



หน้าที่ทางชีวภาพของบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนและซิสเตอีนสูง
และบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จินีนสูงของครัสตินจากกุ้งขาว

BIOLOGICAL FUNCTION OF GLY-CYS-RICH REGION AND PRO-ARG-RICH REGION
OF CRUSTINS FROM WHITELEG SHRIMP

ทัศนีย์ ศรีสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

หน้าที่ทางชีวภาพของบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนและซิสเตอีนสูง
และบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จินีนสูงของครีตีนจากกุ้งขาว



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

BIOLOGICAL FUNCTION OF GLY-CYS-RICH REGION AND PRO-ARG-RICH REGION
OF CRUSTINS FROM WHITELEG SHRIMP



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

หน้าที่ทางชีวภาพของบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนและซิสเตอีนสูง
และบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จินีนสูงของครีตีนจากกุ้งขาว

ของ

ทัศนีย์ ศรีสุข

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์ นอนพุดชา) (ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์ นอนพุดชา)

| | |
|------------------|---|
| ชื่อเรื่อง | หน้าที่ทางชีวภาพของบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนและซิสเตอีนสูง และบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพวาลีนและอาร์จินีนสูงของครัสตินจากกุ้งขาว |
| ผู้วิจัย | ทัศนีย์ ศรีสุข |
| ปริญญา | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต |
| ปีการศึกษา | 2563 |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเชาวนธ์ ดอนพุดชา |

ครัสตินจัดเป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้ ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพหลายชนิด แต่พบว่ามีเพียงครัสตินชนิดที่ 3 เท่านั้นที่มีทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพและการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษายีนของครัสตินชนิดที่ 1 (*Lvcarcinin*), 2 (*CrustinP*) และ 3 (*PA-SWD*) รวมทั้งยีนบริเวณโดเมน WAP ของยีน *CrustinP* (*WAP-PV*) และยีนบริเวณโดเมน WAP ของยีน *PA-SWD* (*WAP-SWD*) ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) นอกจากนี้ยังได้ทำการเชื่อมยีนบริเวณกรดอะมิโนโพวาลีนและอาร์จินีนของ *PA-SWD* เข้ากับยีน *WAP-PV* (*PA-WAP-PV*) อีกด้วย เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ยีน *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD*, *WAP-SWD* และ *PA-WAP-PV* เป็นครัสตินที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 336, 438, 163, 210, 156 และ 217 คู่เบส ตามลำดับ สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 111, 145, 53, 69, 51 และ 71 โมเลกุลตามลำดับ หลังจากนั้นทั้ง 6 นี้ไปผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *Escherichia coli* แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Agar diffusion assay พบว่า *rLvcarcinin* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ส่วน *rCrustinP*, *rWAP-PV*, *rPA-SWD*, *rWAP-SWD* และ *rPA-WAP-PV* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แต่อย่างไรก็ตาม *WAP-PV* และ *WAP-SWD* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้ต่ำกว่า *CrustinP* และ *PA-SWD* ตามลำดับ นอกจากนั้นเมื่อนำโปรตีนลูกผสมไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K พบว่ามีเพียง *rPA-SWD* และ *rWAP-SWD* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 3 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ได้ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า *Lvcarcinin*, *CrustinP* และ *PA-SWD* น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวต่อการป้องกันการรุกรานของจุลชีพ นอกจากนี้บริเวณกรดอะมิโนไกลซีนและซิสเตอีนของครัสตินชนิดที่ 2 และบริเวณกรดอะมิโนโพวาลีนและอาร์จินีนของครัสตินชนิดที่ 3 ยังมีความสำคัญต่อการต้านเชื้อจุลชีพอีกด้วย

คำสำคัญ : *Litopenaeus vannamei*, ครัสติน, ฤทธิ์การต้านจุลชีพ, ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โปรทีเนส

| | |
|----------------|--|
| Title | BIOLOGICAL FUNCTION OF GLY-CYS-RICH REGION AND PRO-ARG-RICH REGION OF CRUSTINS FROM WHITELEG SHRIMP |
| Author | THASSANEE SRISOOK |
| Degree | MASTER OF SCIENCE |
| Academic Year | 2020 |
| Thesis Advisor | Assistant Professor Dr. Suchao Donpudsa |

Crustins are antimicrobial peptides that are important for the shrimp immune system. Their biological activities exhibited the growth inhibition of microorganisms. In the previous research, the Type I and Type II crustins showed the antimicrobial activities against several microorganisms, whereas the Type III crustins had both antimicrobial and antiproteinase activities. In this work, a novel Type I crustin (*Lvcarcinin*), Type II crustin (*CrustinP*), Type III crustin (*PA-SWD*), the WAP domain of the *CrustinP* (*WAP-PV*) and WAP domain of *PA-SWD* (*WAP-SWD*) from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were characterized. In addition, the Pro and Arg-rich region of *PA-SWD* was ligated with *WAP-PV* (*PA-WAP-PV*) in order to study the biological activities. The *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD*, *WAP-SWD* and *PA-WAP-PV* genes consist of an open reading frame of 336, 438, 163, 210, 156 and 217 bp, respectively and encoding a putative protein of 111, 145, 53, 69, 51 and 71 amino acid residues, respectively. After producing these six recombinant proteins using *Escherichia coli* expression system, the growth inhibition of microorganisms was determined using an agar well diffusion assay. The results showed that the r*Lvcarcinin* could inhibit the growth of *Bacillus subtilis*. The r*CrustinP*, r*WAP-PV*, r*PA-SWD*, r*WAP-SWD* and r*PA-WAP-PV* inhibited the growth of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. However, r*WAP-PV* and r*WAP-SWD* weakly inhibited the growth compared with r*CrustinP* and r*PA-SWD*, respectively. Furthermore, the result of proteinase inhibitory activities showed that the Type III crustin, r*PA-SWD* and r*WAP-SWD*, exhibited the inhibition against proteinase K. As a result, the *Lvcarcinin*, *CrustinP* and *PA-SWD* were probably involved in the shrimp immune system. Moreover, the Gly and Cys-rich region of Type II crustin and the Pro and Arg-rich region of Type III crustin might be important for antimicrobial action.

Keyword : *Litopenaeus vannamei* Crustin Antimicrobial activities Proteinase inhibitory activities

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเชาว์ ดอนพุดชา อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ที่ได้เมตตาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการแก้ปัญหาเพื่อให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากที่สุด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เป็นแหล่งสถานศึกษาที่มอบความรู้ โอกาส และสิ่งที่มีประโยชน์ต่อตัวของข้าพเจ้าตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล และรองศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์ ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานและกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้วิชา ตลอดจนมอบรับสั่งสอน พร้อมทั้งให้กำลังใจ ทำให้ข้าพเจ้าได้ขบคิดและมีสติในการเรียนมากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร. สุวัฒนา วิเศษนันท์ และนางสาวอรรวรรณ เปี้ยพริ๊ด ที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำการทดลองในงานวิจัยนี้ ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินไปด้วยความราบรื่นและประสบผลสำเร็จ

ขอขอบคุณกัลยาณมิตรทุกท่าน ทั้งเพื่อนร่วมชั้นเรียนปริญญาโท และเพื่อนเก่าทั้งในและนอกมหาวิทยาลัยที่คอยอยู่เคียงข้าง ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีให้กันเสมอมาทั้งในยามสุขและทุกข์

สุดท้ายนี้สิ่งที่ข้าพเจ้าทำไม่อาจประสบผลสำเร็จได้หากขาดแรงสนับสนุนสำคัญจากครอบครัวอันเป็นที่รัก ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัว ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนด้านการศึกษา รวมถึงเป็นกำลังใจที่ดีของข้าพเจ้าเสมอมา คุณค่าและประโยชน์อันเกิดจากปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณอันยิ่งใหญ่แด่บิดา มารดา ครูอาจารย์ ตลอดจนผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทั้งปวงแก่ข้าพเจ้า

ทัศนีย์ ศรีสุข

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญรูปภาพ..... | ญ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| ภูมิหลัง..... | 1 |
| ความมุ่งหมายของการวิจัย..... | 11 |
| ความสำคัญของการวิจัย..... | 11 |
| ขอบเขตการวิจัย..... | 11 |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม..... | 13 |
| 1. ลักษณะทั่วไปของกิ้ง..... | 13 |
| 2. โรคของกิ้ง..... | 15 |
| 3. ภูมิคุ้มกันของกิ้ง..... | 22 |
| 4. เปปไทด์ต้านจุลชีพ Antimicrobial peptides (AMPs)..... | 23 |
| 5. ครัสติน..... | 27 |
| 6. เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย..... | 31 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... | 34 |
| อุปกรณ์และสารเคมี..... | 35 |
| วิธีการทดลอง..... | 37 |

| | |
|--|----|
| บทที่ 4 ผลการศึกษา..... | 44 |
| 1. การสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน <i>Lvcarcinin</i> , <i>CrustinP</i> , <i>WAP-PV</i> , <i>PA-SWD</i> , <i>WAP-SWD</i> และ <i>PA-WAP-PV</i> | 44 |
| 2. การแสดงออกของโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์..... | 54 |
| 3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay . | 59 |
| 4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนสเค (proteinase K) | 62 |
| บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... | 64 |
| สรุปผลการวิจัย | 64 |
| อภิปรายผลการวิจัย..... | 65 |
| ข้อเสนอแนะ..... | 68 |
| บรรณานุกรม..... | 69 |
| ภาคผนวก..... | 76 |
| | 81 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 83 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|--|------|
| ตาราง 1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 1..... | 5 |
| ตาราง 2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 2..... | 6 |
| ตาราง 3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 3..... | 8 |
| ตาราง 4 ไพร์เมอร์สำหรับการโคลนยีน..... | 40 |
| ตาราง 5 ข้อมูลของยีน <i>Lvcarcinin</i> , <i>CrustinP</i> และ <i>PA-SWD</i> | 44 |
| ตาราง 6 ข้อมูลไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับโคลนยีน..... | 46 |
| ตาราง 7 ข้อมูลพลาสมิดลูกผสมทั้ง 6 ชนิด..... | 49 |
| ตาราง 8 ข้อมูลโปรตีนลูกผสมต่อฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย..... | 60 |

สารบัญรูปภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| ภาพประกอบ 1 ข้อมูลการส่งออกกุ้งขาว..... | 1 |
| ภาพประกอบ 2 โครงสร้างพื้นฐานของครัสติน | 4 |
| ภาพประกอบ 3 กุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>) | 14 |
| ภาพประกอบ 4 กุ้งขาวที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว | 15 |
| ภาพประกอบ 5 กุ้งขาวที่เป็นโรคทอว่า ซินโดรม | 16 |
| ภาพประกอบ 6 กุ้งขาวที่เป็นโรคไวรัสหัวเหลือง | 18 |
| ภาพประกอบ 7 กุ้งขาวที่เป็นโรคโรคแคระแกร็น..... | 18 |
| ภาพประกอบ 8 กุ้งขาวที่เป็นโรคเรืองแสง..... | 20 |
| ภาพประกอบ 9 กุ้งที่เป็นโรคซีขาว..... | 21 |
| ภาพประกอบ 10 กุ้งที่เป็นโรคตายด่วน..... | 22 |
| ภาพประกอบ 11 การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพรูปแบบบาร์เรล-สเตฟวี..... | 25 |
| ภาพประกอบ 12 การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพรูปแบบคาร์เปท | 26 |
| ภาพประกอบ 13 การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพรูปแบบโทรอยดัล | 26 |
| ภาพประกอบ 14 ขั้นตอนสรุปโดยย่อของการทำการทดลอง | 34 |
| ภาพประกอบ 15 ลำดับเบสและกรดอะมิโน ของ <i>Lvcarcinin</i> (ก) <i>CrustinP</i> (ข) และ <i>PA-SWD</i> (ค) | 46 |
| ภาพประกอบ 16 3% agarose gel ของผลิตภัณฑ์ PCR และพลาสมิดลูกผสมที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>Lvcarcinin</i> , <i>CrustinP</i> , <i>WAP-PV</i> , <i>PA-SWD</i> , <i>WAP-SWD</i> | 50 |
| ภาพประกอบ 17 การเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม Clustal Omega..... | 54 |

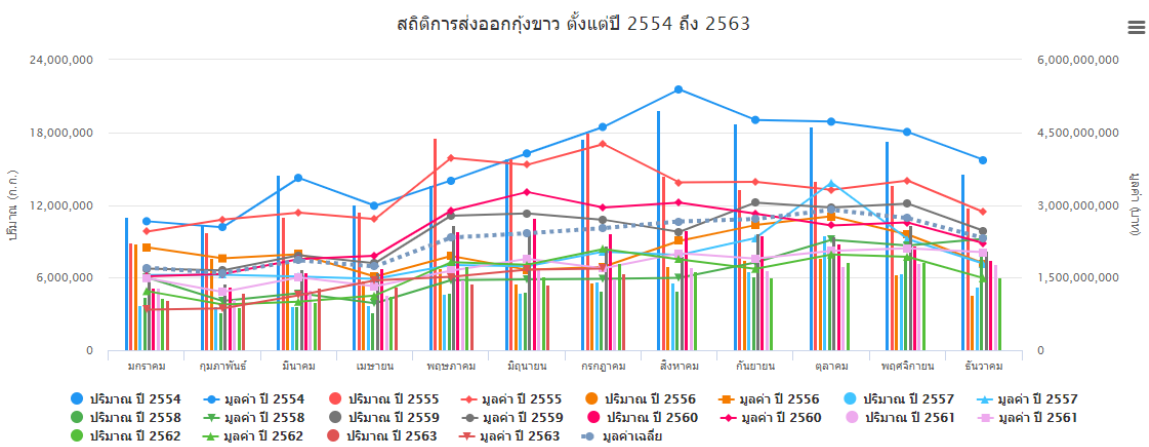
| | |
|--|----|
| ภาพประกอบ 18 15% SDS-PAGE ของเซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ณ เวลาต่างๆ โดยแถว M คือ โปรตีนมาตรฐาน และแถว 1-5 คือ เซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ..... | 56 |
| ภาพประกอบ 19 15% SDS-PAGE ของโปรตีนลูกผสม rLvcarcinin(ก), rCrustinP(ข), rWAP-PV(ค), rPA-SWD(ง), rWAP-SWD(จ) และ rPA-WAP-PV(ฉ) เมื่อถูกทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column | 58 |
| ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิค agar diffusion assay โดยแสดงเป็นอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากโปรตีน rLvcarcinin(ก) rCrustinP(ข) rWAP-PV(ค) rPA-SWD(ง) rWAP-SWD(จ) และ rPA-WAP-PV(ฉ) เทียบกับยาปฏิชีวนะ | 62 |
| ภาพประกอบ 21 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Proteinase K ของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.08 μ M, 0.8 μ M, 2.0 μ M, 4.0 μ M และ 8.0 μ M โดยใช้ 0.08 μ M proteinase K และ 1xPBS buffer เป็น positive control และ negative control ตามลำดับ | 63 |
| ภาพประกอบ 22 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA..... | 81 |
| ภาพประกอบ 23 แผนภาพเวกเตอร์ pVR500 ได้ถูกดัดแปลงมาจากเวกเตอร์ pET-32a(+) โดยตัดบริเวณ His-tag และ S-tag ที่อยู่ระหว่างตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MscI</i> และ <i>KpnI</i> ก่อนทำการเชื่อมสายดีเอ็นเอโดยใช้ T4 DNA polymerase | 82 |

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กุ้งนับว่าเป็นอาหารทะเลที่มีผู้นิยมบริโภคมากเป็นอันดับต้นๆ ของโลก โดยประเทศไทยมีอุตสาหกรรมกุ้งเป็นอุตสาหกรรมส่งออกหลักที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก เนื่องจากกุ้งทะเลสามารถนำรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท ส่งผลให้วิธีการเลี้ยงกุ้งทะเลในปัจจุบันได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณมากขึ้น (มฤดี สนิธิ, 2559) จากภาพประกอบ 1 ซึ่งเป็นกราฟแสดงข้อมูลการส่งออกของกุ้งขาวชี้ให้เห็นว่าตั้งแต่ปี 2554 ถึง ปี 2563 นั้นมูลค่าการส่งออกของกุ้งขาวลดลงเป็นอย่างมาก อาจมีสาเหตุมาจากสภาพด้านสิ่งแวดล้อม หรือโรคระบาดของคนที่ทำให้หลายๆประเทศไม่สามารถนำเข้าหรือส่งออกสินค้าได้เนื่องจากมีการปิดประเทศจึงผลกระทบด้านเศรษฐกิจไปทั่วทั้งโลก แต่สาเหตุหลักอีกประการหนึ่งก็คือ มีโรคระบาดของกุ้งแพร่เข้ามาในประเทศไทย ส่งผลให้กุ้งเกิดการติดเชื้อและตายในที่สุด



ภาพประกอบ 1 ข้อมูลการส่งออกกุ้งขาว

ที่มา: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ส. (2563). สถิติการส่งออกกุ้งขาว. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S_YEAR=2554&EYEAR=2563&PRODUCT_GROUP=5248&PRODUCT_ID=3814&wf_search=&WF_SEARCH=Y

โรคระบาดส่วนใหญ่ที่มักพบในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) และโรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head Virus Disease, YHV) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* เช่น โรคแบคทีเรียเรืองแสง และอีกหนึ่งโรคที่ส่งผลกระทบต่อวงการเพาะเลี้ยงกุ้งคือ โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS) หรือเรียกอีกชื่อว่าการล้มตายและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome: AHPNS) เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND) ที่มีพลาสมิดที่สามารถสร้าง toxin ได้ ส่งผลให้ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งถูกทำลายอย่างรุนแรงและส่งผลให้กุ้งตาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโรคระบาดเหล่านี้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก ดังนั้นเกษตรกรจึงหาแนวทางการป้องกันโรคระบาดด้วยวิธีการแก้ไขที่ผ่านมาและยังคงใช้กันอยู่จนถึงปัจจุบันก็คือ การใช้ยาปฏิชีวนะ แต่อาจมีข้อเสียหากใช้ยาที่ไม่ถูกต้อง ซึ่งทำให้เกิดความสิ้นเปลืองและยังก่อให้เกิดปัญหาตามมาได้แก่ ปัญหาดื้อยาของจุลินทรีย์ต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม (Pham et al., 2018) เกิดปัญหาการตกค้างและการสะสมของยาในสัตว์น้ำ และมนุษย์ที่บริโภคสัตว์น้ำ จากปัญหาดังกล่าวนี้ จึงเริ่มมีการศึกษาถึงวิธีการต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคในกุ้ง แทนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงและลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะลง รวมทั้งวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (มลฤดี สอนธิ, 2559) ได้แก่ การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคต่างๆ เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวิเคราะห์ และการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจะศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นแบบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งจะทำหน้าที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือด โปรตีน หรือสารเคมีต่างๆ ของร่างกายเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยเกิดกลไกการตอบสนองสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การตอบสนองโดยการใช้เซลล์ (cellular immune response) ได้แก่ กระบวนการกินเซลล์แบบฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) การกักล้อมสิ่งแปลกปลอม(encapsulation) และการเกิดโนดูล (nodule formation) และอีกรูปแบบหนึ่งคือ การตอบสนองด้วยสารน้ำ (humoral immune response) โดยภายในเซลล์เม็ดเลือดจะผลิตและปล่อยสารต่าง ๆ ออกมาเพื่อใช้ตอบสนองต่อการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม เช่น เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides, AMPs) ตัวยับยั้งโปรตีนเนส

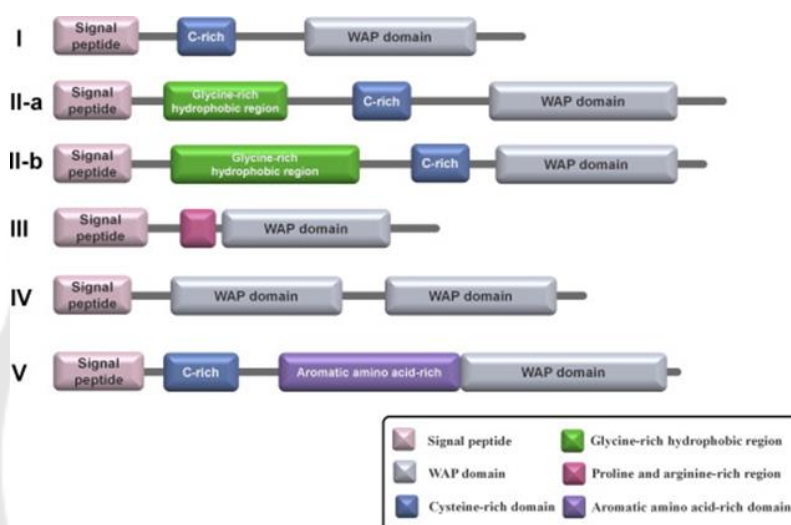
(proteinase inhibitor) และไซโทคีนไลต์แฟกเตอร์ (cytokine-like factors) เป็นต้น (Tassanakajon et al., 2013; มลฤดี สนิธิ, 2559)

AMPs เป็นโปรตีนขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนน้อยกว่า 150-200 โมเลกุล ซึ่งพบอยู่ในระบบภูมิคุ้มกันสิ่งมีชีวิตที่มีมาโดยกำเนิดและหน้าที่เป็นแนวป้องกันแรกที่ต่อสู้กับจุลินทรีย์ที่บุกรุก ดังนั้น AMPs จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการต่อสู้กับการรุกรานของเชื้อโรค AMPs สามารถแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น พีเนียดิน (penaeidins) ไลโซไซม์ (lysozymes) แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (antilipopopolysaccharide factors, ALFs) และครัสติน (crustins) โดยแต่ละชนิดจะมีลักษณะโครงสร้าง การทำงานและความจำเพาะที่แตกต่างกัน (Tassanakajon et al., 2013) ได้มีรายงานการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ AMPs หลากหลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งพบว่า AMPs แต่ละชนิดมีอยู่หลายไอโซฟอร์ม โดยแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันไป (Tassanakajon et al., 2015) จากการศึกษา AMPs ในกุ้ง พบว่า AMPs ที่ใช้ป้องกันสิ่งแปลกปลอมนี้มักจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งได้รับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่ง AMPs แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน (Donpudsa et al., 2014; Liu et al., 2016; Yu et al., 2016) โดยในงานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับครัสติน ซึ่งเป็นเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่ในสิ่งมีชีวิตตระกูลครัสเตเชียน ได้แก่ ปู และ กุ้ง

ครัสตินเป็น AMPs ชนิดหนึ่งที่มีลักษณะเฉพาะ ซึ่งโครงสร้างของครัสตินประกอบด้วยบริเวณที่เป็นเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ที่บริเวณปลาย N ของสายพอลิเปปไทด์ และบริเวณที่เรียกว่า โดเมน WAP (Whey acidic protein (WAP) domain) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน Cysteine (Cys) จำนวนมาก โดยโดเมน WAP จะอยู่บริเวณปลาย C ของสายพอลิเปปไทด์ของครัสติน ในปัจจุบันสามารถจำแนกครัสตินได้ 5 ชนิด ดังภาพประกอบ 2 โดยครัสตินแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างบริเวณของเปปไทด์ส่งสัญญาณกับโดเมน WAP ดังนี้

ครัสตินชนิดที่ 1 ประกอบด้วยบริเวณที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่มาก (Cys-rich) ครัสตินชนิดที่ 2 ประกอบด้วยบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนและกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่มาก (Gly-rich และ Cys-rich) ในครัสตินชนิดที่ 3 หรืออีกชื่อเรียกหนึ่งว่า single WAP domain (SWD) containing protein ประกอบด้วยบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและกรดอะมิโนอาร์จินีนอยู่มาก (Pro และ Arg-rich) ส่วนครัสตินชนิดที่ 4 หรืออีกชื่อเรียกหนึ่งว่า double WAP domain (DWD) containing protein นั้นประกอบด้วยโดเมน WAP จึงทำให้ครัสตินชนิดที่ 4 มีบริเวณโดเมน WAP ถึงสองโดเมนอยู่ติดกัน และครัสตินชนิดที่ 5 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับครัสตินชนิดที่ 1 แต่มีโดเมน

ที่มีกรดอะมิโนประเภทวงอะโรมาติกอยู่มาก (aromatic amino acid-rich) แทรกเข้ามาอยู่ระหว่าง Cys-rich และโดเมน WAP (Tassanakajon et al., 2015) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านจุลชีพต่าง ๆ ของครัสติน โดยส่วนมากครัสตินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Smith, 2011) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยพบว่าครัสตินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสได้อีกด้วย (Donpuksa et al., 2014)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างพื้นฐานของครัสติน

ที่มา : Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., & Amparyup, P. (2015). Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 324-341.

จากการรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในครัสตินชนิดที่ 1-3 พบว่า ครัสตินชนิดที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสทีนชนิดที่ 1

| ชื่อเรียกของ ครัสทีนชนิดที่ 1 | แหล่งที่พบ | ฤทธิ์ในการต้าน จุลชีพที่พบ | เอกสารอ้างอิง |
|--|---|---|---|
| <i>CruHa1</i> <i>CruHa2</i> | <i>Hyas araneus</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | (Sperstad et al., 2009) |
| <i>Plcrustin1</i> <i>Plcrustin2</i> | <i>Pacifastacus leniusculus</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | (Donpudsa et al., 2010) |
| <i>CrusEs</i> | <i>Eriocheir sinensis</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | (Mu et al., 2010) |
| <i>PtCrustin2</i> | <i>Portunus trituberculatus</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และยีสต์ | (Cui et al., 2012) |
| <i>PtCrustin3</i> | <i>Portunus trituberculatus</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ | (Cui et al., 2012) |
| <i>MjCrus I-1</i> | <i>Marsupenaeus</i> <i>japonicus</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ | (Liu et al., 2015) |
| <i>MjCrus I-3</i> | <i>Marsupenaeus</i> <i>japonicus</i> | แบคทีเรียแกรมลบ | (Jiang et al., 2015) |
| <i>CqCrs</i> | <i>Cherax quadricarinatus</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ | (Yu et al., 2016) |
| <i>PcCru</i> | <i>Procambarus clarkii</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ | (Liu et al., 2016) |
| <i>SpCrus3</i> <i>SpCrus4</i> | <i>Scylla paramamosain</i> | แบคทีเรียแกรมบวกและ <i>V. parahemolyticus</i> | (Wang, Y., Zhang, X. W., et al., 2018) |
| <i>SpCrus6</i> | <i>Scylla paramamosain</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ เชื้อรา และ WSSV | (Du, Wang, et al., 2019) |
| <i>Pc-crustin 4</i> | <i>Procambarus clarkii</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ | (Du, Li, et al., 2019) |
| <i>LvCrustin I-1</i> | <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | (Lv, Li, Yu, Xiang, et al., 2020) |

นอกจากนี้รายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นครัสตินที่สามารถพบได้มากที่สุดในกุ้งชนิดต่างๆ และมีหลากหลายไอโซฟอร์ม (Tassanakajon et al., 2015) พบว่า ครัสตินชนิดที่ 2 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 2

| ชื่อเรียกของครัสตินชนิดที่ 2 | แหล่งที่พบ | ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่พบ | เอกสารอ้างอิง |
|------------------------------|---------------------------------|---|-------------------------------------|
| rCruFc | <i>Fenneropenaeus chinensis</i> | <i>S. aureus</i> | (Zhang et al., 2007) |
| CrustinPm1 | <i>Penaeus monodon</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และ <i>E. coli</i> 363 | (Supungul et al., 2008) |
| LvABP1 | <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>Vibrio penaeicida</i> | (Shockey et al., 2009) |
| crustinPm5 | <i>Penaeus monodon</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | (Vatanavicharn et al., 2009) |
| crustinPm1 | <i>Penaeus monodon</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | (Suthianthong et al., 2012) |
| MjCRS | <i>Marsupenaeus japonicus</i> | แบคทีเรียแกรมลบ (<i>Vibrio penaeicida</i>) | (Hipolito et al., 2014) |
| crustinPm4 | <i>Penaeus monodon</i> | <i>B. megaterium</i> <i>E. coli</i> 363 <i>V. harveyi</i> 639 | (Donpudsa et al., 2014) |
| Fi-Crustin2 | <i>Fenneropenaeus indicus</i> | แบคทีเรียแกรมลบ | (Sruthy et al., 2017) |
| LvCrustinA | <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> และ WSSV | (Li et al., 2018) |
| SpCrus5 | <i>Scylla paramamosain</i> | <i>V. parahemolyticus</i> และ <i>S. aureus</i> | (Wang, Y., Zhang, C., et al., 2018) |
| SpCrus2 | <i>Scylla paramamosain</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และเชื้อรา | (Wang, H. et al., 2018) |

ตาราง 2 (ต่อ)

| ชื่อเรียกของ ครัสตินชนิดที่ 2 | แหล่งที่พบ | ฤทธิ์ในการต้าน จุลชีพที่พบ | เอกสารอ้างอิง |
|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| LvcrustinA | <i>Litopenaeus vannamei</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | (อรรวรรณ เปียพันธ์, 2018) |
| LvCrustinB | <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | (Li et al., 2019) |
| crusFpau | <i>Farfantepenaeus paulensis</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ | (Bandeira et al., 2020) |
| Mn-Gly-Cru1 | <i>Macrobrachium</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | (Dai et al., 2020) |
| Mn-Gly-Cru2 | <i>nipponense</i> | และแกรมลบ และ WSSV | |
| LvCrustin II-1 | <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | (Lv, Li, Yu, Zhang, et al., 2020) |

นอกเหนือจากนั้นในปี 2012 ได้มีการศึกษาบริเวณ Gly และ Cys-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 (crustinPm1) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Suthianthong et al., 2012) โดยนำบริเวณ Gly และ Cys-rich แยกออกจากโดเมน WAP ของ crustinPm1 จากนั้นจึงนำเฉพาะส่วนของโดเมน WAP ไปผลิตโปรตีนลูกผสม และนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ ผลการทดลองที่ได้พบว่าโปรตีนที่มีเฉพาะส่วนของโดเมน WAP นี้ไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำบริเวณ Gly-rich หรือ Cys-rich ออกจากโดเมน WAP ของ crustinPm1 เพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งเท่านั้น พบว่าโปรตีนลูกผสมดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอยู่ แต่ความแรงของฤทธิ์การต้านจุลชีพนี้ลดลงกว่า crustinPm1 ปกติที่มีครบทั้งบริเวณ Gly-rich และ Cys-rich ถัดมาในปี 2018 ได้มีการศึกษาครัสตินชนิดใหม่คือ SpCrus5 จากปู *Scylla paramamosain* ที่มีโครงสร้างที่ต่างจากครัสตินชนิดที่ 2 ทั่วไปคือ ประกอบด้วยบริเวณ Cys-rich ที่ปลาย N มีโดเมน WAP อยู่ตรงกลาง แต่บริเวณ Gly-rich กลับย้ายไปอยู่ที่ปลาย C (Wang, Y., Zhang, C., et al., 2018) โดยนำบริเวณ Gly-rich ออกจากโปรตีนนี้ จากนั้นจึงนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมและทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ พบว่าโปรตีน SpCrus5 ปกติมีฤทธิ์ต้านจุลชีพและจับกับจุลินทรีย์และองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่า SpCrus5 ที่ไม่มีบริเวณ Gly-rich ดังนั้นจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาจึงแสดงให้เห็นว่าทั้งบริเวณ Gly-rich และ Cys-rich น่าจะมีความสำคัญต่อความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพ

แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พยายามทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 เกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนชนิดต่างๆ ดังนี้ ในปี 2010 ได้มีการศึกษา ครัสตินชนิดที่ 1 (P1crustin1 และ P1crustin2) จากเคยรยฟิช *Pacifastacus leniusculus* (Donpuksa et al., 2010) พบว่าโปรตีนทั้ง 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก แต่เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนกลับพบว่า ครัสตินทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่พบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน ต่อจากนั้นได้มีการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนของครัสตินชนิดที่ 2 นั่นคือ *crustinPm1* จากกุ้งกุลาดำ (Suthiantong et al., 2012) และ *SpCrus5* จากปู *Scylla paramamosain* (Wang, Y., Zhang, C., et al., 2018) แต่ก็ไม่พบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเช่นกัน ซึ่งแตกต่างจากครัสตินชนิดที่ 3 ซึ่งพบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีน

สำหรับในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 3 นั้น นอกจากจะพบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 แล้ว ยังพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนได้อีกด้วย ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 3

| ชื่อเรียกของครัสตินชนิดที่ 3 | แหล่งที่พบ | ฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบ | | |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--|-------------------------|
| | | การต้านจุลชีพ | การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีน | เอกสารอ้างอิง |
| SWDPm2 | <i>Penaeus monodon</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | Subtilisin A | (Amparyup et al., 2008) |
| Fc-SWD | <i>Fenneropenaeus chinensis</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และเชื้อรา | Subtilisin A ProteinaseK และ Trypsin | (Jia et al., 2008) |
| Pc-SWD | <i>Procambarus clarkii</i> | ไม่มีฤทธิ์ | proteinase from bacteria | (Du et al., 2010) |

ตาราง 3 (ต่อ)

| ชื่อเรียกของ ครัสทีนชนิดที่ 3 | แหล่งที่พบ | ฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบ | | |
|----------------------------------|--------------------------------------|--|---|------------------------------|
| | | การต้านจุลชีพ | การยับยั้งการ ทำงานของ เอนไซม์ โปรทีเนส | เอกสารอ้างอิง |
| CrusEs2 | <i>Eriocheir sinensis</i> | แบคทีเรียแกรมบวก | NA | (Mu et al., 2011) |
| MrCrs | <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ IHHV และ WSSV | NA | (Arockiaraj et al., 2013) |
| MjSWD | <i>Marsupenaeus japonicus</i> | สามารถจับกับ ผนังเซลล์แบคทีเรีย แกรมบวกและ แกรมลบ | Subtilisin A Proteinase K และ proteinase from bacteria | (Jiang et al., 2013) |
| Lv-SWDi | <i>Litopenaeus vannamei</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ | proteinase from bacteria | (Du et al., 2015) |
| LvSWD | <i>Litopenaeus vannamei</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ (<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (VP _{AHPND})) | subtilisin A | (Visetnan et al., 2017) |
| LvSWD3 | <i>Litopenaeus vannamei</i> | WSSV | ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง การทำงานของ เอนไซม์โปรทีเนส | (Yang et al., 2018) |
| LvSWD4 | <i>Litopenaeus vannamei</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และ WSSV | NA | (Yang et al., 2019) |
| LvSWD5 | <i>Litopenaeus vannamei</i> | แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และ WSSV | NA | (Yang et al., 2020) |

หมายเหตุ NA หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

งานวิจัยก่อนหน้านี้ (Amparyup et al., 2008) ได้ศึกษาครัสตินชนิดที่ 3 ในกุ้งกุลาดำ (rSWDPm2) ซึ่งพบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีนเอสต่อ subtilisin A ส่วนในกุ้ง *F. chinensis* (rSWDFc) (Jia et al., 2008) พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อรา รวมทั้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีนเอสต่อ subtilisin A proteinase K และ trypsin ซึ่งทั้ง SWDPm2 และ SWDFc มีลักษณะโครงสร้างเช่นเดียวกับครัสตินชนิดที่ 3 นั่นคือประกอบด้วยบริเวณที่เป็นเปปไทด์สังสัญญาณ บริเวณ Pro และ Arg-rich และโดเมน WAP แต่ครัสตินจากกุ้ง *Masupenaesus japonicas* และ crayfish *Procambarus clarkia* ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับครัสตินชนิดที่ 3 แต่ขาดบริเวณ Pro และ Arg-rich ซึ่งผลการทดลองพบว่าครัสตินดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่พบเพียงฤทธิ์ในการยับยั้งโปรตีนเอสเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 อาจมีความสำคัญต่อฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (Du et al., 2010; Jiang et al., 2013; Tassanakajon et al., 2015) ต่อมาในปี 2017 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของ LvSWD ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (Visetnan et al., 2017) พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิดก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}) ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคตายด่วนในกุ้ง รวมทั้งยังพบว่าความสามารถในยับยั้งโปรตีนเอสต่อ subtilisin A อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการผลิตโปรตีนลูกผสมของ LvSWD โดยผลิตเฉพาะส่วนที่เป็นโดเมน WAP เท่านั้น (rLvSWD-WAP) พบว่า rLvSWD-WAP มีเพียงความสามารถในยับยั้งโปรตีนเอสเท่านั้น ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และในปี 2018 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของยีน LvSWD3 จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เช่นเดียวกัน (Yang et al., 2018) ซึ่ง LvSWD3 จัดเป็นครัสตินชนิดที่ 3 แต่ไม่มีองค์ประกอบของบริเวณ Pro และ Arg-rich พบว่าโปรตีนลูกผสม LvSWD3 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อไวรัส แต่พบว่าทำได้เพียงยืดระยะเวลาในการตายของกุ้งเมื่อติดเชื้อ WSSV เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวไปข้างต้นว่าบริเวณ Pro และ Arg-rich นั้นอาจเกี่ยวข้องกับการต้านจุลินทรีย์ (Tassanakajon et al., 2015) แต่ไม่น่าจะส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอส

จากผลของงานวิจัยที่กล่าวมานั้นแสดงให้เห็นว่าในงานวิจัยส่วนใหญ่ของครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา และเชื้อไวรัส แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส ในทางตรงข้ามพบว่า

ครัสตินชนิดที่ 3 มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพเช่นเดียวกับครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส ซึ่งแตกต่างจากครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 (Du et al., 2010) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 1 บริเวณ Gly และ Cys-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 และบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลชีพและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาครัสตินและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง รวมถึงยังสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาครัสตินต่อการควบคุมโรคของกุ้งได้ต่อไปในอนาคตอีกด้วย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 1, 2 และ 3 ที่พบในกุ้งขาว รวมถึงหน้าที่ทางชีวภาพของบริเวณ Gly และ Cys-rich และ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส

ความสำคัญของการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับครัสตินชนิดที่ 1 ครัสตินชนิดที่ 2 และครัสตินชนิดที่ 3 รวมทั้งบริเวณ Gly และ Cys-rich และ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จะทำให้ทราบถึงหน้าที่และฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินทั้ง 3 ชนิด รวมทั้งความสำคัญของโครงสร้างและองค์ประกอบโดเมนของครัสตินต่อหน้าที่ทางชีวภาพ ซึ่งข้อมูลที่ได้นั้นสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและพัฒนาวิธีควบคุมโรคของกุ้งต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความต้องการที่จะศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 1, 2 และ 3 รวมทั้ง Gly และ Cys-rich และ Pro และ Arg-rich ในครัสตินชนิดที่ 2 และชนิดที่ 3 ในกุ้งขาว ตามลำดับ โดยเริ่มจากการโคลนยีนทั้ง 6 ชนิดเข้าสู่พลาสมิด ได้แก่ ยีน *Lvcarcinin* ของครัสตินชนิดที่ 1 ยีน *CrustinP* ของครัสตินชนิดที่ 2 และโดเมน WAP ของยีน *CrustinP* (WAP-PV) ยีน *PA-SWD* รวมถึงยีนบริเวณ Pro และ Arg-rich (*Pro-Arg-SWD*) และโดเมน WAP (WAP-SWD) ของครัสตินชนิดที่ 3 นอกจากนี้ก็จะทำการโคลนยีนอีก 1 ชนิดเข้าสู่พลาสมิดคือ ยีนที่ทำการเชื่อมต่อกันระหว่างบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 (*Pro-Arg-SWD*) และ

ยีนบริเวณโดเมน WAP ของครัสตินชนิดที่ 2 (WAP-PV) เพื่อให้ได้ยีนที่สนใจคือยีน PA-WAP-PV จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมของยีนทั้ง 6 ชนิดนี้เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสมและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำโปรตีนที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

ในการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ลักษณะทั่วไปของกุ้ง
2. โรคของกุ้ง
3. ภูมิคุ้มกันของกุ้ง
4. เปปไทด์ต้านจุลชีพ
5. ครัสติน
6. เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

1. ลักษณะทั่วไปของกุ้ง

1.1. ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

1.1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งขาว

กุ้งขาว (Pacific white shrimp) ซึ่งวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei*
การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานเป็นดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarid Ecarida

Order Decapoda

Suborder Natantia

Section Penaeidea

Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

Species *Litopenaeus vannamei*

1.1.2 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ดังแสดงในภาพ ประกอบที่ 3 บนลำตัวมี 8 ปล้อง มีสีขาว หน้าอกใหญ่ และมีการเคลื่อนไหวเร็ว ในส่วนหัว มี 1 ปล้อง มีกรรียวประมาณ 0.8 เท่าของความยาว มีเปลือกหัวสันกรรสูงแต่ปลายกรรแคบ ในส่วนของกรรมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรรด้านบนมี 8 ฟัน กรรด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรรมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น หนวดแดง 2 เส้นยาว ตาแดงเข้ม ส่วนตัวมี 6 ปล้อง เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดง เปลือกบาง ขาวว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวข้างในที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบและ 1 กรรหาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งสายพันธุ์นี้จะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ หากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายน้ำล่องน้ำแก่ง ลอกคราบเร็วทุกๆ สัปดาห์ไม่หมกตัว (กมลศิริ พันธนิยะ, 2012)



ภาพประกอบ 3 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ที่มา : OCENA. (2020). Instant Expert: White Shrimp Retrieved October 2, 2020, from <https://oceana.org/marine-life/cephalopods-crustaceans-other-shellfish/white-shrimp>

กุ้งขาว เป็นกุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลา นิคารากัว คอสตาริกา ปานามา โคลัมเบีย อีควาดอร์ และเปรู เป็นต้น กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรงและทนทาน ส่งผลให้เกิดการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้าง ส่วนใหญ่ตามแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่เม็กซิโกไปจนถึงเปรู ที่ช่วงระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต เนื่องจากลักษณะภูมิภาคในแถบนี้มีพื้นที่ใต้ท้องทะเลที่มีลักษณะเหมือนโคลนจึงเหมาะสมแก่การ

เจริญเติบโตและสามารถเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ได้ ซึ่งประเทศคิวบาจัดเป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งลูกกุ้ง รวมถึงพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ด้วย (กมลศิริ พันธนิยะ, 2012)

2. โรคของกุ้ง

2.1. โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

2.1.1. โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV)

White Spot Syndrome Virus (WSSV) หรือโรคดวงขาว(จุดขาว) ดังแสดงในภาพประกอบ 4 เป็นโรคที่พบกับกุ้งทะเลทุกชนิดรวมทั้งกุ้งขาวด้วย โดยมีสาเหตุจากเกิดจากเชื้อไวรัสดวงขาว ที่เรียกว่า White Spot Syndrome Virus หรือ WSSV (Tang and Lightner, 2000) ซึ่งมีขนาด 130 x 350 นาโนเมตร (ขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาไวรัสกุ้ง) มี envelope รูปไข่ มีหางตรงปลายยอด nucleocapsid เป็นรูปแท่ง เป็นไวรัสที่มีดีเอ็นเอสายคู่ สายดีเอ็นเอเป็นวง ขดเป็นเกลียว ขนาดประมาณ 305 Kb ไวรัสนี้เพิ่มจำนวนภายในนิวเคลียส ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาทีหรือ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที เชื้อมีชีวิตรอดได้ในน้ำทะเลเป็นเวลาอย่างน้อย 30 วันและอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ 3 ถึง 4 วัน เชื้อไวรัสที่สามารถทำลายเนื้อเยื่อผิวได้เปลือก เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมมน้ำเหลืองและเม็ดเลือด โดยทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวมโต (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ, 2008)

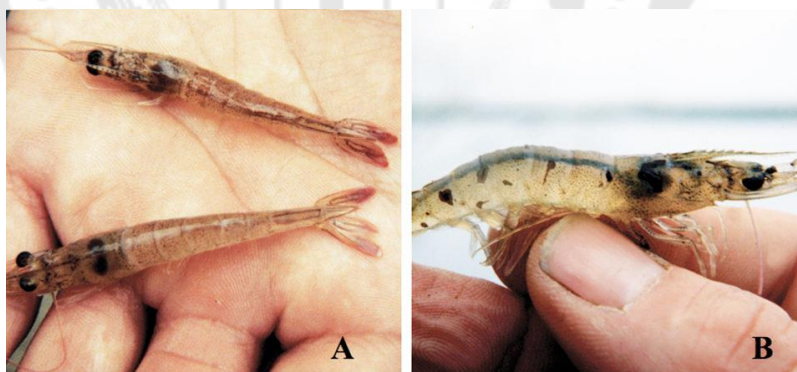


ภาพประกอบ 4 กุ้งขาวที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว

ที่มา : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ส. (2563). โรคจุดขาวในกุ้ง (White spot disease). สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก <http://niah.dld.go.th/th/AnimalDisease/aquaticWhiteSpot.htm>

อาการของกุ้งที่เป็นโรคดวงขาวจะมีลักษณะจุดขาวหรือดวงขาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 ถึง 2 มิลลิเมตร ซึ่งดวงสีขาวบริเวณเปลือกลักษณะดวงที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากความผิดปกติของการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ผิดปกติ ซึ่งลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคดวงขาวนี้จะไม่แข็งแรงติดตัวทำให้กุ้งส่วนใหญ่จะว่ายอยู่บริเวณผิวน้ำหรือเกยขอบบ่อ บางครั้งพบว่ากุ้งอาจจะมีอาการลอกคราบไม่ออกหรือลอกคราบแล้วไม่แข็งตัว ตัวนิ่ม กินอาหารลดลง โดยส่วนใหญ่การตายของกุ้งหลังจากติดโรคจะขึ้นอยู่กับฤดูกาลและแหล่งเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะช่วงฤดูที่มีอากาศหนาวหรือฝนตกหนักติดต่อกันนานๆ อัตราการตายของกุ้งสูง 80 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 4 ถึง 5 วัน และไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคระบาดชนิดนี้ได้ แต่สามารถป้องกันเพื่อลดความรุนแรงของโรคดวงขาวได้ โดยหลีกเลี่ยงการปล่อยลูกกุ้งเลี้ยงในบ่อในช่วงที่อากาศหนาวเย็นหรือถ้าจะเลี้ยงในบริเวณที่มีโอกาสระบาดของโรค ควรจะฆ่าพาหะในน้ำก่อนการปล่อยลูกกุ้งด้วยคลอรีนผง และซื้อลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักที่มีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free, SPF) เท่านั้น นอกจากนี้ควรมีบ่อพักน้ำและเติมน้ำจากบ่อพักน้ำที่มีการฆ่าเชื้อและพักน้ำเป็นเวลานานแล้วเท่านั้น (กรมประมง; ชลล ลัมสุวรรณ, 2546; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2563)

2.1.2 โรคทอราซินโดรม (Taura Syndrome)



ภาพประกอบ 5 กุ้งขาวที่เป็นโรคทอราซินโดรม

ที่มา : Kathy F.J., T., Joel O., W., Solangel A., N., & Donald V., L. (2009). Evolutionary history of Taura Syndrome Virus. Retrieved September 30, 2020, from <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/evolutionary-history-taura-syndrome-virus/>

ไวรัสทอรา ซินโดรม (Taura Syndrome Virus) สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งชาวลิทอพีเนียสแวนนาไม โดยมีอัตราการตายสูง 75 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโรคนี้ได้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากเนื่องจากผลผลิตกุ้งชนิดนี้ โดยสาเหตุของโรคทอราซินโดรมนั้นเกิดจากเชื้อไวรัสชื่อ ไวรัสทอรา (Taura Virus) ไวรัสทอรา ซินโดรม (Taura Syndrome Virus) โรคหางแดง (Little Red Tail) หรือ โรค La Colita Roja ซึ่งลักษณะของไวรัสทอรานั้น มีขนาด 31 ถึง 34 นาโนเมตร เป็น RNA virus ที่มีสาย RNA สายเดี่ยว จัดเป็นพอกพิโคนาไวรัส (picornavirus) ซึ่งจะเข้าไปอาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์บุผนังของกุ้งที่ติดเชื้อ โดยลักษณะอาการของโรคทอราซินโดรม มี 2 ระยะ คือ ระยะเฉียบพลัน (peracute) และระยะเรื้อรัง (chronic or recovery) โดยโรคนี้จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อบริเวณได้เปลือก ทำให้เปลือกอ่อนนิ่ม กุ้งมักจะตายช่วงลอกคราบ ลักษณะอีกอย่างที่แสดงว่ากุ้งติดเชื้อคือบั้งสีแดงซีดที่เกิดจากการอักเสบของเซลล์สีแดงในชั้นผิวหนังและที่แพนหาง กุ้งที่รอดตายและสามารถลอกคราบได้จะมีอาการดีขึ้นหรืออาจเข้าสู่การติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งมักแสดงรอยโรคหลายแห่งที่เปลือก ดังแสดงในภาพประกอบ 5 ในการป้องกันและควบคุมโรคนี้คือ เลี้ยงกุ้งปลอดเชื้อ (Specific Pathogen-Free) โดยเริ่มจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อผลิตออกมาเป็นกุ้งพี และลงเลี้ยงบ่อดินก็จะปลอดเชื้อเช่นกัน นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้กุ้งชนิดต้านโรคทอราซินโดรมแทนได้อีกด้วย (กมลศิริ พันธนิยะ, 2012)

2.1.3 โรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head Virus Disease, YHV)

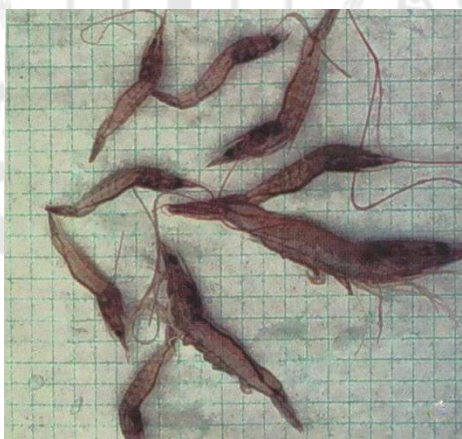
ไวรัสหัวเหลืองมีรายงานการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยและต่อมาได้มีการแพร่กระจายในแหล่งเลี้ยงกุ้งที่เพาะเลี้ยงในทวีปเอเชีย อาการของกุ้งที่เป็นโรคนี้คือลำตัวจะซีด และบริเวณส่วนหัวจะมีสีเหลืองดังแสดงในภาพประกอบ 6 เนื่องจากตัวของกุ้งมีสีเข้มขึ้นเพราะถูกทำลายด้วยไวรัส YHV ซึ่งจัดเป็นไวรัส RNA สายเดี่ยว(ssDNA) ที่มีผนังหุ้ม (Enveloped Virus) รูปร่างเป็นท่อน (Bacilliform) มีความยาว 150 ถึง 200 นาโนเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค 40 ถึง 50 นาโนเมตร พบอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อและช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งในการป้องกันโรคหัวเหลือง สิ่งสำคัญคือจะต้องมีการเตรียมน้ำ และมีบ่อพักน้ำที่เพียงพอ ซึ่งจะช่วยป้องกันปัญหาได้ดีและมีน้ำเพียงพอในการเลี้ยง มีระบบการให้อาการที่ดีเพื่อป้องกันการเน่าเสียที่พื้นบ่อ และปรับเปลี่ยนการให้อาหารที่เหมาะสม (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2563)



ภาพประกอบ 6 กุ้งขาวที่เป็นโรคไวรัสหัวเหลือง

ที่มา : ขวัญเรือน สุวรรณรัตน์. (15 พฤศจิกายน 2561). โรคกับการเลี้ยงกุ้ง. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก <http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-11-14/591-2018-11-19-04-43-15>

2.1.4 โรคแคระแกร็น (RDS - Runt Defomity Syndrom)



ภาพประกอบ 7 กุ้งขาวที่เป็นโรคโรคแคระแกร็น

ที่มา : ขวัญเรือน สุวรรณรัตน์. (15 พฤศจิกายน 2561). โรคกับการเลี้ยงกุ้ง. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก <http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-11-14/591-2018-11-19-04-43-15>

โรคแคะแกร็น Runt Deformity Syndrome (RDS) เป็นโรคที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในกุ้งขาว ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) ไวรัส IHHNV มีขนาด 22 นาโนเมตร เป็น DNA virus ที่มีสาย DNA สายเดี่ยวจัดเป็นพวกวาไวรัส (parvovirus) สาเหตุการระบาดนั้นนอกจากการกระจายตามปกติในบ่อกุ้ง ทั้งการกินกันเองและการติดเชื้อในน้ำแล้ว อีกทางหนึ่งก็คือผ่านทางมูลนก โดยมีอาการสำคัญคือการกินอาหารลดลง ความอยากอาหารลดลง กุ้งกินกันเอง และมีขนาดตัวที่เล็กลงอย่างเห็นได้ชัด ส่งผลให้มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นสูง 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 7 ในกุ้งที่ติดโรคจะพบจุดขาวหรือเหลืองหม่นที่เปลือกโดยเฉพาะบริเวณรอยต่อของแผ่นปิดช่องท้อง ซึ่งในการป้องกันและรักษาในงานวิจัยใหม่ๆ ที่ให้ผลดีกว่าการการเพิ่ม pH โดยใช้ปูนขาวคือ การแนะนำให้ตากบ่อเพื่อให้ความร้อนจากแสงแดดเป็นตัวช่วยในการฆ่าเชื้อ เนื่องจากการป้องกันโรคระบาดชนิดนี้ยังไม่มีวิธีที่เฉพาะเจาะจง แต่อีกทางเลือกหนึ่งก็คือทำการเพาะกุ้งจากแม่กุ้งที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen-Free) โดยเริ่มจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อผลิตออกมาเป็นกุ้งฟิหรือกุ้งระยะโพสลาร์วาแล้วจึงนำลงเลี้ยงบ่อดินก็จะปลอดเชื้อเช่นกัน (กมลศิริ พันธนิยะ, 2012)

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

2.2.1 โรคแบคทีเรียเรืองแสง

โรคแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งเกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมาซึ่งเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) ซึ่งทำให้เกิดการเรืองแสงได้ในที่มืด ดังแสดงในภาพประกอบ 8 โดยลักษณะอาการของโรคนี้คือ กุ้งที่ป่วยจะว่ายน้ำขึ้นมาเกยอยู่ตามบริเวณผิวน้ำหรือขอบบ่อ ซึ่งกุ้งป่วยเหล่านี้จะสามารถสังเกตได้จากการเรืองแสงในเวลากลางคืนที่ส่วนหัวอย่างชัดเจน เมื่อนำส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่ป่วย หรือนำเลือดกุ้งมาตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องจะพบแบคทีเรียท่อนสั้นที่สามารถเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก ถ้าหากนำเชื้อไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ซีบีเอส (TCBS agar) จะพบว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นชนิดสีเขียว และเมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วยพบว่าส่วนตับและตับอ่อนนั้นถูกทำลายอย่างรุนแรงทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติและอาหารที่สะสมไว้ในตับก็จะน้อยลง กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากนั้นยังพบว่าถ้าได้เกิดเซลล์ตายและมีอาการอักเสบอย่างชัดเจนเช่นกัน ซึ่งในการป้องกันควรหาน้ำที่มีความเค็มต่ำหรือน้ำจืดมาเติมในบ่อให้ปรับความเค็มในบ่อเหลือประมาณ 5 ถึง 7 พีพีที ปัญหาของโรคเรืองแสงจะน้อยลงมาก

นอกจากการลดความเค็มแล้ววิธีที่ง่ายและได้ผลที่สุดคือการลดปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในน้ำลงหรือควบคุมปริมาณอาหารให้อยู่ในระดับที่กุ้งกินได้หมดพอดีนั่นเอง (พรเลิศจันทร์รัชชกุล, 2546; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), 2563)



ภาพประกอบ 8 กุ้งขาวที่เป็นโรคเรื่องแสง

ที่มา : ขวัญเรือน สุวรรณรัตน์. (15 พฤศจิกายน 2561). โรคกับการเลี้ยงกุ้ง. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก <http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-11-14/591-2018-11-19-04-43-15>

2.2.2 โรคขี้ขาว (White feces syndrome)

อาการของโรคขี้ขาวคือ เมื่อกุ้งได้รับเชื้อกรีนจากสารพิษของเชื้อเช่น หอย เพรียง ลูกกุ้ง เคย และหนอนชนิดต่าง ๆ เข้าไปในทางเดินอาหารแล้ว เชื้อที่เข้าไปก็จะมีการพัฒนาและเจริญเติบโตมากขึ้นเรื่อย ๆ จนเต็มลำไส้กุ้งก็จะทำให้ลำไส้เกิดการอุดตัน กุ้งก็จะกินอาหารได้น้อยลง ส่งผลให้มีต้นทุนอาหารสูงขึ้น ซึ่งอาการของกุ้งที่เป็นโรคนี้คือมีขี้ขาวลอยอยู่บนผิวน้ำ แต่บางครั้งอาการขี้ขาวของกุ้งก็อาจเกิดจากการที่กุ้งกินอาหารที่มีไขมันมากเกินไป เมื่อขับถ่ายออกมาก็จะมีขี้ขาวลอยอยู่บนผิวน้ำเนื่องจากมีก้อนไขมันปะปนอยู่มาก ดังแสดงในภาพประกอบที่ 9 ทั้งนี้ต้องสังเกตอาการอื่น ๆ ประกอบควบคู่ไปด้วย เมื่อเปรียบเทียบสีของเปลือกกุ้งที่เป็นโรคขี้ขาวกับปกติก็จะพบว่ากุ้งที่เป็นโรคขี้ขาวจะมีเปลือกบางกว่าปกติและมีสีซีดเนื่องจากเนื้อเยื่อใต้เปลือกได้เกิดการอักเสบและตาย ส่วนผลที่ตามมาอีกประการคือ เปลือกกุ้งจะหลวม อาการของโรคนี้นอกจากจะส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหารกุ้งโดยตรงแล้วยังทำให้

ระบบกล้ามเนื้อมีการอักเสบ มีสีขาวยุ่นและเหี่ยว ทำให้กุ้งเคลื่อนไหวได้ช้าลง และไม่ติดตัว เมื่อยกยอแล้วก็จะทยอยตายในที่สุด ส่วนในการการป้องกันโรคชี้ขาวควรใช้ลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อ กรีกาเรียนและจะต้องตรวจสอบสุขภาพและทางเดินอาหารของกุ้งให้บ่อยขึ้นเพื่อไม่ให้พยาธิกรีกาเรียน เข้าไปเติบโต นอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้ในฟาร์มควรแยกใช้เฉพาะบ่อและใช้อวนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้ว ในการรักษาโรคชี้ขาวในกุ้งยังไม่มีวิธีการที่สามารถทำได้สำเร็จ ทำให้ผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ จะต้องจับกุ้งขายก่อนกำหนด ดังนั้นเรื่องของการรักษาโรคชี้ขาวในกุ้งขาวแวนนาไม่ยังคงเป็น ประเด็นที่จะต้องทำการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการรักษาต่อไปเพิ่ม (อนุสรฯ แก่นทอง, 2562; เอกอนันต์ ยุวเบญจพล, 2553)



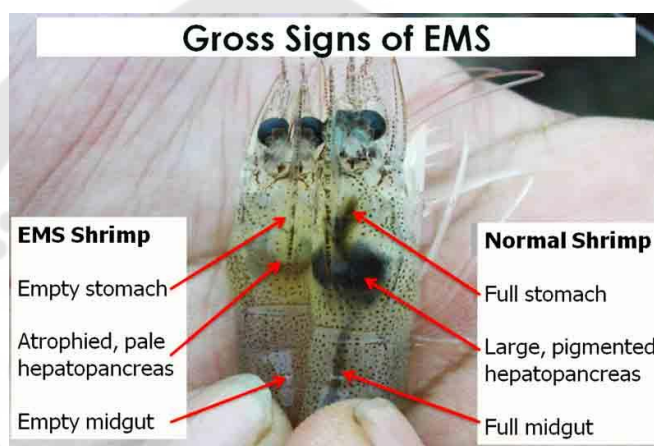
ภาพประกอบ 9 กุ้งที่เป็นโรคชี้ขาว

ที่มา : อนุสรฯ แก่นทอง. (2562). เมื่อกุ้งเป็นโรคชี้ขาว. สืบค้นเมื่อ 2 ตุลาคม 2563 จาก <http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-14-19/843-2019-06-21-04-24-01>

2.2.3 โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS)

โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS) หรือเรียกอีกชื่อ ว่ากลุ่มอาการตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome: AHPNS) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 10 เป็นสาเหตุของการตายเป็น จำนวนมากของ กุ้งซึ่งได้สร้างความเสียหายเป็นวงกว้างต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศในแถบเอเชีย บ่อเลี้ยง กุ้งที่มีการติดโรคได้ประสบกับปัญหาการตายของกุ้งเป็นปริมาณสูงมากในช่วงระยะแรกของการ

เจริญเติบโตของกุ้งซึ่งอัตราการตายของกุ้งในบางฟาร์มอาจสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยสาเหตุของการเกิดโรคนี้นับว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่พบได้ทั่วไปในน้ำกร่อยบริเวณชายฝั่งทะเลทั่วโลก ซึ่งก็คือ *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีพลาสมิดที่สามารถสร้าง toxin ได้ ส่วนวิธีการป้องกันปัญหาที่มีความเกี่ยวข้องกับโรค EMS ได้คือ ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมก่อนเข้าสู่ตัวเต็มวัยจากแหล่งที่เชื่อถือได้และควรได้รับใบรับรองการตรวจสอบสุขภาพก่อนที่จะนำลูกกุ้งเข้าสู่ฟาร์ม และต้องมีการกักกันลูกกุ้งใหม่ไว้ชั่วคราวก่อนที่จะทำการปล่อยลงในบ่อเลี้ยง นอกจากนี้ควรให้อาหารที่มีคุณภาพดีหลีกเลี่ยงความเครียดต่างๆ ที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม และเลี้ยงกุ้งให้มีสุขภาพแข็งแรง (องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ(FAO), 2556)



ภาพประกอบ 10 กุ้งที่เป็นโรคตายด่วน

ที่มา : shrimp news international. (December 11, 2013). Instant Expert: Early Mortality Syndrome. Retrieved September 30, 2020, from <http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/NewsReportsFolder/VietnamGAAwebinarEMS.html>

3 ภูมิคุ้มกันของกุ้ง

กุ้งขาวเป็นสัตว์ที่มีเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่ไม่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาภายในตัว กุ้งขาวจะเกิดการตอบสนองโดยใช้เม็ดเลือด (hemocyte) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเม็ดเลือดนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ เซลล์ไฮยาลิน (Hyaline cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีแกรนูลาร์ มีขนาดเล็กใช้ในกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เซลล์เซมิแกรนูลาร์ (semi-granular cell) และ

เซลล์แกรนูลาร์ (granular cell) เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลจำนวนมากและเป็นตำแหน่งของระบบโปรตีนออกท็อกซิเดส (ProPO system) โดยสารภูมิคุ้มกันหลายชนิดถูกผลิตและเก็บไว้ในแกรนูลของเม็ดเลือดก่อนที่จะปล่อยออกสู่เม็ดเลือดแดงเมื่อกระตุ้นโดยแบคทีเรียหรือส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Tassanakajon et al., 2013)

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย กิ่งจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือด โปรตีน หรือเอนไซม์ ต่างๆ ในขณะนั้นๆ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยจะเกิดกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกิ่งโดยเริ่มจากปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ได้แก่ peptidoglycan(PG) lipopolysaccharides (LPS) และ β -glucans (BGs) เป็นต้น ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพผ่านตัวรับ Pattern Recognition Proteins (PRPs) หรือ Pattern Recognition Receptors (PRRs) เช่น เลคติน (lectin) เป็นต้น ที่อยู่บนผนังเซลล์เม็ดเลือดกิ่ง ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถจำแนกได้ว่าสิ่งนี้เป็นแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย จากนั้นโมเลกุลหรือโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ การส่งสัญญาณ (signal molecules) จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยจะมีกลไกการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม 2 รูปแบบ คือ

การตอบสนองโดยการใช่เซลล์ (cellular immune response) โดยเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในระบบเลือดจะเคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่มีการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม ต่อมาจะเกิดการทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์เม็ดเลือดซึ่งประกอบด้วย กระบวนการกินเซลล์แบบฟาโกไซโทซิส การเกิดในดูล และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม

ส่วนการตอบสนองอีกรูปแบบหนึ่งคือ การตอบสนองด้วยสารน้ำ (humoral immune response) โดยภายในเซลล์เม็ดเลือดจะผลิตและปล่อยสารต่าง ๆ ออกมาเพื่อใช้ตอบสนองต่อการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม เช่น AMPs ตัวยับยั้งโปรทีเนส และไซโทคีนไลต์แฟกเตอร์ เป็นต้น (Tassanakajon et al., 2013; มลฤดี สนิธิ, 2559)

4 เปปไทด์ต้านจุลชีพ Antimicrobial peptides (AMPs)

4.1 ลักษณะทั่วไปของเปปไทด์ต้านจุลชีพ

เปปไทด์ต้านจุลชีพ (AMPs) เป็นโปรตีนขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนน้อยกว่า 150-200 โมเลกุล ซึ่งพบอยู่ในระบบภูมิคุ้มกันสิ่งมีชีวิตที่มีมาโดยกำเนิดและหน้าที่เป็นแนวป้องกันแรกที่ต่อสู้กับจุลินทรีย์ที่บุกรุก ดังนั้น AMPs จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการต่อสู้กับการรุกรานของเชื้อโรค AMPs สามารถแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น พีเนียดิน (penaeidins) ไลโซไซม์ (lysozymes) แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (antilipopolysaccharide factors, ALFs)

และครัสติน (crustins) โดยแต่ละชนิดจะมีลักษณะโครงสร้างการทำงานและความจำเพาะที่แตกต่างกัน (Tassanakajon et al., 2013) ได้มีรายงานการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ AMPs หลากหลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งพบว่า AMPs แต่ละชนิดมีอยู่หลายไอโซฟอร์ม โดยแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันไป (Tassanakajon et al., 2015) จากการศึกษา AMPs ในกุ้งพบว่า AMPs ที่ใช้ป้องกันสิ่งแปลกปลอมนี้มักจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งได้รับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมซึ่ง AMPs แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน (Donpuksa et al., 2014; Liu et al., 2016; Yu et al., 2016) โดยในงานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับครัสติน ซึ่งเป็น AMPs ที่พบส่วนใหญ่ในสิ่งมีชีวิตตระกูลครัสเตเชียน ได้แก่ ปู และกุ้ง

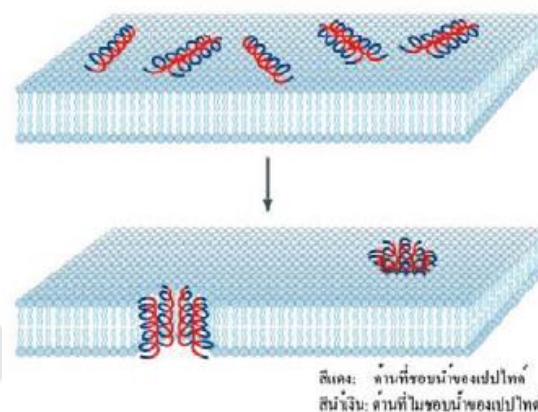
4.2 กลไกการทำงานของ AMPs

AMPs ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1-5 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (cation antimicrobial peptides) เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกลาง (non-polar solvents) ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยกลไกในการทำงานของ AMPs เริ่มต้นจากการดึงดูดกันระหว่างขั้วลบที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์กับขั้วบวกของโปรตีน เช่น กลุ่มฟอสเฟตของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ในแบคทีเรียแกรมลบ และกรดเทโคอิก (teichoic acid) ในแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นเมื่อ AMPs ถูกดึงดูดเข้ามาบริเวณใกล้เชื้อจุลินทรีย์ และเคลื่อนตัวผ่านส่วนเปลือกนอกของแบคทีเรียเข้ามาใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วนั้น AMPs จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ เนื่องจากโครงสร้างมีลักษณะแบบแอมฟิพาติก (amphipathic) คือ มีทั้งด้านที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และด้านที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยด้านที่ไม่ชอบน้ำจะจับกับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ AMPs สามารถยึดติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ กลไกการทำงานของ AMPs ในการแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์มีผู้เสนอ (อภิชาติ กาญจนทัต & ณัฐชัย เทียงบูรณธรรม, 2553) ไว้หลายรูปแบบ ดังต่อไปนี้

4.2.1 รูปแบบบาร์เรล-สเตฟว์ (Barrel-stave model)

AMPs จะทำให้ชั้นในของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่องว่างโดยการแทรกตัวเข้าไปจากนั้นจะจัดเรียงตัวโดยนำด้านที่ไม่ชอบน้ำเรียงตัวชิดกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของฟอสโฟลิปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ และนำด้านที่ชอบน้ำเรียงตัวชิดกับช่องที่อยู่ตรงกลางซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำอยู่ โดยทำการจัดเรียงตัวแบบขนานกับทั้งชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์และชั้นฟอสโฟลิปิดสองชั้น (phospholipids bilayer) ดังนั้นสารโมเลกุลเล็กต่างๆ และไอออน จึงสามารถเคลื่อนออกสู่

ภายนอกเซลล์ได้ ดังนั้นเมื่อส่วนประกอบของเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติทำให้เชื้อจุลินทรีย์จะตายในที่สุด ดังแสดงในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 การทำงานของเปปไทด์ต้านจุลชีพรูปแบบบาร์เรล-สเตฟวี

ที่มา: Brogden K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3), 238-250.

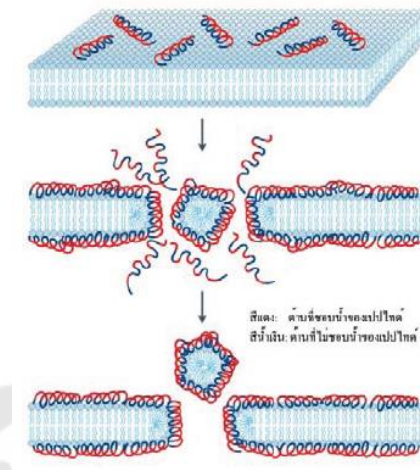
4.2.2 รูปแบบคาร์เปท (Carpet model)

AMPs จะปกคลุมเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะขนานกับเยื่อหุ้มเซลล์คล้ายกับการปูพรมโดยเรียงตัวด้านที่ชอบน้ำของเปปไทด์ออกสู่ของเหลวที่อยู่ภายนอกเซลล์ และตัวด้านที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีความเข้มข้นของเปปไทด์สูงพอแล้วเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์จะเกิดเป็นช่องทางติดต่อขึ้นชั่วคราว ดังนั้น AMPs จึงสามารถแทรกตัวเข้ามาจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของชั้นฟอสโฟลิปิดสองชั้นได้ จากนั้นเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นช่องอย่างต่อเนื่องขนาดใหญ่จะส่งผลให้ส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ที่สำคัญจะหลุดออกมานอกเซลล์ได้ (อภิชาติ กาญจนทัต & ณัฐชัย เทียงบุญธรรม, 2553) ดังแสดงในภาพประกอบ 12

4.2.3 รูปแบบโทรอยดัล (Toroidal model)

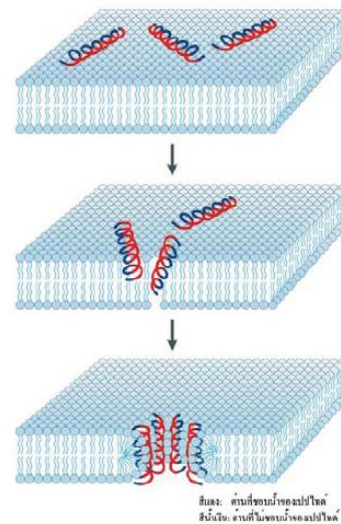
AMPs จะปกคลุมเยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการรวมตัวกัน และเหนี่ยวนำให้กลุ่มของปลายที่เป็นไขมัน (lipid head group) ของฟอสโฟลิปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์มีการงอตัวเข้ามาหา

กันเกิดเป็นช่องว่างจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ ช่องว่างนี้จะมีผนังบุด้วยส่วนของ AMPs ที่แทรกตัวเข้ามาและส่วนของฟอสโฟลิปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังแสดงในภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 12 การทำงานของเปปไทด์ด้านจุลชีพรูปแบบคาร์เปท

ที่มา : (Brogden K. A., 2005) Brogden K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3), 238-250.



ภาพประกอบ 13 การทำงานของเปปไทด์ด้านจุลชีพรูปแบบโทรอยดัล

ที่มา: Brogden K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3), 238-250.

5 ครัสติน

5.1 ข้อมูลพื้นฐานของครัสติน

ครัสตินเป็น AMPs ชนิดหนึ่งที่มีลักษณะเฉพาะ ซึ่งโครงสร้างของครัสตินประกอบด้วยบริเวณที่เป็นเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ที่บริเวณปลาย N ของสายพอลิเปปไทด์ และบริเวณที่เรียกว่า โดเมน WAP ซึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน Cysteine (Cys) จำนวนมาก โดยโดเมน WAP จะอยู่บริเวณปลาย C ของสายพอลิเปปไทด์ของครัสติน ในปัจจุบันสามารถจำแนกครัสตินได้ 5 ชนิด ดังภาพประกอบที่ 2 โดยครัสตินแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างเปปไทด์ส่งสัญญาณกับโดเมน WAP ซึ่งครัสตินทุกประเภทนั้นประกอบด้วยเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ที่บริเวณปลาย N ซึ่งเปปไทด์ส่งสัญญาณนั้นทำหน้าที่ในการส่งสารน้ำออกไปนอกเซลล์เพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม และโดเมน WAP ที่ปลาย C ซึ่งครัสตินแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของโดเมนและความยาวแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างเปปไทด์ส่งสัญญาณกับโดเมน WAP

โดยครัสตินชนิดที่ 1 ประกอบด้วยบริเวณที่มี Cys-rich ครัสตินชนิดที่ 2 ประกอบด้วยบริเวณที่มี Gly-rich และ Cys-rich ในครัสตินชนิดที่ 3 หรืออีกชื่อเรียกหนึ่งว่า single WAP domain (SWD) containing protein ประกอบด้วยบริเวณที่มี Pro และ Arg-rich ส่วนครัสตินชนิดที่ 4 หรืออีกชื่อเรียกหนึ่งว่า double WAP domain (DWD) containing protein นั้นประกอบด้วยโดเมน WAP ทำให้ครัสตินชนิดที่ 4 มีโดเมน WAP ถึง 2 โดเมน และครัสตินชนิดที่ 5 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับครัสตินชนิดที่ 1 แต่มี aromatic amino acid-richแทรกเข้ามาซึ่งอยู่ระหว่าง Cys-rich และโดเมน WAP (Tassanakajon et al., 2015)

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโดเมน WAP โดยใช้ NJ phylogenetic พบว่าโดเมน WAP สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยครัสตินชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 และชนิดที่ 5 ส่วนในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยครัสตินชนิดที่ 3 และชนิดที่ 4 ซึ่งโดยทั่วไปโดเมน WAP ที่อยู่ในสัตว์จะแสดงรูปแบบการทำงานทางชีวภาพที่หลากหลายในระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพและยับยั้งการทำงานของโปรตีนบางชนิด งานวิจัยหลายชิ้นได้รายงานว่ครัสตินมีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันและยังแตกต่างกันไปตามการตอบสนองต่อสิ่งเร้าในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันด้วย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และอุณหภูมิหรือสภาวะแวดล้อมต่างๆ นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของครัสตินยังแสดงให้เห็นว่า ครัสตินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก (ครัสตินชนิดที่ 1, 2 และ 3) และแบคทีเรียแกรมลบ (ครัสตินชนิดที่ 2 และครัสตินชนิด

ที่ 3 บางประเภท) และเป็นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส (ครัสตินชนิดที่ 3 และ 5) ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Tassanakajon et al., 2015)

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านจุลชีพต่าง ๆ ของครัสติน โดยส่วนมากครัสตินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Smith, 2011) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยพบว่าครัสตินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสได้อีกด้วย (Donpudsa et al., 2014) จากการรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 1 พบว่า ครัสตินชนิดที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนี้ โปรตีน CruHa1 และ CruHa2 จากปู *Hyas araneus* (Sperstad et al., 2009) และโปรตีน CrusEs จากปูขน (*Eriocheir sinensis*) (Mu et al., 2010) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก ต่อมาในปี 2012 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน PtCrustin2 และ PtCrustin3 จากปูม้า (*Portunus trituberculatus*) (Cui et al., 2012) พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ ถัดมา (Wang, Y., Zhang, X. W., et al., 2018) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน SpCrus3 และ SpCrus4 ในปูขาว (*Scylla paramamosain*) พบว่านอกจากจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบแล้ว ยังสามารถจับกับองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียได้ด้วย จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ และถัดมาในปี 2019 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน SpCrus6 ในปูขาว (*S. paramamosain*) (Du, Wang, et al., 2019) พบว่ามีลักษณะโครงสร้างแตกต่างจากครัสตินชนิดที่ 1 ทั่วไปคือ ประกอบด้วยเปปไทด์สังสัญญาณที่บริเวณปลาย N ถัดมาเป็นกรดอะมิโนโพสไลน์ กรดอะมิโนไกลซีน กรดอะมิโนซีเตอีน และตามด้วยโดเมน WAP ที่บริเวณปลาย C ของสายพอลิเปปไทด์ แต่ SpCrus6 ถือเป็นครัสตินชนิดใหม่ที่ยังจัดอยู่ในครัสตินชนิดที่ 1 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา และยั้งรวมถึง white spot syndrome virus (WSSV) อีกด้วย ซึ่งในด้านลักษณะโครงสร้างภายในครัสตินที่ส่งผลต่อฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพชนิดต่างๆ นั้นเป็นเรื่องที่ยังคงต้องทำการศึกษาต่อไป

และจากรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นครัสตินที่มีอยู่ในกุ้ง และแสดงไอโซฟอร์มที่หลากหลายมาก (Smith et al., 2008; Tassanakajon et al., 2015) พบว่ายีน crustinPm1 ในกุ้ง *Penaeus monodon* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Supungul et al., 2008) ส่วนโปรตีน Crus-likePm ใน *P. monodon* แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่รุนแรงต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรีย

แกรมลอบ (Amparyup et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนลูกผสมจากยีนของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (CrusPm5) และกุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* (Crus-likeFc1) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลอบ (Vatanavicharn et al., 2009; Zhang et al., 2007) แต่ในทางตรงกันข้าม เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนครัสติน LvABP1 ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ส่งผลให้การติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลอบ (*Vibrio penaeicida*) เพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Shockey et al., 2009) แสดงให้เห็นว่าครัสตินชนิดที่ 2 มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถต้านการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลอบได้ นอกเหนือจากนั้น ในปี 2012 ได้มีการศึกษาบริเวณ Gly-rich และ Cys-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 (crustinPm1) ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (Suthiantong et al., 2012) โดยศึกษาบริเวณ Gly-rich, Cys-rich และโดเมน WAP ของ crustinPm1 โดยแยกผลิตโปรตีนลูกผสมของทั้ง 3 บริเวณ และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ ผลการทดลองที่ได้พบว่าโปรตีนที่มีเฉพาะส่วนของโดเมน WAP ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลอบ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำโปรตีนลูกผสมของบริเวณ Gly-rich หรือ Cys-rich เพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งเท่านั้นมาทดสอบ พบว่าโปรตีนลูกผสมดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอยู่ แต่ความแรงของฤทธิ์การต้านจุลชีพนี้ลดลงกว่า crustinPm1 ปกติที่มีองค์ประกอบครบทั้งบริเวณ Gly-rich และ Cys-rich ถัดมาในปี 2018 ได้มีการศึกษายีน SpCrus5 จากปู *S. paramamosain* ที่มีโครงสร้างที่ต่างจากครัสตินชนิดที่ 2 ทั่วไปคือ ประกอบด้วยบริเวณ Cys-rich ที่ปลาย N มีโดเมน WAP อยู่ตรงกลาง ส่วนบริเวณ Gly-rich ย้ายไปอยู่ที่ปลาย C (Wang, Y., Zhang, C., et al., 2018) โดยนำบริเวณ Gly-rich ออกไปจากโปรตีนนี้ จากนั้นจึงนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมและทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ พบว่าโปรตีน SpCrus5 ตัวปกติมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ และสามารถจับกับจุลินทรีย์และองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่า SpCrus5 ที่ไม่มีบริเวณ Gly-rich ดังนั้นจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาจึงแสดงให้เห็นว่าทั้งบริเวณ Gly-rich และ Cys-rich น่าจะมีความสำคัญต่อความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพ

แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พยายามทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 เกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนสชนิดต่างๆ ดังนี้ ในปี 2010 พบว่ายีน Plcrustin1 และ Plcrustin2 ของครัสตินชนิดที่ 1 จากเครย์ฟิช *Pacifastacus leniusculus* (Donpuksa et al., 2010) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก แต่เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรทีเนสกลับ

พบว่ายีนทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเนส ต่อจากนั้นได้มีการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสของครัสตินชนิดที่ 2 นั่นคือ *crustinPm1* จากกุ้งกุลาดำ (Suthianthong et al., 2012) และ *SpCrus5* จากปู *S. paramamosain* (Wang, Y., Zhang, C., et al., 2018) แต่ไม่พบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสเช่นกัน ซึ่งแตกต่างจากครัสตินชนิดที่ 3 ที่พบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส

สำหรับในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของครัสตินชนิดที่ 3 นั้น นอกจากจะพบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 แล้ว ยังพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสได้อีกด้วยดังนี้ (Amparyup et al., 2008) ได้ศึกษาครัสตินชนิดที่ 3 ในกุ้ง *P. monodon* (rSWDPm2) พบว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อแบคทีเรียแกรมบวกและมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส subtilisin A นอกจากนี้การศึกษาครัสตินชนิดที่ 3 ในกุ้ง *F. chinensis* (rSWDFc) ก็มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ subtilisin A proteinase K และ trypsin อีกด้วย (Jia et al., 2008) ซึ่งทั้ง SWDPm2 และ SWDFc ถูกจัดอยู่ในครัสตินชนิดที่ 3 ซึ่งมีลักษณะทั่วไปคือที่ปลาย N ประกอบด้วย Pro และ Arg-rich ส่วนปลายด้าน C ประกอบด้วยโดเมน WAP แต่อย่างไรก็ตามมีครัสตินที่ผิดปกติจากครัสตินชนิดที่ 3 ทั่วไป คือจากกุ้ง *Marsupenaeus japonicas* (MjSWD) และ crayfish *Procambarus clarkii* (Pc-SWD) มีเฉพาะส่วนของโดเมน WAP เท่านั้น ซึ่งครัสติน 2 ชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส ได้แก่ subtilisin A proteinase K และ โปรตีนเนสที่หลังจากแบคทีเรียเท่านั้น แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพแม้ว่าจะสามารถจับกับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้หลายชนิด ดังนั้นตามที่ได้กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าบริเวณที่ประกอบด้วย Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 อาจมีบทบาทสำคัญในการต้านจุลชีพ (Du et al., 2010; Jiang et al., 2013) ต่อมาในปี 2017 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของ LvSWD ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) (Visetnan et al., 2017) พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิดก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}) ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคตายด่วนในกุ้ง รวมทั้งยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเนสต่อ subtilisin A อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการผลิตโปรตีนลูกผสมของ LvSWD โดยผลิตเฉพาะส่วนที่เป็นโดเมน WAP เท่านั้น (rLvSWD-WAP) พบว่า rLvSWD-WAP มีเพียงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเนสเท่านั้น ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และ

ในปี 2018 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของยีน LvSWD3 จากกุ้งขาว (*L. vannamei*) เช่นเดียวกัน (Yang et al., 2018) ซึ่ง LvSWD3 จัดเป็นครีตีนชนิดที่ 3 แต่ไม่มีองค์ประกอบของบริเวณ Pro และ Arg-rich พบว่าโปรตีนลูกลผสม LvSWD3 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อไวรัส แต่พบว่าทำได้เพียงยืดระยะเวลาในการตายของกุ้งเมื่อติดเชื้อ WSSV เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวไปข้างต้นว่าบริเวณ Pro และ Arg-rich นั้นอาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (Tassanakajon et al., 2015) แต่ไม่น่าจะส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส

6 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

6.1 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วนั้น รูปร่างโมเลกุล ขนาดของสาร แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ก็ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสารเช่นกัน ปกติแล้วภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอจะประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมากจึงส่งผลให้สารละลายของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอมีประจุเป็นลบที่ pH มีค่าเป็นกลาง ดังนั้นเมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเกิดการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากมีองค์ประกอบเป็นหมู่ฟอสเฟตอยู่ภายในโมเลกุล โดยขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะมีประจุต่อมวลน้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าประจุต่อมวลโมเลกุลเท่ากัน ดังนั้นความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ (อนุชิตา วงศ์ชื่น, 2563)

6.1.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล (Agarose gel electrophoresis)

อะกาโรสเจลเป็นพอลิเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydro-galactose ซึ่งแยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสจับตัวกับสารต่างๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยทั่วไปจะใช้อะกาโรสเจลเป็นส่วนใหญ่ เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่าและการเตรียมทำได้ง่ายและไม่มีอันตรายเมื่อเทียบกับ โพลีอะครีลาไมด์ คือสามารถเตรียมให้เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนได้มากกว่า 10 นาโนเมตร โดยขนาดของรูพรุนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสคือ ถ้าความเข้มข้นของอะกาโรสน้อยลงจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนใหญ่ จึงเหมาะสำหรับการแยกสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก (ขนาดประมาณ 50-30,000 คู่เบส) หรือโปรตีนขนาดใหญ่ (อนุชิตา วงศ์ชื่น, 2563)

6.1.2 Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยอาศัยการเชื่อมต่อนของ acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจลโดยมี TEMED เป็น catalyst และมี ammonium persulfate เป็น initiator โดยโปรตีนจะอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent โดย SDS จะจับพอลิเปปไทด์ โดยมี -mercaptoethanol หรือ dithiothreitol เป็น reducing agent เพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide โปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบเมื่อให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดน้ำหนักโมเลกุล และขนาดของรูพรุนของเจล (โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก) โดยขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้มข้นของ acrylamide ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้นขนาดของรูพรุนจะเล็กลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูล (BIOTECH, 2563)

6.2 Agar well diffusion method

Agar well diffusion method เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียโดยการนำสารที่ต้องการทดสอบที่อยู่ในรูปสารละลายหรือของเหลวหยอดลงในหลุม (Well) โดยให้สารที่ต้องการทดสอบแพร่ผ่านเข้าไปในรูพรุนของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบกระจายตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง หากสารที่ต้องการทดสอบมีฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งกระบวนการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะปรากฏบริเวณใส (Clear zone) ขึ้น เนื่องจากไม่มีเชื้อแบคทีเรียทดสอบเจริญเติบโต (ณัฐพนธ์ ทรงนาคา, 2561)

กระบวนการเริ่มจากเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ การควบคุมปริมาณเชื้อที่ต้องการ โดยการเทียบความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland หรือมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง $1-2 \times 10^8$ CFU/mL จากวิธีการนับจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จากนั้นกระจายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและเจาะรูให้ได้หลุมขนาด 6-8 mm บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งด้วย Pipette tip ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ แต่ละหลุมมีปริมาตร 20-100 μ L เตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นที่ต้องการและหยอดลงไปในแต่ละหลุม ขั้นตอนสุดท้ายนำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ได้รับการหยอดสารละลายลงในหลุม บ่มในสภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ และทำการวัดขนาดของบริเวณใสที่ปรากฏ

การทดสอบโดยวิธีการ Agar well diffusion เป็นวิธีการทดสอบที่สามารถประยุกต์ใช้สารที่ได้จากแหล่งกำเนิดที่หลากหลาย สามารถกำหนดปริมาณความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ และสามารถใช้อย่างปฏิชีวนะมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นเป็น Positive control และตัวทำละลายที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบเป็น Negative control เพื่อให้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างสารที่สนใจกับยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน(ณัฐพนธ์ ทรงนาคา, 2561)

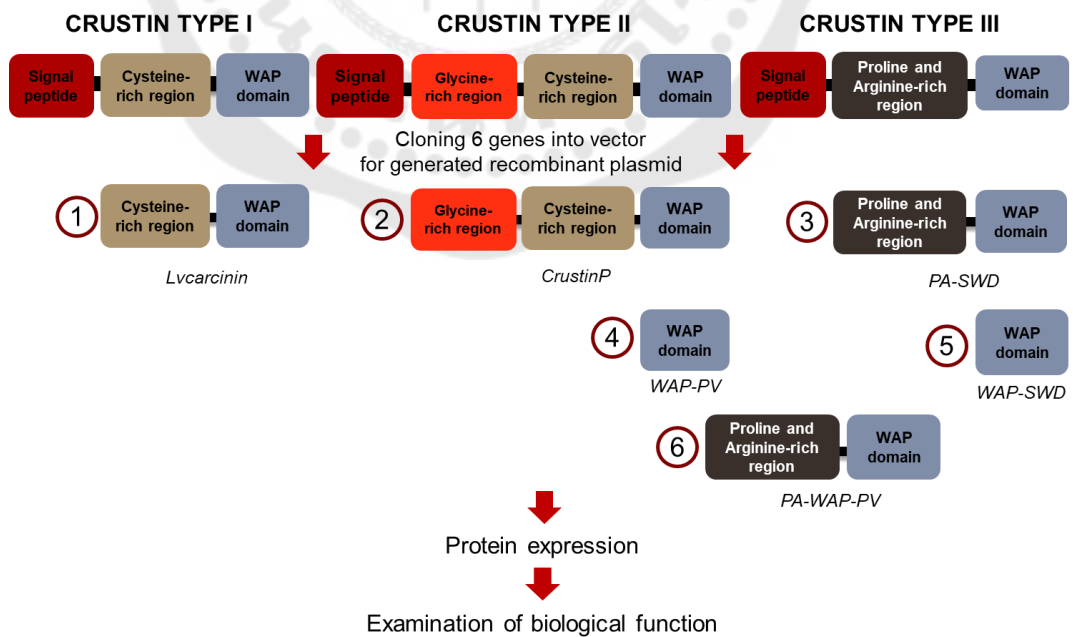


บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของยีนของครัสตินชนิดที่ 1, 2 และ 3 รวมทั้งบริเวณ Gly และ Cys-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 และบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 ที่พบในกุ้งขาวต่อฤทธิ์การต้านจุลชีพ และฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส โดยผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนที่แสดงได้ดังภาพประกอบ 14 ดังนี้

1. การสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีนทั้ง 5 ชนิด ประกอบด้วยยีน *Lvcarcinin* ของครัสตินชนิดที่ 1 ยีน *CrustinP* และโดเมน WAP (WAP-PV) ของครัสตินชนิดที่ 2 รวมทั้งยีน *PA-SWD* และโดเมน WAP (WAP-SWD) ของครัสตินชนิดที่ 3 เพื่อนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli*
2. การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PA-SWD* ต่อกับ *WAP-PV* (*PA-WAP-PV*) จากนั้นโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดเพื่อนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli*
3. การผลิตโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิดในระบบ *E. coli* และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์
4. การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด
5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนสของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด



ภาพประกอบ 14 ขั้นตอนสรุปโดยย่อของการทำการทดลอง

หมายเหตุ ความหมายชื่อยีน *PA-WAP-PV* คือ PA ย่อมาจากบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครีส์ทินชนิดที่ 3 ส่วน *WAP-PV* นั้นคือบริเวณโดเมน WAP ของครีส์ทินชนิดที่ 2 และ *PV* ย่อมาจาก *penaeus vannamei*

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารเคมี

1.1 ชุดเพิ่มปริมาณ DNA (BioLab tag DNA Polymerase) บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2 ชุดเชื่อมต่อยีนที่สนใจกับเวกเตอร์ (T4 DNA ligase) บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

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

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

1.5 Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose column บริษัท GE Healthcare ประเทศสวีเดน

1.6 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RV บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.8 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.9 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I บริษัท BioLabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.10 RedSafe Nucleic Acid Staining Solution บริษัท Boca Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

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

1.12 ยาปฏิชีวนะ Ampicillin บริษัท Gold Biotechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.13 ยาปฏิชีวนะ Kanamycin บริษัท Gold Biotechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.14 Yeast Extract Poder บริษัท HIMEDIA ประเทศอินเดีย

1.15 Peptone บริษัท BD Biosciences ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.16 Tris บริษัท Vivantis ประเทศมาเลเซีย

1.17 เอนไซม์โปรตีนเนสเค (proteinase K)

1.18 นมผงคาร์เนชั่นสูตร 3+ บริษัท Nestle ประเทศไทย

2. เครื่องมือ

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

2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น UNIVERSAL320R ยี่ห้อ Hettish

ประเทศเยอรมัน

2.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1200 ยี่ห้อ MAPADA ประเทศจีน

2.4 เครื่อง thermal cycler ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T100™ ประเทศสิงคโปร์

2.5 หม้อน้ำแช่เชื้อโรคอัตโนมัติ รุ่น GI54TW บริษัท upmarketing

2.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น ZHWY-100H ยี่ห้อ ZHICHEN ประเทศจีน

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

3. จุลชีพ

3.1 *Bacillus megaterium*

3.2 *Bacillus subtilis*

3.3 *Escherichia coli* 363

3.4 *Escherichia coli* BL21(DE3)

3.5 *Micrococcus luteus*

3.6 *Staphylococcus aureus*

3.7 *Vibrio harveyi* 639

3.8 *Vibrio parahaemolyticus*

3.9 *Vibrio parahaemolyticus* (APHAND)

4. โปรแกรม

4.1 โปรแกรม signalP

4.2 โปรแกรม Clustal Omega

4.3 โปรแกรม ExPASy

4.4 โปรแกรม Blast

วิธีการทดลอง

1. การสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีนทั้ง 5 ชนิด ประกอบด้วยยีน *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD* และ *WAP-SWD* เพื่อนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli*

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

โดยทั่วไปในการผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli* โปรตีนที่ได้จะต้องไม่มีส่วนประกอบของเปปไทด์ส่งสัญญาณอยู่ในสายพอลิเปปไทด์ ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD* และ *WAP-SWD* จำเป็นที่จะต้องนำไปวิเคราะห์หาบริเวณที่เป็นเปปไทด์ส่งสัญญาณด้วยโปรแกรม SignalP จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนทั้ง 5 นี้ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยปราศจากบริเวณเปปไทด์ส่งสัญญาณ ในส่วนไพรเมอร์ Forward ของยีน จะทำการเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของที่สามารถแปลรหัสได้เป็นกรดอะมิโนฮิสทีดีน 6 โมเลกุล (6×His-tag) เพื่อใช้สำหรับขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อใช้สำหรับในการโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์หรือพลาสมิด และไพรเมอร์ Reverse จะเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อใช้สำหรับในการโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์หรือพลาสมิด และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสหยุดเข้าไปด้วย ดังแสดงในตาราง 4

1.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

การเพิ่มปริมาณของยีนบริเวณที่ต้องการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ DNA ซึ่งปริมาตรรวมในปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 50 μ l ประกอบด้วยสารผสมดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 mM dNTP 0.2 μ M forward primer 0.2 μ M reverse primer และ 1.25 units ของ taq DNA polymerase น้ำปราศจากไอออน (Deionized water หรือ DI water) และ cDNA ของกุ้งขาว โดยในการเพิ่มปริมาณยีนจะใช้ไพรเมอร์ของยีนแต่ละชนิดดังที่แสดงในตาราง 5 โดยยีน *Lvcarcinin* ใช้ไพรเมอร์ LVCarcininlikeProteinF และ LVCarcininlikeProteinR, ยีน *CrustinP* ใช้ไพรเมอร์ PvHm082-crustinPF_V2 และ PvHm082crustinPR, ยีน *WAP-PV* ใช้ไพรเมอร์ WAP_PvHm082crustinPF และ PvHm082crustinPR, ยีน *PA-SWD* ใช้ไพรเมอร์ Lv-SWD-PArgF-V2 และ Lv-SWD-R และยีน *WAP-SWD* โดยใช้ไพรเมอร์ Lv-SWD-WAPF และ Lv-SWD-R โดยการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *PA-SWD* และ *WAP-SWD* ได้ทำการดัดแปลงวิธีจาก (Visetnan et al., 2017) จากนั้นนำสารผสมไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาในสภาวะที่กำหนดอีก 35 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจึงทำ

ปฏิกิริยาที่ 72 °C ต่ออีก 10 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 3% agarose gel ที่ผสมกับ Redsafe ซึ่งเป็นสารวางแสงในการวิเคราะห์ และตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต

1.3 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีส่วนของยีนที่สนใจอยู่

การสร้างพลาสมิดลูกผสม เริ่มจากการเชื่อมชิ้นส่วนยีนที่สนใจกับเวกเตอร์ (พลาสมิดที่ใช้สำหรับนำยีนที่สนใจเข้าสู่แบคทีเรีย เพื่อนำไปผลิตโปรตีนในแบคทีเรีย) ทำได้โดยการสกัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่สนใจออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยตัดชิ้นส่วนของเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อไปทำให้บริสุทธิ์ เมื่อได้ยีนที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามที่ได้ออกแบบไว้ เพื่อนำชิ้นยีนที่สนใจโคลนเข้าไปใน pVR500 vector (พลาสมิดที่ดัดแปลงมาจาก pET32 โดยตัดส่วนที่เป็น 6×His-tag ออก ซึ่งอธิบายไว้ใน (Donpuksa et al., 2009) ซึ่ง pVR500 vector จะต้องถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับ ผลิตภัณฑ์ PCR เช่นกัน โดยปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR และ pVR500 vector ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการสกัดผลิตภัณฑ์ PCR และ pVR500 vector ดังกล่าวออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ และทำการเชื่อมต่อระหว่างยีนที่สนใจกับเวกเตอร์ดังกล่าวเข้าด้วยกัน ด้วย T4 DNA ligase และบ่มที่ 16 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม จากนั้นจึงนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-blue ที่เตรียมอยู่ในรูป competent cell โดยวิธี CaCl₂ transformation จากนั้นทำการกระตุ้นด้วยความร้อนที่ 42.5 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB 1 mL แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำให้เชื้อแบคทีเรียกระจายตัวบนอาหารรุ้นเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ที่ประกอบด้วย 100 µg/µl ampicillin แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* ที่เจริญเติบโตบนอาหารรุ้นเพาะเลี้ยงเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ที่มีส่วนประกอบของ 100 µg/µl ampicillin แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำพลาสมิดลูกผสมไปสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดพลาสมิด จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ไปบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดลูกผสมที่ได้ โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วยพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ในการตัดต่อยีนเข้าสู่เวกเตอร์ สารละลายบัฟเฟอร์ และนำปราชจากไอออน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ไฟรีซีส โดยใช้ 3% agarose gel ที่ผสมกับ Redsafe ซึ่งเป็นสารขาวแสงสำหรับการวิเคราะห์ และตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต

1.4 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

เมื่อได้พลาสมิดลูกผสมที่คาดว่าน่าจะถูกต้องแล้ว ก็จะนำพลาสมิดลูกผสมไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการส่งไปตรวจสอบที่บริษัท U2Bio จากนั้นนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal Omega

2. การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PA-SWD* ต่อกับ *WAP-PV* (*PA-WAP-PV*) จากนั้นโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดเพื่อนำไปผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli*

2.1 การเชื่อมบริเวณ Pro และ Arg-rich ของยีน *PA-SWD* เข้ากับยีน *WAP-PV*

การเชื่อมบริเวณ Pro และ Arg-rich ของยีน *PA-SWD* เข้ากับยีน *WAP-PV* ทำได้โดยทำการเพิ่มปริมาณบริเวณที่ประกอบด้วย Pro และ Arg-rich ของยีน *PA-SWD* โดยใช้ไพรเมอร์ Lv-SWD-PAArgF-V2 และ Lv-SWD-PAArgR และยีน *WAP-PV* โดยใช้ไพรเมอร์ PvHm082crustinP_WAPF และ PvHm082-crustinPR ดังแสดงในตาราง 4 ตามวิธีการในข้อ 1.2 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการสกัดออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยตัดชิ้นส่วนของเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์ PCR เพื่อไปทำให้บริสุทธิ์ เมื่อได้ยีนที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามที่ได้ออกแบบไว้ เพื่อนำบริเวณที่ประกอบด้วย Pro และ Arg -rich ของยีน *PA-SWD* และยีน *WAP-PV* มาเชื่อมต่อกันและโคลนเข้าไปใน pVR500 vector ตามวิธีการทดลองข้อ 1.3 และ 1.4

ตาราง 4 ไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน

| ไพรเมอร์ | ชนิดของ ไพรเมอร์ | ลำดับเบส (5'-3') | วัตถุประสงค์ การใช้งาน |
|------------------------|---------------------|--|-------------------------------------|
| LVCarcininlikeProteinF | forward | TTAACCATGGGCCATCATCATCATCA TTGCCGCTATTACTGC | เพิ่มปริมาณยีน <i>Lvcarcinin</i> |
| LVCarcininlikeProteinR | reverse | ATATCTCGAGTTATCCTCCTCGATTAC | |
| PvHm082crustinPF_V2 | forward | AATTGATATCCATCATCATCATCATGG CAAGTTTCGCGGCTTC | เพิ่มปริมาณยีน <i>CrustinP</i> |
| PvHm082crustinPR | reverse | TATACTCGAGTCATCCGAAAACCTGCG | |
| WAP_PvHm082crustinPF | forward | AATTGAATTCCATCATCATCATCATTTG CCCACAAGTCCGTC | เพิ่มปริมาณยีน <i>WAP-PV</i> |
| PvHm082crustinPR | reverse | TATACTCGAGTCATCCGAAAACCTGCG | |
| Lv-SWD-PArgF-V2 | forward | TTAAGATATCCATCATCATCATCATGT TCCGACGAGACACAGTC | เพิ่มปริมาณยีน <i>PA-SWD</i> |
| Lv-SWD-R | reverse | ATATCTCGAGTTACCTTCTTCCGTTTCCG | |
| Lv-SWD-WAPF | forward | TTAAGGATCCCATCATCATCATCATTT GCCAGATACGAGC | เพิ่มปริมาณยีน <i>WAP-SWD</i> |
| Lv-SWD-R | reverse | ATATCTCGAGTTACCTTCTTCCGTTTCCG | |
| Lv-SWD-PArgF-V2 | forward | TTAAGATATCCATCATCATCATCATGT TCCGACGAGACACAGTC | เพิ่มปริมาณยีน <i>PA-WAP-PV</i> |
| Lv-SWD-PArgR | reverse | ATATGGATCCCGTGCCCGGCCGGGG | |
| PvHm082crustinP_WAPF | forward | ATATGGATCCTGCCACAAGTCCGTTCC | |
| PvHm082crustinPR | reverse | TATACTCGAGTCATCCGAAAACCTGCG | |

3. การผลิตโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิดในระบบ *E.coli* และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่างๆ

ในการผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบ *E. coli* ทำได้โดยการนำพลาสมิดลูกผสมทั้ง 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD*, *WAP-SWD* และ *PA-WAP-PV* เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่อยู่ในรูป competent cell โดยวิธี CaCl_2 transformation จากนั้นทำการกระตุ้นด้วยความร้อนที่ 42.5°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำให้แบคทีเรียกระจายบนวุ้นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ที่ประกอบด้วย $100\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ampicillin แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* ที่เจริญเติบโตบนอาหารวุ้นเพาะเลี้ยงเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวที่มีส่วนประกอบของ $100\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ampicillin แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจาง 100 เท่า ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว ที่มีส่วนประกอบของ $100\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ampicillin และนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) มีค่าอยู่ในช่วง 0.6-0.8 แล้วจึงเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ตามระยะเวลาที่สนใจจะศึกษาคือ ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่างๆ โดยปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นละลายด้วยสารละลาย PBS แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) แล้วย้อมด้วยสารละลาย comessie เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลาย destain จนแผ่นเจลใส

3.2 การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ในการตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนนั้นสามารถทำได้โดยการนำเซลล์แบคทีเรียที่มีการแสดงออกดีที่สุดในช่วงเวลาที่เหมาะสมมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนของสารละลายและตะกอน โดยนำตะกอนไปละลายด้วยสารละลาย PBS ก่อนนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสารละลาย comessie เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลาย destain จนแผ่นเจลใส

3.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

เมื่อทราบเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในการผลิตโปรตีนและรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนแล้ว ก็จะทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น เพื่อนำไปผลิตโปรตีนสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นนำตะกอนของเซลล์ที่ได้ไปละลายด้วย PBS แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง แล้วนำเฉพาะส่วนสารละลายซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจอยู่ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA column ซึ่งวิธีการใช้ Ni-NTA agarose column นั้น ทำได้โดยการเติมสารละลายโปรตีนลงไปในคอลัมน์เพื่อให้โปรตีนที่เราสนใจจับกับเม็ด bead ในคอลัมน์ แล้วเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ (flow through) จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่จับกับเม็ด bead ด้วย washing buffer (สารละลาย 20 mM imidazole ในตัวทำละลาย PBS) จากนั้นทำการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย elution buffer (สารละลาย 300 mM imidazole ในตัวทำละลาย PBS) แล้วนำสารละลายที่ชะออกมาจากคอลัมน์ไปทำการไดอะไลซิส (dialysis) ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสารละลาย comessie เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลาย destain จนแผ่นเจลใส

3.4 การวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford

ในการวัดความเข้มข้นของโปรตีนนั้น ทำได้โดยดัดแปลงวิธีจาก (Bradford, 1976) โดยการนำโปรตีน 10 μ l ไปเติมสารละลาย Bradford 200 μ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย BSA เป็นสารมาตรฐาน

4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด ด้วยเทคนิค Agar diffusion assay

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด ด้วยเทคนิค Agar diffusion assay ได้ทำการดัดแปลงวิธีจาก (Donpuksa et al., 2014) ทำได้โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดที่เราจะใช้ทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด คือ *B. megaterium*, *B. subtilis*, *M. luteus* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด คือ *E. coli*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. parahaemolyticus* (AHPND) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ยกเว้นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดค่า OD₆₀₀

แล้วเจือจางเชื้อแต่ละชนิดด้วย 1% (w/v) agarose gel ในสารละลาย PBS โดยให้เชื้อแต่ละชนิดมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.4 และมีปริมาตรสุดท้าย 20 มิลลิลิตร จากนั้นรอกจนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วเจาะหลุมกว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร เพื่อเติมโปรตีนความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ในการทดลองคือ 1.5325, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 ไมโครโมลาร์ ลงหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 5 นาโนโมลาร์ kanamycin และ PBS เป็น positive control และ negative control ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการวัดบริเวณใส (clear zone) โดยรายงานผลในรูปแบบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เกิดจากโปรตีนต่อยาปฏิชีวนะ

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนสเคของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิดต่อเอนไซม์โปรทีเนสเค (proteainase K) ได้ทำการดัดแปลงวิธีจาก (Raveschot et al., 2020) สามารถทำได้โดยผสมโปรตีนลูกผสมแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.08, 0.8, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครโมลาร์ กับเอนไซม์ proteinase K ที่มีความเข้มข้น 0.08 ไมโครโมลาร์ ต่อมาทำการผสม 2.5% (w/v) นมผงลงใน 1.5% (w/v) agar powder ในสารละลาย PBS แล้วเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นรอกจนกระทั่งเจลแข็งตัวแล้วทำการเจาะหลุมกว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร แล้วจึงนำสารละลายผสมโปรตีนและเอนไซม์ลงไปเติมลงในหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ proteinase K 0.08 ไมโครโมลาร์ และ PBS เป็น negative control และ positive control ตามลำดับ แล้วบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ด้วยตาเปล่า โดยการสังเกตบริเวณใส (clear zone) เทียบกับ positive control

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับครัสตินซึ่งเป็น AMPs ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านจุลชีพและฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส ซึ่งในหลายรายงานที่ผ่านมามีพบว่าทั้งครัสตินชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 และชนิดที่ 3 นั้นสามารถต้านจุลชีพได้หลายชนิด แต่กลับพบว่ามีเพียงครัสตินชนิดที่ 3 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ทางชีวภาพของยีน *Lvcarcinin* ของครัสตินชนิดที่ 1 ยีน *CrustinP* ของครัสตินชนิดที่ 2 และโดเมน WAP ของ *CrustinP* (WAP-PV) ยีน *PA-SWD* ของครัสตินชนิดที่ 3 และโดเมน WAP ของ *PA-SWD* (WAP-SWD) นอกจากนี้ยังต้องการศึกษาเกี่ยวกับยีน *PA-WAP-PV* ซึ่งเป็นการเชื่อมยีนบริเวณที่ประกอบด้วย Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 (Pro-Arg-SWD) และยีน *WAP-PV* ซึ่งเป็นยีนบริเวณโดเมน WAP ของครัสตินชนิดที่ 2 เข้าด้วยกัน เพื่อที่จะศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพเปรียบเทียบกับยีนของครัสตินที่อยู่ในรูปแบบปกติ

1. การสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD*, *WAP-SWD* และ *PA-WAP-PV*

ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนทั้ง 3 ชนิดสามารถแสดงข้อมูลได้ดังในตาราง 5

ตาราง 5 ข้อมูลของยีน *Lvcarcinin*, *CrustinP* และ *PA-SWD*

| ชื่อยีน | ขนาดยีน (base pair) | ตำแหน่งกรดอะมิโน ของเปปไทด์สังสัญญาณ (5'-3') ที่ปลาย N | กรดอะมิโน (โมเลกุล) | มวลโมเลกุล (kDa) | ค่าจุด ไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) |
|-------------------|------------------------|--|------------------------|---------------------|--|
| <i>Lvcarcinin</i> | 336 | 1(Met) - 15(Ala) | 111 | 12.4 | 6.06 |
| <i>CrustinP</i> | 438 | 1(Met) - 18(Ala) | 145 | 14.29 | 7.47 |
| <i>PA-SWD</i> | 210 | 1(Met) - 24(Ala) | 69 | 7.35 | 8.54 |

นอกจากข้อมูลในตารางแล้วได้ทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน พบว่ายีน *Lvcarcinin* นั้นมีบริเวณ Cys-rich ระหว่างเปปไทด์สังสัญญาณและโดเมน WAP ดังแสดงในภาพประกอบ 14(ก) จึงสามารถบอกได้ว่า *Lvcarcinin* จัดเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 1 ในส่วนของ

ยีน *CrustinP* ประกอบด้วยบริเวณ Gly-rich และ Cys-rich ระหว่างเปปไทด์ส่งสัญญาณและโดเมน WAP ดังแสดงในภาพประกอบ 14(ข) จึงสามารถบอกได้ว่า *CrustinP* เป็นยีนของคริสตินชนิดที่ 2 และองค์ประกอบระหว่างเปปไทด์ส่งสัญญาณและโดเมน WAP ของยีน *PA-SWD* นั้นประกอบด้วยบริเวณ Pro-Arg rich จึงสามารถบอกได้ว่ายีน *PA-SWD* เป็นยีนของคริสตินชนิดที่ 3 ซึ่งแสดงดังภาพประกอบ 14(ค)

(ก)

```

ATGCGCGTGA TCGTCCTTGC ACTCCTGGTG GCGGCGTCCT CTGCCTGCCG CTATTACTGC 60
M R V I V L A L L V A A S S A C R Y Y C

AAAACHTTAA GTGATGAAAC CTACTGTTGC GATGGCGGGA AAGATTACAA CCTCCCGAA 120
K T L S D E T Y C C D G G K D Y N P P E

TACCACGACG GAAATTGCCG GGAGGTTGCG AGCTTCTGCC CGCGAATCGA GGGTGGCAGC 180
Y H D G N C P E V R S F C P R I E G G S

AGGAGGCCCG ACGTGTGCCC TCACGACGGC GCCTGCCAAC CCTACGAGAA GTGCTGCTTC 240
R R P D V C P H D G A C Q P Y E K C C F

GACACCTGCC TGGACCACCA CACCTGCAAG CTGGCCGACG AGCCCTCCAG CACCGCGACG 300
D T C L D H H T C K L A D E P S S T A T

CCCACGCTCA CCACGCCAC CACGAAGCCT CCGTACGTCA TCGCCAACTT CGCGAGAAAC 360
P T L T T P T T K P P Y V I A N F A R N

AAGGTGAATC GAGGAGGATA A 381
K V N R G G *

```

(ข)

```

ATGAAGGGCA TCAAGGCGGT GATTCTGTGC GGCCTCTTTA CGGCGGTTTT GGCTGGCAAG 60
M K G I K A V I L C G L F T A V L A G K

TTTCGCGGCT TCGGACAGCC ATTTGGAGGT CTGGGTGGTC CAGGAGGCGG TGTAGGTGTA 120
F R G F G Q P F G G L G G P G G G V G V

GGTGTGGT TCCCCGAGG CGGTTTAGGT GTAGGTGGCG GTCTTGGTGT AGGTGGCGGT 180
G G G F P G G G L G V G G G L G V G G G

CTTGGTGTAG GTGGCGGTCT TGGTGTAGGT GGCGGTCTTG GAACTGGCAC AAGCGACTGC 240
L G V G G G L G V G G G L G T G T S D C

AGGTATTGGT GCAAGACTCC GGAGGGTCAA GCCTACTGCT GCGAGTCGGC CCACGAACCA 300
R Y W C K T P E G Q A Y C C E S A H E P

GAGACACCTG TTGGCACCAA GCCACTCGAC TGCCCCACAAG TCCGTCCCAC ATGCCACGT 360
E T P V G T K P L D C P Q V R P T C P R

TTCCATGGGC CCCCCAAC CTGTTCCAAC GACTACAAGT GTGCTGGCCT CGATAAGTGT 420
F H G P P T T C S N D Y K C A G L D K C

TGCTTCGACA GGTGTCTGGG AGAACACGTG TGCAAGCCTC CCTCATTCTT CGGATCGCAG 480
C F D R C L G E H V C K P P S F F G S Q

GTTTTCGGATGA 492
V F G *

```

(ค) ATGGTCAGCG TCAAGGAGGT TCTGGTCGTG TTGGTCTTGG TGGCCGCTGT GGCCGTCTCC 60
M V S V K E V L V V L V L V A A V A V S

CCCGCCGATG CTGTTCCGAC GAGACACAGT CGGCCCCGTC CCCAGCCAG GCCCCGGCCG 120
P A D A V P T R H S R P R P Q P R P R P

GGCACGTGCC CAGATACGAG CGACGTCATC GGCCCCTGCG TCATCACGGA GAGGAACTGC 180
G T C P D T S D V I G P C V I T E R N C

TTGTCGGACA GTCAGTGCGC ACCCGGCCAG AAGTGCTGTC CGAGCGGCTG CGGCAGAGAG 240
L S D S Q C A P G Q K C C P I G C G R E

TGCCTGGCTG TAGGTCTCTCC TTACGGAAAC GGAAGAAGGT AA 282
C L A V G P P Y G N G R R *

ภาพประกอบ 15 ลำดับเบสและกรดอะมิโน ของ *Lvcarcinin*(ก) *CrustinP*(ข) และ *PA-SWD*(ค) โดยตัวหนาเป็นส่วนของเปปไทด์สังเคราะห์ ส่วนต่อมาเป็นบริเวณ Cys-rich สำหรับ *Lvcarcinin* บริเวณ Gly-rich และบริเวณ Cys-rich สำหรับ *CrustinP* และบริเวณ Pro-Arg-rich สำหรับ *PA-SWD* ส่วนที่ขีดเส้นใต้เป็นบริเวณของโดเมน WAP และ * แสดง stop codon

1.1 การออกแบบไพรเมอร์

การเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR ของ *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD*, Pro และ Arg-rich ของ *PA-SWD*, *WAP-SWD* และ *PA-WAP-PV* จะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (Pro และ Arg-rich ของ *PA-SWD* ใช้ไพรเมอร์ร่วมกับ *PA-WAP-PV*) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะไม่มีส่วนประกอบของบริเวณเปปไทด์สังเคราะห์ในการโคลนนิ่ง นอกจากนั้นในไพรเมอร์ที่เป็น forward ทุกตัวที่ทำการออกแบบนั้นจะประกอบด้วย 6xHis-tag เพื่อใช้ในการทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ และในไพรเมอร์ชนิด reverse จะมีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะรวมทั้งรหัสหยุดการแปลรหัสพันธุกรรมไปเป็นกรดอะมิโนด้วย โดยสามารถสรุปดังในตาราง 6 ตาราง 6 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับโคลนนิ่ง

| ชื่อยีน | ชื่อไพรเมอร์ที่ใช้ | ตำแหน่งเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน | เอนไซม์ตัดจำเพาะ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มเติมเข้าไปในไพรเมอร์ |
|-------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------|---|
| <i>Lvcarcinin</i> | LVCarcininlikeProteinF | 46 -60 | <i>NcoI</i> | 6xHis tag |
| | LVCarcininlikeProteinR | 319-336 | <i>XhoI</i> | Stop codon |
| <i>CrustinP</i> | PvHm082crustinPF_V2 | 56-73 | <i>EcoRV</i> | 6xHis tag |
| | PvHm082crustinPR | 477-493 | <i>XhoI</i> | Stop codon |

ตาราง 6 (ต่อ) ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับโคลนยีน

| ชื่อยีน | ชื่อไพรเมอร์ที่ใช้ | ตำแหน่งเบส ของไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับยีน | เอนไซม์ตัด จำเพาะ | ลำดับนิวคลีโอ ไทด์ที่เพิ่มเติมเข้าไป ในไพรเมอร์ |
|-----------|----------------------|--|----------------------|---|
| WAP-PV | WAP_PvHm082crustinPF | 332-347 | <i>EcoRV</i> | 6xHis tag |
| | PvHm082crustinPR | 477-493 | <i>XhoI</i> | Stop codon |
| PA-SWD | Lv-SWD-PArgF-V2 | 73-91 | <i>EcoRV</i> | 6xHis tag |
| | Lv-SWD-R | 264-282 | <i>XhoI</i> | Stop codon |
| WAP-SWD | Lv-SWD-WAPF | 127-141 | <i>BamHI</i> | 6xHis tag |
| | Lv-SWD-R | 264-282 | <i>XhoI</i> | Stop codon |
| PA-WAP-PV | Lv-SWD-PArgF-V2 | 73-91 | <i>EcoRV</i> | 6xHis tag |
| | Lv-SWD-PArgR | 112-126 | <i>BamHI</i> | - |
| | PvHm082crustinP_WAPF | 332-349 | <i>BamHI</i> | - |
| | PvHm082crustinPR | 477-493 | <i>XhoI</i> | Stop codon |

1.2 การการสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD* และ *WAP-SWD* โดยนำเข้าสู่เวกเตอร์ pVR500

หลังจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนชนิดนั้นๆ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 3% agarose gel ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Lvcarcinin* มีขนาด 371 คู่เบส แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้และเวกเตอร์ pVR500 ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* หลังจากนั้นนำไปเชื่อมต่อเข้าด้วยกันระหว่าง *Lvcarcinin* และเวกเตอร์ pVR500 จะได้พลาสมิดลูกผสม *Lvcarcinin_pVR500* ดังภาพประกอบ 15(ก)

สำหรับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *CrustinP* มีขนาด 476 คู่เบส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* และ *XhoI* แล้วนำชิ้นยีนที่ได้ไปเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pVR500 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม *CrustinP_pVR500* ดังภาพประกอบ 15(ข) ก่อนจะนำไปใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณยีน *WAP-PV* ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 183 คู่เบส ดังภาพประกอบ 15(ค) แล้วจึงนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* และ *XhoI* จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม *WAP-PV_pVR500*

และในส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *PA-SWD* มีขนาด 248 คู่เบส แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* และ *XhoI* แล้วนำชิ้นยีนที่ได้ไปเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pVR500 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม *PA-SWD_pVR500* ดังภาพประกอบ 15(ง) ก่อนจะนำไปใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มยีน *WAP-SWD* โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 176 คู่เบส แล้วจึงนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามทีออกแบบไว้คือ *BamHI* และ *XhoI* ก่อนจะเชื่อมชิ้นยีนเข้ากับเวกเตอร์ pVR500 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม *WAP-SWD_pVR500* ดังภาพประกอบ 15(จ)

1.3 การสร้างพลาสมิดลูกผสมของบริเวณ Pro และ Arg-rich ของยีน *PA-SWD* เข้ากับยีน *WAP-PV* (*PA-WAP-PV*) โดยนำเข้าสู่เวกเตอร์ pVR500

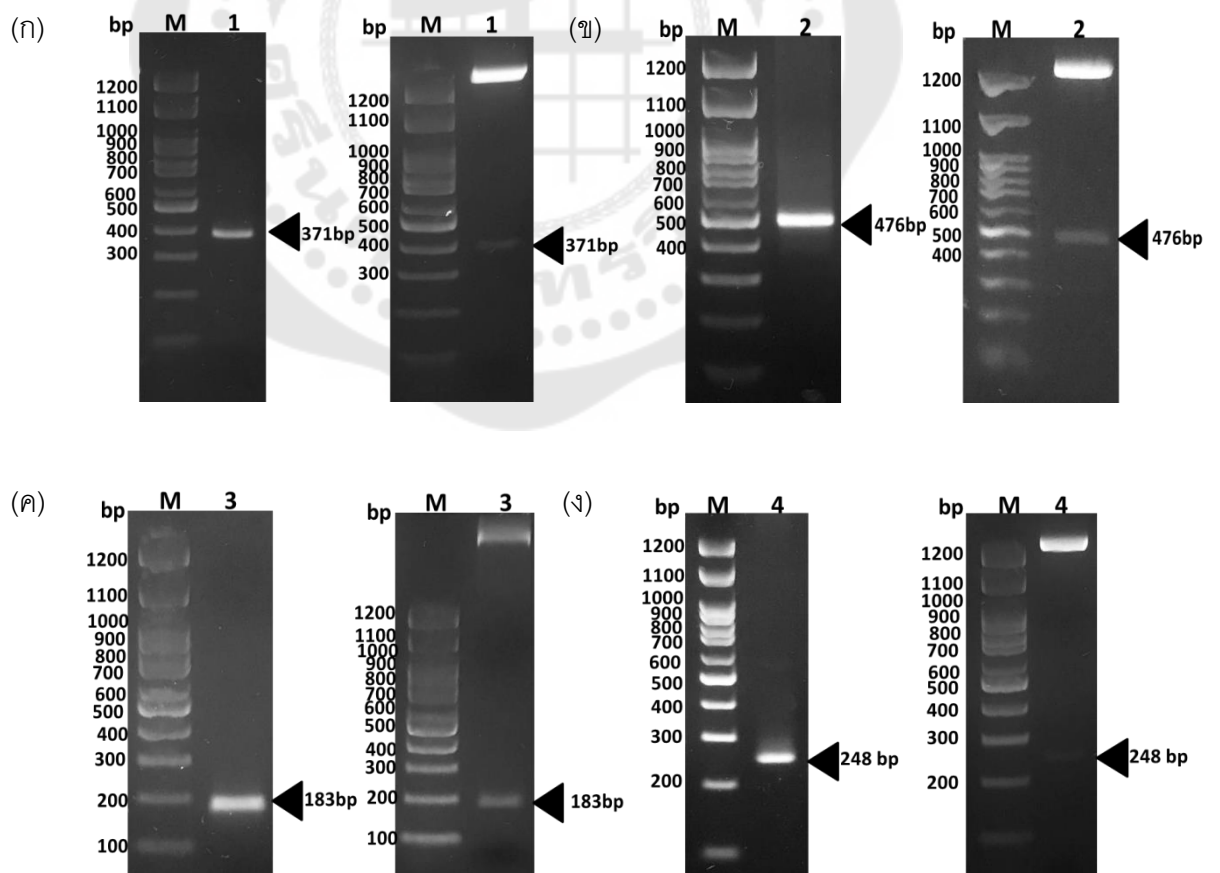
หลังจากทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา PCR ผลิตภัณฑ์ของ PCR ของบริเวณ Pro และ Arg-rich ของยีน *PA-SWD* มีขนาด 92 คู่เบส จึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* และ *BamHI* จากนั้นจึงนำมาเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *WAP-PV* ซึ่งมีขนาด 183 คู่เบส และได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *XhoI* ก่อนนำยีนทั้งสองชิ้นมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase เพื่อสร้างยีนชิ้นใหม่ที่สนใจจะศึกษาคือ ยีน *PA-WAP-PV* จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Lv-SWD-PAArgF-V2 และ PvHm082crustinPR แล้วนำไปวิเคราะห์ที่ด้วย 3% agarose gel ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *PA-WAP-PV* มีขนาด 261 คู่เบส แล้วจึงนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* และ *XhoI* ก่อนจะเชื่อมกับเวกเตอร์ pVR500 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม *PA-WAP-PV_pVR500* ดังภาพประกอบ 15(ฉ)

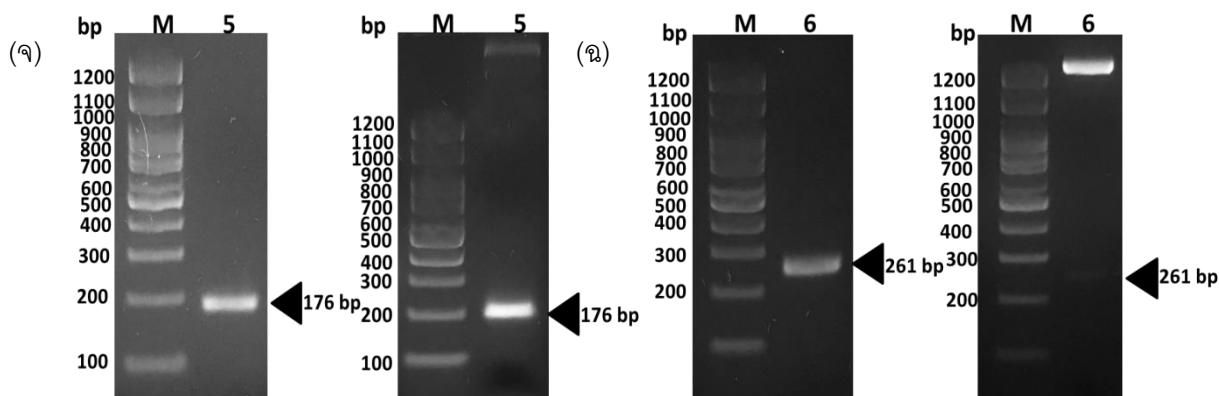
1.4 การตรวจสอบความถูกต้องของยีน

ก่อนนำพลาสมิดลูกผสมไปส่งตรวจลำดับเบส พลาสมิดลูกผสมจะถูกนำไปบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนที่สนใจ โดยทั้งยีน *Lvcarcinin_pVR500*, *CrustinP_pVR500*, *WAP-PV_pVR500*, *PA-SWD_pVR500*, *WAP-SWD_pVR500* และ *PA-WAP-PV_pVR500* เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI/XhoI*, *EcoRV/XhoI*, *EcoRV/XhoI*, *EcoRV/XhoI*, *BamHI/XhoI* และ *EcoRV/XhoI* ตามลำดับ จะให้ชิ้นส่วนของยีนที่มีขนาดถูกต้องตามที่ได้โคลนยีนเข้าไปใน pVR500 vector ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังตาราง 7 และภาพประกอบ 15(ก-ฉ ขวา) ตามลำดับ

ตาราง 7 ข้อมูลพลาสมิดลูกผสมทั้ง 6 ชนิด

| ชื่อยีน | ขนาดของพลาสมิดลูกผสม (คู่เบส) | เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ | ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล | |
|-------------------|-------------------------------|------------------------|--|--------------------------|
| | | | % identity of Nucleotide | % identity of Amino acid |
| <i>Lvcarcinin</i> | 371 | <i>NcoI/XhoI</i> | 99.11 | 98.20 |
| <i>CrustinP</i> | 476 | <i>EcoRV/XhoI</i> | 98.63 | 100 |
| <i>WAP-PV</i> | 183 | <i>EcoRV/XhoI</i> | 98.77 | 100 |
| <i>PA-SWD</i> | 248 | <i>EcoRV/XhoI</i> | 99.05 | 98.55 |
| <i>WAP-SWD</i> | 176 | <i>BamHI/XhoI</i> | 98.72 | 98.04 |
| <i>PA-WAP-PV</i> | 261 | <i>EcoRV/XhoI</i> | 99.10 | 100 |





ภาพประกอบ 16 3% agarose gel ของผลิตภัณฑ์ PCR และพลาสมิดลูกผสมที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *Lvcarcinin*, *CrustinP*, *WAP-PV*, *PA-SWD*, *WAP-SWD* และ *PA-WAP-PV* ตามลำดับ

โดย M คือ ขนาดของ DNA มาตรฐาน,

แถวที่ 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *Lvcarcinin* (ซ้าย) และ *Lvcarcinin_pVR500* ที่ตัดด้วย *NcoI* และ *XhoI* (ขวา)

แถวที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *CrustinP* (ซ้าย) และ *CrustinP_pVR500* ที่ตัดด้วย *EcoRV* และ *XhoI* (ขวา)

แถวที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *WAP-PV* (ซ้าย) และ *WAP-PV_pVR500* ที่ตัดด้วย *BamHI* และ *XhoI* (ขวา)

แถวที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *PA-SWD* (ซ้าย) และ *PA-SWD_pVR500* ที่ตัดด้วย *EcoRV* และ *XhoI* (ขวา)

แถวที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *WAP-SWD*(ซ้าย) และ *WAP-SWD_pVR500* ที่ตัดด้วย *BamHI* และ *XhoI* (ขวา)

แถวที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *PA-WAP-PV*(ซ้าย)และ *PA-WAP-PV_pVR500* ที่ตัดด้วย *EcoRV* และ *XhoI* (ขวา)

จากนั้นจึงได้นำพลาสมิดลูกผสมทั้ง 6 ชนิดไปส่งตรวจหาลำดับเบส นำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ไปตรวจหาค่าความถูกต้องของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของยีนทั้ง 6 ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ซึ่งจะเห็นได้ว่าลำดับเบสของยีน *Lvcarcinin* มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีนฐานข้อมูลคิดเป็น 99.11% ซึ่งเมื่อนำไปแปลรหัส

เป็นกรดอะมิโนแล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า มีความเหมือนคิดเป็น 98.20% ดังภาพประกอบ 16(ก) ส่วนลำดับเบสของยีน *CrustinP* มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนคิดเป็น 98.63% และ 100% ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 16(ข) ถัดมาลำดับเบสของยีน *WAP-PV* มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนคิดเป็น 98.77% และ 100% ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 16(ค) ในส่วนลำดับเบสของยีน *PA-SWD* มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนคิดเป็น 99.05% และ 98.55% ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 16(ง) นอกจากนี้ลำดับเบสของยีน *WAP-SWD* มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนคิดเป็น 98.72% และ 98.04% ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 16(จ) และลำดับเบสของยีน *PA-WAP-PV* มีความเหมือนของลำดับเบสและกรดอะมิโนคิดเป็น 99.10% และ 100% ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 16(ฉ)

| | | | |
|-----|-------------------------------------|---|-----|
| (ก) | <i>Lvcarcinin</i> .database | TGCCGCTATTACTGCAAACTTTAAGTGATGAAACCTACTGTTGCGATGGCGGGAAGAT | 60 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | TGCCGCTATTACTGCAAACTTTAAGTGATGAAACCTACTGTTGCGATGGCGGGAAGAT | 60 |
| | | ***** | |
| | <i>Lvcarcinin</i> .database | TACAACCCCTCCCGAATACCACGACGGAAATTGCCCGGAGGTTGCGAGCTTCTGCCCGCGA | 120 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | TACAACCCCTCCCGAATACCACGACGGAAATTGCCCGAAGGTTGCGAGCTTCTGCCCGCGA | 120 |
| | | ***** | |
| | <i>Lvcarcinin</i> .database | ATCGAGGGTGGCAGCAGGAGGCCCGACGTGTGCCCTCACGACGGCGCCTGCCAACCCCTAC | 180 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | ATCGAGGGTGGCAGCAGGAGGCCCGACGTGTGCCCTCACGACGGCGCCTGCCAACCCCTAC | 180 |
| | | ***** | |
| | <i>Lvcarcinin</i> .database | GAGAAGTGCTGCTTCGACACCTGCCTGGACCCACACCTGCAAGCTGGCCGACGAGCCC | 240 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | GAGAAGTGCTGCTTCGACACCTGCCTGAACCCACACCTGCAAGCTGGCCGACGAGCCC | 240 |
| | | ***** | |
| | <i>Lvcarcinin</i> .database | TCCAGCACCGCGACGCCACGCTCACGACGCCACCGAAGCCTCCGTACGTATCGCC | 300 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | TCCAGCACCGCGACGCCACGCTCACGACGCCACCGAAGCCTCCGTACGTATCGCT | 300 |
| | | ***** | |
| | <i>Lvcarcinin</i> database | AACTTCGCGAGAAACAAGGTGAATCGAGGAGGATAA | 336 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | AACTTCGCGAGAAACAAGGTGAATCGAGGAGGATAA | 336 |
| | | ***** | |
| | <i>Lvcarcinin</i> .database (amino) | CRYYCKTLSDETYCCDGGKDYNPPEYHDGNCPEVRSFCPRIEGGSRRPDVCPHDGACQPY | 60 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | CRYYCKTLSDETYCCDGGKDYNPPEYHDGNCPKVRSFCPRIEGGSRRPDVCPHDGACQPY | 60 |
| | | ***** | |
| | <i>Lvcarcinin</i> .database (amino) | EKCCFDTCLDHHTCKLADEPSTATPTLITPTTKPPYVIANFARNKVNRRGG | 111 |
| | <i>Lvcarcinin</i> | EKCCFDTCLNHHTCKLADEPSTATPTLITPTTKPPYVIANFARNKVNRRGG | 111 |
| | | ***** | |

| | | | |
|-----|---------------------------|--|-----|
| (๑) | CrustinP.database | GGCAAGTTTCGGCGCTTCGGACAGCCATTTGGAGGTCGGGTGGTCCAGGAGGCGGTGTA | 60 |
| | CrustinP | GGCAAGTTTCGGCGCTTCGGACAGCCATTTGGAGGTCGGGTGGTCCAGGAGGCGGTGTA | 60 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database | GGTGTAGGTGGTGGTTTCCCGGAGGCGGTTTAGGTGTAGGTGGCGGTCTTGGTGTAGGT | 120 |
| | CrustinP | GGTGTAGGTGGTGGTTTCCCGGAGGCGGTTTAGGTGTAGGTGGCGGTCTTGGTGTAGGT | 120 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database | GGCGGTCTTGGTGTAGGTGGCGGTCTTGGTGTAGGTGGCGGTCTTGGAACTGGCACAAGC | 180 |
| | CrustinP | GGCGGTCTTGGTGTAGGTGGCGGTCTTGGTGTAGGTGGCGGTCTTGGAACTGGCACAAGC | 180 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database | GACTGCAGGTATTGGTGCAGACTCCGGAGGGTCAAGCCTACTGCTGCGAGTGGCCCCAC | 240 |
| | CrustinP | GACTGCAGGTATTGGTGCAGACTCCGGAGGGTCAAGCCTACTGCTGCGAGTGGCCCCAC | 240 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database | GAAACCAGAGACACCTGTTGGCAACCAAGCCACTCGACTGCCACAAGTCGCTCCACATGC | 300 |
| | CrustinP | GAAACCAGAGACACCTGTTGGCAACCAAGATACTCGACTGCCACAAGTCGCTCCACATGC | 300 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database | CCACGTTTCCATGGGCCCCCACAACCTGTTCCACGACTACAAGTGTGCTGGCCTCGAT | 360 |
| | CrustinP | CCACGTTTCCATGGGCCCCCACAACCTGTTCCACGACTACAAGTGTGCTGGCCTCGAT | 360 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database | AAGTGTGCTTCGACAGGTGTTGGGAGAACACGTTGCAAGCCTCCCTCATTCTTCGGA | 420 |
| | CrustinP | AAGTGTGCTTCGACAGGTGTTGGGAGAACACGTTGCAAGCCTCCCTCATTCTTCGGA | 420 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database | TCGCAGGTTTTCGGATGA 438 | |
| | CrustinP | TCGCAGGTTTTCGGATGA 438 | |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database (amino) | GKFRFGQPFGLGGPGGVGVGGGFPGGGLGVGGGLGVGGGLGVGGGLGTGTS | 60 |
| | CrustinP. (amino) | GKFRFGQPFGLGGPGGVGVGGGFPGGGLGVGGGLGVGGGLGVGGGLGTGTS | 60 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database (amino) | DCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETFVGTNPLDCPQVRPTCFRPHGPPPTCSNDYKCAGLD | 120 |
| | CrustinP. (amino) | DCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETFVGTNPLDCPQVRPTCFRPHGPPPTCSNDYKCAGLD | 120 |
| | | ***** | |
| | CrustinP.database (amino) | KCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG 145 | |
| | CrustinP. (amino) | KCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG 145 | |
| | | ***** | |
| (๒) | WAP-PV.database | CTGCCACAAGTCCGTCACATGCCACGTTTCCATGGGCCCCCACAACCTGTTCCAA | 60 |
| | WAP-PV | TTGCCACAAGTCCGTCACATGCCACGTTTCCATGGGCCCCCACAACCTGTTCCAA | 60 |
| | | ***** | |
| | WAP-PV.database | CGACTACAAGTGTGCTGGCCTCGATAAGTGTGCTTCGACAGGTGTCTGGGAGAACACGT | 120 |
| | WAP-PV | CGACTACAAGTGTGCTGGCCTCGATAAGTGTGCTTCGACAGGTGTCTGGGAGAACACGT | 120 |
| | | ***** | |
| | WAP-PV.database | GTGCAAGCCTCCCTCATTCTTCGGATCGCAGGTTTTCGGATGA 163 | |
| | WAP-PV | GTGCAAGCCTCCCTCATTCTTCGGATCGCAGGTTTTCGGATGA 163 | |
| | | ***** | |
| | WAP-PV.database (amino) | CPQVRPTCFRPHGPPPTCSNDYKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG | 53 |
| | WAP-PV. (amino) | CPQVRPTCFRPHGPPPTCSNDYKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG | 53 |
| | | ***** | |

(۳) PA-SWD.database GTTCCGACGAGACACAGTCGGCCCCGTCCCAGCCCAGGCCCGGGCCGACGTGCCCA 60
 PA-SWD GTTCCGACGAGACACAGTCGGCCCCGTCCCAGCCCAGGCCCGGGCCGACGTGCCCA 60

 PA-SWD.database GATACGAGCGACGTTCATCGGCCCTGCGTCATCACGGAGAGGAACTGCTTGTGGACAGT 120
 PA-SWD GATACGAGCGACGTTCATCGGCCCTGCGTCATCACGGAGAGGAACTGCTTGTGGACAGT 120

 PA-SWD.database CAGTGCACCCCGCCAGAAGTGTGTCCGAGCGGCTGCGGCAGAGAGTGCCTGGTGTA 180
 PA-SWD CAGTGCACCCCGCCAGAAGTGTGTCCGAGCGGCTGCGGCAGAGAGTGCCTGGTGTA 180

 PA-SWD.database GGTCCCTCCTTACGGAAACGGAAGAAGGTAA 210
 PA-SWD GGTCCCTCCTTACGGAAACGGAAGAAGGTAA 210

 PA-SWD.database (amino) VPIRHSRPRPQPRPRPGTCTPDTSDVIGPCVITERNCLSDSQCAPGQKCCPIGCGRECLAV 60
 PA-SWD. (amino) VPIRHSRPRPQPRPRPGTCTPDTSDVIGPCVITERNCLSDSQCAPGQKCCPSGCGRECLAV 60

 PA-SWD.database (amino) GPPYNGRR 69
 PA-SWD. (amino) GPPYNGRR 69



(۴) WAP-SWD.database TGCCAGATACGAGCGACGTTCATCGGCCCTGCGTCATCACGGAGAGGAACTGCTTGTGCG 60
 WAP-SWD TGCCAGATACGAGCGACGTTCATCGGCCCTGCGTCATCACGGAGAGGAACTGCTTGTGCG 60

 WAP-SWD.database GACAGTCAGTGCACCCCGCCAGAAGTGTGTCCGAGCGGCTGCGGCAGAGAGTGCCTG 120
 WAP-SWD GACAGTCAGTGCACCCCGCCAGAAGTGTGTCCGAGCGGCTGCGGCAGAGAGTGCCTG 120

 WAP-SWD.database GCTGTAGGTCCTCCTTACGGAAACGGAAGAAGGTAA 156
 WAP-SWD GCTGTAGGTCCTCCTTACGGAAACGGAAGAAGGTAA 156

 WAP-SWD.database (amino) CPDTSDVIGPCVITERNCLSDSQCAPGQKCCPIGCGRECLAVGPPYNGRR 51
 WAP-SWD. (amino) CPDTSDVIGPCVITERNCLSDSQCAPGQKCCPSGCGRECLAVGPPYNGRR 51



(۵) PA-WAP-PV.database GTTCCGACGAGACACAGTCGGCCCCGTCCCAGCCCAGGCCCGGGCCGACGGGATCC 60
 PA-WAP-PV GTTCCGACGAGACACAGTCGGCCCCGTCCCAGCCCAGGCCCGGGCCGACGGGA-TC 59

 PA-WAP-PV.database CTGCCACAAGTCCGTCACATGCCACGTTTCCATGGGCCCCCAACCTGTTCCTCAA 120
 PA-WAP-PV CTGCCACAAGTCCGTCACATGCCACGTTTCCATGGGCCCCCAACCTGTTCCTCAA 119

 PA-WAP-PV.database CGACTACAAGTGTGCTGGCCTCGATAAGTGTGCTTCGACAGGTGTCTGGGAGAACACGT 180
 PA-WAP-PV CGACTACAAGTGTGCTGGCCTCGATAAGTGTGCTTCGACAGGTGTCTGGGAGAACACGT 179

 PA-WAP-PV.database GTGCAAGCCTCCCTCAITTCCTCGGATCGCAGGTTTTTCGGATGA 223
 PA-WAP-PV GTGCAAGCCTCCCTCAITTCCTCGGATCGCAGGTTTTTCGGATGA 222

 PA-WAP-PV.database (amino) VPIRHSRPRPQPRPRPGTGCPCQVRETCPRFHGPPPTICSNDYKAGLDKCCFDRCLGEHV 60
 PA-WAP-PV. (amino) VPIRHSRPRPQPRPRPGTGCPCQVRETCPRFHGPPPTICSNDYKAGLDKCCFDRCLGEHV 60

 PA-WAP-PV.database (amino) CKPPSFFGSQVFG 73
 PA-WAP-PV. (amino) CKPPSFFGSQVFG 73

ภาพประกอบ 17 การเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล

ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

โดย (ก) การเปรียบเทียบลำดับเบส (*Lvcarcinin*) และลำดับกรดอะมิโน (*Lvcarcinin*.(amino)) ของ *Lvcarcinin* กับลำดับเบส (*Lvcarcinin*.database) และลำดับกรดอะมิโน (*Lvcarcinin*.database.(amino)) ของฐานข้อมูล

(ข) การเปรียบเทียบลำดับเบส (*CrustinP*) และลำดับกรดอะมิโน (*CrustinP*.(amino)) ของ *CrustinP* กับลำดับเบส (*CrustinP*.database) และลำดับกรดอะมิโน (*CrustinP*.database.(amino)) ของฐานข้อมูล

(ค) การเปรียบเทียบลำดับเบส (*WAP-PV*) และลำดับกรดอะมิโน (*WAP-PV*.(amino)) ของ *WAP-PV* กับลำดับเบส (*WAP-PV*.database) และลำดับกรดอะมิโน (*WAP-PV*.database.(amino)) ของฐานข้อมูล

(ง) การเปรียบเทียบลำดับเบส (*PA-SWD*) และลำดับกรดอะมิโน (*PA-SWD*.(amino)) ของ *PA-SWD* กับลำดับเบส (*PA-SWD*.database) และลำดับกรดอะมิโน (*PA-SWD*.database.(amino)) ของฐานข้อมูล

(จ) การเปรียบเทียบลำดับเบส (*WAP-SWD*) และลำดับกรดอะมิโน (*WAP-SWD*.(amino)) ของ *WAP-SWD* กับลำดับเบส (*WAP-SWD*.database) และลำดับกรดอะมิโน (*WAP-SWD*.database.(amino)) ของฐานข้อมูล

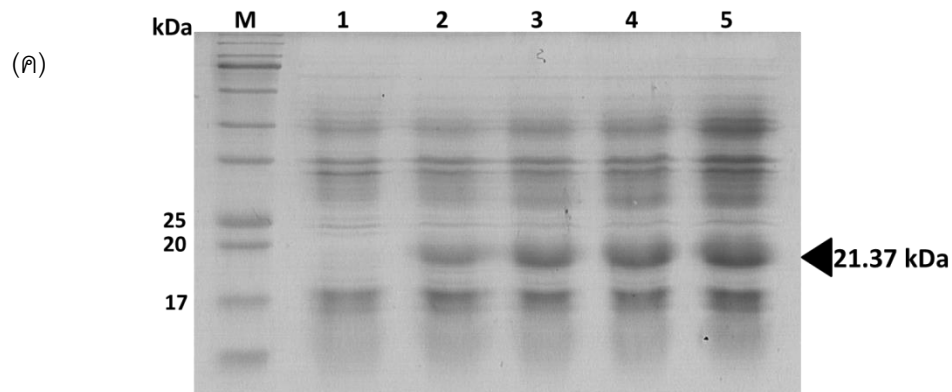
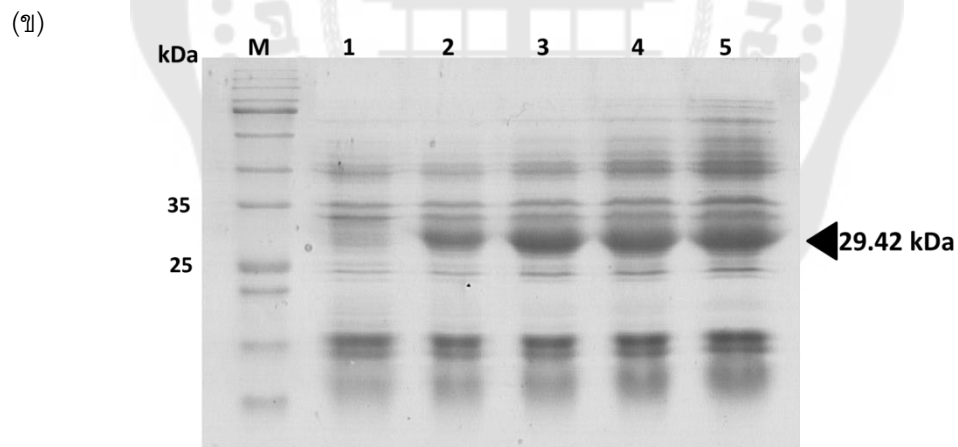
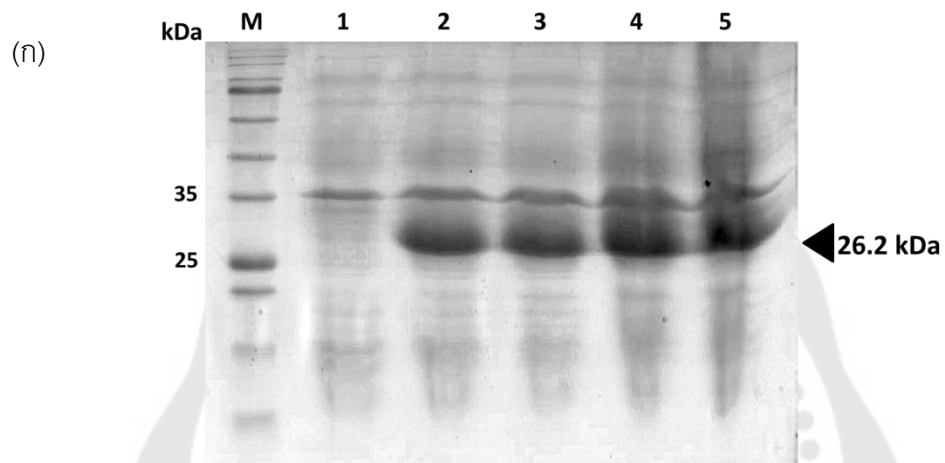
(ฉ) การเปรียบเทียบลำดับเบส (*PA-WAP-PV*) และลำดับกรดอะมิโน (*PA-WAP-PV*.(amino)) ของ *PA-WAP-PV* กับลำดับเบส (*PA-WAP-PV*.database) และลำดับกรดอะมิโน (*PA-WAP-PV*.database.(amino)) ของฐานข้อมูล

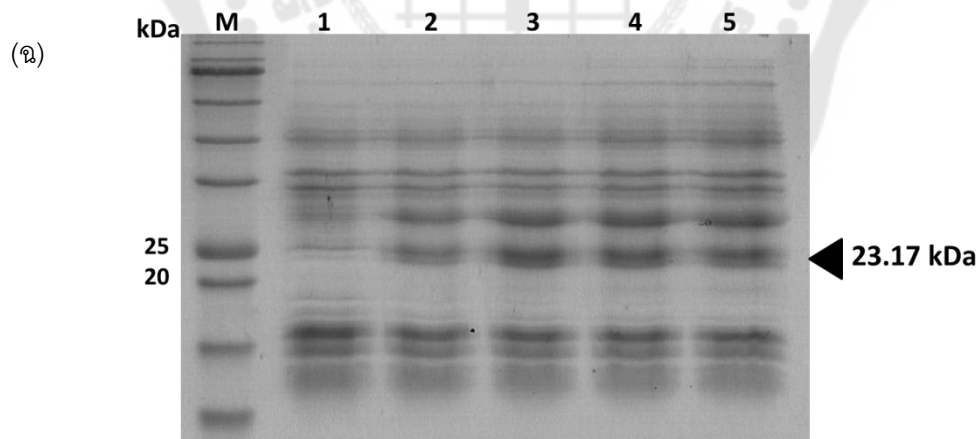
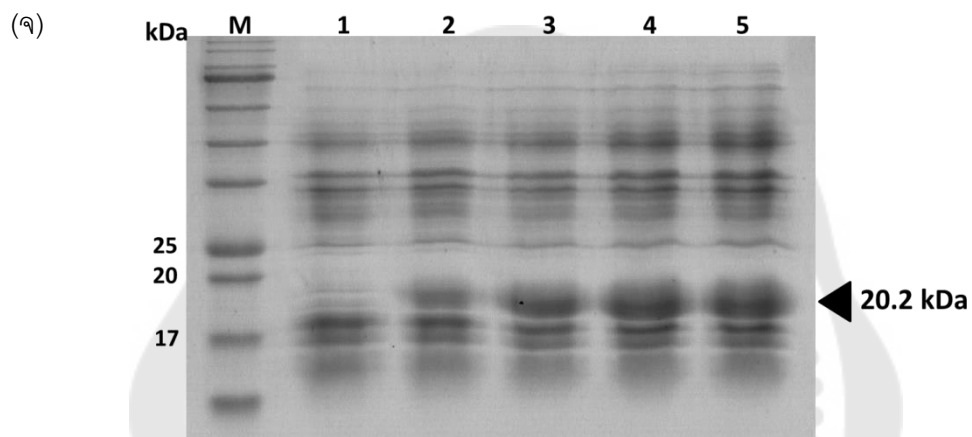
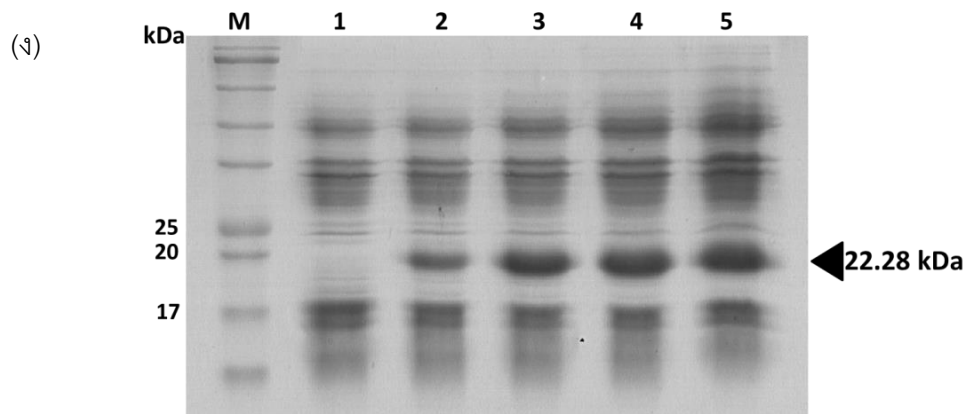
2. การแสดงออกของโปรตีนและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

2.1 การแสดงออกของโปรตีนที่เวลาต่างๆ

การผลิตโปรตีนหลอมผสมเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ นั้น สามารถทำได้ โดยนำพลาสมิดหลอมผสม *Lvcarcinin_pVR500*, *CrustinP_pVR500*, *WAP-PV_pVR500*, *PA-SWD_pVR500*, *WAP-SWD_pVR500* และ *PA-WAP-PV_pVR500* เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งหลังจากเติม IPTG แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 15% SDS-PAGE พบว่า r*Lvcarcinin*, r*CrustinP*, r*WAP-PV*, r*PA-SWD*,

rWAP-SWD และ rPA-WAP-PV มีขนาด 26.2, 29.42, 21.37, 22.28, 20.2 และ 23.17 kDa ตามลำดับ ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 6.31, 6.41, 6.34, 6.86, 6.20 และ 7.07 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่า โปรตีนแต่ละชนิดเริ่มมีการแสดงออกตั้งแต่วันที่ชั่วโมงที่ 1 และมีแนวโน้มการแสดงผลที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ดังภาพประกอบ 17 (ก-ค) ตามลำดับ

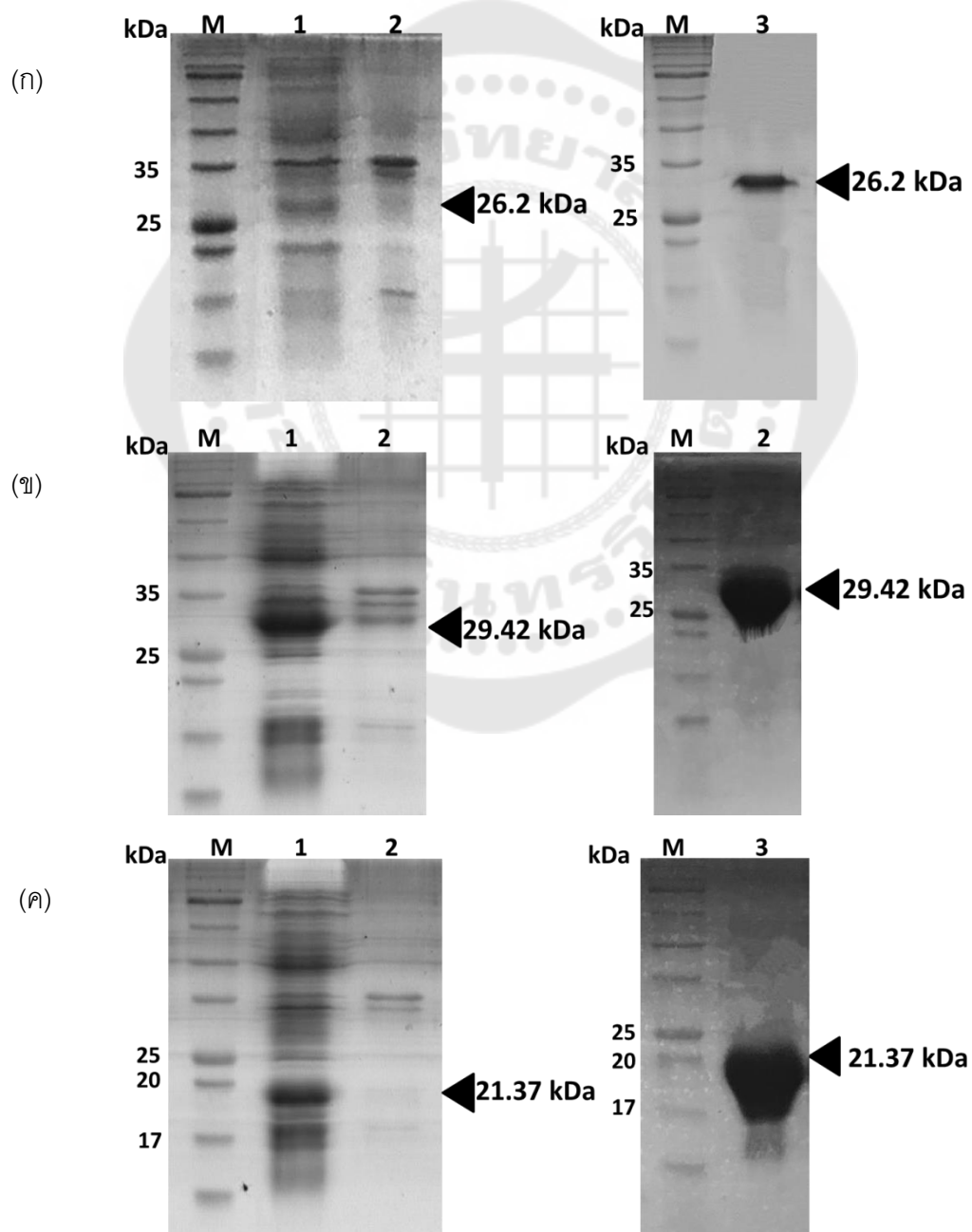


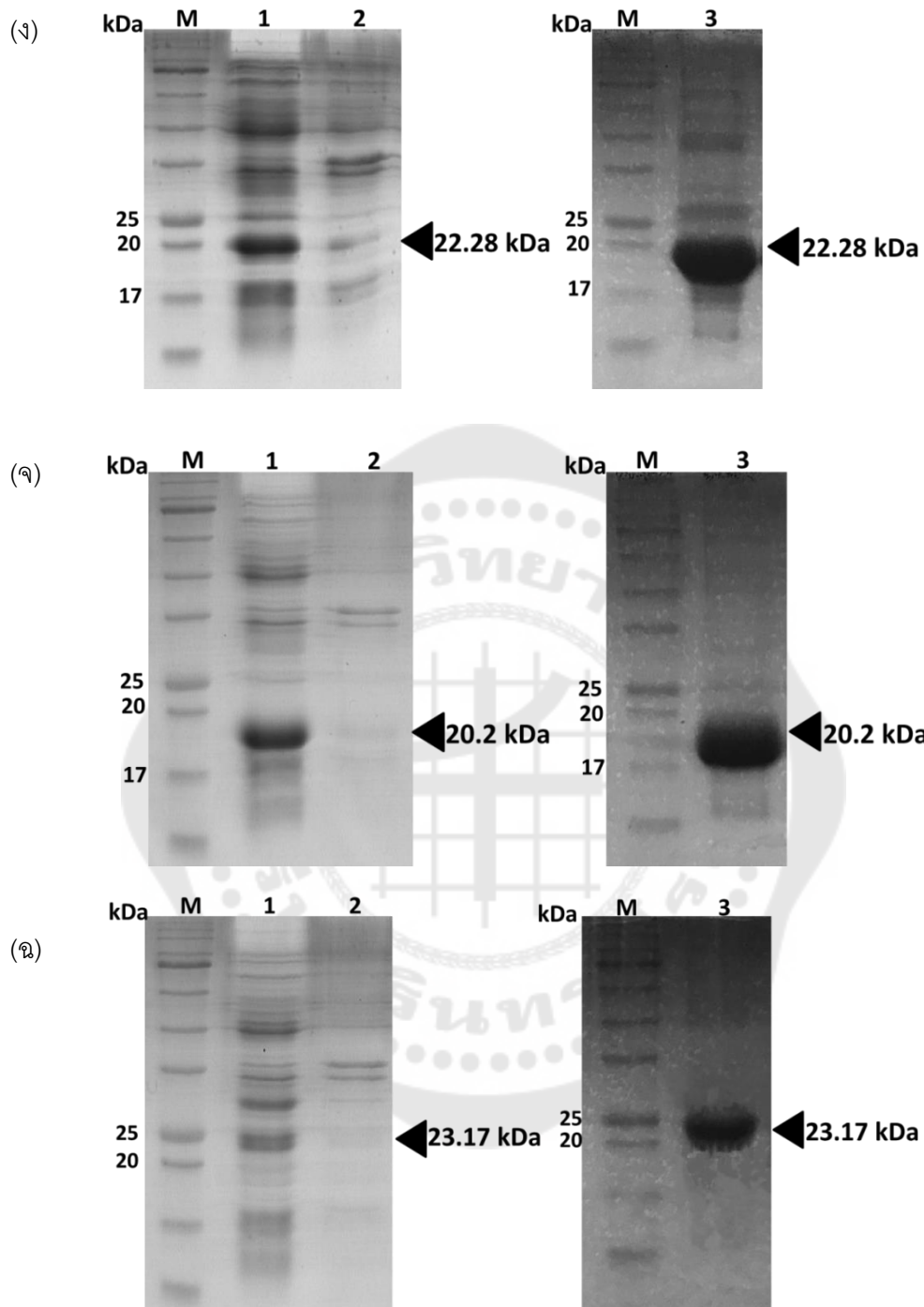


ภาพประกอบ 18 15% SDS-PAGE ของเซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ณ เวลาต่างๆ โดยแถว M คือ โปรตีนมาตรฐาน และแถว 1-5 คือ เซลล์แบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนด้วย IPTG ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากนั้นจึงได้นำเฉพาะเซลล์แบคทีเรียลูกผสมที่ถูกกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีน ณ เวลาที่เหมาะสมด้วยการเติม IPTG โดยโปรตีนลูกผสม rLvcarcinin, rCrustinP, rWAP-PV,

rPA-SWD, rWAP-SWD และ rPA-WAP-PV นั้นเลือกใช้ระยะเวลาที่ 3 ชั่วโมงเหมือนกันทั้งหมด จากนั้นไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator เพื่อตรวจสอบสภาพของโปรตีนว่าอยู่ในรูปของสารละลายหรือตะกอนด้วย 15% SDS-PAGE จากผลการทดลองพบว่า โปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด อยู่ในรูปของสารละลาย ดังภาพประกอบ 18 (ก-ค ซ้าย) จากนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE อีกครั้ง ได้ผลการทดลองดังภาพประกอบ 18 (ก-ค ขวา) พบว่าโปรตีนลูกผสมมีความบริสุทธิ์มากขึ้น และสามารถนำโปรตีนลูกผสมที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป





ภาพประกอบ 19 15% SDS-PAGE ของโปรตีนลูกผสม rLvcarcinin(ง), rCrustinP(จ), rWAP-PV(ค), rPA-SWD(ง), rWAP-SWD(จ) และ rPA-WAP-PV(ฉ) เมื่อถูกทำให้เซลล์แตกที่เรียกว่าแตกด้วยเครื่อง sonicator แล้วนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column

โดยที่ แถว M คือ โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 1 คือ ส่วนของสารละลายหลังจากที่ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง sonicator ส่วนแถวที่ 2 คือ ส่วนของตะกอนหลังจากที่ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง sonicator และแถวที่ 3 คือ โปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตีชนิด Ni-NTA column

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion assay

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1.5325, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 ไมโครโมลาร์ นั้น ได้มีการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด คือ *B. megaterium*, *B. subtilis*, *M. luteus* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด คือ *E. coli* 363, *V. harveyi* 639, *V. parahaemolyticus* และ *V. parahaemolyticus* (AHPND) โดยใช้ยาปฏิชีวนะในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสม ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสามารถวัดได้จากเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของโปรตีนลูกผสมและยาปฏิชีวนะ

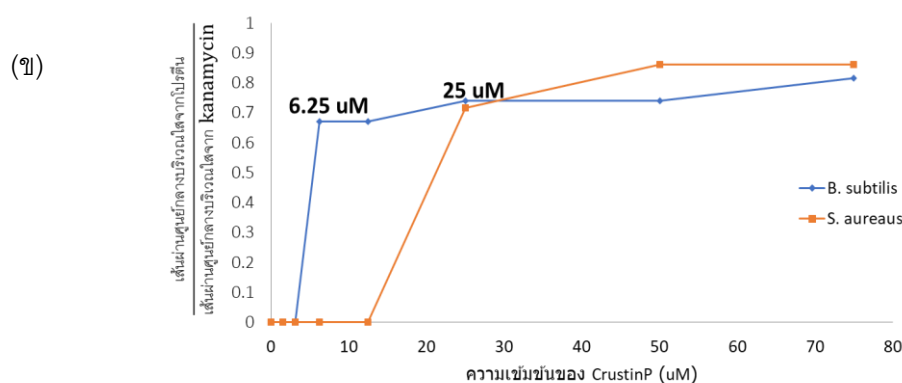
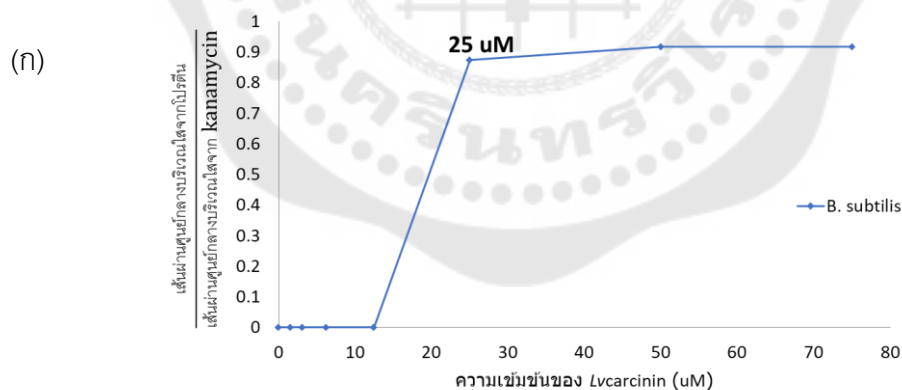
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ rLvcarcinin พบว่า rLvcacinin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 1 ชนิด คือ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 25 μM จากการนำข้อมูลผลการทดลองมาสร้างกราฟอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจาก rLvcarcinin กับ 5 nmol Kanamycin พบว่า เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังภาพประกอบ 19(ก)

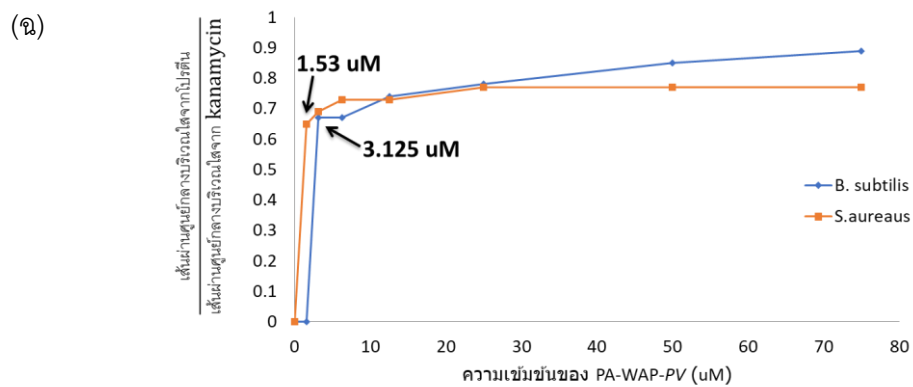
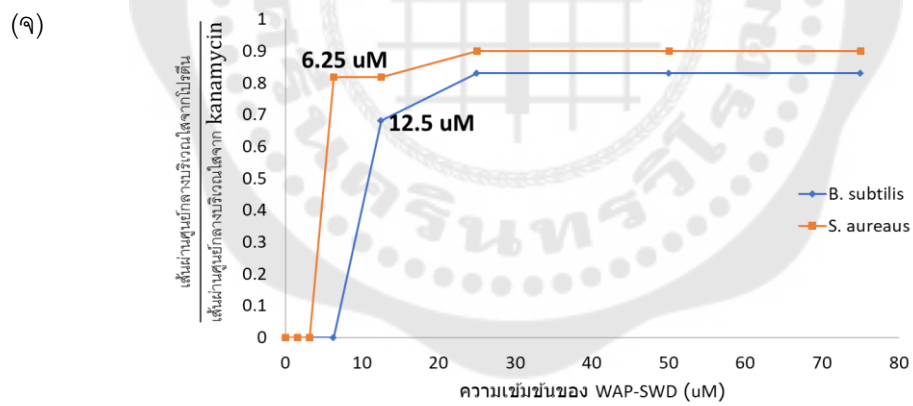
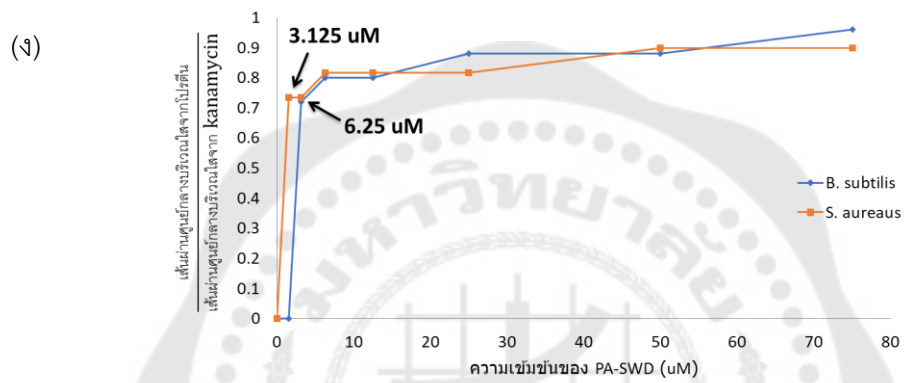
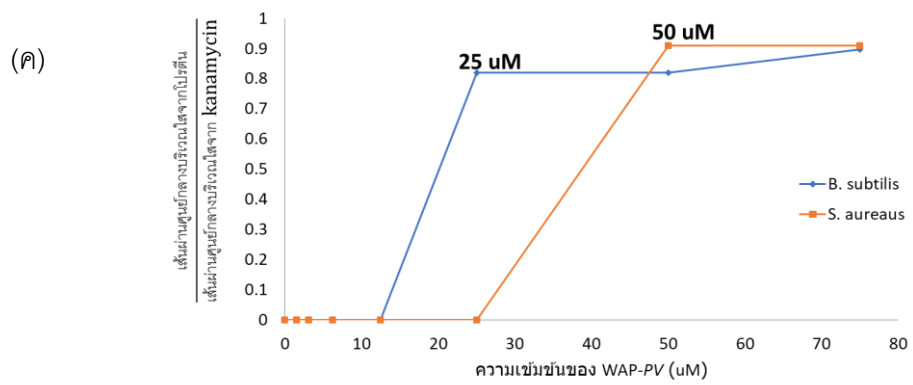
ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ rCrustinP, rWAP-PV, rPA-SWD, rWAP-SWD และ rPA-WAP-PV พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* โดยการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนลูกผสม rCrustinP เท่ากับ 6.25 μM และ 25 μM , rWAP-PV เท่ากับ 25 μM และ 50 μM , rPA-SWD เท่ากับ 3.125 μM และ 6.25 μM , rWAP-SWD เท่ากับ 6.25 μM และ 12.5 μM และ rPA-WAP-PV เท่ากับ 1.5325 μM และ 3.125 μM ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังตาราง 8 จากการนำข้อมูลผลการทดลองมาสร้างกราฟอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากโปรตีนลูกผสมแต่ละชนิดกับ 5 nmol Kanamycin พบว่าเมื่อ

ความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสมเพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน ดังภาพประกอบ 19(ข-ช)

ตาราง 8 ข้อมูลโปรตีนลูกผสมต่อฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

| ชื่อโปรตีนลูกผสม | ความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนลูกผสม ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (μM) | |
|------------------|--|------------------|
| | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i> |
| | rLvcarcinin | 25.0 |
| rCrustinP | 6.25 | 25.0 |
| rWAP-PV | 25.0 | 50.0 |
| rPA-SWD | 3.125 | 6.25 |
| rWAP-SWD | 6.25 | 12.5 |
| rPA-WAP-PV | 1.5325 | 3.125 |



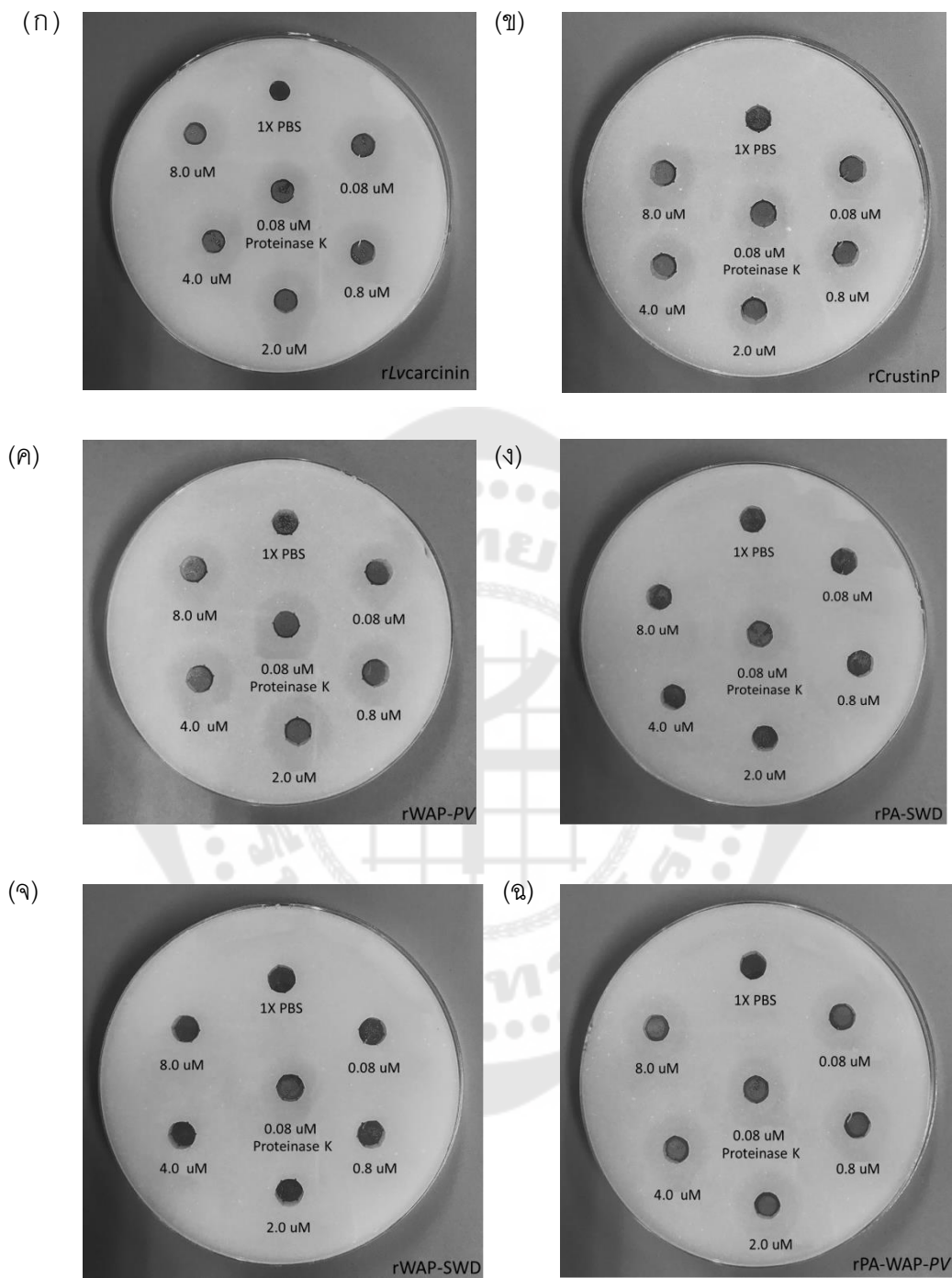


ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสม ด้วยเทคนิค agar diffusion assay โดยแสดงเป็นอัตราส่วนระหว่างบริเวณใสของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากโปรตีน rLvcarcinin(ก) rCrustinP(ข) rWAP-PV(ค) rPA-SWD(ง) rWAP-SWD(จ) และ rPA-WAP-PV(ฉ) เทียบกับยาปฏิชีวนะ

4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนสเค (proteinase K)

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด ทำได้โดยการผสมโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.08 μM , 0.8 μM , 2.0 μM , 4.0 μM และ 8.0 μM กับสารละลาย proteinase K เข้มข้น 0.08 μM และนำไปใส่ลงในหลุมบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ 1.5% (w/v) agar powder และ 2.5% (w/v) นมผงเด็กที่มีส่วนผสมของ skim milk ซึ่งโดยปกติแล้วเอนไซม์โปรทีเนสเคมีความสามารถย่อยโปรตีนได้ จึงส่งผลทำให้เกิดบริเวณใสขึ้น แต่ในการทดลองนี้มีความต้องการที่จะทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ซึ่งถ้าโปรตีนลูกผสมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K แล้วจะส่งผลให้เกิดบริเวณใสขึ้น

จากผลการทดลองทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิด พบว่ามีโปรตีนลูกผสม 2 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K คือ rPA-SWD และ rWAP-SWD โดยโปรตีนลูกผสมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ได้ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง คือ ที่ความเข้มข้น 0.08 μM , 0.8 μM , 2.0 μM , 4.0 μM และ 8.0 μM ดังภาพประกอบ 20(ง) และ 20(จ) ตามลำดับ ส่วนโปรตีนลูกผสมอีก 4 ชนิด คือ rLvcarcinin, rCrustinP, rWAP-PV และ rPA-WAP-PV นั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ซึ่งแสดงผลดังภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 21 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Proteinase K ของโปรตีนลูกผสม ทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.08 μM , 0.8 μM , 2.0 μM , 4.0 μM และ 8.0 μM โดยใช้ 0.08 μM proteinase K และ 1xPBS buffer เป็น positive control และ negative control ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องหน้าที่ทางชีวภาพของบริเวณที่มีกรดอะมิโนไกลซีนและซิสเทอีนสูงและบริเวณที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จินีนสูงของครัสตินจากกุ้งขาว ผู้วิจัยได้ทำการผลิตโปรตีนลูกผสมของครัสตินชนิดที่ 1 2 และ 3 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K หลังจากดำเนินการแล้ว สามารถสรุปผลการดำเนินงาน โดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

กุ้งขาวจัดเป็นหนึ่งในสัตว์เศรษฐกิจสำคัญที่สร้างรายได้มูลค่าหลายล้านบาทให้กับประเทศไทย แต่ปัจจุบันกลับพบว่ามูลค่าการส่งออกลดลงเนื่องจากผลกระทบจากโรคระบาดของกุ้งที่เกิดจากจุลชีพชนิดต่างๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio spp.* ส่งผลให้กุ้งติดเชื้อและตาย สร้างความเสียหายและส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจเป็นวงกว้าง ดังนั้นจึงได้มีการคิดหาแนวทางในการควบคุมโรคที่ยั่งยืน ซึ่งหนึ่งในวิธีการนั้นคือการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งซึ่งครัสตินจัดเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อการต้านการรุกรานของจุลชีพหลากหลายชนิด (Smith et al., 2008; Tassanakajon et al., 2015)

ในปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่ได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในครัสตินชนิดที่ 1, 2 และ 3 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพได้หลายชนิด แต่พบความแตกต่างคือมีเพียงครัสตินชนิดที่ 3 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสได้ (Amparyup et al., 2008; Jia et al., 2008; Visetnan et al., 2017) ซึ่งเมื่อสังเกตลักษณะโครงสร้างของครัสตินทั้ง 3 ชนิด พบว่าในครัสตินชนิดที่ 3 ประกอบด้วยบริเวณ Pro และ Arg-rich แทนบริเวณ Cys-rich ที่อยู่ในครัสตินชนิดที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าครัสตินชนิดที่ 3 ที่ไม่มีบริเวณ Pro และ Arg-rich ในโครงสร้างไม่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพแต่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสได้ แสดงให้เห็นว่าบริเวณ Pro และ Arg-rich อาจจะมีผลต่อการยับยั้งจุลชีพแต่อาจจะไม่ส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส (Du et al., 2010; Jiang et al., 2013; Yang et al., 2018) และมีบางงานวิจัยได้ศึกษาเฉพาะส่วนบริเวณ Gly-rich, Cys-rich และโดเมน WAP ของครัสตินชนิดที่ 2 (Suthiantong et al., 2012; Wang, Y., Zhang, C., et al., 2018) พบว่าโปรตีนมีฤทธิ์ในการ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้แต่น้อยกว่าโปรตีนของครัสตินตัวปกติ แสดงให้เห็นว่า บริเวณ Gly-rich และ Cys-rich น่าจะมีความสำคัญต่อความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของยีน *Lvcarcinin* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 1 ยีน *CrustinP* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 2 และโดเมน WAP ของ *CrustinP* (*WAP-PV*) และยีน *PA-SWD* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 3 และโดเมน WAP ของ *PA-SWD* (*WAP-SWD*) ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) รวมถึงยีน *PA-WAP-PV* ที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่างบริเวณ Pro และ Arg-rich ของ *PA-SWD* กับ *WAP-PV* รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของยีนบริเวณ Gly และ Cys-rich ของ *CrustinP* และ Pro และ Arg-rich ของ *PA-SWD* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส

จากผลการวิจัยทั้งหมดสามารถสรุปผลได้ว่า สามารถโคลนยีน *Lvcarcinin* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 1 ยีน *CrustinP* และยีน *WAP-PV* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 2 และยีน *PA-SWD* และยีน *WAP-SWD* ซึ่งเป็นยีนของครัสตินชนิดที่ 3 รวมถึงยีน *PA-WAP-PV* ที่เกิดจากการเชื่อมกันระหว่างบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 กับ *WAP-PV* ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) แล้วนำไปผลิตโปรตีนลูกผสม *rLvcarcinin*, *rCrustinP*, *rWAP-PV*, *rPA-SWD*, *rWAP-SWD* และ *rPA-WAP-PV* จากนั้นเมื่อนำโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่า *rLvcarcinin* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 1 ชนิด คือ *B. subtilis* ส่วน *rCrustinP*, *rWAP-PV*, *rPA-SWD*, *rWAP-SWD* และ *rPA-WAP-PV* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* นอกจากนี้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K พบว่ามีเพียงโปรตีนลูกผสม *rPA-SWD* และ *rWAP-SWD* เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K โดยสามารถยับยั้งได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดลองนี้คือ $0.08 \mu\text{M}$ แสดงให้เห็นว่ายีนของครัสตินชนิดที่ 1 2 และ 3 มีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการโคลนยีนทั้ง 6 ชนิดของครัสตินชนิดที่ 1 2 และ 3 เมื่อทำการวิเคราะห์ยีน *Lvcarcinin* พบว่าจัดเป็นครัสตินชนิดที่ 1 เนื่องจากประกอบด้วยบริเวณของ Cys-rich อยู่ระหว่างเปปไทด์สังสัญญาณและโดเมน WAP ส่วนยีน *CrustinP* พบว่าจัดเป็นครัสตินชนิดที่ 2 เนื่องจากประกอบด้วยบริเวณ Gly-rich และ Cys-rich อยู่ในโครงสร้างระหว่างเปปไทด์สังสัญญาณและโดเมน WAP และยีน *PA-SWD* พบว่าจัดเป็นครัสตินชนิดที่ 3 เนื่องจากประกอบด้วยบริเวณ Pro

และ Arg-rich ในโครงสร้างบริเวณระหว่างเปปไทด์ส่งสัญญาณและโดเมน WAP จากผลการโคลนยีน *CrustinP* และยีน *PA-SWD* นั้นสามารถนำยีนทั้งสองชนิดไปเป็นแม่แบบในการโคลนยีนต่อไปได้ โดยโคลนยีน *WAP-PV* จากยีน *CrustinP* และโคลนยีน Pro และ Arg-rich ของ *PA-SWD* และยีน *WAP-SWD* จากยีน *PA-SWD* จากนั้นนำเอายีน Pro และ Arg-rich ของ *PA-SWD* มาเชื่อมต่อกับยีน *WAP-PV* ได้เป็นยีน *PA-WAP-PV* ขึ้นมาใหม่ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนทุกตัวนั้นมีความถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล และสามารถนำไปใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสมได้

ในการผลิตโปรตีน *rLvcarcinin*, *rCrustinP*, *rWAP-PV*, *rPA-SWD*, *rWAP-SWD* และ *rPA-WAP-PV* นั้นสามารถทำได้ในระบบ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) และพบว่าโปรตีนมีการแสดงออกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วย IPTG โดยโปรตีนลูกผสม *rLvcarcinin*, *rCrustinP*, *rWAP-PV*, *rPA-SWD*, *rWAP-SWD* และ *rPA-WAP-PV* มีขนาด 26.2, 29.42, 21.37, 22.28, 20.2 และ 23.17 kDa ตามลำดับ และมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในรูปของสารละลาย จึงสามารถนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) ชนิด Ni-NTA column เนื่องจากได้มีการออกแบบโดยการเพิ่มบริเวณ 6xHis tag เข้าไปภายในโมเลกุลจึงทำให้โปรตีนสามารถจับกับนิกเกิล (Nickel) ภายในคอลัมน์และทำบริสุทธิ์ได้

ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสมทั้ง 6 ชนิดพบว่า *rLvcarcinin* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 1 ชนิด คือ *B. subtilis* ส่วน *rCrustinP*, *rWAP-PV*, *rPA-SWD*, *rWAP-SWD* และ *rPA-WAP-PV* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* ซึ่งจากข้อมูลกราฟอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากโปรตีนลูกผสมแต่ละชนิดกับ 5 nmol Kanamycin ดังแสดงในภาพประกอบ 19 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสมเพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่มีการศึกษาเกี่ยวกับครัสตินพบว่าส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Smith, 2011) แต่ในยีนของครัสตินบางชนิดก็มีการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงเชื้อรา และไวรัสด้วย (Donpudsa et al., 2014; Du, Wang, et al., 2019; Jia et al., 2008) และจากการวิเคราะห์ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของครัสตินชนิดที่ 2 (*CrustinP*) และ 3 (*PA-SWD*) เปรียบเทียบกับโปรตีนของบริเวณโดเมน WAP คือ *rWAP-PV* และ *rWAP-SWD* พบว่าฤทธิ์ในการ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพของยีนบริเวณโดเมน WAP ของครัสตินทั้งสองชนิดมีประสิทธิผลลดลงเมื่อเทียบกับครัสตินที่มีโครงสร้างปกติ แสดงให้เห็นว่าบริเวณ Gly และ Cys-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 และบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 มีความสำคัญต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ ส่วน rPA-WAP-PV ที่เกิดจากการเชื่อมยีนของครัสตินชนิดที่ 2 และ 3 เข้าด้วยกันนั้นก็มียุทธศาสตร์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้มีประสิทธิผลเช่นเดียวกันกับ rPA-SWD ซึ่งจากการสังเกตผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของ rPA-WAP-PV เปรียบเทียบกับ rCrustinP และ rWAP-PV ดังภาพประกอบที่ 19 นั้น พบว่า rPA-WAP-PV สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าทั้ง rCrustinP และ rWAP-PV แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ rPA-SWD และ rWAP-SWD พบว่า rPA-WAP-PV มียุทธศาสตร์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ใกล้เคียงกับ rPA-SWD แต่มียุทธศาสตร์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีกว่า rWAP-SWD ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าบริเวณ Pro และ Arg-rich ของ PA-SWD มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K พบว่ามีเพียงโปรตีนลูกผสม rPA-SWD และ rWAP-SWD เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K โดยสามารถยับยั้งได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 0.08 μ M ส่วน rLvcarcinin, rCrustinP และ rWAP-PV หรือแม้แต่ rPA-WAP-PV ที่เกิดจากการเชื่อมยีนของ Pro และ Arg-rich ของ PA-SWD และ WAP-PV เข้าไว้ด้วยกันก็ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ได้ ซึ่งจากผลการทดลองนั้นมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่ายีนของครัสตินชนิดที่ 1 และครัสตินชนิดที่ 2 นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนส (Donpudsa et al., 2010; Suthianthong et al., 2012; Wang, Y., Zhang, C., et al., 2018) และยังคงสอดคล้องกับสมมุติฐานของงานวิจัยก่อนหน้าที่กล่าวไว้ว่าบริเวณ Pro และ Arg-rich นั้นอาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (Tassanakajon et al., 2015) แต่ไม่น่าจะส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรทีเนสอีกด้วย

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปผลได้ว่า บริเวณ Gly และ Cys-rich ของครัสตินชนิดที่ 2 มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ไม่ส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ส่วนบริเวณ Pro และ Arg-rich ของครัสตินชนิดที่ 3 นั้นแสดงให้เห็นว่ามีความสำคัญต่อฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่ไม่ส่งผลต่อฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K เนื่องจาก rWAP-SWD ซึ่งเป็นโดเมน WAP ของ

rPA-SWD ยังสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K แม้จะขาดบริเวณ Pro และ Arg-rich ก็ตาม รวมทั้งเมื่อนำบริเวณ Pro และ Arg-rich ไปเชื่อมต่อกับ WAP-PV ซึ่งเป็นโดเมน WAP ของครัสตินชนิดที่ 2 พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ดีขึ้นกว่า WAP-PV แต่ยังคงไม่พบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ proteinase K

ข้อเสนอแนะ

จากผลของงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าครัสตินชนิดที่ 1 2 และ 3 มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งขาว เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase K ได้ แสดงให้เห็นว่าผลของงานวิจัยนี้อาจเป็นประโยชน์ถ้าหากนำไปใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งขาวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่ผลงานวิจัยที่ได้ อาจเป็นเพียงส่วนน้อยเท่านั้น อาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับข้อมูลเชิงลึกของครัสตินทั้งสามชนิดนี้ในกิ้งขาวต่อไปในอนาคต เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาและควบคุมโรคระบาดของกิ้งขาวอย่างยั่งยืนและอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกิ้ง

บรรณานุกรม

- Amparyup, P., et al. (2008). Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(12), 1497-1509.
- Arockiaraj, J., et al. (2013). Crustin, a WAP domain containing antimicrobial peptide from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Immune characterization. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(1), 109-118.
- Bandeira, P. T., et al. (2020). A Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (crusFpau) is constitutively synthesized and stored by specific granule-containing hemocyte subpopulations. *Fish & Shellfish Immunology*, 97, 294-299.
- BIOTECH, E. (2563). Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). <https://www.enzymart.com/sds.php>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brogden K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3), 238-250.
- Cui, Z., et al. (2012). Crustins from eyestalk cDNA library of swimming crab *Portunus trituberculatus*: Molecular characterization, genomic organization and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 937-945.
- Dai, X., et al. (2020). Molecular cloning and expression analysis of two type II crustin genes in the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology*, 98, 446-456.
- Donpuksa, S., et al. (2010). Characterization of two crustin antimicrobial peptides from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3), 234-238.
- Donpuksa, S., et al. (2009). Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus*

- monodon. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 481-488.
- Donpudsa, S., et al. (2014). Type I and type II crustins from *Penaeus monodon*, genetic variation and antimicrobial activity of the most abundant crustinPm4. *Developmental & Comparative Immunology*, 47(1), 95-103.
- Du, Z., et al. (2019). A new antimicrobial peptide isoform, Pc-crustin 4 involved in antibacterial innate immune response in fresh water crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 861-870.
- Du, Z., et al. (2010). A single WAP domain (SWD)-containing protein with antipathogenic relevance in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1), 134-142.
- Du, Z., et al. (2019). A new crustin homologue (SpCrus6) involved in the antimicrobial and antiviral innate immunity in mud crab, *Scylla paramamosain*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 733-743.
- Du, Z., et al. (2015). A novel single WAP domain-containing protein isoform with antibacterial relevance in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(2), 478-484.
- Hipolito, S. G., et al. (2014). Role of *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide against *Vibrio penaeicida* and white spot syndrome virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(2), 461-469.
- Jia, Y., et al. (2008). A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibitory activities. *Aquaculture*, 284(1), 246-259.
- Jiang, H., et al. (2015). Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 43(2), 387-395.
- Jiang, H., et al. (2013). A single whey acidic protein domain containing protein (SWD) inhibits bacteria invasion and dissemination in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2), 310-318.
- Kathy F.J., T., et al. (2009). Evolutionary history of Taura Syndrome Virus. Retrieved September 30, 2020, from

<https://www.aquaculturealliance.org/advocate/evolutionary-history-taura-syndrome-virus/>

- Li, M., et al. (2018). Molecular cloning, expression, promoter analysis and functional characterization of a new Crustin from *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 73, 42-49.
- Li, M., et al. (2019). A new crustin is involved in the innate immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 398-406.
- Liu, N., et al. (2015). A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Developmental & Comparative Immunology*, 49(2), 313-322.
- Liu, N., et al. (2016). Characterization of a type-I crustin with broad-spectrum antimicrobial activity from red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 61, 145-153.
- Lv, X., et al. (2020). The immune function of a novel crustin with an atypical WAP domain in regulating intestinal microbiota homeostasis in *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 111, 103756.
- Lv, X., et al. (2020). Characterization of a gill-abundant crustin with microbiota modulating function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 105, 393-404.
- Mu, C., et al. (2011). A novel type III crustin (CrusEs2) identified from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(1), 142-147.
- Mu, C., et al. (2010). Molecular characterization and expression of a crustin-like gene from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(7), 734-740.
- OCENA. (2020). Instant Expert: White Shrimp Retrieved October 2, 2020, from <https://oceana.org/marine-life/cephalopods-crustaceans-other-shellfish/white-shrimp>
- Pham, T. T. H., et al. (2018). Analysis of antibiotic multi-resistant bacteria and resistance genes in the effluent of an intensive shrimp farm (Long An, Vietnam). *Journal of Environmental Management*, 214, 149-156.
- Raveschot, C., et al. (2020). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from

- Mongolian traditional dairy products: A multiparametric analysis. *Food Chemistry*, 304, 125415.
- Shockey, J. E., et al. (2009). The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(5), 668-673.
- shrimp news international. (December 11, 2013). Instant Expert: Early Mortality Syndrome. Retrieved September 30, 2020, from <http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/NewsReportsFolder/VietnamGAAwEbinarEMS.html>
- Smith, V. J. (2011). Phylogeny of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core proteins and their role in lower vertebrates and invertebrates. *Biochem Soc Trans*, 39(5), 1403-1408.
- Smith, V. J., et al. (2008). Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(7), 758-772.
- Sperstad, S. V., et al. (2009). Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4), 583-591.
- Sruthy, K. S., et al. (2017). Molecular cloning, recombinant expression and functional characterization of an antimicrobial peptide, Crustin from the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 71, 83-94.
- Supungul, P., et al. (2008). Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(1), 61-70.
- Suthianthong, P., et al. (2012). The N-terminal glycine-rich and cysteine-rich regions are essential for antimicrobial activity of crustinPm1 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 977-983.
- Tassanakajon, A., et al. (2015). Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 324-341.

- Tassanakajon, A., et al. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. In *Fish & Shellfish Immunology* (Vol. 34, pp. 954-967).
- Vatanavicharn, T., et al. (2009). Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustinPm5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(3), 244-252.
- Visetnan, S., et al. (2017). A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* possesses antiproteinase activity against subtilisin and antimicrobial activity against AHPND-inducing *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 341-348.
- Wang, H., et al. (2018). Newly identified type II crustin (SpCrus2) in *Scylla paramamosain* contains a distinct cysteine distribution pattern exhibiting broad antimicrobial activity. *Developmental & Comparative Immunology*, 84, 1-13.
- Wang, Y., et al. (2018). Involvement of a newly identified atypical type II crustin (SpCrus5) in the antibacterial immunity of mud crab *Scylla paramamosain*. *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 346-356.
- Wang, Y., et al. (2018). SpCrus3 and SpCrus4 share high similarity in mud crab (*Scylla paramamosain*) exhibiting different antibacterial activities. *Developmental & Comparative Immunology*, 82, 139-151.
- Yang, L., et al. (2020). A shrimp gene encoding a single WAP domain (SWD)-containing protein regulated by JAK-STAT and NF- κ B pathways. *Developmental & Comparative Immunology*, 104, 103537.
- Yang, L., et al. (2019). A JAK-STAT pathway target gene encoding a single WAP domain (SWD)-containing protein from *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 555-563.
- Yang, L., et al. (2018). A single WAP domain (SWD)-containing protein with antiviral activity from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 73, 167-174.
- Yu, A. Q., et al. (2016). Characterisation of a novel Type I crustin involved in antibacterial

and antifungal responses in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 48, 30-38.

YUMPU. (2015). Instant Expert: pET-32a(+). Retrieved July 27, 2021, from

<https://www.yumpu.com/en/document/view/39357443/pet-32a-c-vectors>

Zhang, J., et al. (2007). Expression, purification, and characterization of recombinant Chinese shrimp crustin-like protein (CruFc) in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 29(5), 813-817.

กมลศิริ พันธนิยะ. (2012). กุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม (Pacific white shrimp). สืบค้นเมื่อ 2 ตุลาคม 2563 จาก <https://www.shrimpcenter.com/t-shrimp051.html>

กรมประมง. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก

<http://www.nicaonline.com/kungthaipage26.html>

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ส. (2563). โรคจุดขาวในกุ้ง (White spot disease). สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก http://niah.dld.go.th/th/AnimalDisease/aquatic_WhiteSpot.htm

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ส. (2563). สถิติการส่งออกกุ้งขาว. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S_YEAR=2554&E_YEAR=2563&PRODUCT_GROUP=5248&PRODUCT_ID=3814&wf_search=&WF_SEARCH=Y

ขวัญเรือน สุวรรณรัตน์. (2561). โรคกับการเลี้ยงกุ้ง. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก

<http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-11-14/591-2018-11-19-04-43-15>

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2546). โรคกุ้งขาวแวนนาไม. สัตว์น้ำเศรษฐกิจ. สืบค้นเมื่อ 28 กันยายน 2563 จาก <https://www.shrimpcenter.com/t-shrimp043.html>

ณัฐพนธ์ ทรงนาคา. (2561). วิธีการเบื้องต้นในการทดสอบสารมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ในอนาคต.

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ. (2008). คู่มือการตรวจและวินิจฉัยโรคในกุ้งทะเล *Thai-NIAH eJournal*, 89 - 121.

พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. (2546). การจัดการสุขภาพกุ้งในฟาร์มเลี้ยง. สืบค้นเมื่อ 28 กันยายน 2563 จาก <https://www.shrimpcenter.com/t-shrimp014.html>

มลฤดี สนนี. (2559). การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล 373-382. สืบค้นเมื่อ 28 กันยายน 2563 จาก

<https://ag2.kku.ac.th/kaj/PDF.cfm?filename=20%20Molruedee.pdf&id=2556&keeptrack=3>

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). (2563). โรคของกุ้ง. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน 2563 จาก <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/shrimp/controller/01-04.php>

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ(FAO). (2556). โรคตายด่วนในกุ้ง (Early Mortality Syndrome: EMS). สืบค้นเมื่อ 28 กันยายน 2563 จาก

https://www.fisheries.go.th/ems/images/15.05.56/FAO%20Cause%20of%20AHPNS_p.pdf

อนุชิตา วงศ์ชื่น. (2563). เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส สืบค้นเมื่อ 3 พฤศจิกายน 2563 จาก

<https://erp.mju.ac.th/openFile.aspx?id=MTMyMTM4>

อนุสรฯ แก่นทอง. (2562). เมื่อกุ้งเป็นโรคช้ำขาว. สืบค้นเมื่อ 2 ตุลาคม 2563 จาก

<http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-14-19/843-2019-06-21-04-24-01>

อภิชาติ กาญจนทัต, & ณัฐชัย เทียงบูรณธรรม. (2553). เปปไทด์ต้านจุลชีพ. มหาวิทยาลัยทักษิณ.

สืบค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2563 จาก <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/tsujournal/article/view/68543/55812>

อรรวรรณ เปี้ยพัฑ. (2018). ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของครัสตินชนิดที่ 2 ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). Paper presented at the วารสาร วิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยี หัวเฉียว เฉลิมพระเกียรติ ISSN 2651-2483 (Online)(TCI Tier 2), คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

เอกอนันต์ ยุกเบญจพล. (2553). White feces syndrome in thailand. สืบค้นเมื่อ 30 กันยายน

2563 จาก <https://www.shrimpcenter.com/shrimp00214.html>



ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB เหลว ปริมาตรรวม 1 ลิตร

| | |
|---------------|---------|
| NaCl | 10 กรัม |
| Peptone | 10 กรัม |
| Yeast extract | 5 กรัม |

1.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แข็ง

Agar 15 กรัม ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB เหลว 1 ลิตร

1.3 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TBS เหลว ปริมาตรรวม 1 ลิตร

| | |
|------|---------|
| TSB | 30 กรัม |
| NaCl | 30 กรัม |

1.4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TBS แข็ง

Agar 15 กรัม ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TBS เหลว 1 ลิตร

1.5 การเตรียม 10X PBS (pH 7.4) 1000 mL

| | |
|----------------------------------|-----------|
| NaCl | 80 กรัม |
| KCl | 2 กรัม |
| Na ₂ HPO ₄ | 14.4 กรัม |
| KH ₂ PO ₄ | 2.4 กรัม |

2. การวิเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.1 การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1.1 สารละลาย 10X TBE Buffer ปริมาตรรวม 1 ลิตร

| | |
|------------|------------|
| Tris | 108.0 กรัม |
| Boric acid | 35.0 กรัม |
| EDTA | 7.44 กรัม |

2.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.2.1 การเตรียม 3% Agarose gel

ชั่ง Agarose gel 0.6 กรัม

ใส่ตัวทำละลาย 1x TBE 20.0 mL

นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agarose gel ละลายจนหมด

ย้อมเจลโดยใช้ redsafe 1 μ l
 เทเจลลงใน tray เซ็ตเจลที่มี comb สำหรับทำให้เกิดหลุมเสียบอยู่ โดยระวัง
 ไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นรอให้เจลแข็ง แล้วดึง well combs ออก

2.2.2 การหยอดสารตัวอย่าง

วางเจลลงใน chamber โดยนำด้านที่มีหลุมไว้ทางด้านประจุลบ
 เทสารละลาย 1x TBE ให้ท่วมแผ่นเจล
 ผสมตัวอย่างกับ 6x DNA loading dye ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อ
 6x DNA loading dye เท่ากับ 5 : 1 แล้วหยอดลงในหลุมในเจล
 ต่อ chamber เข้ากับเครื่องจ่ายไฟ โดยตั้งค่าเป็น 120V เป็นเวลา 30 นาที
 ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน

3.1 การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.1 การเตรียม 10x SDS running buffer ปริมาตรรวม 1 ลิตร

| | |
|-----------|----------|
| Tris Base | 30 กรัม |
| SDS | 10 กรัม |
| Glycine | 144 กรัม |

3.1.2 การเตรียมสารละลาย coomassie gel stain ปริมาตรรวม 1 ลิตร

| | |
|---------------------|--------|
| Coomassie Blue | 1 กรัม |
| Methanol | 450 mL |
| Glacial acetic acid | 100 mL |
| Water | 450 mL |

3.1.3 การเตรียมสารละลาย coomassie gel destain ปริมาตรรวม 1 ลิตร

| | |
|---------------------|--------|
| Methanol | 450 mL |
| Glacial acetic acid | 100 mL |
| Water | 450 mL |

3.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.2.1 เตรียม 15% SDS-PAGE ตามจำนวนที่ต้องการวิเคราะห์ โดย 1 แผ่น มี ปริมาตรเท่ากับ 5 mL สามารถเตรียมได้ดังนี้

| สารเคมี/ปริมาตร | 5 mL | 10 mL | 15 mL | 20 mL |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| Water | 1.1 mL | 2.3 mL | 3.4 mL | 5.7 mL |
| 30% acrylamide mix | 2.5 mL | 5.0 mL | 7.5 mL | 10.0 mL |
| 1.5M Tris (pH 8.8) | 1.3 mL | 2.5 mL | 3.8 mL | 5.0 mL |
| 10% SDS | 0.05 mL | 0.1 mL | 0.15 mL | 0.2 mL |
| 10% APS | 0.05 mL | 0.1 mL | 0.15 mL | 0.2 mL |
| TEMED | 0.002 mL | 0.004 mL | 0.006 mL | 0.008 mL |

3.2.2 เตรียม stacking Gel ตามจำนวนที่ต้องการวิเคราะห์ โดย 1 แผ่นมีปริมาตร เท่ากับ 1 mL สามารถเตรียมได้ดังนี้

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

- 3.2.3 รวบรวมแผ่นเจลแห้ง จากนั้นประกอบแผ่นเจลเข้ากับเครื่องรันโปรตีน
- 3.2.4 เติม 1x SDS running buffer ใหม่ลงในช่องระหว่างแผ่นเจลด้านใน แล้วหยอดโปรตีนที่ผสมกับ loading dye แล้วลงไปหลอดหลอดละ 20 μ l
- 3.2.5 ตั้งค่าเครื่องโดยแผ่นเจล 1 แผ่นต่อ 25 mA เป็นเวลา 60 นาที
- 3.2.6 ย้อมสีด้วย Coomassie blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.2.7 ล้างสีด้วย Destain จนแผ่นเจลใส

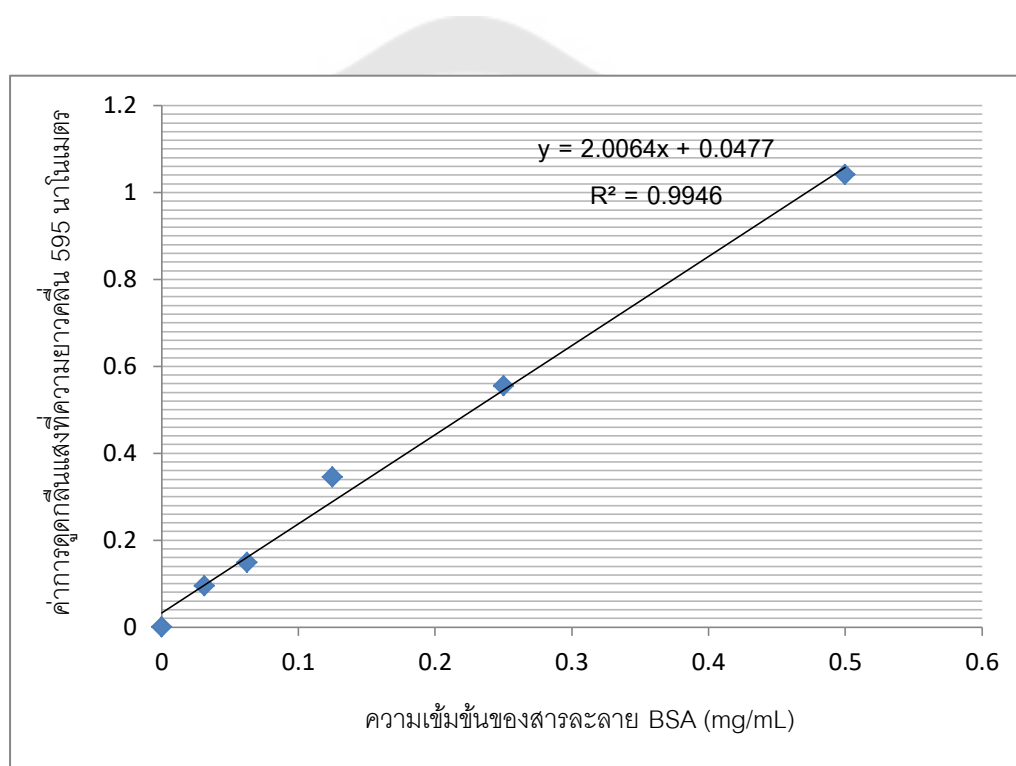
การเตรียม competent cell

1. นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่ต้องการทำให้อยู่ในรูป competent cell ลงอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แล้วเลี้ยงไว้ที่ 37°C เป็นเวลา ประมาณ 16-18 ชั่วโมง
2. นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาเจือจาง 100 เท่า ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LB แล้ว แล้วเลี้ยงไว้ที่ 37°C เป็นเวลาจนกระทั่งค่า OD600 มีค่าประมาณ 0.4
3. นำหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าแล้ววางไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
4. นำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
5. เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน แล้วเติมสารผสมของ 0.02 M MgCl₂ และ 0.02 M CaCl₂ จากนั้นทำให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกับสารละลายด้วยปิเปต แล้ววางไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
6. เก็บเฉพาะส่วนของตะกอนมาเติมสารผสมของ 0.1 M CaCl₂ และ 15% glycerol ที่เย็น จากนั้นทำให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกับสารละลายด้วยปิเปต
7. แบ่ง competent cell ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ หลอดละ 100 μ l
8. แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80°C

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับโปรตีน

1. เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0 mg/mL, 0.03125 mg/mL, 0.0625 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL และ 1 mg/mL
2. เติมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในเพลต ความเข้มข้นละ 10 μ l
3. เติมสารละลาย Bradford 200 μ l แล้วป่มเป็นเวลา 5 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำไปสร้าง

กราฟมาตรฐาน



ภาพประกอบ 22 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA



pET-32a-c(+) Vectors

TB122 12/98

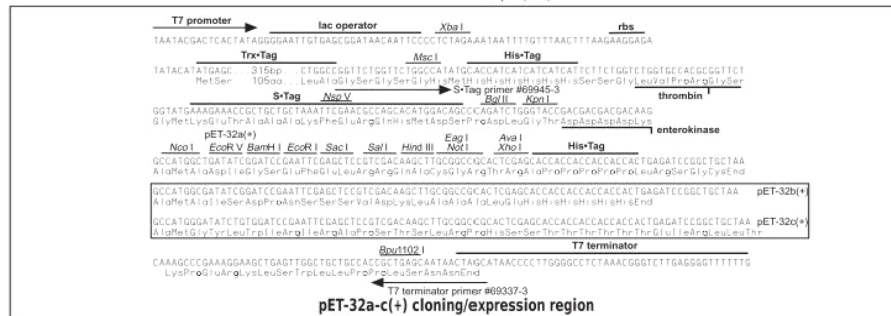
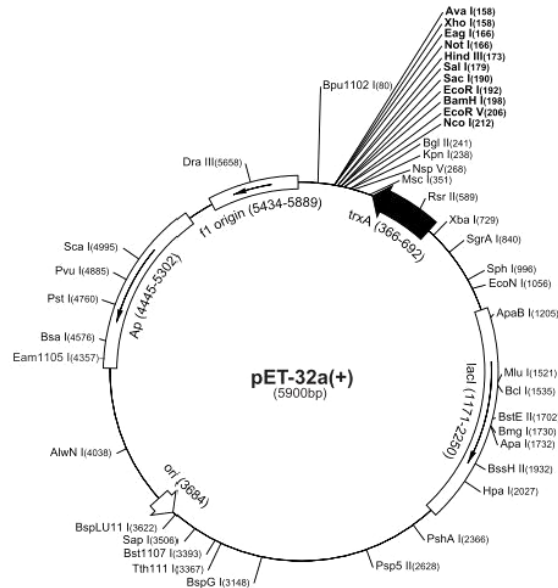
| | Cat. No. |
|-------------|----------|
| pET-32a DNA | 69015-3 |
| pET-32b DNA | 69016-3 |
| pET-32c DNA | 69017-3 |

The pET-32 series is designed for cloning and high-level expression of peptide sequences fused with the 109aa Trx*Tag™ thioredoxin protein (1). Cloning sites are available for producing fusion proteins also containing cleavable His*Tag™ and S*Tag™ sequences for detection and purification. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circle map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

1. LaValle, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) *BioTechnology* **11**, 187-193.

| pET-32a(+) sequence landmarks | |
|--------------------------------|-----------|
| T7 promoter | 764-780 |
| T7 transcription start | 763 |
| Trx*Tag coding sequence | 366-692 |
| His*Tag coding sequence | 327-344 |
| S*Tag coding sequence | 249-293 |
| Multiple cloning sites | |
| (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I) | 158-217 |
| His*Tag coding sequence | 140-157 |
| T7 terminator | 26-72 |
| <i>lacI</i> coding sequence | 1171-2250 |
| pBR322 origin | 3684 |
| <i>bla</i> coding sequence | 4445-5302 |
| f1 origin | 5434-5889 |

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam* H I at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam* H I at 198 except for *Eco* R V, which cuts at 209.



Novagen • ORDERING 800-526-7319 • TECHNICAL SUPPORT 800-207-0144

ภาพประกอบ 23 แผนภาพเวกเตอร์ pVR500 ได้ถูกดัดแปลงมาจากเวกเตอร์ pET-32a(+) โดยตัดบริเวณ His-tag และ S-tag ที่อยู่ระหว่างตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msc* I และ *Kpn* I ก่อนทำการเชื่อมสายดีเอ็นเอโดยใช้ T4 DNA polymerase

ที่มา YUMPU. (2015). Instant Expert: pET-32a(+). Retrieved July 27, 2021, from <https://www.yumpu.com/en/document/view/39357443/pet-32a-c-vectors>

ประวัติผู้เขียน

| | |
|-------------------|---|
| ชื่อ-สกุล | ทัศนีย์ ศรีสุข |
| วัน เดือน ปี เกิด | 1 สิงหาคม 2538 |
| สถานที่เกิด | จังหวัดสุพรรณบุรี |
| วุฒิการศึกษา | พ.ศ. 2556 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุพรรณบุรี พ.ศ. 2560 ปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2563 ปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ |
| ที่อยู่ปัจจุบัน | 100 ซอยเทศบาล 20 หมู่ 4 ตำบลเขาพระ อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี 72120 |
| รางวัลที่ได้รับ | รางวัลดีเด่นเหรียญทอง การประกวดประเภท Poster Presentation สาขาวิชาชีววิทยาและการประยุกต์ วิทยาศาสตร์การประมง วิทยาศาสตร์ สิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์การเกษตร วิทยาศาสตร์สุขภาพ จุลชีววิทยา วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยาประยุกต์ วิทยาศาสตร์การอาหาร และเทคโนโลยีทางอาหาร งานประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 12 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |