

การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาราช ครั้งที่ 2

The 2nd STOU Graduate Research Conference

ผลของยีน Phagocytosis Activating Protein (PAP) ต่อการรอดชีวิต

ในสภาวะเครียดในกุ้งขาว (*Litopenaeus Vannamei*)

The Effect of Phagocytosis Activating Protein (PAP) Gene on the Survival Rate in Stress of White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*)

นายอิลฮาม สือรี (Ilham Sueree)* วิลาวรรณ โชติเกียรติ (Wilaiwan Chotigeat)**

ปัญชลิกา เดชะมาก (Panchalika Deachamag)***

บทคัดย่อ

ยีน Phagocytosis Activating Protein (PAP) ผลิตโปรตีน PAP ซึ่งกระตุ้นการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว การศึกษานี้ศึกษาผลของยีน PAP ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งโดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพรเฟโนออกซิเดส (prophenoloxidase activity) และผลของยีน PAP ต่อความสามารถในการอยู่รอดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียด

ให้กุ้งกินอาหารผสมสารละลาย PBS (กลุ่ม PBS), พลาสมิด phMGFP (กลุ่ม phMGFP) และพลาสมิดรวมผสม PAP-phMGFP (กลุ่ม PAP)

จากการทดลองพบว่ากลุ่ม PAP มีกิจกรรมของเอนไซม์โพรเฟโนออกซิเดสในวันที่ 1, 3 และ 7 เท่ากับ 64.16 ± 8.73 , 60.33 ± 8.34 และ 35.39 ± 3.90 หน่วยต่อเนื้อที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม phMGFP ในวันที่ 1, 3 และ 7 วัน (50.09 ± 5.65 , 34.87 ± 7.06 และ 25.03 ± 1.27 หน่วยต่อเนื้อที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) และเมื่อให้กุ้งที่เลี้ยงในสภาวะเครียด (โดยเลี้ยงในน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกง (NaCl)) กินอาหารดังกล่าวแล้วข้างต้นเช่นเดียวกัน เป็นเวลา 7 วันพบว่ากุ้งที่ได้รับยีน PAP ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อวัน มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่ปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ (66.67%)

Abstract

Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene encodes PAP protein which activates haemocyte phagocytosis in shrimp. This study aims to investigate the effect of PAP DNA on immune response in White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) via Prophenoloxidase activity. In addition, the effect of PAP DNA to enhance the survival rate of the shrimp under stress environment was also investigated.

The shrimp were fed with pellet mixed with PBS (PBS group), phMGFP vector (phMGFP group) and PAP-phMGFP (PAP group). Then the hemolymph was taken on day 1, 3 and 7 after feeding to determine the Prophenoloxidase activity. The results showed the Prophenoloxidase activity of PAP group on day 1, 3 and 7 were 64.16 ± 8.73 , 60.33 ± 8.34 and 35.39 ± 3.90 , respectively that increased significantly when compared to phMGFP group on day 1, 3 and 7 (50.09 ± 5.65 , 34.87 ± 7.06 and 25.03 ± 1.27 , respectively).

In addition, the shrimp which cultured in stress environment (NaCl added water) were also fed with pellets as previously described above for 7 days and the survival rate was observed. And found that the shrimp fed with the feed mixed with 150 ug of PAP per day, had the highest survival rate (66.67%) in stress environment when compared to the other groups.

คำสำคัญ โพรเฟโนออกซิเดส, กุ้งขาว, สภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียด

Keywords: Prophenoloxidase, White shrimp, Stress environment

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ilhamseri@gmail.com

** รองศาสตราจารย์ ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ wilaiwan58@hotmail.com

*** นักวิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ deachamag@hotmail.com

บทนำ

กุ้ง (Shrimp) นับเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก การเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อการบริโภคและส่งออกทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมหาศาล โดยเฉพาะประเทศในแถบทวีปอเมริกา เช่น เอกวาดอร์ บราซิล ฮอนดูรัส และเม็กซิโก นั้นมีส่วนของผลผลิตกุ้งประมาณร้อยละ 20 จากผลผลิตโดยรวมทั่วโลก (Lightner, 2011) โดยกุ้งชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงหลักๆ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*), กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*), กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) และกุ้งน้ำจืดออสเตรเลีย (*Metapenaeus endeavouri*) เป็นต้น เอเชียก็เป็นทวีปหนึ่งที่ทำรายได้จากการส่งออกกุ้งเป็นจำนวนมหาศาลต่อปี โดยประเทศไทยเป็นประเทศผู้ค้ารายสำคัญที่มีปริมาณการส่งออกกุ้งไปขายยังต่างประเทศมากเป็นอันดับต้นๆ ของเอเชีย ทำรายได้ให้กับประเทศมากกว่าพันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี (Flegel, 2006) กุ้งขาวหรือกุ้งแวนนาไมนับเป็นสายพันธุ์กุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมากขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 จนกระทั่งปี พ.ศ. 2548 ได้มีการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้มากถึงร้อยละ 80 ของการเพาะเลี้ยงกุ้งทุกชนิด แทนที่กุ้งกุลาดำซึ่งเคยเป็นที่นิยมมาก แต่ต้องประสบปัญหากุ้งโตช้า และให้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน อีกทั้งกุ้งขาวซึ่งมีคุณสมบัติเลี้ยงง่าย โตเร็ว และให้ผลผลิตสูง จึงเป็นที่นิยมของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในไทย (นิติ และคณะ, 2549)

ต่อมาพบว่ามีกระบาดของโรคหลายชนิดที่เป็นเหตุให้กุ้งตาย และสร้างความเสียหายให้กับฟาร์มกุ้งได้มาก โดยสาเหตุเกิดจากความสัมพันธกันระหว่างสภาพแวดล้อมและเชื้อก่อโรค เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค จำนวนของเชื้อ ชนิดของเชื้อ รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของกุ้ง ซึ่งจะส่งผลต่อความรุนแรงของโรคไปด้วย (Snieszko, 1973 อ้างโดย วิรุทธ, 2553) ในประเทศไทยมีการรายงานว่า เชื้อชนิดแรกที่พบในกุ้งคือไวรัสที่มีชื่อว่า Yellow-head Virus (YHV) หรือไวรัสหัวเหลือง ซึ่งเริ่มระบาดในช่วงปี ค.ศ. 1992 (Flegel, 2006) และนับแต่นั้นเป็นต้นมาก็มีเชื้อก่อโรคในกุ้งชนิดอื่นๆ ตามมาอีกหลายชนิด เช่น ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon Baculovirus, MBV), ไวรัสเฮปาทิ (Hepatopancreatic parvovirus, HPV), ไวรัสเทารา (Taura syndrome virus, TSV), ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) รวมถึงแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio*) เป็นต้น

ปัจจุบันความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล (Molecular biology) มีมากและแพร่หลายยิ่งขึ้น ความเข้าใจในเรื่องราวของ บทบาทและหน้าที่ของชีวโมเลกุลบางชนิดโดยเฉพาะดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) หรือยีน (Gene) ต่อสิ่งมีชีวิตนั้นนับว่าสำคัญยิ่ง งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษา ยีน Phagocytosis Activating Protein หรือ PAP (GenBank accession no. AY680836) ซึ่งถูกแยกได้ครั้งแรกจาก Haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Khimmakthong et al., 2011 ; Deachamag et al., 2006) โดยถูกตั้งชื่อตามบทบาทของยีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) (Deachamag et al., 2006) ซึ่งเป็นกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Innate immunity) โดยเซลล์ที่เกี่ยวข้องเช่น macrophage, neutrophil และเซลล์อื่นๆอีก จะทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยการจับกิน เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร ที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ โดยนำสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพเหล่านั้นมาย่อยสลายโดย lysosome ซึ่งมีเอนไซม์ hydrolytic อยู่มาก (Harrison and Grinstein, 2002 ; Greenberg, and Grinstein, 2002) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดโดยการบ่มเซลล์กับ Glutathione-S-transferase-PAP หรือ GST-PAP จะมีผลให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดการฟาโกไซโทซิสสูงขึ้น และมีผลทำให้กุ้งมีภาวะด้านทานต่อสิ่งแปลกปลอมที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย (Deachamag et al., 2006) อีกทั้งยังพบว่า PAP มีปฏิสัมพันธ์กับ alpha-2-macroglobulin (α 2M) ในการช่วยให้ GST-PAP สามารถเข้าสู่เซลล์ฟาโกไซโทซิส และนำไปสู่การลดอัตราการตายของกุ้งเมื่อติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (Chotigeat et al., 2007) ยีน PAP มีความเหมือน (Homology) อย่างสูงกับไรโบโซมอลโปรตีนแอล 26 (Ribosomal

