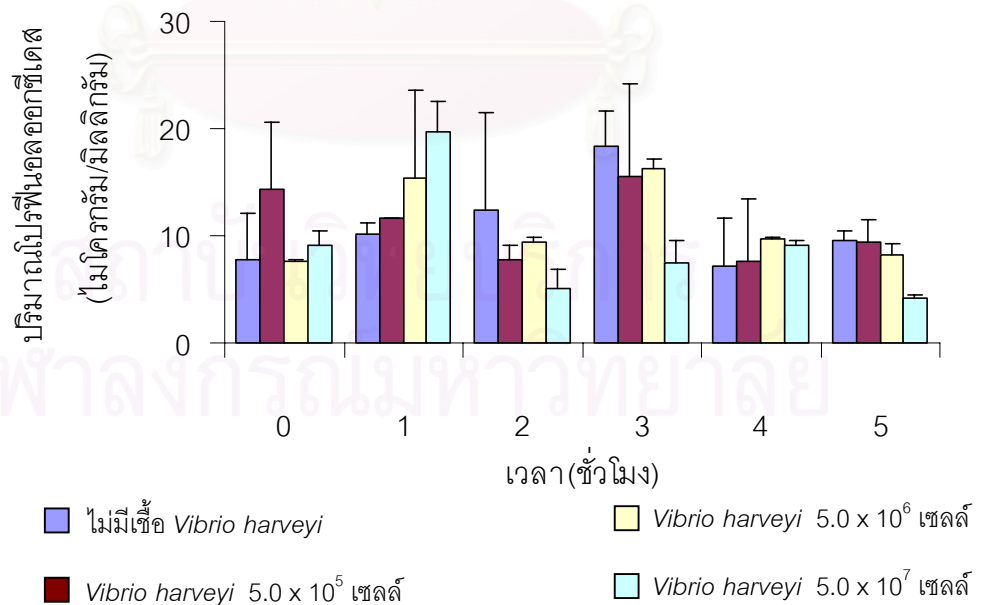
ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณของโปรตีนออกนอกเซลล์ในเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำ (ไมโครกรัมกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน) หลังจากเติมเชื้อ *Vibrio harveyi* เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง

	เวลาหลังจากเติมเชื้อ <i>V. harveyi</i> (ชั่วโมง)					
	0	1	2	3	4	5
ไม่เติมเชื้อ <i>V. harveyi</i>	7.722	10.123	12.349	18.371	7.103	9.479
	±	±	±	±	±	±
<i>V. harveyi</i> 5.0x10 <sup>5</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	4.383	1.113	9.159	3.283	4.474	1.002
	±	±	±	±	±	±
<i>V. harveyi</i> 5.0x10 <sup>6</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	14.366	11.603	7.829	15.455	7.650	9.349
	±	±	±	±	±	±
<i>V. harveyi</i> 5.0x10 <sup>7</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	6.165	0.061	1.296	8.658	5.721	2.131
	±	±	±	±	±	±
<i>V. harveyi</i> 5.0x10 <sup>6</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	7.630	15.391	9.444	16.285	9.701	8.159
	±	±	±	±	±	±
<i>V. harveyi</i> 5.0x10 <sup>7</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	0.198	8.135	0.356	0.848	0.217	1.169
	±	±	±	±	±	±
<i>V. harveyi</i> 5.0x10 <sup>7</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	9.148	19.720	5.016	7.514	9.171	4.178
	±	±	±	±	±	±
<i>V. harveyi</i> 5.0x10 <sup>7</sup> เซลล์/มิลลิลิตร	1.230	2.862	1.887	1.977	0.338	0.295
	±	±	±	±	±	±

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ n = 2



รูปที่ 4.30 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำหลังจากเติมเชื้อ *Vibrio harveyi* เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมด



รูปที่ 4.31 แสดงปริมาณของโปรตีนออกซีเดสของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำหลังจากเติมเชื้อ *Vibrio harveyi*

#### 4.9 ผลของการเปรียบเทียบโปรตีนออกซิดีสในกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* กับกุ้งกุลาดำปกติ ในการทดลองแบบ *in vivo*

##### 4.9.1 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือด

จากการทดลองฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในตัวกุ้งกุลาดำเป็นปริมาณ  $3.8 \times 10^5$  เซลล์ต่อตัว พบว่าในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดลดลงจากช่วงเวลาที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกุ้งปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.32

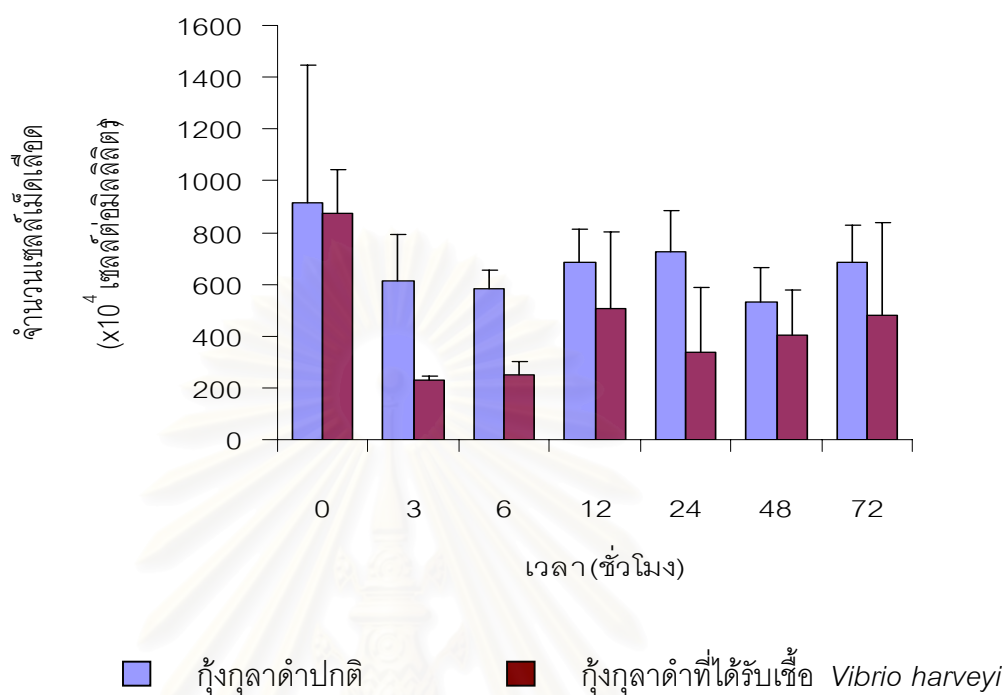
ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ ( $\times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร) หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

	เวลาหลังจากได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i> (ชั่วโมง)						
	0	3	6	12	24	48	72
กุ้งปกติ	916.67	611.67	581.67	685.00	726.67	532.50	686.67
	± 529.37	± 183.00	± 75.01	± 126.17	± 157.76	± 133.39	± 141.34
กุ้งที่ได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i>	871.67	227.50	251.67	504.17	339.17	405.00	482.50
	± 168.94	± 19.53	± 49.33	± 295.93	± 251.21	± 170.61	± 357.73

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ  $n = 3$

##### 4.9.2 เปรียบเทียบค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีส

ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีสในกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* กับกุ้งกุลาดำปกติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีสในกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่ม มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน กล่าวคือ ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีสจากช่วงเวลาที่ 0 ถึงช่วงเวลาที่ 12 มีค่าลดลงเรื่อยๆ จากนั้นค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีสค่อยๆ เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.33

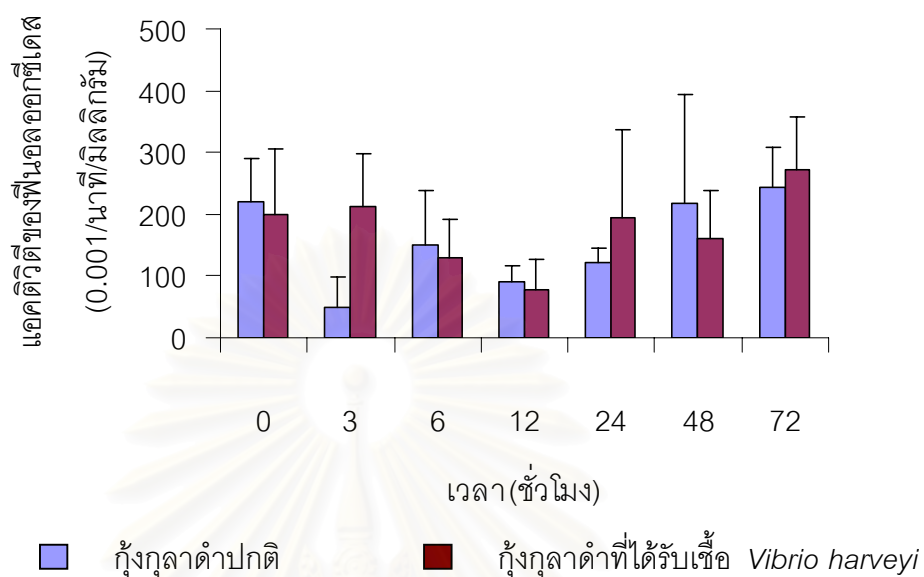


รูปที่ 4.32 แสดงปริมาณเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.12 แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส (0.001/นาทีก/มิลลิกรัมโปรตีน) หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

	เวลาหลังจากได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i> (ชั่วโมง)						
	0	3	6	12	24	48	72
กุ้งปกติ	220.35	147.22	149.28	89.51	120.52	218.24	244.10
	±	±	±	±	±	±	±
	69.01	42.02	89.33	28.01	24.21	174.65	64.94
กุ้งที่ได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i>	199.20	212.68	129.06	77.41	194.46	160.58	272.01
	±	±	±	±	±	±	±
	107.76	86.07	61.68	49.65	142.44	77.75	85.41

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ  $n = 3$



**รูปที่ 4.33** แสดงแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

#### 4.9.3 เปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนออกซีเดสโดยวิธี ELISA

ปริมาณของโปรตีนออกซีเดสในกุ้งปกติกับกุ้งที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* ในทุกช่วงเวลาดังแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 72 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณของโปรตีนออกซีเดสในกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* มีแนวโน้มสูงกว่าในกุ้งปกติดังแสดงในตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.34

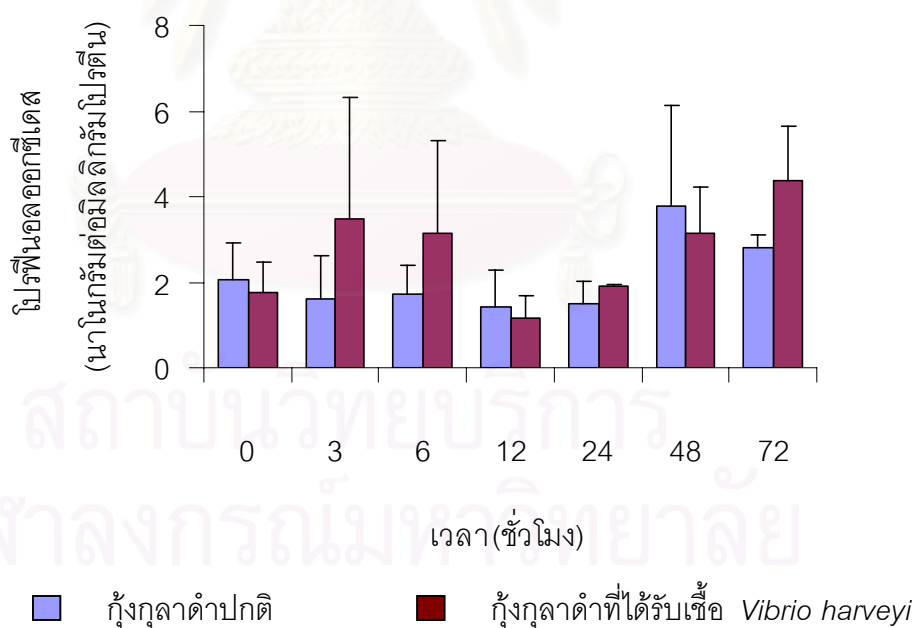
สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.13 แสดงปริมาณของโปรตีนออกนอกซีเดส (นาโนกรัม/มิลลิกรัมโปรตีน) หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

	เวลาหลังจากได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i> (ชั่วโมง)						
	0	3	6	12	24	48	72
กุ้งปกติ	2.071	1.617	1.713	1.418	1.501	3.787	2.802
	± 0.846	± 1.016	± 0.679	± 0.860	± 0.500	± 2.327	± 0.284
กุ้งที่ได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i>	1.767	3.459	3.127	1.150	1.905	3.143	4.389
	± 0.705	± 2.847	± 2.167	± 0.528	± 0.053	± 1.077	± 1.265

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ n = 3



รูปที่ 4.34 แสดงปริมาณของโปรตีนออกนอกซีเดสหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

#### 4.9.4 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซีเดสโดยใช้วิธี RT-PCR

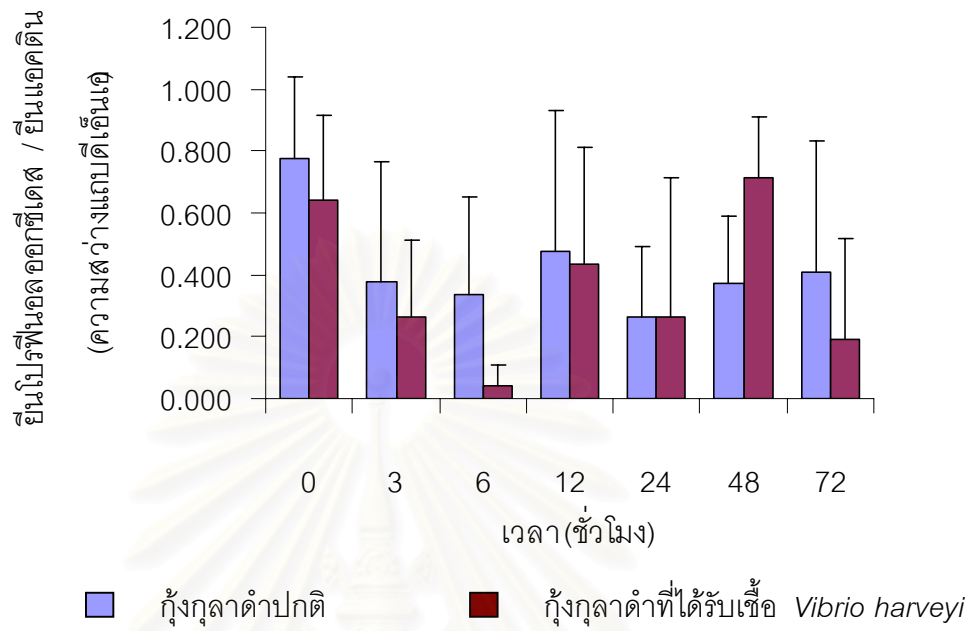
จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซีเดสในกึ่งกลาดำปกติ กับกึ่งกลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณยีนโปรตีนออกซีเดสในกึ่งกลาดำปกติ กับกึ่งกลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในกึ่งกลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณยีนโปรตีนออกซีเดสต่ำกว่ากึ่งปกติดังแสดงในตารางที่ 4.14 และ รูปที่ 4.35 โดยค่าที่แสดงเป็นค่าของความสว่างของแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนออกซีเดส ต่อ ความสว่างของแถบดีเอ็นเอของยีนแอกตินบนอะกาโรสเจล (รูปที่ 4.36, 4.37, 4.38)

**ตารางที่ 4.14** แสดงอัตราส่วนของยีนโปรตีนออกซีเดสต่อยีนแอกติน (ความสว่างแถบดีเอ็นเอ)

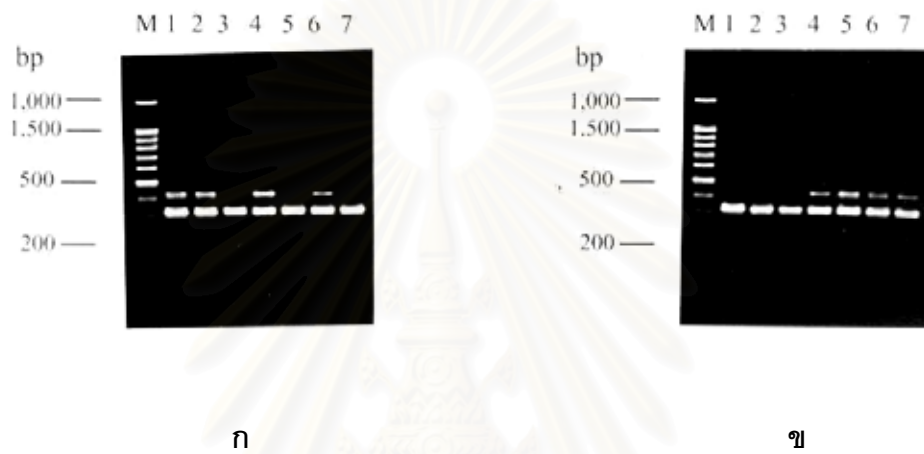
หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

	เวลาหลังจากได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i> (ชั่วโมง)						
	0	3	6	12	24	48	72
กึ่งปกติ	0.774	0.380	0.338	0.478	0.263	0.373	0.410
	±	±	±	±	±	±	±
	0.267	0.387	0.316	0.452	0.230	0.217	0.420
กึ่งที่ได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i>	0.642	0.265	0.039	0.434	0.262	0.715	0.189
	±	±	±	±	±	±	±
	0.274	0.249	0.068	0.376	0.453	0.195	0.327

ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เมื่อ  $n = 3$

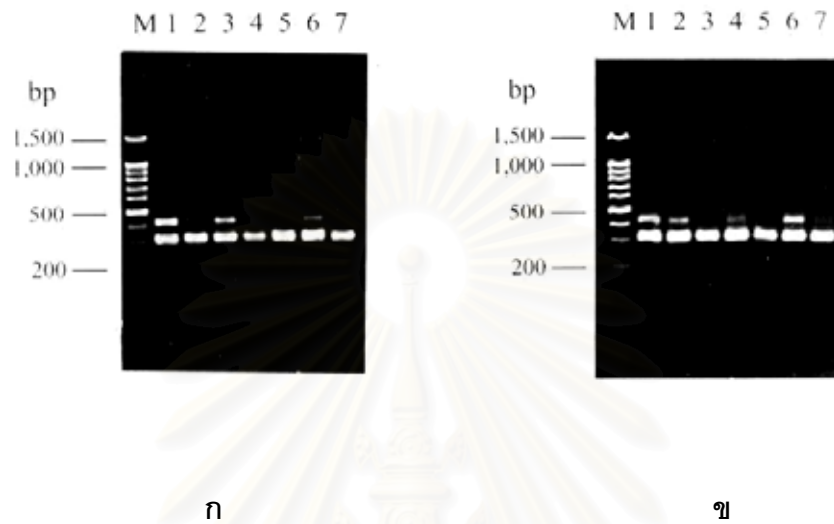


รูปที่ 4.35 แสดงปริมาณการขับถ่ายของยีสต์แอคทีฟของยีสต์แอคทีฟหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.36 semi-quantitative RT-PCR ของกุ้งปกติ (ก) และ กุ้งที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* (ข) ในการทดลองซ้ำที่ 1

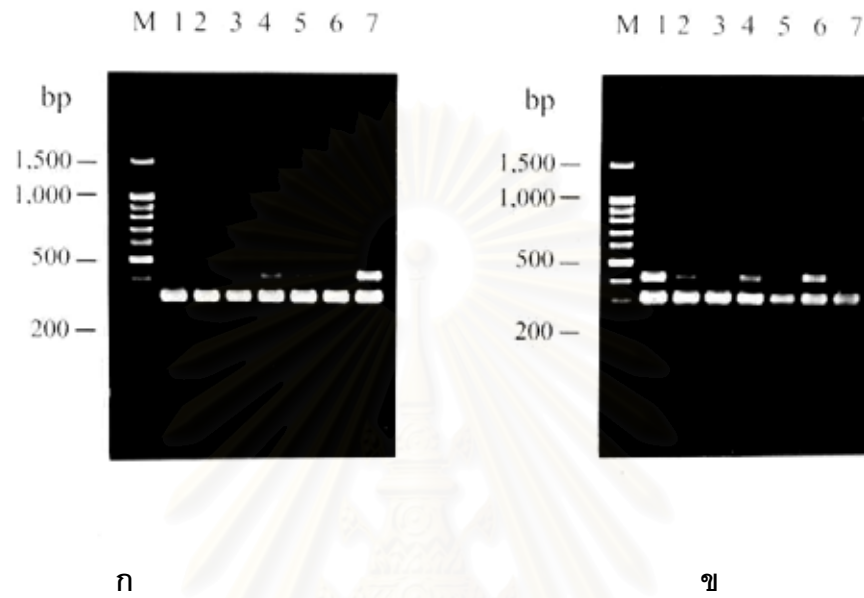
ช่อง M	=	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100bp ladder)
ช่องที่ 1	=	เวลา 0 ชั่วโมง
ช่องที่ 2	=	เวลา 3 ชั่วโมง
ช่องที่ 3	=	เวลา 6 ชั่วโมง
ช่องที่ 4	=	เวลา 12 ชั่วโมง
ช่องที่ 5	=	เวลา 24 ชั่วโมง
ช่องที่ 6	=	เวลา 48 ชั่วโมง
ช่องที่ 7	=	เวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.37 semi-quantitative RT-PCR ของกุ่มปกติ (ก) และ กุ่มที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* (ข) ในการทดลองซ้ำที่ 2

- |           |   |                                |
|-----------|---|--------------------------------|
| ช่อง M    | = | ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100bp ladder) |
| ช่องที่ 1 | = | เวลา 0 ชั่วโมง                 |
| ช่องที่ 2 | = | เวลา 3 ชั่วโมง                 |
| ช่องที่ 3 | = | เวลา 6 ชั่วโมง                 |
| ช่องที่ 4 | = | เวลา 12 ชั่วโมง                |
| ช่องที่ 5 | = | เวลา 24 ชั่วโมง                |
| ช่องที่ 6 | = | เวลา 48 ชั่วโมง                |
| ช่องที่ 7 | = | เวลา 72 ชั่วโมง                |





รูปที่ 4.38 semi-quantitative RT-PCR ของกุ้งปกติ (ก) และ กุ้งที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* (ข) ในการทดลองซ้ำที่ 3

ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)

ช่องที่ 1 = เวลา 0 ชั่วโมง

ช่องที่ 2 = เวลา 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 3 = เวลา 6 ชั่วโมง

ช่องที่ 4 = เวลา 12 ชั่วโมง

ช่องที่ 5 = เวลา 24 ชั่วโมง

ช่องที่ 6 = เวลา 48 ชั่วโมง

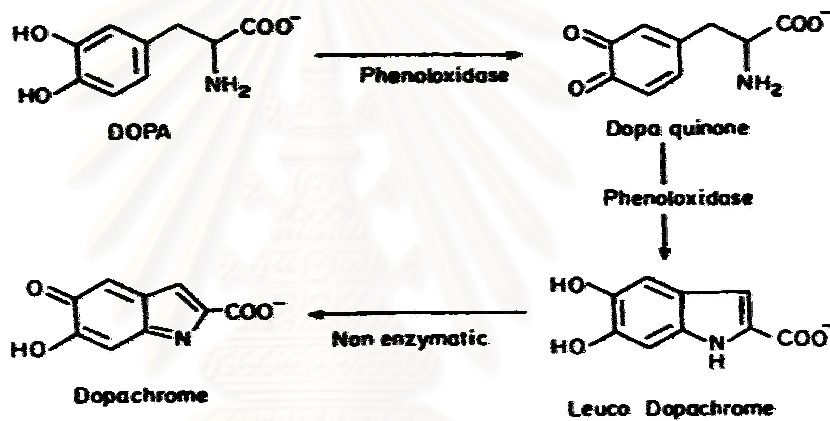
ช่องที่ 7 = เวลา 72 ชั่วโมง

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง

#### 5.1 การวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสทางเคมี

การตรวจวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสทางเคมีทำได้โดยวัดปริมาณของโดพาโครมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟีนอลออกซีเดสกับสับสเตรท L-DOPA ที่เพิ่มขึ้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 ปฏิกิริยาการเกิดโดพาโครมจากการทำปฏิกิริยาของฟีนอลออกซีเดสกับ L-DOPA (ดัดแปลงจาก Walivittan, 1999)

การทดสอบภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสจากตัวแปร 3 ประเภท ได้แก่ ค่า pH ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และปริมาณเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส

จากผลการทดสอบการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสทางเคมีที่ pH ตั้งแต่ 3-11 พบว่าช่วงที่ฟีนอลออกซีเดสมีค่าแอกติวิตีสูงสุดคือใน pH 7.0 และ 8.0 ซึ่งเป็นช่วง pH ของน้ำเลือดปกติในกิ้งกูดดำซึ่งมีค่า pH 7.43 (กิจการ และคณะ, 2543a) และค่า pH ของเลือดกิ้ง *P. stylirostris* เป็น 7.25 ในกิ้งตัวผู้ และ 7.33 ในกิ้งตัวเมีย (Vargas-Albores และ Ochoa, 1992) โดยค่า pH ที่เหมาะสมกับการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดลองในกิ้ง *P. setiferus* คือค่า pH 6.5-8.0 (Simpson และคณะ, 1987) และกิ้ง *P. californiensis* คือค่า pH

7.0-8.0 (Gollas-Galvan และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเมื่อค่า pH สูงกว่า 8 จะทำให้ L-DOPA ซึ่งเป็นสับสเตรตในการตรวจสอบแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสสามารถเกิด autoxidation ได้ คือสามารถให้สีที่วัดได้ในช่วงความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรได้เช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาของฟีนอลออกซีเดสโดยที่ไม่มีฟีนอลออกซีเดสอยู่เลย ดังนั้นค่า pH ของการตรวจวัดค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสในกึ่งกลางค่าที่ดีจึงไม่ควรเกิน 8.0 เพราะจะทำให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสที่วัดได้สูงกว่าความเป็นจริง

ในการศึกษาผลของเอนไซม์ทริปซินต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส พบว่าการเติมเอนไซม์ทริปซินจะทำให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสสูงกว่าการที่ไม่เติมเอนไซม์ทริปซินอย่างมาก โดยมีค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสสูงกว่าถึงประมาณ 6 เท่าของปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ทริปซินและการใช้เอนไซม์ทริปซินนี้จะใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย (< 1%) ก็สามารถทำให้เกิดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสที่สมบูรณ์ได้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากว่าเอนไซม์ทริปซินจะทำหน้าที่เช่นเดียวกับเอนไซม์ serine protease คือ เปลี่ยน โปรฟีนอลออกซีเดสซึ่งอยู่ในรูป inactive form ให้เป็นฟีนอลออกซีเดสที่อยู่ในรูป active form โดยการตัดโปรฟีนอลออกซีเดสที่ตำแหน่ง Arg44 และ Val45 (Sritunyalucksana และคณะ, 1999) ดังนั้นการตรวจวัดค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสโดยที่มีหรือไม่มีเอนไซม์ทริปซิน จึงเป็นการตรวจวัดได้ค่าของแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสที่อยู่ในรูป active และ inactive form หรือตรวจวัดเฉพาะฟีนอลออกซีเดสที่อยู่ในรูป active form ตามลำดับ จากการที่ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสสูงขึ้นอย่างมากเมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินแสดงให้เห็นว่าฟีนอลออกซีเดสที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลางดำส่วนใหญ่อยู่ในรูปของโปรฟีนอลออกซีเดส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในกึ่ง *P. californiensis* (Vargas-Albores และคณะ, 1993b) และกึ่ง *P. paulensis* (Perazzolo และ Barracco, 1997)

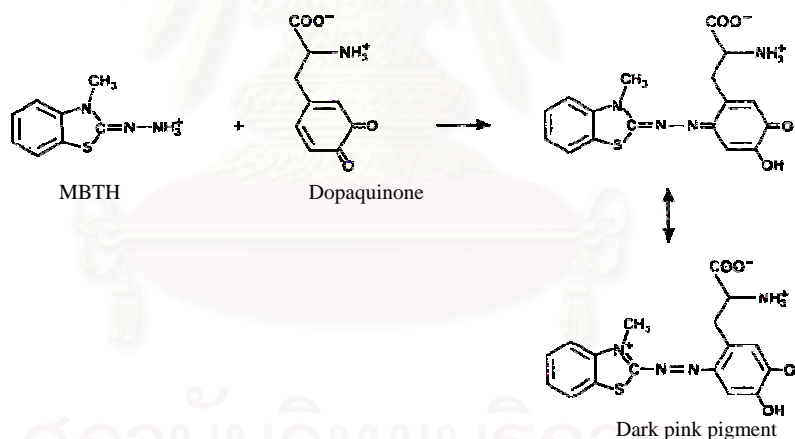
ในการทดลองวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส โดยใช้สารละลายที่แตกต่างกัน คือ สารละลายแอ่งค์ที่ไม่มีแมกนีเซียม แคลเซียม ( $H_0$ ) สารละลายแอ่งค์ที่มีแมกนีเซียม แคลเซียม ( $H_1$ ) สารละลายไซเดียมซีเตรต สารละลาย PBS สารละลาย Tris-HCl และสารละลาย CAC buffer ซึ่งสารละลายทั้ง 6 ชนิดมีค่า pH เท่ากันคือ 7.5 พบว่า ในสภาวะที่มีเอนไซม์ทริปซินสารละลาย CAC buffer ให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสสูงกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ รองลงมาได้แก่สารละลาย Tris-HCl สารละลายไซเดียมซีเตรต 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย  $H_1$  และ สารละลาย PBS ตามลำดับ ส่วน  $H_0$  ให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส ต่ำกว่าสารละลายชนิดอื่นๆ แต่เมื่อทดลองวัดโดยไม่มีเอนไซม์ทริปซิน พบว่าสารละลาย Tris-HCl สารละลาย  $H_0$  PBS และสารละลายไซเดียมซี

เตรท ให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสที่ค่อนข้างต่ำมาก ทั้งนี้ น่าจะมาจากปริมาณสารประกอบ แคลเซียมในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด โดยในสารละลายทั้ง 4 ชนิดนี้ไม่มี  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นส่วนประกอบ ขณะที่สารละลาย  $\text{H}_1$  และ CAC buffer มี  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นส่วนประกอบ ถึงแม้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ทริปซินช่วยเปลี่ยนโปรตีนออกซีเดส เป็นฟีนอลออกซีเดสแต่ในสารละลาย HLS ที่สกัดมาจากเม็ดเลือดกึ่งก็ยังมีเอนไซม์ serine protease ซึ่งสามารถทำหน้าที่ได้ในสภาพที่มี  $\text{Ca}^{2+}$  อยู่ในสารละลายจึงทำให้โปรตีนออกซีเดสบางส่วนยังคงเปลี่ยนไปเป็นฟีนอลออกซีเดสได้ ทำให้ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสที่ตรวจวัดในสารละลายที่มี  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นองค์ประกอบให้ค่าที่สูงกว่า ดังนั้นในการหาค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสโดยรวมจึงควรใช้สารละลายที่มี  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นองค์ประกอบ แต่หากต้องการหาค่าของโปรตีนออกซีเดสเพื่อเปรียบเทียบกับค่าของฟีนอลออกซีเดส การใช้สารละลายที่มีและไม่มี  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นองค์ประกอบทั้ง 2 แบบน่าจะให้ค่าที่ถูกต้องมากที่สุด นอกจากนี้การใช้  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นตัวแปรยังทำให้สามารถประเมินแอกติวิตี ของ serine protease ที่มีอยู่ในเลือดของกิ้งกูดดำได้อีกทางหนึ่งด้วย

ในการทดสอบการกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสด้วยไซโมแซนเอซึ่งเป็น 1-3,เบต้ากลูแคนชนิดหนึ่ง ในหลอดทดลองพบว่าไซโมแซนเอไม่สามารถกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสของกิ้งกูดดำในระดับที่สามารถตรวจสอบได้ในสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทั้งในแบบที่มีและไม่มีเอนไซม์ทริปซิน ในขณะที่มีรายงานบางฉบับรายงานว่า เบต้า, 1-3, กลูแคนสามารถกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสได้ในกึ่งบางชนิด (Vargas-Albores, 1995; Vargas-Albores และคณะ, 1996 และ 1997) แต่อย่างไรก็ตามการกระตุ้นแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสนั้นเป็นการกระตุ้นการเกิดกระบวนการ degranulation ไม่ได้เป็นการกระตุ้นการทำงานของฟีนอลออกซีเดสโดยตรง (Gollas-Galvan และคณะ, 1997)

การวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสโดยใช้ MBTH เป็นสารในการทำปฏิกิริยากับโดพาคควินโนน (Dopaquinone) ให้สารสีชมพูเข้มซึ่งมีความเสถียรและตรวจวัดได้ง่าย มีรายงานการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสใน *Botryllus schlosseri* (Frizzo และคณะ, 1999) ด้วยการใช้ MBTH ซึ่งในปี 1991 Winder และ Harris รายงานว่าวิธีการวัดแอกติวิตีของโดพาคควินโนนโดยวิธี MBTH มีความไวมากกว่าการวัดด้วยวิธี DOPA ถึง 7 เท่า สมการการเกิดปฏิกิริยาของ MBTH กับโดพาคควินโนนที่ได้จากปฏิกิริยาของฟีนอลออกซีเดสกับ L-DOPA แสดงดังรูปที่ 5.2

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า การใช้วิธี MBTH ทำให้ค่าความไวของการวัดแอสคอร์บิกแอซิดของ ฟีนอลออกซิเดสสูงกว่าวิธีเดิมที่ใช้แต่เพียง DOPA ประมาณ 3.5 เท่า ข้อดีของการใช้ MBTH คือ ทำให้สามารถตรวจวัดค่าแอสคอร์บิกแอซิดจากตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ได้โดยใช้น้ำ เลือดประมาณ 6 ถึง 10 ไมโครลิตร ในขณะที่วิธีที่ใช้ L-DOPA เพียงอย่างเดียวต้องใช้ปริมาณน้ำ เลือดประมาณ 20 ถึง 40 ไมโครลิตร นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก MBTH ทำปฏิกิริยากับโดพา ควินโนน คือ สารสีชมพูเข้มยังมีความเสถียรมากกว่าโดพาโครมที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ L-DOPA กับฟีนอลออกซิเดส โดยเมื่อทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดเปอร์คลอริกแล้วโดพาโครมไม่สามารถหยุดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งทำให้ต้องรีบวัดค่าการดูดกลืนแสงอย่างรวดเร็วและ พร้อมกันทำให้ไม่สะดวกในการตรวจวัดค่าแอสคอร์บิกแอซิดในกรณีที่มีตัวอย่างมากๆ ได้ ในขณะที่สารสีชมพูเข้มสามารถหยุดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์โดยการเติมกรดเปอร์คลอริกและ สีที่ได้จะคงที่ได้นาน ซึ่งมีข้อดีคือสามารถวัดค่าแอสคอร์บิกแอซิดได้ถูกต้องแม่นยำกว่า โดยไม่ต้องรีบร้อนในการวัดตัวอย่างที่หลายๆ ในเวลาเดียวกันทั้งหมด



รูปที่ 5.2 ปฏิกิริยาของโดพาควินโนนกับ MBTH (Winder และ Harris, 1991)

## 5.2 การแยกโปรตีนออกซิเดสจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ

ในการแยกสกัดโปรตีนออกซิเดสจากเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำในครั้งนี้เพื่อศึกษาคุณลักษณะบางประการของโปรตีนออกซิเดส และทำบริสุทธิ์โปรตีนออกซิเดส เพื่อใช้ในการทำ โพลีโคลนอลแอนติบอดีจึงได้ใช้การแยกสกัด 2 วิธี คือการแยกสกัดด้วยการชะโปรตีนออกซิเดสออกจากโพลีอะครีลาไมด์เจลหลังจากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ และการทำลิวทิดโครมาโตกราฟี ทั้งสองวิธีใช้ตัวอย่างในการแยกสกัดโปรตีนออก



ซึ่งได้มาจากสารละลาย HLS จากเม็ดเลือดกึ่งกุดดำ ในวิธีแรกทำโดยการนำสารละลาย HLS มาแยกโปรตีนออกนอกซีเดสโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติแล้ว ย้อมด้วย L-DOPA และ สีย้อมคูแมสซีบลู พบว่าแถบของโปรตีนออกนอกซีเดสที่ย้อมด้วย L-DOPA เห็นค่อนข้างชัดเจน มีขนาด 480 kDa แต่ที่ย้อมด้วยสีย้อมคูแมสซีบลูเห็นแถบของโปรตีนออกนอกซีเดสค่อนข้างยากเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนของโปรตีนออกนอกซีเดสในแต่ละช่องมีน้อยมาก อย่างไรก็ตามได้ทำการตัดเอาเนื้อโพลีอะครีลาไมด์เจลในบริเวณที่คาดว่าจะมีโปรตีนออกนอกซีเดสออกมาทำการบดแล้วทำการฉีดเข้าสู่กระต่ายเพื่อสร้างแอนติบอดี ผลที่ได้พบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับกับแถบของโปรตีนออกนอกซีเดสได้แต่มีความไวต่ำ (low sensitivity) และความจำเพาะต่ำ (low specificity) ซึ่งสาเหตุน่าจะมาจากการที่โปรตีนออกนอกซีเดสที่แยกด้วยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมีปริมาณที่ค่อนข้างน้อยไม่สามารถแยกออกจากแถบโปรตีนอื่นที่อยู่บริเวณใกล้เคียงซึ่งมีปริมาณมากกว่าได้อย่างสมบูรณ์ทำให้เป็นสาเหตุของการมีความจำเพาะต่ำ ประกอบกับไม่สามารถชะโปรตีนออกนอกซีเดสออกจาก โพลีอะครีลาไมด์เจลก่อนการนำไปกระตุ้นกระต่ายได้เนื่องจากปริมาณโปรตีนออกนอกซีเดสที่น้อย จึงอาจทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายไม่ได้สัมผัสกับโปรตีนออกนอกซีเดสในปริมาณที่มากพอทำให้ความไวของแอนติบอดีที่ได้ต่ำด้วย

ส่วนการแยกสกัดโปรตีนออกนอกซีเดสโดยวิธีลิวติโครมาโตรกราฟีทำโดยใช้เทคนิคแบบ affinity chromatography ด้วยคอลัมน์บลูเซปฟาโรส พบว่าโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์บลูเซปฟาโรสได้เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในสารละลาย HLS ซึ่งตรวจไม่พบแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส แต่เมื่อชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์บลูเซปฟาโรสด้วยสารละลายไซเตียมคลอไรด์ กลับตรวจพบแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสในสารละลายโปรตีนที่ชะออกมาและมีขนาดโมเลกุลประมาณ 480 kDa ซึ่งผลที่ได้นี้ต่างจากที่มีรายงานในการแยกสกัดโปรตีนออกนอกซีเดสจาก *Pacifastacus leniusculus* (Aspán และ Söderhäll, 1991) และ *Penaeus californiensis* (Gollas-Galván และคณะ, 1999) ด้วยวิธีเดียวกันนี้โดยโปรตีนออกนอกซีเดสของ *Pacifastacus leniusculus* และ *P. californiensis* เป็นส่วนที่ผ่านคอลัมน์บลูเซปฟาโรสออกมา ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้โปรตีนออกนอกซีเดสที่สกัดได้มีแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส 5.61 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแอกติวิตีเริ่มต้น และได้ปริมาณโปรตีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนตั้งต้น ซึ่งปริมาณโปรตีนออกนอกซีเดสที่แยกได้นี้มีน้อยมาก และไม่สามารถคงสภาพให้มีแอกติวิตีได้นานพอจึงไม่เพียงพอที่จะนำไปสร้างแอนติบอดีต่อไปได้

### 5.3 การโคลน และการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซีเดส

ยีนของโปรตีนออกซีเดสมีขนาด 2,072 คู่เบส สร้างขึ้นโดยการออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งเริ่มต้น (start codon) และ ตำแหน่งสิ้นสุด (stop codon) ของยีนโปรตีนออกซีเดสที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank (AF099741) (Sritunyalucksana และคณะ, 1999) โดยที่ด้านปลาย 5' ของตำแหน่งเริ่มต้นของยีนโปรตีนออกซีเดส ไพรเมอร์ถูกออกแบบให้เข้ากันได้พอดีกับบริเวณ ที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I บน T-easy vector เมื่อทำการตัดต่อยีนโปรตีนออกซีเดสเข้าสู่ T-easy vector แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Eco*RI ทำให้ได้ขึ้น insert ที่มีส่วนของยีนโปรตีนออกซีเดสอยู่สามารถต่อเข้ากันได้พอดีกับ insertion site ของเวกเตอร์ pET17b ซึ่งเป็น expression vector ที่สามารถสร้างโปรตีนได้ดีใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) *plys*S จากการทำให้ protein expression พบว่ามีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณที่ค่อนข้างมากที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนออกซีเดสของกิ้งกูดดำที่ได้จากการคำนวณจากลำดับกรดอะมิโนซึ่งมีขนาดประมาณ 78.7 kDa (Sritunyalucksana และคณะ, 1999) โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกซีเดสที่ได้นี้ได้นำไปใช้เป็นแอนติเจนเพื่อสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนออกซีเดสของกิ้งกูดดำ

### 5.4 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากรีคอมบิแนนท์โปรตีน

เมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตโดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สร้างจากยีนโปรตีนออกซีเดสของกิ้งกูดดำ มาตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนออกซีเดสในเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำ พบว่า แอนติบอดีที่ได้สามารถจับได้กับแถบโปรตีนขนาด 480 kDa จากสารละลาย HLS ของกิ้งกูดดำซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นโปรตีนออกซีเดสโดยดูจากการทำปฏิกิริยากับ L-DOPA บนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบโปรตีนไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ (native-PAGE) และแอนติบอดีที่ได้นี้ยังมีความจำเพาะกับโปรตีนออกซีเดสที่อยู่ในรูปที่สูญเสียสภาพธรรมชาติบนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE) ด้วย แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อโปรตีนออกซีเดสในเซลล์เม็ดเลือดกิ้งกูดดำ ส่วนการตรวจวัดโปรตีนออกซีเดสในน้ำเลือดนั้นแอนติบอดีไม่สามารถตรวจวัดโปรตีนออกซีเดสได้จากโปรตีนที่มาจากน้ำเลือด เนื่องจากปริมาณของโปรตีนออกซีเดสที่อยู่ในน้ำเลือดจะน้อยกว่าในเซลล์เม็ดเลือด เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนออกซีเดสในสารละลาย HLS ของกิ้งกูดดำมีขนาด 70 kDa ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกซีเดสที่มีขนาด 73 kDa เห็นได้จากการตรวจสอบด้วยแอนติบอดี ซึ่งความแตกต่างนี้น่าจะเกิดจากโปรตีนออกซีเดสในสารละลาย HLS อาจจะมี

อยู่ในรูป active form คือ ฟีนอลออกซีเดสซึ่งถูกเอนไซม์ serine protease ตัดที่ตำแหน่ง Arg44 และ Val45 ทำให้มีขนาดเล็กกว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนฟีนอลออกซีเดสที่อยู่ในรูป inactive form

ในการทดสอบแอนติบอดีกับโปรตีนฟีนอลออกซีเดสบน native-PAGE พบว่าโปรตีนฟีนอลออกซีเดสมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยย่อย (subunit) ของโปรตีนฟีนอลออกซีเดส ที่ตรวจสอบได้ใน SDS-PAGE ซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 70 kDa ทำให้พอจะคำนวณได้ว่าโปรตีนฟีนอลออกซีเดสในรูป native form น่าจะประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากันประมาณ 7 หน่วยย่อย จากการศึกษาโปรตีนฟีนอลออกซีเดสในรูป native form ใน *Pacifastacus leniusculus* โปรตีนฟีนอลออกซีเดสมีขนาด 300 kDa ประกอบไปด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากันคือ 76 kDa (Aspán และ Söderhäll, 1991) และ โปรตีนฟีนอลออกซีเดสในกุ้ง *P. californiensis* มีขนาด 272 kDa ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากันคือ 114 kDa (Gollas-Galván และ คณะ, 1999)

หลังจากตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีกับโปรตีนฟีนอลออกซีเดสแล้ว ได้ทดลองทำ ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากตัวอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนฟีนอลออกซีเดสพบว่า ค่าไตเตอร์ของแอนติเจนเท่ากับค่าการเจือจางที่ 1 ต่อ 200 หรือ 13.75 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้สารละลาย HLS จากกุ้งกุลาดำเป็นแอนติเจนในการทำ ELISA พบว่าไตเตอร์ของแอนติเจนเท่ากับค่าการเจือจางที่ 1 ต่อ 50 หรือ 18.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเจือจางเท่ากับ 1 ต่อ 1,000 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความเหมาะสมในการใช้ตรวจวัดปริมาณของโปรตีนฟีนอลออกซีเดสในสารละลาย HLS ของกุ้งกุลาดำ ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนฟีนอลออกซีเดสที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี ELISA อยู่ที่ประมาณ 14 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้จากการศึกษาครั้งนี้ และตัวอย่างสารละลาย HLS ที่จะนำมาตรวจวัดปริมาณฟีนอลออกซีเดสควรมีความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นอย่างน้อยจึงจะสามารถตรวจวัดปริมาณของฟีนอลออกซีเดสได้อย่างถูกต้อง

## 5.5 การตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนฟีนอลออกซีเดสด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

ในการทำ semi-quantitative RT-PCR ได้ใช้ไพรเมอร์ PO1 และ PO2 ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนฟีนอลออกซีเดสซึ่งทำให้มีขนาดของผลผลิตของ RT-PCR เท่ากับ 417 คู่เบส โดยมีไพรเมอร์ actin 1 และ actin 2 ที่ออกแบบจากยีนแอกตินของกุ้งกุลาดำซึ่งให้ผล

ผลิตขนาด 327 คู่เบส เป็นตัวเปรียบเทียบเนื่องจากว่ายีนแอกตินเป็นยีนมีการแสดงออกเท่ากันตลอดเวลา และมีขนาดของผลผลิต RT-PCR ไม่แตกต่างจากขนาดของผลผลิต RT-PCR ของยีนโปรตีนออกซิดอกซีเดสมาก และค่า  $T_m$  ของคู่ไพรเมอร์ ทั้ง 2 คู่มีค่าใกล้เคียงกัน คือ PO1 และ PO2 มีค่า  $T_m$  เป็น 55.1 และ 55.7 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ actin1 และ actin2 มีค่า  $T_m$  เป็น 51.3 และ 52.0 องศาเซลเซียสตามลำดับ ทำให้การปรับอุณหภูมิในช่วง annealing ในการทำ RT-PCR แบบใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ในหลอดเดียวกัน (multiplex RT-PCR) ซึ่งมีอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR ดังนี้ คือ ใช้ PO1 และ PO2 เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ และใช้ actin1 และ actin2 เข้มข้น 0.12 ไมโครโมลาร์ ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนประมาณ 8:1 ซึ่งแสดงถึงว่าสำเนาของยีนแอกตินกับยีนโปรตีนออกซิดอกซีเดสของกิ้งกูดาค่าแตกต่างกันมาก และเมื่อทดสอบการใช้ปริมาณของอาร์เอ็นเอแม่พิมพ์ พบว่าที่ปริมาณของอาร์เอ็นเอแม่พิมพ์ 10 นาโนกรัม ยังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดอกซีเดสได้แต่ไม่ชัดเจนมากนัก ดังนั้นปริมาณอาร์เอ็นเอแม่พิมพ์ที่เหมาะสม คือ 100 นาโนกรัม และเมื่อพิจารณาถึงจำนวนรอบที่เหมาะสมในการทำ semi-quantitative คือ 25 รอบ เนื่องจากว่าเป็นช่วง log phase ของปฏิกิริยา โดยสังเกตได้จากการเปรียบเทียบปริมาณผลผลิต RT-PCR ที่ได้จากการทำ RT-PCR 25 รอบ กับ 30 รอบ พบว่าที่ 30 รอบมีความสว่างของแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น

#### 5.6 การตรวจวัดระดับของโปรตีนออกซิดอกซีเดสในกิ้งกูดาค่าที่ได้รับเชื้อ *V. harvayi* ด้วยวิธีทางเคมี วิธีทางอิมมูโนวิทยา (ELISA) และวัดระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดอกซีเดสด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

ทำการศึกษการติดเชื้อ *V. harvayi* ในกิ้งกูดาค่า 2 แบบ คือ *in vitro* ทำโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดกึ่งปริมาณเท่ากัน มาเติมเชื้อ *V. harvayi* ที่ปริมาณต่างๆ กัน แล้วทำการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดอกซีเดสด้วยวิธีทางเคมีแบบใช้ MBTH และวัดปริมาณโปรตีนออกซิดอกซีเดสด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่ได้เติมเชื้อ พบว่าโดยรวมแล้วในเวลา 4 ชั่วโมงแรกหลังจากเติมเชื้อยังไม่พบความแตกต่างกันของแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดอกซีเดส แต่เริ่มเห็นความแตกต่างในการทดลองที่เติมเชื้อ *V. harvayi* ปริมาณที่สูง โดยแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดอกซีเดสลดต่ำลงในชั่วโมงที่ 5 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการทดลอง อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดไม่อยู่ในสภาพที่จะตอบสนองต่อเชื้อ *V. harvayi* ที่เติมลงไป ส่วนในการศึกษาแบบ *in vivo* เป็นการศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อ *V. harvayi* ในตัวกิ้งกูดาค่า โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าที่กล้ามเนื้อของกิ้งกูดาค่าแล้วทำการเก็บเลือดมาวิเคราะห์ค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดอกซีเดสด้วยวิธีทางเคมีแบบใช้ MBTH วัดปริมาณโปรตีนออกซิดอกซีเดสด้วยวิธี ELISA และวัดระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดอกซีเดสด้วยวิธี



semi-quantitative RT-PCR เปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเนื่องจากว่าค่าฟีนอลออกซีเดสของกุ้งแต่ละตัวนั้นมีความแปรปรวนสูง

จากการศึกษาการติดเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำแบบ *in vitro* พบว่าเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่เติมเชื้อ *V. harveyi* ในปริมาณ  $5.0 \times 10^7$  เซลล์ซึ่งมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ 10 เท่า นั้นมีค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส และปริมาณของโปรตีนออกซีเดสต่ำกว่าในชุดการทดลอง เซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้เติมเชื้อ *V. harveyi* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนระหว่างจำนวนเซลล์เม็ดเลือดกับจำนวนแบคทีเรียมีผลต่อแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส อย่างไรก็ตามผลที่ได้สามารถเห็นได้ชัดเจนเมื่อจำนวนแบคทีเรียมีปริมาณสูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดมากๆ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาสุดท้ายที่มีการจับบันทึกข้อมูลในการทดลองครั้งนี้ ดังนั้นจึงเห็นว่าถ้ามีการทำการทดลองที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้น และทำการบันทึกจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่เมื่อเวลาผ่านไปก็น่าจะให้ผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้นในกรณีที่ต้องการทราบว่าเซลล์เม็ดเลือดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้หรือไม่ โดยจากการศึกษาของ Lee และคณะ (1995) พบว่า *V. harveyi* สามารถผลิตสารย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือด (haemolysin) ได้ ดังนั้นจึงทำให้เซลล์เม็ดเลือดลดลง ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนออกซีเดสลดลงด้วยเพราะว่าโปรตีนออกซีเดสพบอยู่ในเซลล์เม็ดเลือด นอกจากนี้สารดังกล่าวอาจจะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซีเดสจึงทำให้แอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสที่วัดได้ลดน้อยลงไปด้วย

ส่วนในการศึกษาการติดเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำแบบ *in vivo* โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำ พบว่าในชั่วโมงที่ 3 และ 6 หลังจากฉีดเชื้อ กุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดรวมต่ำกว่ากุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป พบว่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีจำนวนไม่แตกต่างจากกุ้งปกติ อาจเป็นไปได้ว่ากุ้งกุลาดำได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกายทำให้เซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนของร่างกายลดลงเนื่องจาก เซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอมซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Martin และคณะ (1993) ที่พบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งทะเล *Sicyonia ingentis* ลดลง 20 เปอร์เซ็นต์หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้าไป 24 ชั่วโมง โดยเมื่อพิจารณาถึงค่าแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส และปริมาณโปรตีนออกซีเดสของเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ ส่วนในการวัดระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซีเดสนั้นมีข้อสังเกตว่าค่าที่ได้มีความแปรปรวนสูงมาก นอกจากนี้ในบางตัวอย่างไม่สามารถตรวจ



พบปริมาณยีนโปรตีนออกซิดีสเดสเลยอาจเป็นเพราะว่ามีปริมาณอยู่น้อยกว่ายีนแอกติวีนที่เป็นยีนเปรียบเทียบ จนไม่อาจตรวจพบยีนโปรตีนออกซิดีสเดสด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR ได้

การวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีสเดสเป็นการวัดการทำงานของฟีนอลออกซิดีสเดสซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของฟีนอลออกซิดีสเดสที่ยังคงสภาพธรรมชาติอยู่ไม่รวมถึงโปรตีนออกซิดีสเดสที่สลายไปแล้ว ส่วนการวัดโปรตีนออกซิดีสเดสทางอิมมูโนวิทยาโดยวิธี ELISA เป็นการหาปริมาณโปรตีนออกซิดีสเดสทั้งในส่วนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติไปแล้ว และที่ยังคงสภาพธรรมชาติอยู่ และวิธี semi-quantitative RT-PCR เป็นการวัดโปรตีนออกซิดีสเดสในระดับการแสดงออกของยีนโปรตีนออกซิดีสเดส ซึ่งมีอีกหลายขั้นตอนกว่าจะสร้างเป็นโปรตีนและมีแอกติวิตีเกิดขึ้น ในระหว่างนี้จึงอาจถูกยับยั้งได้ทำให้ค่าของโปรตีนออกซิดีสเดสที่ได้จากวิธีวัดทั้ง 3 แบบไม่เท่ากัน จากการวัดปริมาณของโปรตีนออกซิดีสเดสทั้ง 3 วิธีนี้พบว่าปริมาณของฟีนอลออกซิดีสเดส และแอกติวิตีของฟีนอลออกซิดีสเดสแปรผันตามจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนออกซิดีสเดสมีอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ ซึ่งสอดคล้องกับกับการทดลองในกึ่ง *P. californiensis* (Vargas-Albores และคณะ, 1993b) และกึ่ง *P. paulensis* (Perazzolo และ Barracco, 1997) โดยพบโปรตีนออกซิดีสเดสอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดเช่นเดียวกัน และผลของการแอกติวิตี และปริมาณของฟีนอลออกซิดีสเดสทั้ง 3 วิธีดังกล่าวนี้ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด มีความเป็นไปได้ว่าวิธีวัดโปรตีนออกซิดีสเดสที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปใช้ได้จริง แต่อย่างไรก็ดีผลที่ได้ยังเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ต้องมีการทดสอบในตัวอย่างกึ่งกลาดำในจำนวนที่เพิ่มมากขึ้น รวมถึงทดสอบกับกึ่งที่มีการติดเชื้อจริง ๆ ในบ่อเลี้ยงเปรียบเทียบผลกับกึ่งปกติ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสทางเคมีในกุ่มกุลาดำ โดยใช้สารละลาย CAC buffer ที่ค่า pH 7 – 8
2. การใช้สาร MBTH เป็นตัวทำปฏิกิริยากับโดพาคิวโนโนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการวัดแอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดสได้มากกว่า 3.5 เท่าของวิธีที่ใช้ L-DOPA เป็นสับสเตรตเพียงอย่างเดียว
3. ไม่สามารถตรวจพบกระตุ้นการเกิดแอกติวิตีของโปรตีนออกซีเดสในสารละลาย HLS ของกุ่มกุลาดำได้ด้วยไซโมแซนเอ
4. สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์รีคอมมิแนนท์โปรตีนออกซีเดสที่มีขนาด 73 กิโลดาลตัน ด้วยเวกเตอร์ pET17b ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) plysS
5. สามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนออกซีเดสในเซลล์เม็ดเลือดกุ่มกุลาดำด้วยรีคอมมิแนนท์โปรตีนออกซีเดส
6. โปรตีนออกซีเดสในกุ่มกุลาดำมีขนาดประมาณ 480 kDa ประกอบด้วย 7 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือประมาณ 70 kDa
7. กุ่มกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดน้อยกว่ากุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ
8. แอกติวิตีของฟีนอลออกซีเดส และปริมาณโปรตีนออกซีเดสแปรผันตามจำนวนเซลล์เม็ดเลือด
9. ตรวจไม่พบความแตกต่างของการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสำหรับโปรตีนออกซีเดสในกุ่มกุลาดำที่ได้รับเชื้อ และไม่ได้รับเชื้อ *V. harveyi*

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กิจการ ศุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ Rudolf Hoffmann. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.
- กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภาภา ศิริรัฐนิยม และนรินทร์ สงสีจันทร์. 2543a. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: IV. การศึกษาค่าปกติของระบบภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 597-603.
- ชลอ ลิ่มสุวรรณ. 2535. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: สุสานเศรษฐกิจ.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. 2540. อิมมูโนโลยีและเซอโรโลยี. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2534. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมบัติ รักประทานพร. 2542. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Adema, C.M., van Deutekom-Mulder, E.C., van der Knaap, W.P.W., Meuleman, E.A. and Sminia, T. 1991. Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. Dev. Comp. Immunol. 15: 17-26.
- Adums, A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish Shellfish Immunol. 1: 59-70.
- Amirante, G.A. and Basso, V. 1984. Analytical study of lectins in *Squilla mantis* L. (Crustacea stomatopoda) using monoclonal antibodies. Dev. Comp. Immunol. 8 (3): 721-726.

- Andersson, K., Sun, S.-C., Boman, H.G. and Steiner, H. 1989. Purification of Cecropia phenoloxidase and four protein involved in its activation. Insect Biochem. 19: 629-638.
- Aso, Y., Kramer, K.J., Hopkins, T.L. and Lookhart, G.L. 1985. Characterization of haemolymph protyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta* (L.) Insect Biochem. 15: 9-17.
- Aspàn, A. and Söderhäll, K. 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect Biochem. 21: 363-373.
- Aspàn, A., Huang, T.S., Cerenius, L. and Söderhäll, K. 1995. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 92: 939-943.
- Ashida, M., Ishizaki, Y. and Iwahana, H. 1983. Activation of prophenoloxidase by bacterial cell walls or  $\beta$ -1, 3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113: 562-568.
- Ashida, M. 1971. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Arch. Biochem. Biophys. 144: 749-762.
- Bachère, E., Mialhe, E. and Rodriguez, J. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. Fish Shellfish Immunol. 5: 597-612.
- Bang, F.B. 1962. Serological aspects of immunity in invertebrate. Nature. 196: 88-89.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brivio, M. F., Mazzei, C. and Scari G. 1996. proPO system of *Allogamus auricollis* (Insecta): effects of various compounds on phenoloxidase activity. Comp. Biochem. Physiol. 113B: 281-287.

- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Palva, E.T., Iwanaga, S. and Söderhäll, K. 1994. Structure and biological activity of a 1,3- $\beta$ -D-Glucan-binding protein in crustacean blood. J. Biol. Chem. 269: 29462-29467.
- Chisholm, J.R.S. and Smith, V.J. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. 110A: 39-45.
- Cho, W.L., Liu, H.S., Lee, C.H., Kuo, C.C., Chang, T.Y., Liu, C.T. and Chen, C.C. 1998. Molecular cloning, characterization and tissue expression of prophenoloxidase cDNA from the mosquito *Amigeres subalbatus* inoculated with *Dirofilaria immitis* microfilaria. Insect Mol. Biol. 7: 31-40.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J. and Bachère, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J. Bio. Chem. 272: 18398-28406.
- Durrant, H.J., Ratcliffe, N.A., Hipkin, C.R., Aspàn, A. and Söderhäll, K. 1993. Purification of the pro-phenoloxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis*. Biochem. J. 289: 87-91.
- Duvic, B., and Söderhäll, K. 1990. Purification and characterization of a  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem. 265: 9327-9332.
- Ekpanithanpong, U., Supamattaya, K. and Boonyaratpalin, S. 1999. Separation of shrimp haemocytes (*Penaeus monodon*) and the opsonic effect of Serum on phagocytic activity. Asian Fisheries Sci. 12: 337-342.
- Evans, E.E., Cushing, J.E., Sawyer, S., Weinheimer, P.F., Acton, R.T. and McNeely, J.L. 1969a. Induced bactericidal response in the California spiny lobster, *Panulirus interruptus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132: 111-113.
- Evans, E.E., Painter, B., Evans, M.L., Weinheimer, P. and Acton, R.T. 1968. An induced bactericidin in the spiny lobster, *Panulirus argus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128: 394-397.



- Evans, E.E., Weinheimer, P.F., Painter, B., Acton, R.T. and Evans, M.L. 1969b. Secondary and tertiary responses of the induced bactericidin from the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriol. 98: 943-946.
- Flegal, T.W., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikomudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chantanachookhin, C., Vickers, J.E. and Macdonald, O.D. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In Fulks, W. and Main, K.L. (eds.), Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United states, pp. 57-112. Hawaii: The Oceanic Institute.
- Frizzo, A., Guidolin, L., Ballarin, L. and Sabbadin, A. 1999. Purification and partial characterization of phenoloxidase from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. Mar. Biol. 135: 483-488.
- Fujimoto, K., Masuda, K.I., Asada, N. and Ohnishi, E. 1993. Purification and characterization of phenoloxidase from pupae of *Drosophila melanogaster*. J. Biochem. (Tokyo). 113: 285-291.
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Iwanaga, S. and Ohnishi, E. 1995. Nucleotide sequence of the prophenoloxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 7769-7773.
- Gollas-Galvan, T., Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 117A : 419-425.
- Gollas-Galvan, T., Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) hemocytes. Comp. Biochem. Physiol. 122B: 77-82.
- Hall, J.E. and Rowland, D.T. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins I. Purification and physicochemical characterization. Biochemistry. 13 (4): 821-823.

- Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhäll, K. and Law, J.H. 1995. Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 7764-7768.
- Hall, M.R., and Van Ham, E.H. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. the World Aqua. Soci. 29: 290-299.
- Hara, T., Miyoshi, T. and Tsukamoto, T. 1993. Comparative studies of larval and pupal phenoloxidase of the housefly, *Musca domestica*. L. Comp. Biochem. Physiol. 106B: 287-292.
- Hernández-López, J., Gollas-Galvan, T. and Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 113A: 61-66.
- Hose, L.E., Lightner, D.V., Redman, R.M. and Donald, D.A. 1984. Observations on the pathogenesis of the imperfect fungus, *Fusarium solani*, in the Californian brown shrimp, *Penaeus californiensis*. J. Invert. Pathol. 44: 292-303.
- Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. Biol. Bull. 178: 33-45.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture. 164: 277-288.
- Jiang, H., Wang, Y., Ma, C. and Kanost, M.R. 1997a. Subunit composition of prophenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO-P1. Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 835-850.
- Jiang, H., Wang, Y., Korochkina, S.E., Benes, H. and Kanost, M.R. 1997b. Molecular cloning of cDNAs for two pro-phenol oxidase subunits from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 693-699.

- Johnson, P.T. 1987. A review of fixed phagocytic and pinocytic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. Dev. Comp. Immunol. 11: 679-704.
- Johansson, M.W. 1995. Cellular immune reaction in Crustaceans: method for *in vitro* studies. In Stolen, J.R., *et.al.* (eds.), Techniques in fish immunology-4, pp. 147-154. NJ, USA: SOS Publications.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. Insect. Biochem. 19: 183-190.
- Kawabata, S.-I., Muta, T., Iwanaga, S., 1996. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab. In: Söderhäll, K., Iwanaga, S. and Vasta, G.R. (eds.). New Directions in Invertebrate Immunology. SOS Publications, Fair Haven, pp. 255-283.
- Kawabata, T., Yasushara, Y., Ochiai, M., Matura, S. and Ashida, M. 1995. Molecular cloning of insect pro-phenoloxidase: a copper containing protein homologous to arthropod hemocyanin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 7774-7778.
- Klein, J. 1982. Immunology: The science of self-nonself discrimination. USA: A Wiley Interscience publication.
- Kopáček, P., Grubhoffer, L. and Söderhäll, K. 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharide from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Dev. Comp. Immunol. 17: 407-418.
- Kopáček, P., Weise, C. and Götz, P. 1995. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 1081-1091.
- Kwon, T.H., Lee, S.Y., Lee, J.H. Choi, J.S., Kawabata, S.I., Iwanaga, S. and Lee B.L. 1997. Purification and characterization of prophenoloxidase from the hemolymph of coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. Mol. Cells. 7: 90-97.
- Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology. 80: 393-412.

- Lee, H.S., Cho, M.Y., Lee, K.M., Kwon, T.H., Homma, K-I., Natori, S. and Lee, B.L. 1999. The pro-phenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor*, larvae was activated during cell clump / cell adhesion of insect cellular defense reactions. FEBS Lett. 444: 255-259.
- Lee, K.K., Chen, F.R. and Lui, P.C. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. Fish. Shellfish. Immunol. 5(5): 385-357.
- Lee, W.J., Ahmed, A., Torre, A., Kobayashi, A., Ashida, M. and Brey, P.T. 1998. Molecular cloning and chromosomal localization of a prophenoloxidase cDNA from malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Mol. Biol. 7: 41-50.
- Leonard, C., Ratcliffe, N.A. and Rowley, A.F. 1985. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. J. Insect Physiol. 31: 789-799.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. and Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish shellfish Immunol. 7: 227-234.
- Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., McKrell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. Inver. Pathol. 62: 308-315.
- McKay, D., Jenkin, C.R. and Rowley, D. 1969. Immunity in the invertebrates. I. Studies on the naturally occurring haemagglutinins in the fluid from invertebrates. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 47: 125-134.
- McKay, D. and Jenkin, C.R. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 48: 139-150.
- Muramoto, K. and Kamiya, H. 1986. The amino-acid sequence of a lactin of the acorn barnacle *Megabalanus rosa*. Biochem. Biophys. Acta. 874: 285-295.

- Muramoto, K. and Kamiya, H. 1989. The amino-acid sequence of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lactins. Biochem. Biophys. Acta. 1039: 42-51.
- Müller, H.M., Dimopoulos, G., Blass, C. and Kafatos, F.C. 1999. A hemocyte-like cell established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. J. Biol. Chem. 274: 11727-11735.
- Nappi, A.J. 1973. The role of melanization in the immune reaction of larvae of *Drosophila algonquin* against *Pseudeucoila bochei*. Parasitology. 66: 23-32.
- Nappi, A.J., Vass, E. Frey, F. and Carton, Y. 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. Eur. J. Cell Biol. 68: 450 - 456.
- Naqvi, S.N.H. and Karlson, P. 1979. Purification of the prophenoloxidase in the haemolymph of *Calliphora vicina* (R&D). Arch. Int. Physiol. Biochem. 87: 687-695.
- Noga, E.J., Arroll, T.A. and Fan, Z. 1996. Specificity and some physiochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. Fish Shellfish Immunol. 6: 403-412.
- Ochiai, M., and Ashida, M. 1988. Purification of a  $\beta$ -1, 3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 263: 12056 -12062.
- Ogata, K., Muramoto, M., Yamazaki, M. and Kamiya, H. 1983. Isolation and characterization of *Balanus balanoides* agglutinin. Bull. Jpn. Soc. Sci Fish. 49: 1371-1375.
- Park, D.S., Shin, S.W., Kim, M.G., Park, S.S., Lee, W.J., Brey, P.T. and Park, H.Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the prophenoloxidase of fall webworm, *Hyphantria cunea*. Insect Biochem. Mol. Biol. 27: 983-992.
- Paterson, W.D. and Stewart, J.E. 1974. *In vitro* phagocytosis by hemocytes of the American lobster (*Homarus americanus*). J. Fish. Res. Board Can. 31: 1051-1056.



- Perazzolo, L.M. and Barracco, M.A., 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunol. 21(5): 385-395.
- Persson, M., Cerenius, L. and Söderhäll, K. 1987. The influence of haemocyte number on the disease resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. J. Fish Diseases. 10: 471-477.
- Pick, E. and Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J. Immunol. Methods. 38: 161-170.
- Ratamäki, J., Durrant, H., Liang, Z., Ratcliffe, N.A., Duvic, B. and Söderhäll, K. 1991. Isolation of a 90 kDa protein from haemocytes of *Blaberus craniifer* which has similar properties to the 76kDa protein from crayfish haemocytes. J. Insect Physiol. 37: 627-634.
- Ratanapo, s. and Chulavatnatol, M. 1990. Monodin, a new sialic acid specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 97B: 515-520.
- Ratcliffe, N.A., Brookman, J.L. and Rowley, A.F. 1991. Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. Dev. Comp. Immunol. 15: 33-39.
- Ratcliffe, N.A., Leonard, C. and Rowley, A.F. 1984. Prophenoloxidase activation non-self recognition and cell cooperation in insect immunity. Science . 226: 557-559.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Inter. Rev. Cytology. 97: 183-350.
- Ravindranath, M.H., Higa, H.H., Cooper, E.L. and Paulson, J.C. 1985. Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. J. Biol. Chem. 260: 8850-8856.
- Reade, P.C. 1968. Phagocytosis in invertebrates. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46: 219-229.
- Rodriguez, J., and Le Moullac, G. 2000. State of art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture. 191: 109-119.

- Rowley, A.F. and Rahmet, M. 1990. Prophenoloxidase activation in the blood of *Leucophaea maderae* by microbial product and different strains of *Bacillus cereus*. J. Insect. Physiol. 36: 931-937.
- Simpson, B.K., Marshall, M.R. and Otwell, W.S. 1987. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. J. Agric. Food Chem. 35: 918-921.
- Smith, V.J. and Chisholm, J.R.S. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. Fish shellfish Immunol. 2: 1-31.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1983.  $\beta$ -1,3-glucan activation of crustaceans hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull. 164: 299-314.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15: 251-261.
- Smith, V.J. and Ratcliffe, N.A. 1981. Pathological change in the nephrocytes of the shore crab, *Carcinus maenas* following injection of bacteria. J. Invertebr. Pathol. 38: 113-121.
- Sindermann, C.J., 1990. Mechanisms of internal defense. In Principal disease of marine fish and shellfish. Vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. Academic press Inc. pp. 247-290.
- Söderhäll, K. 1981. Fungal cell wall  $\beta$ -1, 3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. Dev. Comp. Immunol. 5: 565-573.
- Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization- a recognition mechanism in arthropods? A review. Dev. Comp. Immunol. 6: 601-611.
- Söderhäll, K. and Smith, V.J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7: 229-239.

- Söderhäll, K., Rogener, W. Soderhall, I. Newton, R.P. and Ratcliffe, N.A.1988. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a  $\beta$ -1, 3-glucan. Insect. Biochem. 18: 323-330.
- Söderhäll, K. 1992. Biochemical and molecular aspect of cellular communication in arthropods. Bull. Zool. 59: 141 -151.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Fish Dis. 2: 3-23.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. and Johansson, M.W. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defenes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 712: 155-161.
- Söderhäll, K. and Hall, L. 1984. Lipopolysaccharide-induced actyivation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. Biochem. Biophys. Acta. 797: 99-104.
- Solis, N.B. 1988. Biology and ecology. In Solis N.B., J.H. Primavera, Ma.S.R. Licop, F.D. Apud, F. Piedad – Pascual and Ma.C.L. Baticados(eds). Biology and Culture of *Penaeus monodon* . pp. 3 – 36 Iloilo: Brackish Aquaculture Information System, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Phillipines.
- Song, Y.L. and Hsieh, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Dev. Comp. Immunol. 18: 201-209.
- Sritunyalucksana, K. 1995. Study of the humoral defense factors in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Master Thesis, Mahidol University.
- Sritunyalucksana, K. 2001. Characterisation of some immune gene in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Comprehensive summaries of Uppsala dissertation from the Faculty of Science and Technology. pp.45.

- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L. and Söderhäll, K. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 23: 179-186.
- Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 191, 53-69.
- Stewart, J.E., Arie, B., Zwicker, B. M. and Dingle, J.R. 1969. *Gaffkemia*, a bacterial disease of the lobster, *Homarus americanus*: effects of the pathogen, *Gaffkemia homari*, on the physiology of the host. Can. J. Microbiol. 15: 925-932.
- Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1972. Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interaction. Can. J. Microbiol. 18: 1499-1508.
- Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crustacean. Biol. 16: 278-284.
- Thörnqvist, P.-O. and Söderhäll, K. 1997. Crustacean immune reaction, a short review. In Flegel, T.W. and MacRae, I.H. (eds.). Diseases in asian aquaculture III, pp.203-218. Manila: Asian Fisheries Society.
- Valivittan, K., 1999. A method for detecting Dopaminechrome Isomerase activity on gels. Biotech. & Histochem. 74: 213-218.
- van de Braak, C.B.T., Faber, R. and Boon, J.H. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. Comp. Haematol. Internat. 6: 194-203.
- Vargas-Albores, F., Guzman, M.A. and Ochoa J.L. 1993a. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 104B: 407-413.

- Vargas-Albores, F., Guzman, M.A. and Ochoa, J.L. 1993b. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol. 106A : 299-303.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular responses. J. Mar. Biotechnol. 3:153-156.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. and Söderhäll, K. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by  $\beta$ -1, 3-glucan. Dev. Comp. Immunol. 20: 299-306.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification and comparison of  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). Comp. Biochem. Physiol. 116B: 453-458.
- Vargas-Albores, F. and Ochoa, J.L. 1992. Variation of pH, osmolality, sodium and potassium concentration in the haemolymph of sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. Comp. Biochem. Physiol. 102A: 1-5.
- Yeh, M.S., Chen, Y.L. and Tsai, I.H. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. Comp. Biochem. Physiol. 121B: 169-176.
- Weinheimer, P.F., Acton, R.T., Sawyer, S. and Evan, E.E. 1969. Specificity of the induced bactericidin of the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriol. 98: 947-948.
- Winder, A.J. and Harris, H. 1991. New assay for the tyrosine hydroxylase and DOPA oxidase activities of tyrosinase. Eur. J. Biochem. 198: 317-326.





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเหลวลูเรีย-เบอตันี (LB broth)

ทริปโตน	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารเหลว SOC

ทริปโตน	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม

สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 2.5 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 980 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้เติมสารละลายกลูโคส 2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ สารละลายแมกนีเซียม 2 โมลาร์ ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  20.33 กรัม และ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  24.65 กรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายกลูโคส และสารละลายแมกนีเซียมทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน

## 3. อาหารแข็ง LB Plate ที่มียาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน

ทริปโตน	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ปล่อยให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิซิลิน 50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปเทใส่จานเพาะเชื้อ

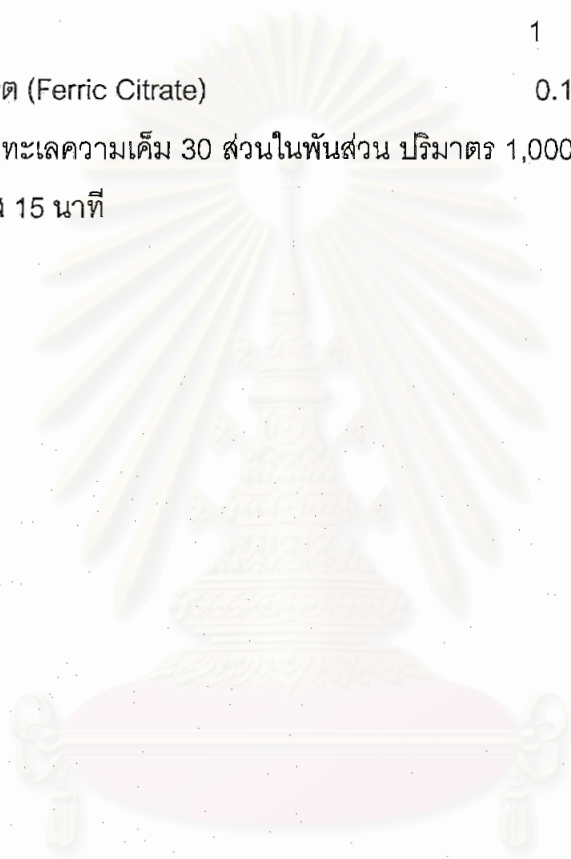
#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีน (Marine broth)

เปปโตน 5 กรัม

ยีสต์สกัด 1 กรัม

เฟอร์ริกซิเตรต (Ferric Citrate) 0.1 กรัม

ละลายในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

## สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

## 1. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10%

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

## 2. บัฟเฟอร์สำหรับเตรียมเซปาเรตติ้งเจล (separating gel) : Tris – HCl เข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 8.8

Tris	36.3	กรัม
------	------	------

ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้ พีเอช 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 โมลาร์ หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

## 3. บัฟเฟอร์สำหรับเตรียมสแตคกิงเจล (stacking gel) : Tris – HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8

Tris	6.0	กรัม
------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้ได้ พีเอช 6.8 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 โมลาร์ หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

## 4. อะคลิลาไมด์ – บิสอะคลิลาไมด์ เข้มข้น 30.8 %

อะคลิลาไมด์	30	กรัม
บิสอะคลิลาไมด์	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

## 5. โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต เข้มข้น 10%

โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

## 6. ทีเมด (TEMED) (N, N, N', N'-tetramethyl ethlenediamine)

สารละลายนี้สามารถสั่งซื้อได้ทั่วไป

## 7. เซปเรตติ้งเจล เข้มข้น 10 %

อะคริลาไมด์ – บิสอะคริลาไมด์ (29 :1)	3.33	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5.245	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์สำหรับเตรียมเซปาเรตติ้งเจล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต เข้มข้น 10%	100	ไมโครลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10 %	75	ไมโครลิตร
ทีเมด	3	ไมโครลิตร

## 8. สแตคกิงเจล เข้มข้น 3.85 %

อะคริลาไมด์ – บิสอะคริลาไมด์ (29: 1)	0.50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.43	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์สำหรับเตรียมสแตคกิงเจล	1.0	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต เข้มข้น 10%	40.0	ไมโครลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10 %	30.0	ไมโครลิตร
ทีเมด	3.0	ไมโครลิตร

## 9. บัฟเฟอร์สำหรับทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส : Tris-HCl เข้มข้น 0.25 โมลาร์, ไกลซีน

เข้มข้น 1.92 โมลาร์ และโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต เข้มข้น 1 % พีเอช 8.3

Tris	3.03	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต	1.0	กรัม

ละลายและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

## 10. บัฟเฟอร์สำหรับผสมกับตัวอย่าง (เข้มข้น 4 เท่า) : ทริส-ไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.0625

โมลาร์ พีเอช 6.8, โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต เข้มข้น 8 %, กลีเซอรอล เข้มข้น 40% และ โบรโมฟินอลบลู เข้มข้น 0.005%

โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต	0.8	กรัม
กลีเซอรอล	4.0	มิลลิลิตร
Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8	5.0	มิลลิลิตร
โบรโมฟินอลบลู	0.5	มิลลิกรัม



ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้น เติม 2- เมอร์แคปโตเอทานอล (2-ME) 1 มิลลิลิตร ต่อ 9 มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์สำหรับผสมกับตัวอย่าง

#### 11. สารละลายสี่ย้อม

คูแมสซีบีลเลียนท์บลู	0.25	กรัม
เมทานอล	45	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45	มิลลิลิตร

#### 12. สารละลายฟอกสี

กรดอะซีติก	100	มิลลิลิตร
เมทานอล	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

#### 13. บัฟเฟอร์สำหรับถ่ายโอนโปรตีนสู่เมมเบรน : Tris-HCl เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.3, ไกลซีน 150 มิลลิโมลาร์ และเมทานอล เข้มข้น 20%

Tris	1.211	กรัม
ไกลซีน	5.63	กรัม

ละลายและปรับให้มีปริมาตร 400 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น และเติมเมทานอล 100 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร

#### 14. โบรไมด์ ซีรัม อัลบูมิน เข้มข้น 1%

โบรไมด์ ซีรัม อัลบูมิน	1	กรัม
ละลายในสารละลาย PBS พีเอช 7.4 ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

#### 15. สับสเตรทสำหรับทำให้เกิดสี

3,3' ไดอะมิโนเบนซามิดีน (DAB)	0.054	กรัม
Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.6	2.5	มิลลิลิตร
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30%	0.5	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	50	มิลลิลิตร

## 16. สารละลายแมกนีเซียมเข้มข้น 2 โมลาร์

แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	20.33	กรัม
--	-------	------

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	24.65	กรัม
---	-------	------

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรน 0.2 ไมครอน

## 17. TE บัฟเฟอร์ พีเอช 8.0

Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 8.0	5	มิลลิลิตร
-------------------------------------	---	-----------

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0	1	มิลลิลิตร
--	---	-----------

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

## 18. สารละลาย GTE: กลูโคส เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, ทริสไฮโดรคลอริก เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0, สารละลาย EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0

กลูโคสเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร	2.27	มิลลิลิตร
--------------------------------------	------	-----------

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร	2	มิลลิลิตร
--	---	-----------

Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 8.0	2.5	มิลลิลิตร
-------------------------------------	-----	-----------

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 19. สารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ : โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 นอร์มอล, โซเดียมโคเดคซิลซัลเฟต เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มอล	2	มิลลิลิตร
-------------------------------------	---	-----------

โซเดียมโคเดคซิลซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	1	มิลลิลิตร
--	---	-----------

ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

## 20. ไปแทสเทียมอะซิเตต เข้มข้น 3 โมลาร์

ไปแทสเทียมอะซิเตต เข้มข้น 5 โมลาร์	60	มิลลิลิตร
------------------------------------	----	-----------

กรดอะซิติก	11.5	มิลลิลิตร
------------	------	-----------

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน

## 21. เอนไซม์ RNAase เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายเอนไซม์ RNAase A (จากตับอ่อน) 100 มิลลิกรัมใน Tris-HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ นำไปให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นช้าๆ ที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

## 22. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline, PBS)

โซเดียมคลอไรด์	8.0	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.44	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.24	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.3 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

## 23. สารละลายบัฟเฟอร์ cacodylate

โซเดียมคาโคดีเลต (sodium cacodylate)	10	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	450	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	26	มิลลิโมลาร์
ปรับพีเอชเป็น 7.3		

24. สารละลาย Hank Salt Solution ( $\text{H}_0$ )

Hank salt	1.902	กรัม
HEPES	0.520	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.220	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชเป็น 7.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

25. สารละลาย Hank Salt Solution (H<sub>1</sub>)

Hank salt	1.902 กรัม
HEPES	0.520 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.220 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.3528 กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์	1.0572 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชเป็น 7.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

## 26. สารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายสต็อก ดังนี้

## 26.1 สารละลายกรดซิตริก 0.1 โมลาร์

กรดซิตริก	21.01 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

## 26.2 สารละลายโซเดียมซีเตรต 0.1 โมลาร์

โซเดียมซีเตรต	29.41 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 26.1 และ 26.2 ผสมกัน ดังนี้

พีเอช	สารละลายกรดซิตริก 1.0 โมลาร์	สารละลายโซเดียมซีเตรต 0.1 โมลาร์
3.0	46.5 มิลลิลิตร	3.5 มิลลิลิตร
4.0	33.0 มิลลิลิตร	17.0 มิลลิลิตร
5.0	20.5 มิลลิลิตร	29.5 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

## 27. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายสต็อก ดังนี้

27.1 สารละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.0 โมลาร์		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		268.03	กรัม
น้ำกลั่น		1,000	มิลลิลิตร
27.2 สารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1.0 โมลาร์		
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$		156.01	กรัม
น้ำกลั่น		1,000	มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 27.1 และ 27.2 ผสมกันดังนี้

พีเอช	สารละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1.0 โมลาร์	สารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1.0 โมลาร์
6.0	12.0 มิลลิลิตร	88.0 มิลลิลิตร
7.0	57.7 มิลลิลิตร	42.3 มิลลิลิตร

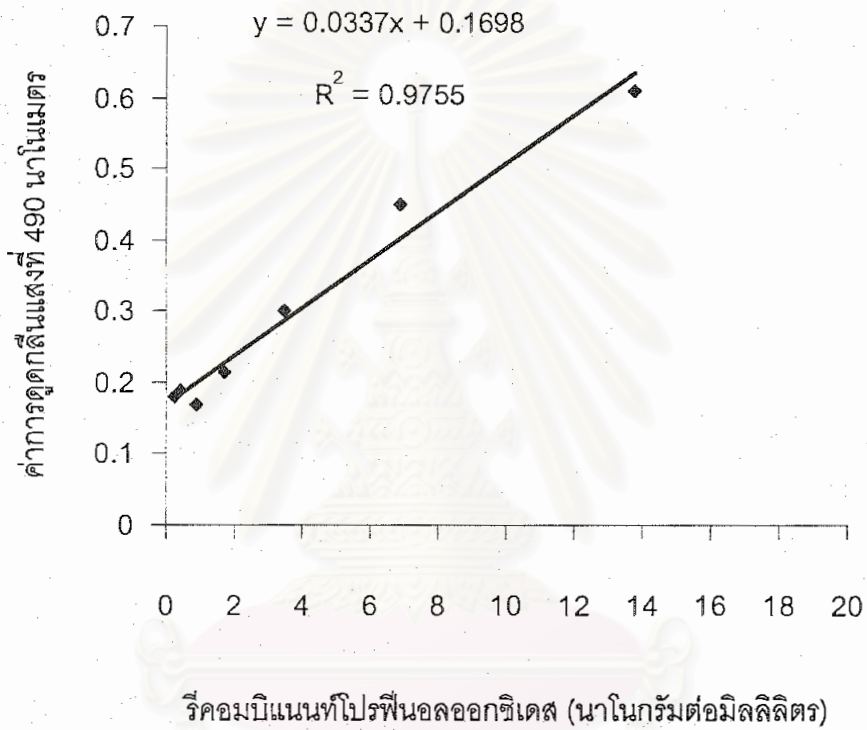
ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ค

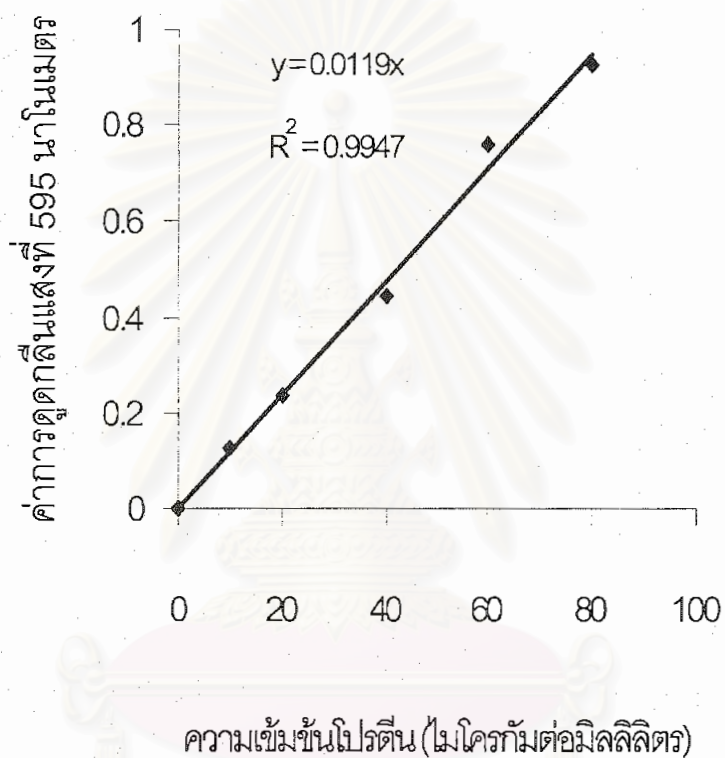
## กราฟมาตรฐานรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกซิดีส โดยวิธี ELISA



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

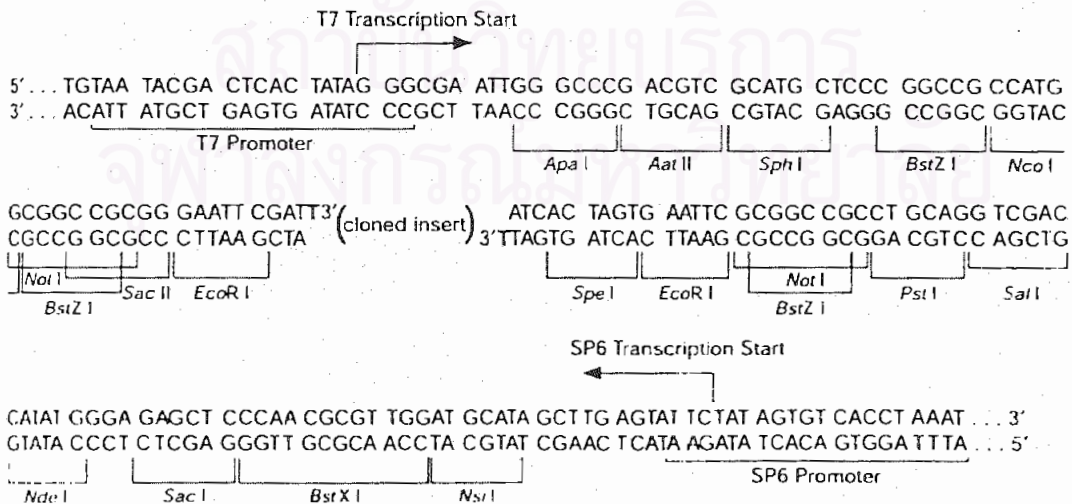
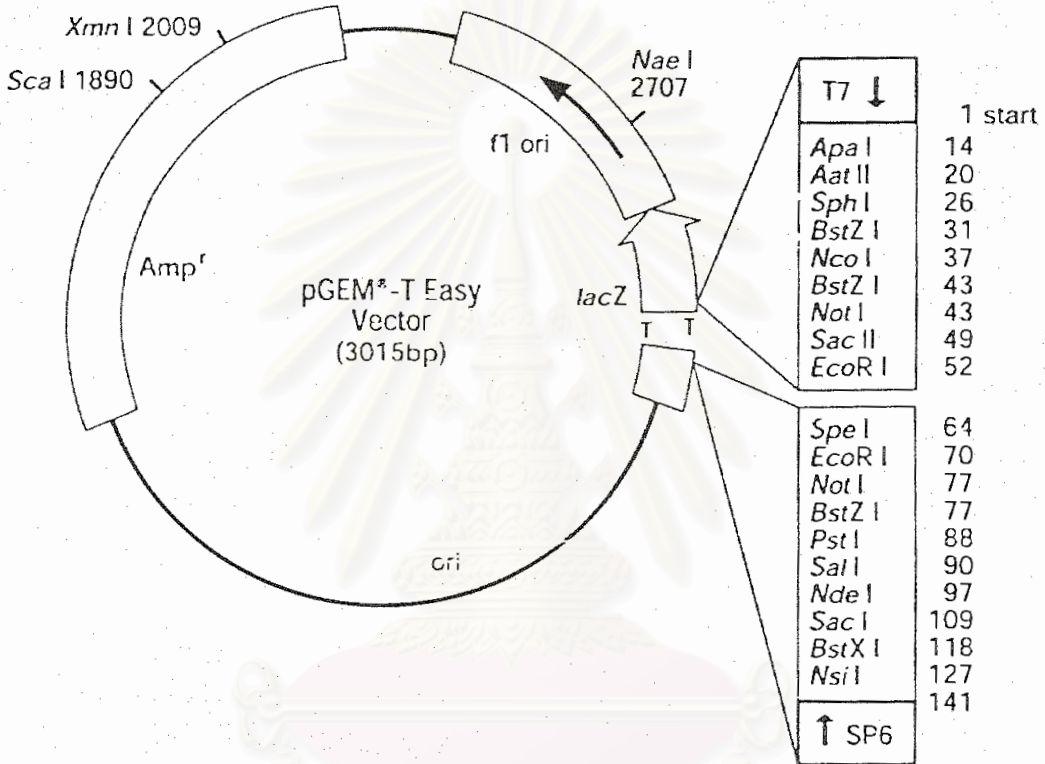
## ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานโปรตีน (bovine serum albumin) โดยวิธี Bradford

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

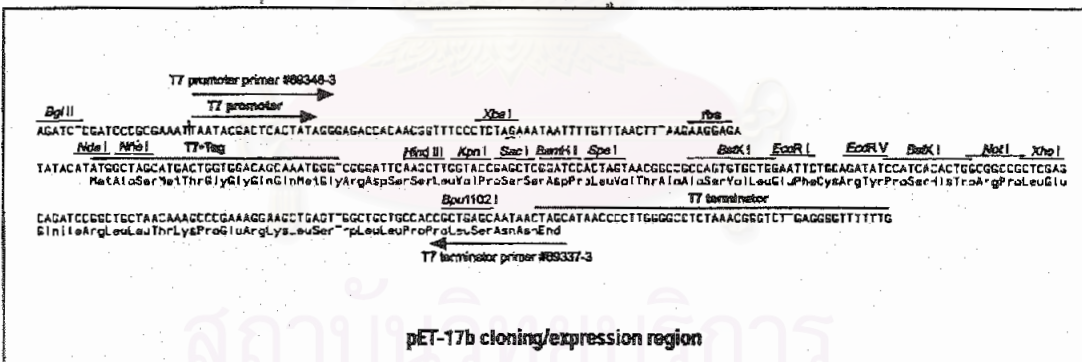
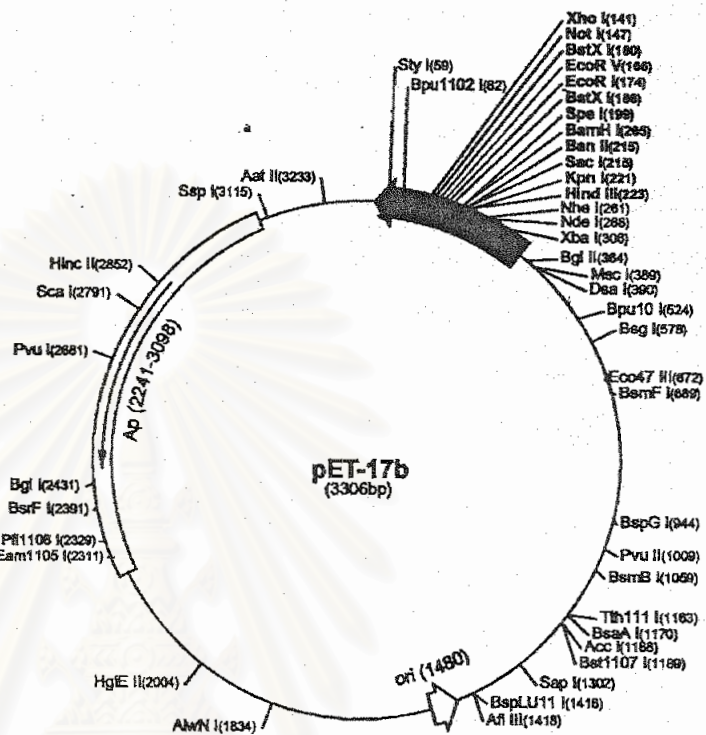
ภาคผนวก จ  
 แผนผังของเวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup> T-easy



2. เวกเตอร์ pET17b

pET-17b sequence landmarks	
T7 promoter	333-349
T7 transcription start	332
T7*Tag coding sequence	237-269
Multiple cloning sites (Hind III - Xho I)	141-228
T7 terminator	28-74
pBR322 origin	1480
bla coding sequence	2241-3098



pET-17b cloning/expression region

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชัยชาญ ไตรศรีศิลป์ เกิดวันพฤหัสบดีที่ 11 ธันวาคม พ.ศ. 2518 ที่กรุงเทพมหานคร เข้ารับการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และตอนปลายที่โรงเรียนทวีธาภิเศก เขตบางกอกใหญ่ กรุงเทพมหานคร และสอบเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาและเข้ารับพระราชทานปริญญาบัตรในปีการศึกษา 2539 หลังจากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2542 และได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปี พ.ศ.2543



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย