บทนำ

กุ้งทะเลเป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เพราะรสชาติดี เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศที่มีความต้องการกุ้งทะเลในปริมาณมาก การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ กุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงกันมากคือกุ้งกุลาดำ (black tiger prawn, *Penaeus monodon*) ความต้องการลูกกุ้งกุลาดำเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งส่งขายเป็นสินค้าส่งออกได้เพิ่มขึ้นอย่างมาก การเลี้ยงลูกกุ้งในบ่อเพื่อให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ทดแทนจากการจับจากแหล่งธรรมชาติไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ปัจจุบันแนวโน้มการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลจากแหล่งธรรมชาติเพื่อใช้ในการเพาะฟักลูกกุ้งได้ทวีความรุนแรงมากขึ้นและมีราคาสูง รวมทั้งกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงมีการติดโรคมากขึ้น กุ้งแชบ๊วยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นมีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากคือการเกิดโรคติดเชื้อในกุ้งที่เกิดจากจุลินทรีย์ (microorganism) แบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งคือ *Vibrio* species โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นโรคเรืองแสงและตายในที่สุด ปัจจุบันโรคระบาดของกุ้งก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษาโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อเชื้อก่อโรคของกุ้ง จึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อสามัญว่า banana shrimp มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguiensis* พบได้ทั่วไปตามบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทยที่มีพื้นที่ท้องทะเลเป็นดินโคลนปนทรายใกล้ปากแม่น้ำหรือเกาะแก่งในบริเวณอ่าวไทย กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเนื่องจากเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ เพราะมีรสชาติดี มีราคาดีกว่ากุ้งทะเลชนิดอื่น ๆ ในแถบเอเชีย แต่มีนิสัยชอบกินกันเองถ้าได้รับอาหารไม่เพียงพอทำให้นิยมเพาะเลี้ยงน้อยกว่ากุ้งกุลาดำ ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีปัญหาสำคัญจากเกิดโรคระบาดที่ไม่สามารถควบคุมได้ เป็นเหตุให้ผลิตกุ้งกุลาดำได้ไม่ต่อเนื่องและส่งผลให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำของประเทศไทยลดน้อยลงมาก รวมทั้งต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำค่อนข้างสูงเพราะการผลิตกุ้งกุลาดำต้องอาศัยแม่พันธุ์กุ้งจากธรรมชาติที่มีราคาสูงทำให้ลูกกุ้งมีราคาสูงตามไปด้วย กุ้งแชบ๊วยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตลูกกุ้ง เพราะกุ้งแชบ๊วยสามารถเจริญพันธุ์ได้รวดเร็วและสามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินในการผลิตลูกกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) หากสามารถเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ได้ขนาดที่ต้องการแล้วจะพบว่ากุ้งแชบ๊วยมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธี วัฒนสิงห์, 2543) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยยังต้องการหลักวิชาที่ต่างจากกุ้งกุลาดำหลายประการ เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมการกินอาหารและนิสัยการว่ายน้ำต่างจากกุ้งกุลาดำ และกลไกการป้องกันตนเองซึ่งยังมีการศึกษากันน้อยมาก

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) มีระบบไหลเวียนเลือดที่เรียกว่าฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) เป็นแบบเปิด กลไกการป้องกันตนเองในสัตว์กลุ่มนี้ประกอบด้วยการทำงานของเม็ดเลือดหรือเซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte) ได้แก่การเกิดฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) จุลินทรีย์ที่บุกรุก การเกิด nudule หรือการกักล้อม (encapsulation) เชื้อที่บุกรุก เป็นต้น ครัสเตเชียนยังมีกลไกป้องกันตนเองโดยสารน้ำ (humoral defense system) ที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด (Söderhäll and Cerenius, 1998) ซึ่งในสภาวะปกติจะมีปริมาณน้อยมาก โดยจะถูกหลั่งออกมามีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่อสัตว์เกิดการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น โปรตีนที่มีการศึกษาไปบ้างแล้วได้แก่ เลคตินและระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system) หรือระบบ proPO

เลคติน (lectin) หรือ agglutinin เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งมีความสำคัญในกุ้งและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง เลคตินสามารถจับอย่างจำเพาะกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) หรือตกตะกอนสารประกอบคาร์ไบไฮเดรตได้ ในครัสเตเชียน เลคตินเป็นตัวการสำคัญในระบบการรับรู้ถึงการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอม (Ratcliffe *et al.*, 1985 อ้างอิงโดย Söderhäll and Cerenius, 1992) เนื่องจากเลคตินจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรทเช่น เบตา-1,3-กลูแคน (β-1,3 glucan) หรือ lipopolysaccharide บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และทำให้เซลล์จุลินทรีย์เกิดการเกาะกลุ่ม จึงเป็นการยับยั้งไม่ให้จุลินทรีย์แพร่กระจายไปยังที่ต่าง ๆ นอกจากนี้ เลคตินยังจับระหว่างจุลินทรีย์และเซลล์เม็ดเลือดก่อให้เกิดฟาโกไซโทซิสจุลินทรีย์ที่บุกรุกได้ (Sritunyaluck- sana *et al.*, 2001) ถึงแม้เลคตินไม่ได้เป็นตัวทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคโดยตรง แต่พบว่าเลคตินสามารถจับกับ β-1,3-glucan binding protein (BGBP) ได้ในกุ้งนาง crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Duvic and Söderhäll, 1990) หรือในกุ้ง *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1996) และเป็นตัวกระตุ้น BGBP ซึ่งไปกระตุ้นระบบ proPO ให้เกิดการตอบสนองของเจ้าบ้านต่อจุลินทรีย์บุกรุกต่อไป จากการศึกษาเลคตินในกุ้งแชบ๊วย พบเลคตินที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาล sialic acid ในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* เกาะกลุ่มได้ดีกว่า *Vibrio* ก่อโรคชนิดอื่น ๆ แต่ไม่ทำให้ *Vibrio* ที่ไม่ก่อโรคในกุ้งเกาะกลุ่ม และยังพบว่าเลคตินในฮีโมลิมฟ์มีระดับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตอบสนองต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* บ่งชี้ว่าเลคตินถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นจากสภาวะการติดเชื้อก่อโรค (Utarabhand *et al.*, 2007)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสหรือระบบ proPO เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง ระบบ proPO เป็นปฏิกิริยาการป้องกันตนเองของสัตว์เปลือกแข็งที่พบในครัสเตเชียนพวกกุ้งและแมลง ทำหน้าที่เหมือนเป็นระบบความจำเพื่อทำหน้าที่จดจำและกำจัดจุลินทรีย์ที่บุกรุก (Söderhäll and Cerenius, 1992) โดยจะผลิตเอนไซม์หลักคือเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) ที่จำเป็นต่อการผลิตเมลานิน (melanin) เพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกจากสิ่งแปลกปลอม ในแมลงพบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมฟ์ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดและพลาสมา (plasma) แต่ในครัสเตเชียนพบเอนไซม์นี้ใน granule ของเซลล์เม็ดเลือด เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมี

บทบาทในด้านการป้องกันตนเอง (Sugumaran, 1996; Söderhäll *et al.*, 1996; Ashida and Brey, 1997) โดยการเปลี่ยนจากโปรตีนโปรฟีนอลออกซิเดสไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยเอนไซม์ serine protease ซึ่งถูกกระตุ้นได้ด้วยเบตา-1,3-กลูแคน (Hernandez-Lopez *et al.*, 1996; Vargas-Albores *et al.*, 1993) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียและ lipopolysaccharide (Ashida *et al.*, 1983) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเร่งปฏิกิริยา *o*-hydroxylation ของ monophenol และปฏิกิริยา oxidation ของ phenol ไปเป็น quinone โดยสามารถเปลี่ยน tyrosine ไปเป็น dihydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยน DOPA ไปเป็น DOPA-quinone (Sugumaran, 1996) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดในวิถีการสร้างเมลานินและไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่บุกรุกต่อไป เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีคอปเปอร์ (copper) เป็นองค์ประกอบคล้ายกับโปรตีนฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ในฮีโมลิมฟ์จากรายงานการศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุลของ proPO ของกุ้งนาง (Aspan *et al.*, 1995) และของแมลง (Kawabata *et al.*, 1995) พบว่าคล้ายกับของฮีโมไซยานิน

ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่หลากหลาย เช่น ขนส่งออกซิเจน เป็นตัวปรับแรงดัน (Paul and Pirow, 1998) ขนส่งฮอร์โมนลอกคราบ (Jaenicke *et al.*, 1999) หรือเป็นสารตั้งต้นของสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001) ฮีโมไซยานินถูกสังเคราะห์จากตับ (hepatopancreas) (Spindler *et al.*, 1992) เนื่องจากโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ 90-95% เป็นฮีโมไซยานิน และมีรายงานการพบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเซลล์ฮีโมไซท์น้อยมาก (Van Holde and Miller, 1995) ดังนั้นเป็นไปได้ที่ฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์เปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในฮีโมลิมฟ์ ดังที่มีรายงานว่าฮีโมไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้ง *Penaeus japonicus* ถูกกระตุ้นด้วย sodium dodecyl sulphate ให้มีแอคทิวิที (activity) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเหมือนกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่พบในเซลล์ฮีโมไซท์ (Adachi *et al.*, 2001) และจากที่มีการรายงานว่าฮีโมไซยานินเป็นสารตั้งต้นของสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดยพบสายโพลีเปปไทด์ด้านปลาย C ของฮีโมไซยานินต้านเชื้อราได้ (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001) จากคุณสมบัติของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียน บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินก็น่าจะเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองต่อเชื้อก่อโรคของกุ้งเช่นกัน แต่เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วยมาก่อน รวมทั้งยังมีการศึกษาฮีโมไซยานินในกุ้งพีเนด (penaeid) ชนิดอื่น ๆ น้อยมาก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้กุ้งแชบ๊วยเป็นตัวอย่างในการศึกษา และเนื่องจากผู้วิจัยพบว่ากุ้งแชบ๊วยมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ดีกว่าเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ งานวิจัยนี้จึงเลือก *V. harveyi* เป็นแบบจำลองของการติดเชื้อก่อโรคกุ้ง โดยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาคุณสมบัติระดับโปรตีนของฮีโมไซยานิน และการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แม้ความรู้ที่ได้ในเบื้องต้นนี้อาจจะยังไม่สามารถนำไปแก้ปัญหาการติดโรคกุ้งโดยตรงได้ แต่จะเข้าใจถึงบทบาทเบื้องต้นทางชีวภาพของโปรตีนฮีโมไซยา