protein L26, RPL26) ในกึ่ง *Penaeus Japonicus* (Watanabe, 1998 อ้างโดย Chotigeat et al., 2007) และ *Mus musculus* (Chotigeat et al., 2007) นอกจากนี้ RPL26 ยังสามารถจับกับส่วน 5'UTR ของยีน p53 ซึ่งเป็นยีนที่ยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งโดยอาศัยกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) โดย RPL26 จะเป็นตัวกระตุ้น (activator) ให้ p53 มีการแสดงออกที่สูงขึ้นกว่าปกติ (Takagi et al., 2005) และมีรายงานว่า RPL26 มีการแสดงออก สูงในกล้ามเนื้อของกึ่งกุลาค่าเมื่อถูกฉีดด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ถูกทำให้อ่อนแรงด้วยฟอร์มาลิน (formalin-inactivated WSSV) (Deachamag et al., 2006) จึงเป็นที่มาของการศึกษาว่ายีน PAP จะมีผลอย่างไรต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Cellular immunity) ของกึ่งขาว โดยเลือกศึกษาาระดับกิจกรรมของเอนไซม์โพรเฟโนลออกซิเดส (Prophenoloxidase) ซึ่งที่พบพบในกระบวนการสร้างเมลานิน (Melanin) พบได้ทั้งในแมลง และครัสเตเชีย กระบวนการจะเริ่มต้นด้วยการทำงานของเอนไซม์โพรเฟโนลออกซิเดส แอกติเวติง (Prophenoloxidase-activating enzyme, PPA) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซอรีน โปรตีเอส (Serine protease) ถูกสร้างจากเซลล์เม็ดเลือด มีขนาดโปรตีน 76 กิโลดาลตัน (Johansson and Soderhall, 1989 อ้างโดย Bachere et al., 1995) ถูกกระตุ้นการทำงานโดยโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย เบต้า 1-3 กลูแคน (β -1,3 glucan) และไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ที่มาจากผนังเซลล์ของจุลชีพ จากนั้นเอนไซม์จะไปกระตุ้นให้เซลล์เซมิกรานูลาร์ และเซลล์กรานูลาร์ ปลดปล่อยส่วนกรานูล (Degranulation) โดยจะมีการปล่อยเพอรอกซิเนคติน (Peroxinectin, PE) ซึ่งมีการสร้างและเก็บไว้ภายในกรานูลออกมาออกเซลล์ แล้วไปทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการโพรเฟโนลออกซิเดสให้เกิดขึ้นต่อไป (Chiu et al., 2007) ในระหว่างกระบวนการจะมีการสังเคราะห์สารควิโนน (Quinone) ซึ่งเป็นสารพิษต่อสิ่งแปลกปลอม (Mavrouli et al., 2005) รวมทั้งมีการกระตุ้นให้เกิดการฟาโกไซโทซิสโดยเซลล์ไฮาลินด้วย โพรเฟโนลออกซิเดสจะถูกยับยั้งโดย Proteinase inhibitor ได้แก่ α -2-macroglobulin และ Trypsin inhibitor (Johansson and Soderhall, 1989 อ้างโดย Bachere et al., 1995) มีรายงานว่า α -2-macroglobulin มีการแสดงออกลดลงในสภาวะแวดล้อมที่ทำให้การแสดงออกของโพรเฟโนลออกซิเดสสูงขึ้น (Yue et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าโพรเฟโนลออกซิเดสจะทำงานร่วมกันกับระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ชนิดอื่นๆ ซึ่งได้แก่ กระบวนการฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) การสร้างโนดูล (Nodulation) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (Encapsulation) (กิจการ, 2543 อ้างโดย วิรุทธ, 2553) และอาจจะมีส่วนต่อเนื่องไปถึงการปรับตัวของกึ่งขาวเพื่อให้มีชีวิตรอดในสภาวะแวดล้อมที่เป็นแรงกดดันเชิงลบได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของยีน PAP ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งขาว และอีกส่วนคือความสามารถในการอยู่รอดเมื่อกึ่งขาวต้องอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่ปกติ ทั้งนี้เพื่อต่อยอดในการรักษาจากโรคต่างๆ โดยเฉพาะที่เกิดจากจุลชีพชนิดต่างๆต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพรเฟโนลออกซิเดสในกึ่งขาวที่ได้รับยีน Phagocytosis Activating Protein (PAP) เมื่อเทียบกับกึ่งขาวที่ไม่ได้รับยีนดังกล่าว
2. เพื่อศึกษาผลของยีน Phagocytosis Activating Protein (PAP) ต่ออัตราการรอดชีวิตของกึ่งขาวในสภาวะแวดล้อมที่ไม่ปกติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพิ่มปริมาณยีน PAP และการผลิตอาหารกุ้งที่ฉาบด้วยยีน PAP

2. นำแบคทีเรีย *E.coli* Top10 (BL21) ที่มีพลาสมิดลูกผสม PAP-phMGFP มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LB agar) ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของ *E.coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (LB broth) ปริมาตร 100 มิลลิตร ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เชื้อที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เมื่อได้ตะกอนเซลล์แล้วจึงทำการละลายด้วยสารละลาย PBS, pH 7.4 จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) จนสารละลายที่มีเซลล์ดังกล่าวปั่นใส เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันก็ทำการเก็บเชื้อจาก LB broth ปริมาตร 100 มิลลิตร มาจำนวน 1 มิลลิตร ไปทำการสกัดพลาสมิด และนำไปทำการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 1% เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ (volt) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อม (stain) ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปล้างสีออก (destain) ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปดูภายใต้แสงยูวี (UV) แล้วทำการถ่ายภาพเก็บไว้ นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นแล้วทำการคำนวณกลับไปยังเซลล์ทั้งหมดเพื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอแบบหยาบๆ

3. นำอาหารกุ้งที่มีลักษณะเป็นเม็ดมาบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำสารละลายใส่ที่ผ่านการ sonicate ดังที่ได้กล่าวก่อนหน้านี้มาผสมให้เข้ากันกับอาหารกุ้ง โดยแบ่งเป็นอาหารผสมพลาสมิดลูกผสม PAP-phMGFP, อาหารผสม phMGFP และอาหารผสม PBS ทำการบดอาหารให้เป็นเม็ดโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิตร ตากอาหารให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1 เตรียมตัวอย่างกุ้งขาว นำกุ้งขาวขนาดน้ำหนัก 10 กรัม ที่ได้จากฟาร์มใน อ.ระโนด จ.สงขลา มาพักเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 60x85 ซม. โดยเลี้ยงในน้ำทะเลที่เจือจางด้วยน้ำจืดกระทั้งมีความเค็มเท่ากับ 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) โดยให้ออกซิเจนตลอดเวลา เป็นเวลาอย่างน้อย 5 วัน ทั้งนี้เพื่อให้กุ้งปรับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่างๆ

3.2 ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โพรทีนอลออกซิเดส นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในน้ำทะเลที่เจือจางด้วยน้ำจืดกระทั้งมีความเค็มเท่ากับ 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) โดยเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50x30 ซม. และให้ออกซิเจนตลอดเวลา ทำการให้อาหารที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 ให้กุ้งกินในอัตราส่วน 0.3 กรัมอาหารต่อตัวต่อวัน เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน จากนั้นทำการดูดเลือดกุ้งแล้วผสมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ CAC (10mM Sodium cacodylate, 0.45M NaCl, 10mM CaCl₂ และ 0.26M MgCl₂) ที่ pH 7.0 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิตร เจาะไปตรงบริเวณขาตู้ที่ 3 ของกุ้ง จากนั้นนำไปทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) ทำครั้งละ 5 วินาที แล้วพัก 30 วินาที จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ต่างๆที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ใส่หลอดใหม่

3.3 ทำการหาปริมาณโปรตีนจากสารละลายส่วนใสที่ได้โดยใช้วิธี Lowry โดยนำสารละลายส่วนใสที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 100 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย A ประกอบด้วยสารละลาย Copper tartrate carbonate (0.1% (w/v) CuSO₄·5H₂O, 2% (w/v) NaCO₃, 1% (w/v) Sodium tartrate), 5% (w/v) SDS และ 0.8 M NaOH ในอัตราส่วน 1 : 2 : 1 ตามลำดับ ให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น

เวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย 2 N Folin และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 5 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD₇₅₀) ในขณะที่เดียวกันทำการหาความสัมพันธ์ของ OD กับโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) ที่ระดับความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายส่วนใส ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส} = \left[\frac{\text{ค่า OD ของสารละลายส่วนใส}}{\text{ค่าความสัมพันธ์ของ OD กับโปรตีนมาตรฐาน BSA}} \times \frac{100}{1000} \right] = \text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)}$$

ในขณะที่เดียวกันทำการหากิจกรรมของเอนไซม์โพर्फิรินออกซิเดสโดยนำส่วนใสปริมาตร 70 ไมโครลิตร มาบ่มกับสารละลายทริปซิน (Trypsin) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมด้วยสารละลาย DOPA (Dihydroxy-L-phenylalanine) แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (OD₄₉₀) โดยการวัดค่า OD ทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าความสัมพันธ์ของค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไปต่อหน่วยเวลา โดยค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1 หน่วย คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โพर्फิรินออกซิเดส ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โพर्फิรินออกซิเดส} = \frac{(\text{ค่าความสัมพันธ์ของ OD ต่อหน่วยเวลา}) \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใส}} = \text{กิจกรรมของเอนไซม์โพर्फิรินออกซิเดส (หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)}$$

การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติแบบ One-Way ANOVA (F-test) โดยใช้การเปรียบเทียบข้อมูลตามวิธีการของ Scheffe (Byrkit, 1975) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

3.4 ทดสอบการรอดชีวิตของกุ้งขาวในสภาวะแวดล้อมที่ไม่ปกติ นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในตู้ขนาด 50x30 ซม. โดยเลี้ยงในน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกง (NaCl) แทนน้ำทะเลจริง ปรับให้ความเค็มของน้ำเท่ากับ 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) แล้วทำการให้อาหารที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 แก่กุ้งตลอดการทดลอง 7 วัน บันทึกอัตราการตาย แล้วคำนวณอัตราการรอดชีวิต (relative percentage survival, RPS) จากสูตรดังนี้

$$RPS = \left[1 - \frac{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของกลุ่ม positive}} \right] \times 100$$

(Amend, 1981 อ้างโดย Li et al., 2005)

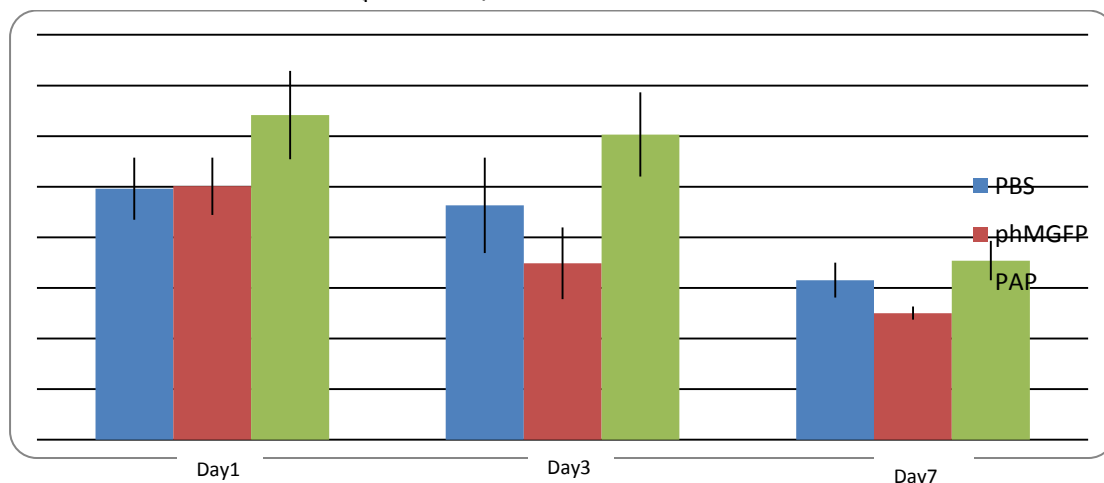


รูปที่ 1 แสดงแผนการทดลองทั้งหมดในครั้งนี้

ผลการวิจัย

1. ผลของยีน PAP ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพฟีนออกซิเดส

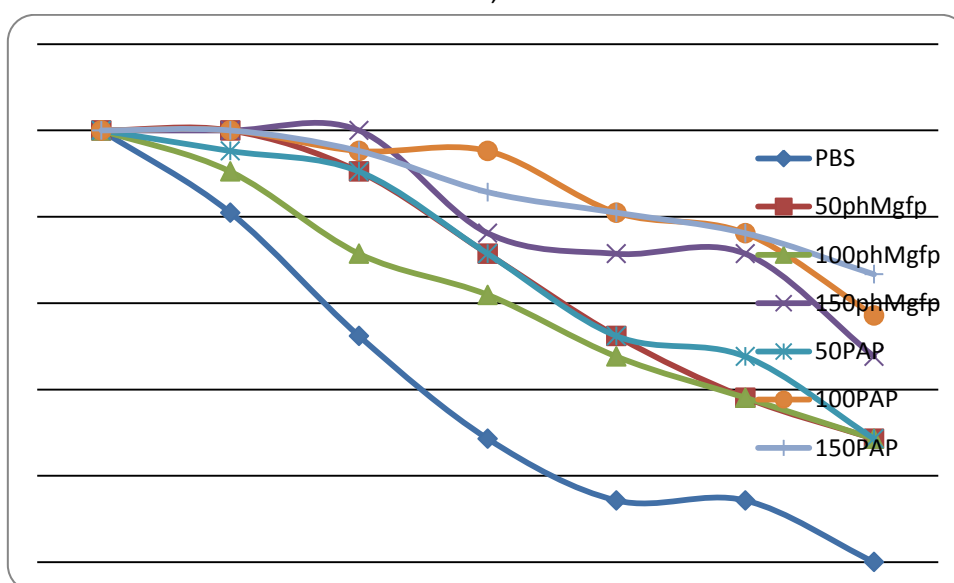
จากการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์โพฟีนออกซิเดสในกุ้งขาว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น กุ้งที่ให้อาหารผสมสารละลาย PBS (กลุ่ม PBS), อาหารผสมเวกเตอร์เปล่า phMGFP (กลุ่ม phMGFP) และอาหารผสม โปรตีนลูกผสม PAP-phMGFP- (กลุ่ม PAP) ในวันต่างๆ พบว่า ในวันที่ 1 กลุ่ม PAP มีการแสดงออกของเอนไซม์โพฟีนออกซิเดส (64.16 ± 8.73 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) สูงกว่ากลุ่ม PBS (49.62 ± 6.13 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) และกลุ่ม phMGFP (50.09 ± 5.65 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม PBS และ phMGFP ส่วนในวันที่ 3 กลุ่ม PAP มีการแสดงออกของเอนไซม์โพฟีนออกซิเดส (60.33 ± 8.34 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) สูงกว่ากลุ่ม phMGFP (34.87 ± 7.06 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม PAP และกลุ่ม PBS (46.31 ± 9.42 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) และระหว่างกลุ่ม PBS และ phMGFP และสุดท้ายในวันที่ 7 กลุ่ม PAP มีการแสดงออกของเอนไซม์โพฟีนออกซิเดส (35.39 ± 3.90 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) สูงกว่ากลุ่ม phMGFP (25.03 ± 1.27 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม PAP กับกลุ่ม PBS (31.53 ± 3.46 หน่วยต่อนาโนกรัมโปรตีน) และระหว่างกลุ่ม PBS กับ phMGFP



รูปที่ 2 แสดงผลการแสดงออกของเอนไซม์โพฟีนออกซิเดส (proPO) ของแต่ละกลุ่มการทดลองในวันต่างๆ (n=5)

2. ผลของยีน PAP ต่อการรอดชีวิตของกุ้งขาวในสภาวะเครียด

ภายในระยะเวลา 7 วัน กุ้งขาวที่เลี้ยงไว้ในน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกลที่ความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) พร้อมทั้งให้อาหารในกลุ่มต่างๆตลอดการทดลอง (ppt) มีอัตราการรอดชีวิตในแต่ละกลุ่มการทดลองแตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมสารละลาย PBS (กลุ่ม positive) ให้อัตราการรอด 0 เปอร์เซ็นต์, กลุ่มที่ให้กินอาหารผสมเวกเตอร์ phMGFP ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 28.57%, 28.57% และ 47.62% ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมดีเอ็นเอลูกผสม PAP-phMGFP ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 28.57%, 57.14% และ 66.67 % ตามลำดับ



รูปที่ 3 แสดงอัตราการตายของกุ้งขาวในแต่ละวันเป็นเวลา 7 วัน (3N, N = 7)

อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่า PAP สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบโพธิ์นอลออกซิเดสได้ โดยเฉพาะในวันที่ 1 และ 3 ซึ่งกลุ่มกุ้งที่ได้รับยีน PAP จะมีการแสดงออกของโพธิ์นอลออกซิเดสค่อนข้างสูง อีกทั้งยังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ได้รับเวกเตอร์เปล่า phMGFP ในวันที่ 1, 3 และ 7 และการแสดงออกของโพธิ์นอลออกซิเดสมีแนวโน้มลดลงในวันที่ 7 ในทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากุ้งอาจเกิดความเครียดจากปัจจัยต่างๆ เช่น คุณภาพของน้ำที่เริ่มเสียจากการตายจากกุ้งบางตัว หรือจากเศษอาหารที่ตกค้างจากการกินของกุ้ง ของเสียจากกุ้ง รวมถึงระยะเวลาที่กุ้งอยู่ในสภาพแวดล้อมดังกล่าว โดยมีหลายรายงานที่ระบุถึงปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต โดย Vergheze และคณะ (2007) รายงานว่าสภาวะแวดล้อมแบบสุดขีด (extreme environmental) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง spiny lobster (*Panulirus homarus*) เพื่อเตรียมพร้อมต่อการบุกรุกของเชื้อโรค และจากงานวิจัยของ Li และคณะ (2010) ที่กล่าวว่า ความเครียดของกุ้งขาวที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* และความเค็มของน้ำที่ต่ำกว่าปกติ ล้วนมีผลให้ความต้านทานในกุ้งลดลง รวมทั้งผลการศึกษาของ Yue และคณะ (2010) ที่พบว่าปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มสูงขึ้นจากปกติมีผลให้ความต้านทานในปู swimming crab (*Portunus trituberculatus*) ลดลงอย่างมาก

ในการทดลองต่อมาเราได้จำลองสถานะน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกง (NaCl) มาใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาทะเลจิ้งที่มียุงประกอบของธาตุชนิดต่างๆ มากมาย รวมทั้งมีแพลงก์ตอนทั้งพืชและสัตว์อีกด้วย ซึ่งเป็นสภาวะแวดล้อมปกติสำหรับการดำรงชีพของสัตว์ทะเลทั่วไปรวมทั้งกุ้งขาวด้วย ซึ่งแตกต่างจากน้ำที่ละลายด้วยเกลือแกง ซึ่งสูญเสียธาตุชนิดต่างๆ ไป โดยสามารถแบ่งแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับกุ้งขาวได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ macro mineral เป็นธาตุหลักชนิดที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณมากเช่น แคลเซียม (Ca), คลอรีน (Cl), แมกนีเซียม (Mg), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K) และโซเดียม (Na) อีกชนิดหนึ่งคือ micro mineral หรือธาตุรองได้แก่ ทองแดง (Cu), เหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn) และซีลีเนียม (Se) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณน้อย ซึ่งทั้งธาตุหลักและรองต่างก็มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง การสร้างเปลือก การเจริญเติบโต รวมทั้งพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (บุญรัตน์, 2550) จึงกล่าวได้ว่าการเลี้ยงกุ้งขาวในสภาพที่มีเพียง NaCl นั้นเป็นสภาวะแวดล้อมที่ไม่ปกติสำหรับกุ้ง ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดได้ และไม่สามารถดำรงชีวิตได้อย่างปกติ ซึ่งจากการทดลองที่ได้นี้ก็ยืนยันได้ว่า กุ้งขาวที่อยู่ในภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยยีน PAP นั้น มีความสามารถในการดำรงชีวิตในสภาวะแวดล้อมของน้ำที่ไม่ใช่ทะเลแตกต่างกัน โดยกุ้งขาวในกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมสารละลาย PBS จะเป็นกุ้งที่อยู่ในภาวะที่ภูมิคุ้มกันไม่ถูกกระตุ้น ส่งผลให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งขาวในกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมเวกเตอร์ pHMGFP และพลาสมิดลูกผสม PAP-pHMGFP ต่างให้อัตราการรอดชีวิตในทั้งสองกลุ่มที่เป็นบวกและแตกต่างกันไป ซึ่งบ่งบอกว่ากุ้งขาวทั้งสองกลุ่มอยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากกว่าปกติ ทั้งนี้เราทราบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียนั้นมี lipopolysaccharide ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Deachamag et al., 2006) โดยการทดลองครั้งนี้เราให้กุ้งกินอาหารที่ผสมสารละลายส่วนใสที่มีทั้งยีน PAP รวมถึงแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เป็นผลให้กุ้งขาวในกลุ่มที่กินอาหารผสมเวกเตอร์ pHMGFP ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน ซึ่งมากที่สุดในกลุ่มที่กินอาหารผสมเวกเตอร์ pHMGFP นั้นได้รับสารกระตุ้น มากที่สุดด้วยเช่นกัน ส่งผลให้กุ้งขาวในกลุ่มนี้มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับภายในกลุ่มที่กินอาหารผสมเวกเตอร์ pHMGFP ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน แต่ทั้งนี้ยังให้อัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่ากุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมพลาสมิดลูกผสม PAP-pHMGFP ที่ความเข้มข้น 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อตัวต่อวัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่ายีน PAP มีบทบาทในกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งให้มีความต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ผิดปกติได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบความเครียดที่มีต่อกุ้งนั้น ควรมีความหลากหลายของปัจจัย รวมทั้งระยะเวลาที่ควรเพิ่มให้นานกว่า 7 วัน เพื่อดูความคงที่ของการต้านทานต่อความเครียดของกุ้งขาว
2. ควรศึกษาผลของ PAP ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอื่นๆ ด้วย โดยเฉพาะกระบวนการฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) ที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับยีนดังกล่าว
3. เมื่อแน่ใจแล้วว่ายีน PAP มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว ก็ควรนำไปสู่การทดสอบด้วยเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ที่ก่อโรคในกุ้งขาวด้วย โดยเฉพาะไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เป็นสาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากและรวดเร็วต่อฟาร์มเลี้ยงกุ้ง

เอกสารอ้างอิง

- นิติ ชูเชิด และคณะ. (2549) “การสร้างเครือข่ายในการส่งเสริมและพัฒนาระบบการจัดการองค์ความรู้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย” พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ
- บุญรัตน์ ปทุมชาติ. (2550) “แร่ธาตุกับกุ้งขาวไทย” เข้าถึงได้จาก <http://www.shrimpcenter.com/shrimp001498.html> (วันที่สืบค้น 2 กรกฎาคม 2555)
- วีรยุทธ อยู่ทอง. (2553) “คุณลักษณะของโปรตีนที่จับกับไวรัสตัวแดงดวงขาว” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A. and Rodriguez, J. (1995) “Knowledge and research prospect in marine mollusk and crustacean immunology” *Aquaculture*. 132 : 17-32.
- Byrkit, D.R. (1975) “Elements of statistics : An introduction to probability and statistical inference” New York. Van Nostrand.
- Chotigeat, W., Deachamag, P. and Phongdara, A. (2007) “Identification of a protein binding to the phagocytosis activating protein (PAP) in immunized black tiger shrimp” *Aquaculture*. 271, 1-4(October) : 112-120.
- Deachamag, P., Intaraphad, U., Phongdara, A. and Chotigeat, W. (2006) “Expression of Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp” *Aquaculture*. 255, 1-4(May) : 165-172.
- Flegel, T.W. (2006) “Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand” *Aquaculture*. 258, 1-4(August) : 1-33.
- Greenberg, S. and Grinstein, S. (2002) “Phagocytosis and innate immunity” *Immunology*. 14 : 136-145.
- Harrison, R.E. and Grinstein, S. (2002) “Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton” *Biochem. Cell Biol.* 80 : 509-515.
- Khimmakthong, U., Deachamag, P., Phongdara, A. and Chotigeat, W. (2011) “Stimulating the immune response of *Litopenaeus vannamei* using the phagocytosis activating protein (PAP) gene” *Fish and Shellfish Immunology*. 31, 3(September) : 415-422.
- Li, C.C., Yeh, S.T. and Chen, J.C. (2010) “Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress” *Fish and Shellfish Immunology*. 28 (October) : 121-127.
- Li, H.X., Meng, X.L., Xu, J.P., Lu, W. and Wang, J. (2005) “Protection of crayfish, *Cambarus Clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein” *Fish Disease*. 28 : 285-291.
- Lightner, D.V. (2011) “Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas) : A review” *Invertebrate Pathology* 106, 1(January) : 110-130.
- Mavrouli, M.D., Tsakas, S., Theodorou, G.L., Lampropoulou, M. and Marmaras, V.J. (2005) “MAP kinase mediated phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1744, 2(June) : 145-156.
- Smith, V.J., Brown, J.H. and Hauton, C. (2003) “Immunostimulation in crustaceans : does it really protect Against infection?” *Fish and Shellfish Immunology*. 15 (August) : 71-90.

- Takagi, M., Absalon, M.J., Mclure, K.G and Kaston, M.B. (2005). "Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin" Cell. 123, 1(October) : 49-63.
- Verghese, B., Radhakrishnan, E.V. and Padhi, A. (2007). "Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758)" Fish and Shellfish Immunology. 23, 5 (November) : 928-936.
- Yue, F., Pan, L., Xie, P., Zheng, D. and Li, J. (2010). "Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia –N stress" Comparative Biochemistry and Physiology. 157, 3(November): 246-251.