

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงาน
คณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 3/2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

บทคัดย่อ

การใช้โปรไบโอติกและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเพาะเลี้ยง ประสบความสำเร็จในการป้องกันและควบคุมโรคสัตว์น้ำ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อติดตามผลของเบต้ากลูแคน ยีสต์ เซลล์ และจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำหมัก ที่มีต่อการแสดงออกของยีนด้านจุลชีพชนิด *crustin*, *penaeidin3* (*LitvanPEN3*) และ *anti-lypopolysaccharide factor* (*LvALF1*) ในเม็ดเลือดของกุ้ง โดยเทคนิค real time PCR ที่ 7 และ 14 วัน ของการทดลอง จากผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ และโปรไบโอติกจากน้ำหมักมีการแสดงออกของยีน *crustin* และ *LitvanPEN3* ในวันที่ 14 ของการเลี้ยง จากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงจากชานอ้อย และจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เตรียมจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนด้านจุลชีพในระดับห้องปฏิบัติการได้

Abstract

Use of probiotics and immunostimulants has been widely accepted in shrimp aquaculture for prevent and control diseases. The objective of this study is to determine the effect of beta-glucan, whole cell yeast and probiotics bacteria on antimicrobial gene expression in hemocyte of shrimps. The expressions of AMPs gene; crustin, penaeidin3 (*LitvanPEN3*) and anti-lypopolysaccharide factor (*LvALF1*) were observed by quantitative real time PCR at 7 and 14 days of experiment. The result showed that shrimps fed diet supplemented with whole cell yeast and probiotic from three differenced preparations had up-regulation crustin and *LitvanPEN3* expression at 14 days. This experiment revealed that supplementation diet with probiotic and whole cells yeast can promote AMPs gene of shrimps in laboratory condition.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
บทคัดย่อ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการจากการวิจัย.....	3
2 เนื้อเรื่อง	
ทบทวนวรรณกรรม	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
ผลการวิจัย.....	32
3 อภิปรายผลการวิจัย.....	38
4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	42
5 ผลผลิต.....	43
รายงานการเงิน.....	44
บรรณานุกรม.....	45
ภาคผนวก.....	51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ช่วงกิจกรรมของเปปไทด์ด้านจุลชีพในกุ้ง.....	13
2.1 แสดงไพรเมอร์ของยีน <i>Crustin</i> , <i>Penaeidin</i> , <i>Anti-lipopolysaccharide factor</i> (<i>LvALF</i>) และ <i>Beta-actin</i> ที่ใช้ในปฏิกิริยา.....	29
2.2 ส่วนประกอบของสารผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR สำหรับตรวจหาการแสดงออกของยีน <i>LitvanPEN3</i> และ <i>Crustin</i>	30
2.3 ส่วนประกอบของสารผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR สำหรับตรวจหาการแสดงออกของยีน <i>LvALF1</i>	30
2-4 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR สำหรับเครื่อง LightCycler® 96 SW1.1 (Roch).....	31
ก-1 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงระหว่างการซ่อมแซมของแบคทีเรีย.....	54
ข-1 การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน.....	57
ข-2 ชั่งน้ำหนักและอายุของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์.....	58
ข-3 อาหารเหลือภายในถังทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง (น้ำหนักอาหารแห้ง)..	58
ข-4 ชั่งน้ำหนักและอายุของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก.....	59
ข-5 อาหารเหลือภายในถังทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง (น้ำหนักอาหารแห้ง)...	59
8-1 การคำนวณข้อมูลจากโปรแกรม LightCycler® 96 SW1.1 โดยวิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta C_q}$).....	64

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1-1 รูปแบบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง.....	13
1-2 ชนิดของครีस्टิน.....	14
1-3 รูปโครงสร้างของพีเนียดิน.....	15
2-1 การออกแบบระบบที่ใช้เลี้ยงกุ้งทดลอง.....	11
2-2 สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) สำหรับนับจำนวนเซลล์ฮีสต.....	18
2-3 ตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และ A B C D (ช่องW)	15
2.4 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม.....	20
2.5 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักกากถั่วเหลือง.....	21
2-6 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักน้ำหมักสับปะรด.....	22
2-7 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักน้ำหมัก Super biotic.....	22
2-8 ตารางบนผิว Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	23
2-9 แสดงอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่ผสมน้ำหมักในแต่ละชนิด.....	23
2.10 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม.....	25
3.1 การแสดงออกของยีน <i>Crustin</i> ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ฮีสตปริมาณที่แตกต่างกันของ 7 วันและ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR.....	32
3.2 การแสดงออกของยีน <i>LitvanPEN3</i> ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ฮีสตปริมาณที่แตกต่างกันของ 7 วันและ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR.....	33
3.3 การแสดงออกของยีน <i>LvALF1</i> ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ฮีสตปริมาณที่แตกต่างกันของ 7 วันและ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR.....	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-4	การแสดงผลของยีน <i>Crustin</i> ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ระยะเวลา 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR.....	35
3-5	การแสดงผลของยีน <i>LitvanPEN3</i> ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ระยะเวลา 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR.....	36
3-6	การแสดงผลของยีน <i>LvALFI</i> ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ระยะเวลา 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR....	37
ก-1	แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSA.....	52
ก-2	เชื้อโปรไบโอติกที่ได้จากน้ำหมักแต่ละชนิด.....	54
ก-3	ภาพแบคทีเรีย <i>Vibrio sp.</i> ที่เจริญบนอาหาร TCBS จากน้ำและดื่บกุ้งในบ่อเลี้ยงทดลอง.....	55
ก-4	ลักษณะดื่บกุ้งในบ่อเลี้ยงทดลอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x.....	69
ค-1	LightCycler® 96 SW1.1.....	62
ค-2	กราฟแสดงจำนวนของ product ที่เกิดจากการส่งสัญญาณของ SYBR Green I dye เมื่อมีการเพิ่มของ product (รูป S shape) ซึ่งจะเปิดแสดงบนโปรแกรม LightCycler® 96 SW1.1.....	62
ค-3	กราฟแสดงอุณหภูมิที่เป็น melting peaks ของ PCR product แต่ละตัว ซึ่งจะเปิดแสดงบนโปรแกรม LightCycler® 96 SW1.1.....	63
ค-4	แสดงค่า Cq ในโปรแกรม LightCycler® 96 SW1.1.....	63