นินที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกกระตุ้นให้ติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ซึ่งจะเป็นข้อมูลวิจัยส่วนหนึ่งนำไปสู่การเรียนรู้กลไกการป้องกันตนเองในกุ้งต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์และหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์
3. เพื่อสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์และพัฒนาเทคนิค ELISA
4. เพื่อสร้าง cDNA ของยีนฮีโมไซยานินจากตับและหาลำดับเบสของยีนนี้
5. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย
6. เพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่มีต่อระดับฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์และต่อการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 การเตรียมพลาสมาจากฮีโมลิมฟ์

กุ้งแชบ๊วยที่ใช้ศึกษาเป็นกุ้งตัวเต็มวัยซึ่งสั่งซื้อจากการจับจากทะเลอันดามันหรืออ่าวไทย ดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแชบ๊วยด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มี 1 มิลลิลิตรของสารกันเลือดแข็งตัว [450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) และ 10 mM HEPES, pH 7.3] และเข็มขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณ pericadium เก็บฮีโมลิมฟ์ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 200 x g ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ นาน 15 นาที นำส่วนใสหรือพลาสมา (plasma) เก็บไว้ที่ -20 $^{\circ}$ซ เพื่อใช้ในการแยกฮีโมไซยานิน

1.2 การเตรียมซีรัมจากฮีโมลิมฟ์

ดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแชบ๊วยด้วยกระบอกฉีดยา ปล่อยให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัวที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ซ เมื่อจะใช้ซีรัม (serum) นำฮีโมลิมฟ์ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 200 x g ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ นาน 15 นาที นำส่วนใสหรือซีรัมไปหาปริมาณฮีโมไซยานิน

2. การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างด้วยชุดหาโปรตีน (Coomassie plus protein assay reagent kit) ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายชุดหาโปรตีน 1 มิลลิลิตร โดยทำควบคู่ไปกับ BSA (bovine serum albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน จาก

นั้นเขย่าให้เข้ากันนาน 1-2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

3. **การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส** (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native PAGE) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความเข้มข้นของเจล 4-10% ทำตามวิธีของ Davis (1964) สำหรับโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพที่มี sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) ใช้ความเข้มข้นเจล 5-15% ทำตามตามวิธีของ Laemmli (1970) ย้อมสีโปรตีนในเจลแบบซิลเวอร์ตามวิธีการของบริษัท หรือด้วยสีคูมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250) โดยแช่เจลในสารละลาย 0.08% คูมาซีบลู - 50% methanol - 7.5% acetic acid แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 18% methanol - 7.5% acetic acid

4. **การทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์**

นำพลาสมาที่เตรียมได้จากฮีโมลิมฟ์ไปเซนตริฟิวจ์ในเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 200,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 4 ชั่วโมง ตามวิธีของ Adachi *et al.* (2001) จากนั้นดูดสารละลายจากส่วนบนเป็นส่วน ๆ (fraction) หลอดละ 800 ไมโครลิตร ส่วนตะกอนละลายด้วย Tris-MgCa (10 mM Tris-HCl, pH 7.8 - 5 mM $MgCl_2$ - 5 mM $CaCl_2$) นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A340) หาปริมาณโปรตีนด้วยชุดหาโปรตีน รวมสารละลายหลอดที่มีฮีโมไซยานิน (ค่า A340 สูง) เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น แล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี preparative PAGE โดยการแยกสารละลายฮีโมไซยานินเข้มข้นด้วย Native PAGE ในเจลทั้งแผ่น ตัดเฉพาะแถบโปรตีนที่เป็นฮีโมไซยานิน นำชิ้นเจลที่ตัดไปใส่ในถุงไดอะไลซ์ แล้วแช่ถุงในบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-192 mM, pH 8.3 แบบ submarine จากนั้นชะฮีโมไซยานินออกจากชิ้นเจลด้วยกระแสไฟที่ 15 mA นาน 18 ชั่วโมง สารละลายที่ชะได้นำไปทำให้เข้มข้น ทดสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมไซยานินที่แยกได้ด้วยการทำ Native PAGE และย้อมสีโปรตีน (วิธีข้อ 3)

5. **การเตรียมแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์**

สังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในกระต่ายขาว ตาแดง โดยฉีดกระต่ายดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 และ 2 ฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์สัปดาห์ละ 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant 1 มิลลิลิตร และอีก 2 สัปดาห์ต่อมา ฉีดฮีโมไซยานิน 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 0.8 มิลลิลิตร หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เจาะเลือดกระต่ายจำนวนมาก ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่ 4 °ซ นาน 1 คืน หลังการเซนตริฟิวจ์ นำซีรัมไปตกตะกอนด้วยเกลือ ammonium sulphate ที่ความอิ่มตัว 50% จากนั้นแยกแอนติบอดีต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (Auttarat *et al.*, 2006; Wallace, 1965)

6. การพัฒนาเทคนิค ELISA และการหาปริมาณฮีโมไซยานิน

6.1 การหาความเข้มข้นของ 1°Ab ที่เหมาะสมในการทำ ELISA

ในการวัดปริมาณฮีโมไซยานินโดย ELISA มีการใช้แอนติบอดี 2 ชนิด คือ แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ (1°Ab) และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (anti-rabbit IgG peroxidase conjugated, 2°Ab) ในการพัฒนาเทคนิค ELISA (ตามวิธีของ Rittidach, 2006) จะใช้ 1°Ab ที่ปริมาณต่าง ๆ กันเพื่อพัฒนาให้เทคนิคนี้สามารถใช้หาปริมาณฮีโมไซยานินได้ด้วยความไวสูง ทำการทดลองแต่ละหลุมดังนี้ นำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เคลือบผิวเพลทหรือไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) บ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ อย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วย PBT (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ล้างซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติม blocking buffer (บริษัท Pierce) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBT 3 ครั้ง แล้วเติม 1°Ab ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาตรอย่างละ 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ PBT 3 ครั้ง เติมสารละลาย 2°Ab ที่เจือจาง 1:25,000 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBT 3 ครั้ง เติมสารละลาย OPD (0.4 mg/ml *o*-phenylenediamine in 50 mM citrate buffer, pH 5) ที่มี 0.012% H_2O_2 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A492) ด้วยเครื่อง ELISA Reader

6.2 การหาความเข้มข้นของซีรัมที่เหมาะสมในการทำ ELISA

เมื่อรู้ค่าการเจือจาง 1°Ab ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คือ 1:2,000 (จากข้อ 6.1) ทำการทดลองโดยใช้ซีรัมที่ได้เจือจางความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตรอย่างละ 150 ไมโครลิตร ไปเคลือบเพลท และทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 6.1 โดยใช้ 1°Ab ที่ค่าเจือจาง 1:2,000

6.3 การหาปริมาณฮีโมไซยานินในซีรัมด้วยวิธี ELISA

หาปริมาณฮีโมไซยานินในซีรัมด้วยวิธี ELISA โดยใช้ซีรัมตัวอย่างที่เจือจาง 1:200 และ 1°Ab ที่เจือจาง 1:2,000 ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการข้อ 6.1 จากค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่วัดได้ สามารถคำนวณปริมาณฮีโมไซยานินในซีรัมตัวอย่างได้ จากกราฟมาตรฐานฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ซึ่งทำในทำนองเดียวกัน แต่ใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เคลือบผิวเพลทในปริมาณต่าง ๆ กัน

7. การศึกษาคุณสมบัติของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

7.1 การศึกษาแบบแผนหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้นำไปทำ SDS-PAGE (Laemmli, 1970) วิเคราะห์จำนวนหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ และนำไปคำนวณหามวลโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทำการทดลองพร้อมกัน

7.2 การหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Superose 12

นำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ไปผ่านคอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 ที่ต่อเข้ากับเครื่อง FPLC ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายหลอดละ 0.8 มิลลิลิตร ติดตามฮีโมไซยานินที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) จากค่าปริมาตรชะสามารถหามวลโมเลกุลของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิดที่ทำการทดลองควบคู่กันคือ ferritin (M_r 440,000) catalase (M_r 232,000) aldolase (M_r 158,000) BSA (M_r 67,000) และ Ovalbumin (M_r 43,000)

7.3 การหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายเอ็น (N-terminal amino acid sequence) ของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

นำฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ไปทำ SDS-PAGE จากนั้นขนถ่ายลงบนแผ่นเมมเบรน PDVF โดยใช้กระแสไฟที่ 500 mA นาน 40 นาที แล้วย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซี จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วตัดเมมเบรนตรงตำแหน่งแถบโปรตีนของฮีโมไซยานินแต่ละหน่วยย่อย นำไปหาลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นด้วยเครื่อง Protein Sequencer วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้านปลายเอ็นของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่หาได้เทียบกับของกุ้งชนิดอื่น

7.4 การทดสอบการมีแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

วัดการมีแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ โดยใช้ L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) เป็นสับสเตรทตามวิธีของวิไลพร ธรรมรัตน์ (2551) ดังนี้ ผสมฮีโมไซยานินบริสุทธิ์กับ 3 mg/ml L-DOPA ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ 2 mg/ml Trypsin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ CAC (10 mM cacodylate, pH 8 ที่มี 25 mM $CaCl_2$) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ CAC ให้มีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นาน 5 นาที แล้วคำนวณหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกำหนดให้แอคทิวิทีของเอนไซม์ 1 หน่วย มีค่าเท่ากับจำนวน A490 ที่เปลี่ยนไป 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที

8. การโคลนยีนฮีโมไซยานิน

8.1 การสร้าง primer และการเตรียม RNA จากตับกุ้งแชบ๊วย

จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายเอ็นของหน่วยย่อยฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ (จากข้อ 7.3) และข้อมูล conserved nucleotide sequence ของฮีโมไซยานินของกุ้งชนิดอื่น ๆ ที่หาได้จากฐานข้อมูลใน GenBank นำข้อมูลเหล่านี้ไปออกแบบสร้าง forward และ reverse primer และนำ primer เหล่านี้ไปใช้ในการสร้าง cDNA ของยีนฮีโมไซยานิน โดยเตรียม RNA ด้วยการสกัด total RNA จากตับของกุ้ง โดยใช้ชุดเตรียม RNA และทำตามวิธีการของบริษัท ตรวจความบริสุทธิ์ของ RNA เทียบกับปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร

8.2 การสร้าง cDNA ของฮีโมไซยานินและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สร้าง cDNA จาก total RNA ที่สกัดจากตับ โดยวิธี RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase (RT) และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อ 8.1 ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ของฮีโมไซยานินด้วยการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ภายใต้สภาวะดังนี้ บ่มที่ 94 °ซ 3 นาที ตามด้วย 30 รอบของการทำ denaturation ที่ 94 °ซ 30 วินาที, annealing ที่ 60 °ซ 30 นาที และ extention ที่ 72 °ซ 1 นาที จากนั้นทำ final extension ที่ 72 °ซ 5 นาที วิเคราะห์ PCR product ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 40 mM Tris-acetate, pH 8-1 mM EDTA ใช้กระแส 50 V นาน 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide

สกัดชิ้น PCR cDNA ออกจากเจลโดยใช้ Gel extraction kit จากนั้นโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy vector ด้วย PCR cloning kit แล้ว transform เข้า competent cell ตรวจสอบชิ้น cDNA ด้วย *Eco*RI และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ T7-SP6 primer, internal primer และ Dye terminator cycle sequencing kit ด้วยเครื่อง Automate DNA Sequencer (Applied Biosystems)

8.3 การสร้าง Full-length cDNA ของยีนฮีโมไซยานิน

สร้างชิ้น cDNA ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีนฮีโมไซยานิน ด้วยเทคนิค 5' และ 3' RACE (rapid amplification of cDNA end) โดยใช้ GeneRacer kit ซึ่งสร้าง cDNA สายแรกด้วย GeneRacer SuperScript II RT และใช้ oligo dT primer แล้วทำ PCR ด้วย *Taq* DNA polymerase โดยใช้ forward specific primer HC และ GeneRacer3' primer สำหรับ 3' RACE ขณะที่ใช้ reverse specific primer HC (รูปที่ 6) และ GeneRacer5' primer สำหรับ 5' RACE ปฏิกิริยาสำหรับทั้ง 3' และ 5' RACE ประกอบด้วยการบ่มที่ 94 °ซ 1 นาที, 68 °ซ 1 นาที และ 72 °ซ 2 นาที จำนวน 30 รอบ วิเคราะห์ PCR product และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีข้อ 8.2 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทุกชิ้นที่เหลื่อมกันมาสร้างเป็น full-length cDNA ของยีนฮีโมไซยานิน นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full - length cDNA ของยีนฮีโมไซยานินที่หาได้ไปเปรียบเทียบกับยีนฮีโมไซยานินของกุ้งชนิดอื่นที่มีอยู่ใน GenBank เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของยีนนี้กับยีนของกุ้งชนิดอื่น ๆ

8.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในเนื้อเยื่อของกุ้ง

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในฮีโมไซท์ ตับและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของกุ้งแชบ๊วย ทำการสร้างโพรบ (probe) ที่มีความจำเพาะของยีนฮีโมไซยานิน โดยการออกแบบสร้าง forward และ reverse primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานิน แล้วนำ primer เหล่านี้ไปใช้ในการสร้าง cDNA probe โดยเตรียม RNA ด้วยการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อเหล่านี้ของกุ้งโดยใช้ชุดเตรียม RNA และทำตามวิธีการของบริษัท จากนั้นใช้ RNA และ primer เหล่านี้ติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีนฮีโมไซยานินในเนื้อเยื่อเหล่านี้โดยวิธี RT- PCR

9. การทดสอบผลการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่มีต่อระดับฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์และต่อการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน

9.1 การเตรียมเชื้อ *Vibrio harveyi*

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *V. harveyi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ม.สงขลานครินทร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tryptic soy agar ที่มี 1.5 % NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารเหลว (tryptic soy broth) ที่มี 1.5% NaCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 °ซ นำเชื้อไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่ 4 °ซ จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) นำไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตะกอนและเตรียมแบคทีเรียในน้ำเกลือให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.9 หน่วย แล้วเก็บที่ 4 °ซ เพื่อใช้ฉีดกุ้งต่อไป

9.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในตับของกุ้งแชบ๊วยที่บ่มด้วยเชื้อ *V. harveyi*

ศึกษาการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินในตับของกุ้งแชบ๊วยที่บ่มด้วย *V. harveyi* ณ เวลาต่าง ๆ ดังนี้ ตัดตับเป็นชิ้นละ 30 มิลลิกรัม วางใน culture plate ที่มี K-199 medium และ *V. harveyi* ($5x10^7$ cells) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ จากนั้นนำชิ้นตับที่เวลาต่าง ๆ ในช่วง 0 - 4 ชั่วโมง ไปสกัด total RNA และติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีนฮีโมไซยานินโดยวิธี RT- PCR (ข้อ 8.2) แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธี semiquantative RT- PCR เปรียบเทียบกับ 18S rRNA ซึ่งใช้เป็น internal standard ตับชุดควบคุมบ่มกับ K-199 และทำการทดลองในทำนองเดียวกัน

9.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินและหาปริมาณฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi*

เลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในถังพลาสติกกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกุ้งดังนี้ ล้างถัง ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อลงในถัง ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 อาทิตย์ แล้วนำกุ้งที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 20 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 4-5 ตัว โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถัง นาน 3 วัน โดยสังเกตว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ($5x10^8$ cells) จากข้อ 9.1 ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน ในการทดลองนี้ใช้กุ้งไม่น้อยกว่า 3-5 ตัวในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ ดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแต่ละตัวที่ถูกฉีดด้วยเชื้อหรือกลุ่มควบคุมที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเตรียมซีรัมตามวิธีข้อ 1.1 แล้วหาปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบปริมาณฮีโมไซยานินในตัวอย่างฮีโมลิมฟ์ของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม