



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาคุณลักษณะ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน Anti-lipopolysaccharide Factors ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression of Anti-lipopolysaccharide Factor Genes in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

นามผู้วิจัย นางสาววนิดย์ คล่องแคล่ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีชัน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ฦ นกร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาคุณลักษณะ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน
Anti-lipopolysaccharide Factors ในกุ้งก้ามกราม
(*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression of
Anti-lipopolysaccharide Factor Genes in Giant Freshwater Prawn
(*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

โดย

นางสาวนวนิตย์ คล่องแคล่ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2552

นวนิตย์ คล่องแคล่ว 2552: การศึกษาคุณลักษณะ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน Anti-lipopolysaccharide Factors ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ, Ph.D. 124 หน้า

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน Anti-lipopolysaccharide factor (ALF) ในกุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACEs) และการสืบค้นในห้องสมุด Complementary DNA (cDNA) ที่ได้จากเม็ดเลือดและ Androgenic gland ของกุ้งก้ามกราม ทำให้สามารถค้นพบ cDNAs ของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามอย่างน้อย 3 Isoforms คือ Mr-ALF1, Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNAs เท่ากับ 794, 959 และ 833 bp และเป็นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open reading frame, ORF) ขนาด 345, 399 และ 366 bp โดยเป็นลำดับของกรดอะมิโน 114, 132 และ 121 Residues ตามลำดับ เมื่อนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNAs ดังกล่าว มาทำนายโครงสร้างของโปรตีนจะพบตำแหน่งของ LPS binding motif ซึ่งมีความสำคัญในการจับกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ที่อยู่ระหว่างกรดอะมิโน Cysteine 2 ตำแหน่งที่จับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide อยู่ภายในโมเลกุล อีกทั้งยังมีบริเวณที่เป็น Consensus pattern [(W/T/R)CP(G/S)W(T/A)] เช่นเดียวกับยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งของ Glycosylation จำนวน 1 ตำแหน่งในลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 อีกด้วย การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF ทั้งสาม Isoforms ของกุ้งก้ามกราม พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF1 จะมีความคล้ายคลึงกับ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการสร้าง Phylogenetic tree ส่วน Mr-ALF2 จะมีความคล้ายคลึงกับ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*) และ Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) มากที่สุด และ Mr-ALF3 จะมีความคล้ายคลึงกับ American lobster (*Homarus americanus*) และ Bristled river shrimp (*M. olfersii*) มากที่สุด นอกจากนี้การศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่ายีน Mr-ALF1 มีการแสดงออกมากที่สุด ในเซลล์เม็ดเลือด หัวใจ ทางเดินอาหารส่วนกลางและตับและตับอ่อน ส่วนการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 มีการแสดงออกมากที่สุด ในกลุ่มของเม็ดเลือด ก้านตา ทางเดินอาหารส่วนต้น เหงือกและหัวใจ และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากทำการฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และให้กินอาหารผสมสาร β -glucan ในอัตรา 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR พบว่าในวันที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 จะเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ Mr-ALF2 เท่านั้นจะมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 และวันที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ภายหลังจากให้กินอาหารผสมสาร β -glucan นั้นจะไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

Nawanith Klongkleaw 2009: Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression of Anti-lipopolysaccharide Factor Genes in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoom, Ph.D. 124 pages.

Full length of complementary DNAs (cDNAs) encoded for anti-lipopolysaccharide factor (ALF) genes of giant freshwater prawn were isolated using Rapid Amplification of cDNA Ends (RACEs) technique and surveying in cDNA libraries of haemocytes and androgenic gland. At least 3 different isoforms (Mr-ALF1, Mr-ALF2 and Mr-ALF3) of ALF were discovered. cDNAs of these isoforms contained nucleotide sequences of 794, 959 and 833 bp respectively. The open reading frames of these cDNAs were 345, 399 and 366 bp (114, 132 and 121 amino acid residues) respectively. Amino acid sequence analysis indicated that these cDNAs bearing the LPS binding motif which actually use to bind cell wall components of pathogens were identified. This motif was observed to situate between two conserved cysteines at the middle part of the protein molecules. The consensus pattern [(W/T/R)CP(G/S)W(T/A)] which similar to those of invertebrates ALFs was also found in Mr-ALF1, Mr-ALF2 and Mr-ALF3. In addition, one glycosylation site was shown in only Mr-ALF2 and Mr-ALF3. Nucleotide and amino acid sequence analysis demonstrated that Mr-ALF1 was closely similar to bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*), corresponding to phylogenetic tree analysis. Mr-ALF2 was more similar to white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) and kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*), while Mr-ALF3 relatively homologued to american lobster (*Homarus americanus*) and bristled river shrimp (*M. olfersii*). Tissues expression analysis of Mr-ALF1 and Mr-ALF2 gene investigated by RT-PCR indicated that Mr-ALF1 gene was highly expressed in haemocytes, heart, mid gut and hepatopancreas. On the contrary, Mr-ALF2 gene was observed to be expressed lightly in haemocytes, eyestalk, fore gut, gills and heart. Transcriptional responses of giant freshwater prawn Mr-ALF1 and Mr-ALF2 to *Aeromonas hydrophila* and β -glucan were investigated by quantitative real-time PCR. Mr-ALF1 was showed to be significantly up-regulated only in day 1 after injected with *A. hydrophila*. Interestingly, Mr-ALF2 showed the expression levels higher than that of control ($P < 0.05$) at day 1, 3 and 7 after injection. Transcriptional levels of Mr-ALF1 and Mr-ALF2 were also determined in prawns that experimentally fed with β -glucan supplemented and normal feed for 14 days. No significant differences of these ALFs between two prawn groups were observed during experimental periods ($P \geq 0.05$).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ที่คอยให้ความช่วยเหลือและชี้แนะในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีชัยน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เรืองวิชัย ยืนพันธ์ อาจารย์ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และรองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลิมสุวรรณ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยในการสอบประมวลความรู้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ ณ นคร เป็นอย่างสูงที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ตลอดจนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำและในภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน ๆ มินกร 52 ทุกคน ที่เป็นกำลังใจและคอยให้คำแนะนำช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้เป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดและคอยอยู่เคียงข้างลูกตลอดมา อีกทั้งยังคอยให้โอกาสทางการศึกษาและสนับสนุนผลักดันให้ลูกได้รับการศึกษาที่ดีตามสติปัญญาและกำลังความสามารถของลูกจนมาถึงทุกวันนี้

นวนิตย์ คล่องแคล่ว

เมษายน 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	20
อุปกรณ์และสารเคมี	20
วิธีการทดลอง	24
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	102
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	105
ภาคผนวก	120
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	124

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Primers และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers ที่ใช้ในการทดลอง	23
2	ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF1 ที่มีค่า <i>E</i> -value สูงสุดใน 5 อันดับแรก โดยการ BlastN	44
3	ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF1 ที่มีค่า <i>E</i> -value สูงสุดใน 5 อันดับแรก โดยการ BlastX	45
4	ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF2 ที่มีค่า <i>E</i> -value สูงสุดใน 5 อันดับแรก โดยการ BlastX	46
5	ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF3 ที่มีค่า <i>E</i> -value สูงสุดใน 5 อันดับแรก โดยการ BlastX	48
6	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms	63
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Consensus pattern ของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustacean ชนิดอื่น ๆ	66
8	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF1 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ	72
9	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF2 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ	74
10	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF3 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในตำแหน่ง Polylinker ของ pGEM-T Easy vector	30
2	แบบแผนของการโคลน Full-length ของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF1)	45
3	แบบแผนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF2)	47
4	แบบแผนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF3 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF3)	48
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF1)	51
6	ตำแหน่ง Putative signal peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF1) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0	52
7	การทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF1)	53
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF2)	55
9	ตำแหน่ง Putative signal peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF2) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0	56
10	การทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF2)	57
11	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF3 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF3)	59
12	ตำแหน่ง Putative signal peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF3 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF3) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0	60
13	การทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 ของยีน ALF3 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF3)	61

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms	62
15	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms	64
16	การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามกับลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ	67
17	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ Mr-ALF1, Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 กับยีนในกลุ่ม AMP ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ใน GenBank database	81
18	การแสดงผลของ Mr-ALF1 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม เปรียบเทียบกับการแสดงผลของยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR	83
19	การแสดงผลของ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม เปรียบเทียบกับการแสดงผลของยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR	84
20	กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ในการศึกษาการแสดงผลของยีน Mr-ALF1 ของกุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR	87
21	กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ในการศึกษาการแสดงผลของยีน Mr-ALF2 ของกุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR	87
22	Dissociation curve ในการศึกษาการแสดงผลของยีน Mr-ALF1 ของกุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR	89
23	Dissociation curve ในการศึกษาการแสดงผลของยีน Mr-ALF2 ของกุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR	89
24	การแสดงผลของยีน Mr-ALF1 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i>	91
25	การแสดงผลของยีน Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i>	92

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	การแสดงผลของยีน Mr-ALF1 ในเม็ดเลือดของกิ้งก่ามกราคมภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นการให้อินอาหารผสมสาร β -glucan 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	95
27	การแสดงผลของยีน Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกิ้งก่ามกราคมภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นการให้อินอาหารผสมสาร β -glucan 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	96

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALF	=	Anti-lipopolysaccharide factor
AMP	=	Antimicrobial peptide
cDNA	=	Complementary DNA
RNA	=	Ribonucleic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
O.D.	=	Optical density
CFU	=	Colony forming unit
W/V	=	Weight by volume
°C	=	Degree celcius
Da	=	Dalton
bp	=	Base pair
M	=	Molar
mM	=	Milimolar
μM	=	Micromolar
μg	=	Microgram
ng	=	Nanogram
ml	=	Mililitre
μl	=	Microlitre
Ala (A)	=	Alanine
Arg (R)	=	Arginine
Asn (N)	=	Asparagine
Asp (D)	=	Aspartic acid
Cys (C)	=	Cysteine
Glu (E)	=	Glutamic acid
Gln (Q)	=	Glutamine
Gly (G)	=	Glycine
His (H)	=	Histidine
Ile (I)	=	Isoleucine

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

Leu (L)	=	Leucine
Lys (K)	=	Lysine
Met (M)	=	Methionine
Phe (F)	=	Phenylalanine
Pro (P)	=	Proline
Ser (S)	=	Serine
Thr (T)	=	Threonine
Trp (W)	=	Tryptophan
Tyr (Y)	=	Tyrosine
Val (V)	=	Valine
Asx (B)	=	Asparagine หรือ Aspartic acid
Glx (Z)	=	Glutamine หรือ Glutamic acid
Xle (J)	=	Leucine หรือ Isoleucine
Xaa (X)	=	Unspecified หรือ unknown amino acid

การศึกษาคูณลักษณะ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน
Anti-lipopolysaccharide Factors ในกุ้งก้ามกราม
(*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression of
Anti-lipopolysaccharide Factor Genes in Giant Freshwater Prawn
(*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

คำนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย จากข้อมูลสถิติของกรมประมงพบว่าในปี พ.ศ. 2548 มีผลผลิตกุ้งก้ามกรามอยู่ที่ 31,800 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,359.1 ล้านบาท ซึ่งลดลงกว่าปี พ.ศ. 2547 ถึง 1,200 ตัน (กรมประมง, 2550) ทั้งนี้เนื่องมาจากในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมา การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยประสบกับปัญหาการระบาดของโรคหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิด *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) และไวรัส Extra small virus (XSV) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักเป็นจำนวนมาก และการระบาดของโรสดังกล่าวยังคงทวีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้เกษตรกรที่เพาะพันธุ์ลูกกุ้งก้ามกรามขาดทุนเป็นจำนวนมากและส่งผลกระทบต่อถึงเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามในบ่อดินเกิดการขาดแคลนลูกพันธุ์ที่จะปล่อยลงเลี้ยง

ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้ทำให้มีผู้เริ่มสนใจที่จะศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามเพิ่มมากขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาโรคระบาดของกุ้งก้ามกราม กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่ม Crustacean ที่มีการศึกษาเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่น้อยมาก ซึ่งจากข้อมูลการศึกษาในปัจจุบันพบว่าสัตว์ในกลุ่มนี้จะมีระบบภูมิคุ้มกันเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immune response) โดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือด (Haemocytes) เป็นศูนย์กลางในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ กระบวนการกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis), กระบวนการห่อล้อมเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม (Nodule formation และ Encapsulation), การแข็งตัวของเลือด (Blood clotting) และกระบวนการ Prophenoloxidase (proPO) cascade ที่เกี่ยวข้องกับยีนในระบบ

ภูมิคุ้มกันหลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันความรู้ทางด้านอณูชีวโมเลกุล (Molecular biology) ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาวิจัยทางด้านระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ชนิดต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น และใช้เป็นเทคนิคหรือเครื่องมือในการศึกษาอื่นหลายชนิด รวมทั้งยีนในกลุ่ม Antimicrobial peptides (AMPs) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (Innate immunity) ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและพืช ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่ายีน AMPs ของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean มีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ Crustin, Penaeidin และ Anti-lipopolysaccharide factor (ALF) โดย AMPs มีหน้าที่หลักในการต้านทานเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ เชื้อราและโปรโตซัว ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์เกิดเป็นรูและส่งผลให้เกิดการ Lysis ของเซลล์ตามมา เมื่อเกิดการบุกรุกจากเชื้อโรครดักกล่าว (Bachère *et al.*, 2000; Hancock and Sahl, 2006)

ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาคู่มือ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ของกุ้งก้ามกราม ตลอดจนทำการศึกษาคู่มือสมบัติ ลักษณะการทำงานและการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษารังนี้ จะเป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้เรามีความรู้ความเข้าใจในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการในการป้องกันและรักษาโรคในกุ้งก้ามกรามที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNAs (cDNAs) ของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ของกิ้งก่ามกราคม
2. เพื่อทำการศึกษาโครงสร้าง คุณสมบัติและลักษณะการทำงานของ cDNAs ของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ของกิ้งก่ามกราคม เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ในอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามกราคม
4. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ในเม็ดเลือดของกิ้งก่ามกราคม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และสาร β -glucan

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางอนุกรมวิธานและลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกราม มีชื่อสามัญว่า Giant freshwater prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii*, de Man หรือมีชื่อเรียกภาษาท้องถิ่นของไทยหลากหลายชื่อ เช่น กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งใหญ่ กุ้งก้ามเกลี้ยง เป็นต้น (ยนต์, 2529; สมพงษ์, 2546) ซึ่ง Houlthuis (1995) ได้จัดจำแนกลักษณะทางอนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกรามไว้ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Section Caridea

Family Palaemonidae

Subfamily Palaemoninae

Genus *Macrobrachium*

Species *rosenbergii*

กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลังที่มีเปลือกหุ้มเป็น โครงร่างแข็งอยู่ภายนอก ร่างกาย (Exoskeleton) ซึ่งมีสารไคติน (Chitin) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ มีเลือดใสไม่มีสี แต่เมื่อถูกออกซิไดซ์แล้วจะเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากมีสารพวก Hemocyanin เป็นองค์ประกอบ กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์สองน้ำ (Catadromous) ขนาดใหญ่ อาศัยอยู่ในน้ำจืดหากินตามบริเวณหน้าดินของแม่น้ำลำคลอง มีความต้องการออกซิเจนสูง จึงมักพบในที่ ๆ น้ำไหลและใสสะอาด มีนิสัยชอบเกาะซุกซ่อนตัวอยู่ตามเสาไม้และรากไม้ตลอดจน โขดหินที่จมอยู่ใต้น้ำ กุ้งก้ามกรามมีความไวต่อแสง ว่องไวปราดเปรียวหลบหลีกศัตรูได้คล่องแคล่วเมื่อถูกรบกวน ตามปกติกุ้งก้ามกรามจะออกหากินในเวลากลางคืน ส่วนในตอนกลางวันจะซุกซ่อนตัวในแหล่งหลบซ่อน กินอาหารได้ทุกประเภท ทั้งอาหารมีชีวิตและซากที่เน่าสลาย ทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ เนื้อปลา เนื้อหอย พันธุ์ไม้น้ำ เมล็ดข้าว ถั่ว ตัวอ่อนของแมลง หนอน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีนิสัยคุ้ยกินกันเอง โดยเฉพาะในระยะที่กำลังลอกคราบ จะอ่อนแอ ถูกทำร้ายและเป็นเหยื่อของกุ้งตัวที่แข็งแรงกว่า (ยนต์, 2529)

กุ้งก้ามกรามมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย แพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำจืดที่มีทางน้ำติดต่อกับทะเล และแหล่งน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำลำคลองและทะเลสาบ พบชุกชุมในประเทศไทย พม่า เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย บังคลาเทศ อินเดีย ศรีลังกา อินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ แต่สำหรับในประเทศไทยนั้นพบกุ้งก้ามกรามแพร่กระจายอยู่เกือบทั่วทุกภาค ในภาคเหนือพบกุ้งชนิดนี้ในแม่น้ำเมย ซึ่งเป็นสาขาของแม่น้ำสาละวินของประเทศพม่า ส่วนภาคกลางมีชุกชุมในกลุ่มแม่น้ำสำคัญต่าง ๆ ได้แก่ แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำปรางบุรี แม่น้ำนครนายก และแม่น้ำบางปะกง ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบในแม่น้ำจันทบุรี แม่น้ำเวฬุ แม่น้ำระยอง และแม่น้ำตรวด ทางภาคใต้มีชุกชุมในแม่น้ำหลังสวน แม่น้ำตาปี แม่น้ำกระบือ แม่น้ำตรัง แม่น้ำปัตตานี และทะเลสาบสงขลา (บรรจง, 2535; เรื่องวิษณุ, 2544) และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีเลี้ยงกันในจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม อ่างทองเจริญ ร้อยเอ็ด และอุบลราชธานี (วนิชยา, 2544)

2. สถานการณ์การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยในปัจจุบัน

การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยเริ่มต้นขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 โดยกรมประมงเริ่มทำการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามขึ้นเป็นครั้งแรกและทำการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเรื่อยมาจนกระทั่งปี พ.ศ. 2512 กรมประมงประสบความสำเร็จสามารถเพาะเลี้ยงและอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนได้ ทำให้วงการการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของไทยเจริญเติบโตมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้มีฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย (กัณฐิย์, 2550)

จากอดีตจนถึงปัจจุบันกุ้งก้ามกรามยังคงจัดเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยมูลค่าการผลิตกุ้งก้ามกรามในปี พ.ศ. 2548 มีค่าเท่ากับ 4,359.1 ล้านบาท ซึ่งมาจากปริมาณผลผลิตกุ้งก้ามกรามทั้งสิ้น 31,800 ตัน ลดลงจากปี พ.ศ. 2547 ถึง 1,200 ตัน (กรมประมง, 2550) ปริมาณผลผลิตกุ้งก้ามกรามที่ลดลงนี้ คาดว่าเนื่องมาจากการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามประสบกับปัญหาการผลิตต่าง ๆ ได้แก่ปัญหาเรื่องต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ปัญหาราคากุ้งตกต่ำ แต่ปัญหาที่สำคัญที่สุดและยากที่จะป้องกันคือปัญหาการระบาดของโรค (พิสิษฐ์, 2550) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคหางขาว (White tail disease) ที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิด *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) และไวรัส Extra small virus (XSV) (พุทธรัตน์, 2550) ซึ่งทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามที่เพาะพันธุ์ได้จากโรงเพาะฟักเกิดการตายเป็นจำนวนมาก ส่งผลต่อเนื่องถึงเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามขาดแคลนลูกพันธุ์ที่จะปล่อยลงเลี้ยง จึงทำให้ปริมาณผลผลิตกุ้งก้ามกรามในปี พ.ศ. 2548 ลดลงตามไปด้วย ซึ่งจากสถานการณ์การระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดดังกล่าว ยังคงทวีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน

3. โรคของกุ้งก้ามกรามที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง

โรคของกุ้งก้ามกรามแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ โรคกุ้งก้ามกรามในช่วงเพาะฟักและอนุบาล กับโรคในช่วงของการเลี้ยง (ยนต์, 2529) ซึ่งโรคที่เกิดขึ้นกับกุ้งก้ามกรามในช่วงเพาะฟักและอนุบาลนั้นมีความคล้ายคลึงกับชนิดที่เกิดขึ้นในลูกกุ้งทะเล โดยทั่วไปแล้วโรคที่มักเกิดขึ้นกับลูกกุ้งก้ามกรามมีหลายชนิด เช่น โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมาก โดยจะติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวเปลือกของลำตัวหรือติดเชื้อภายในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งชนิดที่พบมากในโรงเพาะฟัก ได้แก่ *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Aeromonas* spp. (Phatarpekar *et al.*, 2002) สำหรับชนิดที่พบมากที่สุด คือ *Vibrio harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงหรือโรคเพชรพลอย ซึ่งทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามระยะก่อนคั่วตายด้วยอาการเรืองแสง (จิราพรและคณะ, 2530) ส่วนโรคที่เกิดจากโปรโตซัว ส่วนใหญ่จะเป็นโปรโตซัวพวกที่ยึดเกาะที่พบมากที่สุดคือ *Zoothamnium* sp. และ *Epistylis* sp. พบมากในบ่อเพาะและอนุบาล และบางครั้งอาจพบว่ามี *Vorticella* sp. และ *Acineta* sp. อีกด้วย ซึ่งโปรโตซัวเหล่านี้จะมีผลทำให้ลูกกุ้งเสียการทรงตัว ไม่กินอาหาร อ่อนแอ ถ้ามีมากจะขัดขวางการลอกคราบ ยับยั้งการเจริญเติบโตและตายในที่สุด (ไพบูลย์, 2544)

โดยในปัจจุบันมีรายงานการเกิดโรคชนิดใหม่ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส คือ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) ก่อโรคร่วมกับไวรัสอีกชนิดหนึ่งคือ Extra small virus (XSV) ซึ่งกำลังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดีย จีนและไต้หวัน โดยอาการของโรคที่พบคือกล้ามเนื้อบริเวณหลังหรือส่วนท้องมีลักษณะขาวขุ่น สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน อัตราการตายอาจสูงถึง 100% ภายใน 3-5 วัน (จักรพงษ์, 2549; Qian *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ผลการศึกษาของนิติและคณะ (2548) ที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัส MrNV และ XSV ในกุ้งก้ามกรามของประเทศไทย ทำให้ทราบว่าเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นไวรัสชนิด RNA สายเดี่ยวมีขนาดของสายพันธุกรรม (Genomes) ประมาณ 2.9 และ 1.3 กิโลเบส ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาทางพยาธิสภาพ จะพบ Basophilic cytoplasmic inclusions อยู่ในช่องว่าง (Vacuoles) ภายในเซลล์ตับและตับอ่อน บางเซลล์จะติดสีน้ำเงินอมม่วง (Basophilic-violet intranuclear inclusions) อยู่ในนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้น (Hypertrophic nuclei) ภายในเซลล์ของตับและตับอ่อน นอกจากนี้ยังพบการตายของกล้ามเนื้อลาย (Striated muscle necrosis) ที่ส่วนท้อง หัว หางและรยางค์ของลูกกุ้ง บางครั้งจะพบลักษณะการหดตัวอัดรวมกันแน่นของนิวเคลียส (Pyknotic nuclei)

ภายในกลุ่มของเซลล์กล้ามเนื้อที่ตาย และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบอนุภาคของไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22 - 25 นาโนเมตร พบเซลล์เป็นจำนวนมากที่เกิด Inclusion bodies ในเซลล์ตับและตับอ่อน และในเซลล์กล้ามเนื้อลายที่เกิดการตาย ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีวิธีการในการรักษาโรคดังกล่าว อย่างไรก็ตามวิธีการในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้คือการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามก่อนที่จะนำมาผสมพันธุ์วางไข่ และในลูกกุ้งวัยอ่อนก่อนที่จะนำไปปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดิน ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR พิสูจน์แล้วพบว่าเป็นการตรวจสอบที่ดี เหมาะสมและแม่นยำที่สุดกว่าวิธีอื่น ๆ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ (ศุภมาศ, 2549)

ในส่วนของโรคของกุ้งก้ามกรามที่พบในระหว่างการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามขนาดใหญ่ นั้น เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งโรคที่เกิดจากโปรโตซัว และในบางครั้งอาจพบโรคแคระแกร็น โดยลักษณะของกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคดังกล่าว จะมีลักษณะคล้ายเม็ดสาหร่ายขนาดเล็กบริเวณตับและตับอ่อน จำนวนของลักษณะที่เหมือนเม็ดสาหร่ายนี้มีจำนวนมากขึ้นแตกต่างกันไป ซึ่งกุ้งก้ามกรามที่มีเม็ดสาหร่ายเหล่านี้จะกินอาหารลดลง และจากการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือด (Hematopoietic tissue) พบว่ามี Inclusion body อยู่ภายในเซลล์เหล่านี้จำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะคล้ายกับการติดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคแคระแกร็นหรือโรคตัวพิการ (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV) ในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (ชโลและพรเลิศ, 2547)

นอกจากนี้การเกิดโรคของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามขนาดใหญ่ นั้นอาจมีสาเหตุมาจากวิธีการเลี้ยงและการจัดการฟาร์มที่ไม่เหมาะสม ทำให้คุณภาพน้ำในบ่อและสภาพของพื้นบ่อเกิดการเน่าเสีย จึงทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นได้ เช่น โรคเหงือกดำ ที่มีสาเหตุมาจากการเน่าเสียของพื้นบ่อ เป็นต้น

4. ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (Crustacean)

สัตว์น้ำในกลุ่มครัสเตเชียน เช่น กุ้งและปู จัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) ที่มีระบบภูมิคุ้มกันเป็นแบบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (Innate immunity) โดยมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immune response) ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 ระบบที่มีการทำงานร่วมกันอย่างใกล้ชิด คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (Cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำในเลือด (Humoral immunity)

4.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์

เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญคือเซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ Hyaline cell (Hyalinocyte), Semi-granular cell (Semi-granulocyte) และ Large-granular cell (Granulocyte) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ดังนี้

4.1.1 Hyaline cell หรือ Hyalinocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด มีรูปร่างแบนกลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบรูปร่างคล้ายกระสวยหรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ ลักษณะโครงสร้างที่ผิวของเซลล์ไม่พบ Microvilli หรือเท้าเทียม (Pseudopodia) ไม่มี Granules ภายใน Cytoplasm ขนาดเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.4 - 8.3 ไมครอน (ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม) หรือขนาดความกว้าง 2.5 - 3.6 ไมครอน ยาว 6.8 - 13.9 ไมครอน (ในกรณีที่เซลล์เป็นรูปรีหรือรูปกระสวย) (กิจการและคณะ, 2543) ภายใน Cytoplasm มีโปรตีนจำพวก Lysozymes รวมถึง Proteolytic enzyme หลาย ๆ ชนิด ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของเซลล์ (Söderhäll and Cerenius, 1992) อีกทั้งยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมหรือฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) (วัชรียา, 2549)

4.1.2 Semi-granular cell หรือ Semi-granulocyte เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือที่ขอบ มีเม็ด Granules ขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย ภายใน Cytoplasm เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดีมีส่วนยื่นของเซลล์ (Cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจจะพบ Microvilli บางเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์มีความกว้าง 4.2 - 6.8 ไมครอน และความยาว 9.0 - 14.2 ไมครอน (กิจการและคณะ, 2543) ทำหน้าที่โดยตรงในกระบวนการ Nodule formation และ Encapsulation รวมทั้งในกระบวนการ Prophenoloxidase (วัชรียา, 2549)

4.1.3 Large-granular cell หรือ Granulocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีรูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ ภายใน Cytoplasm มีเม็ด Granules ขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับ Semi-granular cell ลักษณะการยึดของเท้าเทียมหรือส่วนยื่นของเซลล์ชนิดนี้เห็นได้ชัดเจน (Bauchau, 1981; วัชรียา, 2549) ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-10 ไมครอน ความกว้าง 7.2 - 7.8 ไมครอนและความยาว 12.2 - 14.6 ไมครอน (กิจการและคณะ, 2543) เซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้มีหน้าที่หลักในการทำงานในกระบวนการ Prophenoloxidase (Söderhäll and Cerenius, 1992)

ในส่วนของกุ้งก้ามกรามก็มีรายงานการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดเช่นกัน พบว่าสามารถแบ่งเซลล์เม็ดเลือดได้เป็น 3 ชนิด เช่นเดียวกับสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ทั่วไป แต่เม็ดเลือดชนิด Hyaline cell กลับพบว่ามีปริมาณ Granules ภายใน Cytoplasm อยู่เป็นจำนวนมาก ส่วนเม็ดเลือดชนิดอื่นกลับพบว่ามีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า Semi-granular cell และ Large-granular cell มีความว่องไวในกระบวนการ Phagocytosis มากกว่า Hyaline cell (Gargioni and Barracco, 1998)

4.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำในเลือด

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำนี้เกิดจากการทำงานของหลาย ๆ กระบวนการร่วมกัน เช่น การแข็งตัวของเลือด (Blood clotting) และการทำงานของโปรตีนบางชนิดในกระบวนการ Prophenoloxidase สามารถทำให้เกิดการสร้าง Melanin (Melanin formation หรือ Melanization) และเกิดกระบวนการ Opzonization ซึ่งเป็นระบบการป้องกันตัวที่พบได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไปเช่นกัน (ชัยชาญ, 2545 อ้างถึง Lackie, 1980) นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มของ Antimicrobial peptides อีกด้วย (จารุวรรณ, 2550)

5. กลไกการป้องกันเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน

5.1 กลไกการรับรู้ระหว่างเซลล์โดย Pattern Recognition Proteins (PRPs)

เนื่องจากสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนไม่มีการสร้าง Antibody (Immunoglobulin) ซึ่งใช้ในการจดจำกับสิ่งแปลกปลอมแบบจำเพาะเจาะจงที่พบในสัตว์ชั้นสูง ดังนั้นสัตว์ในกลุ่มนี้จะมีการผลิตสารบางอย่างเพื่อช่วยในการจดจำและจับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอย่างง่าย ๆ สารที่ว่านี้

เรียกว่า “Pattern Recognition Proteins หรือ PRPs” ดังนั้น PRPs จึงมีหน้าที่หลักในการจดจำและตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาภายในเซลล์ โดยการอาศัยการจดจำโมเลกุลขนาดเล็กที่ผิวเซลล์ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ซึ่งโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการรับรู้ระหว่างเซลล์ที่สำคัญมีหลายชนิดได้แก่ Lectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถเชื่อมจับกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วย Polysaccharide และ Glycan โดย Lectin จะมีความสามารถในการเชื่อมต่อกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมได้ถึง 2 เซลล์ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจาก Lectin มีคุณสมบัติเป็น Bivalent หน้าที่หลักของ Lectin ในกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัดนัก แต่มีการสันนิษฐานว่า Lectin จะทำหน้าที่ในการป้องกันตัวจากเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมได้ โดยจะไปเหนี่ยวนำทำให้เกิดการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามา (Jomori and Natori, 1992) และตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียและจุลชีพหลายชนิด (Fragkiadakis and Stratakis, 1997)

นอกจากนี้ยังพบโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ PRPs ด้วย เช่น โปรตีนที่พบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มพวก Arthropod ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ β -1,3 glucan ที่เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราได้ เรียกว่า β -1,3 glucan binding protein (β GBP) (Söderhäll and Unestam, 1979; Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000; Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000) ซึ่งเมื่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่มีองค์ประกอบเหล่านี้เข้ามาภายในร่างกาย PRPs ชนิด β GBP จะทำปฏิกิริยาโดยการเข้าจับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมนั้น ทำให้เซลล์เม็ดเลือดมีการหลั่งเอนไซม์และโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ภายใน Granules ออกมา (Degranulation) อีกทั้งยังช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของกระบวนการ Prophenoloxidase ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Unestam and Söderhäll (1997) ที่รายงานว่า β -1,3 glucan สามารถไปกระตุ้นระบบ Prophenoloxidase ในกุ้ง Crayfish ได้ นอกจากนี้ยังพบ PRPs ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ Lipopolysaccharide ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบบริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ เรียก PRPs ชนิดนี้ว่า Lipopolysaccharide binding protein (LPBP) เป็นต้น (เสาวลักษณ์, 2550)

5.2 กระบวนการ Prophenoloxidase (Prophenoloxidase activating system)

เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของ crustaceans เป็นกระบวนการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อโรค ซึ่งกระบวนการ Prophenoloxidase นี้จะประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญคือ Phenoloxidase (PO) ซึ่งอยู่ในรูปของ Proenzyme ที่เรียกว่า

Prophenoloxidase (proPO) กระบวนการนี้สามารถพบได้ใน Granules ของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง Semi-granular cell และ Large-granular cell เมื่อถูกกระตุ้นด้วย β -1,3 glucan (Vetvicka and Sima, 2004; Marques *et al.*, 2006) Lipopolysaccharide (Okumura, 2007) และ Peptidoglycan (Rattanachai *et al.*, 2005) ซึ่งอาศัยกลไกการรับรู้ระหว่างเซลล์ผ่านทาง PRPs ทั้งหลาย จะทำให้เกิดการปล่อย Granules ซึ่งมีสารต่าง ๆ ออกมาภายนอกเซลล์ รวมทั้ง Prophenoloxidase ที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็น Phenoloxidase ซึ่งอยู่ในรูป Active form และสามารถยึดจับกับผิวของจุลชีพได้ โดยอาศัยเอนไซม์ที่เรียกว่า proPO-activating enzyme (PPAE) และโคแฟกเตอร์ Serine proteinase homologues (SPHs) ที่ถูกปล่อยออกมาพร้อมกับ Prophenoloxidase ซึ่งทั้ง PPAEs และ SPHs สามารถรวมกันได้เป็น proPO-activating factor (PPAFs) หลังจากนั้น Phenoloxidase จะเร่งปฏิกิริยา Hydroxylation เปลี่ยน Tyrosinase ให้เป็น Dihydroxylation และออกซิไดซ์ Dihydroxyphenylalanin (DOPA) ให้เป็นสารประกอบ Quinone หลังจากนั้น Quinone จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Dopachrome เกาะรวมตัวกันเกิดเป็นเม็ดสีดำหรือ Melanin และ Toxic metabolites ตัวอื่น ๆ ในที่สุด นอกจากนี้ Melanin ยังทำหน้าที่ช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอีกด้วย (เสาวลักษณ์, 2550)

ในสภาพปกติที่เซลล์เม็ดเลือดยังไม่พบกับเชื้อโรค การทำงานของกระบวนการ Prophenoloxidase นี้จะมีประสิทธิภาพต่ำ แต่เมื่อเซลล์เม็ดเลือดได้สัมผัสกับเชื้อโรคแล้ว กระบวนการนี้จะถูกกระตุ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลาย ๆ ชนิดอย่างรวดเร็ว สำหรับการศึกษานี้เกี่ยวกับกระบวนการ Prophenoloxidase ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนนั้น ได้มีการรายงานผลการศึกษานี้ในสัตว์กลุ่มนี้ไว้หลายชนิดทั้งในระดับอนุชีววิทยาและระดับของโปรตีน เช่น การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase ของกุ้ง *Penaeus californiensis* หลังจากที่ทำกรกระตุ้นด้วย β -1,3 glucan และยังสามารถจำแนก β GBP ได้จาก Plasma โดยการใช้ Polyclonal antibody ต่อ β GBP จาก *P. paulensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1996) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาในกลุ่มของ European crayfish *Astacus astacus* (Söderhäll and Unestam, 1979; Unestam and Söderhäll, 1997), *P. monodon* (Sung *et al.*, 1998) และ *Macrobrachium rosenbergii* (Liu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006) อีกด้วย

5.3 การแข็งตัวของเลือด (Blood clotting)

เป็นกลไกที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากภายนอกและป้องกันการสูญเสียเลือดจากการเกิดบาดแผลของร่างกาย ซึ่ง

กระบวนการนี้เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิด Hyaline cell มีการหลั่งเอนไซม์ Transglutaminase หรือ TGase ออกมา เพื่อไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Clottable protein หรือ Coagulogen ตรงบริเวณที่เกิดบาดแผล ทำให้เกิดปฏิกิริยา Polymerization ได้เป็นเจลหรือโครงข่ายของโปรตีนปิดบริเวณบาดแผล เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย รวมทั้งการสูญเสียของเหลวภายในร่างกายอีกด้วย (เสาวลักษณ์, 2550)

นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแข็งตัวของเลือดนี้จะเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanization) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ Prophenoloxidase (Sritunyaluksana and Söderhäll, 2000) ในบางครั้งการที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้นั้น อาจเกิดมาจากการที่เม็ดเลือดชนิด Hyaline cell มีปริมาณลดลงเนื่องมาจากการติดเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด (วัชรียา, 2549)

5.4 การกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis)

เป็นกระบวนการการป้องกันตัวด่านแรก (The first line of defense) และเป็นกระบวนการที่ไม่จำเพาะเจาะจง เมื่อมีเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านเปลือกหรือโครงร่างแข็งภายนอกเข้าไปในร่างกาย จะมีเซลล์เม็ดเลือดชนิด Hyaline cell มากกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เป็นเซลล์หรืออนุภาคเล็ก ๆ เข้าไปใน Phagosome และจะรวมตัวกับ Lysosome ที่อยู่ในเซลล์ เกิดเป็น Phagolysosome ซึ่งภายใน Lysosome นี้จะบรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมหรือที่เรียกว่า Acid hydrolases ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ DNases, RNases, Proteases, Phosphatases และ Lipases ที่สามารถย่อยและลดขนาดของโมเลกุลของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมลงให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ หลังจากนั้นเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่ถูกย่อยสลายแล้วจะถูกปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ (วัชรียา, 2549)

เมื่อ Phagocyte เข้าจับกับอนุภาคของสิ่งแปลกปลอมที่บริเวณผิวเซลล์ จะเกิดการกระตุ้นการโอบล้อมรอบอนุภาค โดยเชื่อมเซลล์ของ Phagocyte เกิดเป็น Phagosome ต่อมาจะเกิดการสร้าง Superoxide ที่เรียกว่ากระบวนการ Respiratory burst หรือการแตกตัวของออกซิเจน (Oxygen burst) ของ Phagocyte ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเม็ดเลือดมีการรับรู้และเข้าจับกินเชื้อโรค โดยอาศัย Cell adhesion receptor หรือ Peroxinectin จากนั้นมีการนำเอาออกซิเจนเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว และเกิดขบวนการ Reduction ของออกซิเจน เกิดการสร้าง Superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ NADPH oxidase ซึ่งต่อมาจะเปลี่ยนเป็น Toxic peroxide ในรูปของ H_2O_2 โดยเอนไซม์

Superoxide dismutases (SOD) ซึ่ง H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับไอออนอิสระพวก Halides เกิดเป็นกรดที่เป็นสารพิษ เช่น HOCl ที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้โดยตรง (เสาวลักษณ์, 2550)

5.5 การห่อหุ้มเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม (Nodule formation and Encapsulation)

เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนมากกว่ากระบวนการ Phagocytosis ซึ่งการห่อหุ้มเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมนี้ จะสามารถกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่หรือมีจำนวนมากได้ โดยเมื่อมีเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเข้ามาภายในร่างกายเป็นจำนวนมากเกินความสามารถที่กระบวนการ Phagocytosis จะกำจัดได้ ก็จะเกิดการสร้าง Nodule เป็นกลุ่มก้อนมาล้อมรอบเซลล์ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมนั้น เพื่อไม่ให้เชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย ซึ่งมักพบการสร้าง Nodule ที่บริเวณของเหงือกและตับ ในส่วนของการห่อหุ้มเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม โดย Encapsulation จะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาภายในร่างกายมีขนาดใหญ่ (วัชรียา, 2549) โดยเซลล์เม็ดเลือดชนิด Semi-granular cell และ Large-granular cell เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่หลักในการห่อหุ้มเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมในกระบวนการนี้ (Ratcliffe *et al.*, 1985)

6. กลุ่มเปปไทด์ Antimicrobial peptides

Antimicrobial peptides (AMPs) เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (Innate immunity) ในสิ่งมีชีวิตทุก ๆ ชนิดตั้งแต่กลุ่มของแบคทีเรียจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจำพวกมนุษย์ ซึ่ง AMPs นั้นจะถูกจำแนกออกเป็นหลาย ๆ ชนิดด้วยกัน (Bulet *et al.*, 1999; Hancock and Diamond, 2000) AMPs มีลักษณะเป็นสารชีวโมเลกุลพื้นฐาน โดยเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก มีจำนวนของกรดอะมิโนประมาณ 150-200 Residues โครงสร้างมีลักษณะเป็นสายยาว (Amphipathic) และมีคุณสมบัติเป็น Cationic แต่ก็ยังคงคุณสมบัติที่เป็น Anionic peptides ไว้ด้วย ซึ่ง AMPs มีความหลากหลายและความแตกต่างกันของลำดับของกรดอะมิโน ลักษณะโครงสร้าง และกระบวนการในการเกิดปฏิกิริยาอย่างมาก โดยส่วนใหญ่แล้ว AMPs จะเกิดกระบวนการในการต่อต้านการทำงานของจุลชีพอย่างกว้างขวาง ได้แก่เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเส้นใย (Filamentous fungi) อีกทั้งยังมีส่วนในการยับยั้งการทำงานของไวรัสและปรสิตได้ (Hancock and Diamond, 2000; Murakami *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 2000) และอาจจะยับยั้งการเจริญเติบโตของ Tumor cell ได้อีกด้วย (Cruciani *et al.*, 1991) ในสิ่งมีชีวิตจำพวก Arthropods ก็พบว่า AMPs ยังทำหน้าที่ในการต่อต้านการบุกรุกของจุลชีพได้อย่างกว้างขวางเช่นกัน คือสามารถต่อต้านการบุกรุกของเชื้อ

แบคทีเรียและเชื้อราเส้นใย ซึ่งมีรายงานในพวกแมลง (Insects), แมงดาทะเล (Horseshoe crab) และในสัตว์จำพวกกุ้ง (Shrimp) หลายชนิดเช่นกัน (Bachère *et al.*, 2004; Bulet *et al.*, 1999; Vizioli and Salzet, 2002)

โดยทั่วไปแล้ว AMPs สามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มหลัก โดยอาศัยหลักการในจำแนกจากลำดับของกรดอะมิโน โครงสร้างลำดับที่ 2 (Secondary structure) และหน้าที่การทำงานที่คล้ายคลึงกัน ซึ่ง Bulet *et al.* (2004) ได้จำแนก AMPs ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ Linear basic peptide ที่มีรูปร่างเป็น Amphipathic α -helice และไม่มีตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine ได้แก่ Cecropin ซึ่งเป็น AMPs ชนิดแรกที่พบในน้ำเลือดของแมลง

กลุ่มที่ 2 คือ Peptides ที่มีส่วนของพันธะ Disulfide ภายในโมเลกุล 1 ถึง 6 พันธะ ได้แก่ Defensins พบในกลุ่มของ Arthropod เช่นใน *Drosophila* จะพบ Drosomycin และ Metchnikowin ส่วน *Podisus* จะพบ Thanatin และใน *Limulus* จะพบ Tachyplesin, Big defensin, Tachycitin และ Anti-lipopolysaccharide factor

กลุ่มที่ 3 คือ Peptide ที่มีกรดอะมิโนชนิดเดียวกันซ้ำกัน 1-2 Residues ได้แก่ Arginine-, Tryptophan-, Histidine-, Glycine- และ Proline-rich peptides ซึ่ง Glycine-rich peptide เช่น Attacins, Diptericin และ Sarcotoxins ส่วน Proline-rich peptides ได้แก่ Apidaecins และ Drosocin

และกลุ่มที่ 4 คือ Peptide ที่ได้มาจาก Partial hydrolysis ของโปรตีนที่เป็น Precursor ขนาดใหญ่ ได้แก่ Histone และ Hemocyanin

โดยทั่วไปแล้วประจุบวกที่อยู่บน โครงสร้างแบบ Amphipathic ขอบที่จะไปจับกับประจุลบที่อยู่บนผนังเซลล์ของจุลชีพ ซึ่งแตกต่างจากผนังเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปจะมีโครงสร้างทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ใน โมเลกุลเดียวกัน (Zwitterionic) ดังนั้น AMPs จะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นพิษกับจุลชีพแต่จะไม่เกิดการทำให้ปฏิกิริยากับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยลักษณะเฉพาะของ AMPs คือจะมีความเป็นพิษต่อจุลชีพบางชนิดเท่านั้น อีกทั้งยังสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีขนาดเล็ก โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้อย่างกว้างขวางและยังสามารถต้านทานการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย (Matsuzaki, 2001) ซึ่ง AMPs หลาย ๆ ชนิดนั้นจะ

เกิดปฏิกิริยาที่ผนังเซลล์ของจุลชีพเป้าหมายได้โดยตรง ยกเว้น AMP ชนิด Nisin Z ที่จะใช้ Anchored cell wall precursor lipid II เป็น Receptor (Shai and Oren, 2001) นอกจากนี้ AMPs ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาและสอดแทรกเข้าไปภายในชั้นไขมัน (Lipid bilayer) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ผนังเซลล์ของจุลชีพเกิดการยุบตัวลง ทำให้จุลชีพสูญเสียองค์ประกอบของผนังเซลล์บางประการ รวมถึงสูญเสียแหล่งพลังงานที่ใช้ในการดำรงชีพอีกด้วย (กุลยา, 2547)

ในสิ่งมีชีวิตพวก Arthropods นั้น AMPs หลาย ๆ ชนิด ได้มีการแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีนในกลุ่มนี้ในสัตว์หลายชนิด เช่นในกลุ่มของแมลงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Drosophila* และแมงดาทะเล (Chelicerates) (Iwanaga *et al.*, 1998) ที่พบว่า AMPs ที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่จะมาจากเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งถูกเก็บไว้ใน Cytoplasmic granules โดยเซลล์เหล่านี้จะไวต่อการถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และจะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย LPS โดยเกิดกระบวนการ Degranulation ภายใน Granules โดยกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ของแมงดาทะเลจะแตกต่างจากกระบวนการของสิ่งมีชีวิตจำพวกแมลง (Engström, 1999) และจะชักนำให้เกิดความเสียหายในกระบวนการ AMP Gene transcription ส่งผลต่อกระบวนการการสังเคราะห์และกระบวนการหลัง AMP ในกระแสเลือดตามมา

ส่วนสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของ Crustaceans นั้นมีรายงานที่ทำการศึกษเกี่ยวกับ AMP อยู่อย่างจำกัด ซึ่งจากการศึกษาในแมงดาทะเลพบว่ากลุ่มของ Tachyplesin และ Anti-lipopolysaccharide factor นั้นจะทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมลบ (Aketagawa *et al.*, 1986; Muta *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 1988; Ohashi *et al.*, 1984) ในปี ค.ศ. 1997 พบเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีชื่อว่า Callinectin ซึ่งเป็นชนิดหลักที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองในกระบวนการ Antimicrobial activity ได้ถูกค้นพบในเลือดของปู (*Callinectes sapidus*) (Khoo *et al.*, 1999) และในเวลาต่อมาได้มีการค้นพบ AMP กลุ่มใหม่คือ Penaeidins ที่จะทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Destoumieux *et al.*, 1997) โดย Penaeidin นั้น มีส่วนที่เป็น Proline rich domain ทั้งทางด้านปลาย N-terminal และ Carboxy-terminal ซึ่งภายใน Domain จะประกอบด้วยกรดอะมิโน Cysteine 6 residues ที่สามารถจับกันเป็นพันธะ Disulfides ได้ 3 พันธะ ซึ่งภายหลัง cDNA ของ Penaeidin ได้ถูกศึกษาและทำการแยกมาจากเม็ดเลือดของกุ้ง *L. vannamei* และ *L. setiferus* (Gross *et al.*, 2001) และในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Supungul *et al.*, 2004) ส่วน AMP ที่มี Cystein rich และมีน้ำหนักโมเลกุล 11.5 กิโลดาลตัน (kDa) ที่มีชื่อว่า Crustin ได้ถูกค้นพบจากการศึกษาในเลือดของปู (Shore crab หรือ *Carcinus maenas*) (Relf *et al.*, 1999) และยังมี

พบในกุ้งอีกสองชนิด คือ *L. vannamei* และ *L. setiferus* (Bartlett *et al.*, 2002; Vargas-Albores *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบเปปไทด์ที่ได้มาจากเลือดของ *L. vannamei*, *P. stylirostris* และ *P. monodon* ซึ่งมีคุณสมบัติในกระบวนการ Antiviral activity อีกด้วย (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001; Patat *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004) และในเวลาต่อมา มีรายงานว่า Histones และ Histone derived peptides ของ *L. vannamei* เป็น Innate immune effectors เพราะมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Patat *et al.*, 2004)

7. ยีน Anti-lipopolysaccharide factor

ยีน Anti-lipopolysaccharide factor (ALF) เป็นยีนในกลุ่มของ AMP ชนิดหนึ่ง โดยในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจำพวก Arthropods มีการศึกษาครั้งแรกใน Amebocytes ของแมงดาทะเล (Horseshoe crab) *Limulus polyphemus* และ *Tachypleus tridentatus* โดยให้ชื่อว่า LALF และ TALF ตามลำดับ (Tanaka *et al.*, 1982; Morita *et al.*, 1985; Aketagawa *et al.*, 1986; Muta *et al.*, 1987) ซึ่งยีน ALF เป็นโปรตีนขนาดเล็ก ที่มีคุณสมบัติเป็น Cationic ทำหน้าที่ในการจับและยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแกรมลบ ชนิด R อย่างรุนแรง โดยสามารถจับกับ Endotoxin ที่เป็นส่วนประกอบของ Lipopolysaccharide (LPS) ที่ผนังเซลล์แล้วจัดพิษของ Endotoxin ได้ (Morita *et al.*, 1985) แต่ในบางครั้งยังพบว่า ALF สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราเส้นใยได้อีกด้วย (Somboonwivat *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008) และยังสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าไปในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว อีกด้วย (Li *et al.*, 2008)

เมื่อทำการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของแมงดาทะเลสองชนิดคือ *L. polyphemus* และ *T. tridentatus* พบว่ายีน ALF จะเป็น Polypeptides สายเดี่ยว ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 101 หรือ 102 Residues มีกรดอะมิโน Cysteine อยู่ 2 ตำแหน่ง จับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide ภายในโมเลกุล ทำให้ในบริเวณนี้เป็นบริเวณของ LPS binding domain ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสำคัญที่ใช้ในการจับกับผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Ried *et al.*, 1996; Imjongjirak *et al.*, 2007; Andrä *et al.*, 2004) โดยวิไลรัตน์ (2544) และเอกรินทร์ (2546) ได้ทำการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของยีนชนิดนี้ในกุ้งกุลาดำ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12 กิโลดาลตัน และจากการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติ แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของโปรตีน ALF นี้มีกลุ่มหลักอยู่หนึ่งกลุ่มที่ประกอบด้วย α -Helices 3 สายที่เกาะอยู่กับ β -sheet 4 สาย ทำให้โมเลกุลเป็นรูปทรงกลม สูง 40°A และกว้าง 28°A (Hoess *et al.*, 1993)

ในเวลาต่อมา มีผู้ทำการศึกษา ยีน ALF ของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean เพิ่มมากขึ้น โดย Liu *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษา ยีน ALF จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF มีความยาวทั้งสิ้น 600 bp ซึ่งประกอบด้วย ส่วนของ Open reading frame มีความยาวเท่ากับ 369 bp สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 123 residues โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 13,799.16 ดาลตัน และมีค่า Theoretical pI เท่ากับ 10.3 และเมื่อทำการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *L. polyphemus* และ *T. tridentatus* ถึง 56% ในส่วนของ การศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ใน อวัยวะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Northern blot นั้นพบว่า ยีน ALF จะมีการแสดงออกมากที่สุดในเซลล์ เม็ดเลือด รองลงมาคือ เหงือกและลำไส้ ตามลำดับ

นอกจากนี้ ในการศึกษาของ Nagoshi *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษา ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* พบว่า ลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF มีความยาวทั้งสิ้น 746 bp ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็น กรดอะมิโนได้ 123 residues อีกทั้งในส่วนปลายทางด้าน 3' Untranslated region ยังพบตำแหน่ง ของ AU rich element motif (ATTTA) ถึง 4 ตำแหน่ง ซึ่งตำแหน่งของ AU rich element motif นี้ เป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการคงสภาพของ mRNA (mRNA stabilizing function) และใน การศึกษาความคล้ายคลึงกันของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน ALF ของ Japanese horseshoe crabs มากที่สุดถึง 42% และเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ในอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกมากที่สุดในเซลล์เม็ดเลือด รองลงมาคือ Lymphoid organs, หัวใจ ลำไส้ และเหงือกตามลำดับ และเมื่อทำการกระตุ้นด้วย LPS พบว่าการแสดงออกของยีน ALF ใน Lymphoid organs จะมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและมีการ แสดงออกมากที่สุดในชั่วโมงที่ 3 หลังจากทำการกระตุ้น หลังจากนั้นการแสดงออกของยีน ALF จะค่อย ๆ ลดต่ำลงจนกลับมาอยู่ในระดับปกติที่ชั่วโมงที่ 6

Imjongjirak *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษา ลักษณะของยีน ALF จากห้องสมุด cDNA ของ เซลล์เม็ดเลือดของ *Scylla paramamosain* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF มีความยาวทั้งสิ้น 614 bp สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 123 residues มีน้ำหนัก โมเลกุลเท่ากับ 11.18 กิโลดาลตัน และพบ Conserve cysteines จำนวน 2 residues อีกทั้งยังพบ บริเวณที่จัดเป็นส่วนของ Putative LPS binding domain ที่เกี่ยวข้องกับการจับยึดการเจริญเติบโต ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อทำการศึกษาความคล้ายคลึงกันของ ลำดับ นิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *F. chinensis* มากที่สุดถึง 65%

รองลงมาคือ *L. vennamei* 64% และ *M. japonicus* 63% ตามลำดับ ส่วนความยาวทั้งหมดของ Genomic DNA นั้นมีความยาวเท่ากับ 1,075 bp ซึ่งจะประกอบด้วย 3 Exons และ 2 Introns โดยยีน ALF นี้จะมีการแสดงออกมากที่สุดในช่วงเซลล์เม็ดเลือด รองลงมาคือลำไส้และกล้ามเนื้อ ส่วนก้านตา เป็นอวัยวะที่ไม่พบการแสดงออกของยีน ALF เลย

ส่วนการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของยีน ALF จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* นั้น มีผู้ที่ทำการศึกษาไว้หลายรายงาน ตัวอย่างเช่น Somboonwivat *et al.* (2005) ทำการสังเคราะห์ Recombinant protein ของยีน ALF (rALF) และเมื่อนำ rALF ที่ได้ มาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติด้วยวิธี Anti-microbial assay นั้น พบว่า rALF มีคุณสมบัติในการต่อต้านการทำงานของจุลชีพได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเส้นใย และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ ส่วนในการศึกษาของ Tharntada *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษายีน ALF จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ในฐานข้อมูล EST (Expressed sequence tag) ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยยีน ALF ของกลุ่ม A จะประกอบด้วย 3 Exons และ 2 Introns และในขณะที่กลุ่ม B จะประกอบด้วย 4 Exons และ 3 Introns ตามลำดับ

Li *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะของยีน ALF จากเซลล์เม็ดเลือดของ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน ALF มีความยาวทั้งสิ้น 700 bp มีส่วนของ Open reading frame เท่ากับ 363 bp ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 120 residues เมื่อทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในอวัยวะต่าง ๆ พบว่าอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน ALF คือเซลล์เม็ดเลือด หัวใจและอวัยวะสืบพันธุ์ และทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR เมื่อทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Vibrio anguillarum* แล้ว พบว่ายีน ALF จะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเวลาที่ 2 และช่วงเวลาที่ 12 และยังพบว่ายีนชนิดนี้มีความยาวทั้งหมดใน Genomic DNA เท่ากับ 1,174 bp ประกอบด้วย 3 Exons และ 2 Introns และเมื่อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ Recombinant protein ของยีน ALF แล้ว พบว่า rALF ที่ผลิตได้สามารถต่อต้านการทำงานของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

de la Vega *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะของยีน ALF จากกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* แล้วพบว่ายีน ALF ของกุ้งขาวที่ทำการศึกษานี้มี 2 Isoforms โดย Isoform แรกที่พบนั้น คาดว่ามีความยาวของลำดับของกรดอะมิโนทั้งสิ้น 120 Residues ส่วน Isoform ที่สองคาดว่ามีความ

ยาวประมาณ 93 Residues และทำการศึกษาลักษณะการตอบสนองของยีน ALF ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio penaeicida* และ *Fusarium oxysporum* และเชื้อไวรัส White spot syndrome virus (WSSV) ด้วยการตรวจสอบอัตราการตาย ซึ่งเมื่อทำการ Knockdown ยีน ALF แล้วพบว่าอัตราการตายของกุ้งในกลุ่มที่ติดเชื้อ *V. penaeicida* และ *F. oxysporum* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่กุ้งในกลุ่มที่ได้รับ ALF1 dsRNA นั้นจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อ WSSV เพิ่มมากขึ้น

Beale *et al.* (2008) ทำการศึกษาลักษณะการทำงานของยีน ALF ของ American lobster (*Homarus americanus*) พบว่ายีน ALF ของ American lobster นี้มี 2 Isoforms โดยที่ทั้งสอง Isoforms นี้จะมีตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteines 2 ตำแหน่งจับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide เมื่อทำการทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 ของยีน ALF แล้วพบว่าโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของยีน ALF ของ Horseshoe crab (*L. polyphemus*) และจากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF เมื่อทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *V. fluvialis* โดยใช้เทคนิค Real time RT-PCR พบว่ายีน ALF ทั้งสอง Isoforms นั้นจะมีการแสดงออกมากที่สุดในห้อง

ขณะที่ Rosa *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะของยีน ALF จากเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งน้ำจืด *Macrobrachium olfersi*, *Farfantepenaeus paulensis* และ *Litopenaeus schmitti* พบว่ายีน ALF นี้เป็น โมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็น Cationic สูง และพบตำแหน่งของ Conserve cysteins จำนวน 2 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ LPS-binding domain เช่นเดียวกับยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) น้ำหนักประมาณ 60-80 กรัม
2. อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป
3. ตู้กระจก ขนาด 18 x 50 x 30 เซนติเมตร
4. เครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
5. เครื่องชั่ง METTLER PJ 400
6. เข็มฉีดยาขนาด 24G x 1.5 นิ้ว พร้อมกระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร
7. β -glucan ที่มีสารออกฤทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์
8. น้ำมันปลาหมึก
9. -20 °C Freezer (Mirage)
10. -80 °C ULT Freezer (Thermo Forma)
11. Microwave oven (Sanyo Electric Co., Ltd.)
12. Microcentrifuge MIKRO 200R (Hettich)
13. Centrifuge DYNAC II (Centrifuge Clay Adams)
14. Minicentrifuge, Profuge 6K Korea
15. Waterbath shaker, GFL 1083
16. Incubater 37 °C (Memmert)
17. Vortex-2 Genic, Scientific Industries, USA
18. Autoclave (Hirayama)
19. Hot air oven (Memmert)
20. Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
21. Cylinder ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
22. Pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร
23. Plastic box for tube ขนาด 1.5 หรือ 2 มิลลิลิตร และ 10 x 10 channel
24. Centrifuge tube 15 และ 50 มิลลิลิตร
25. Pipette tips ขนาด 1,000, 200 และ 20 ไมโครลิตร (Costar)
26. PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Costar)

27. Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 และ 0.6 มิลลิลิตร
28. 96 Well Polypropylene plates และ Optical cap (Stratagene)
29. Glass/Teflon potter homogenizers
30. TaKaRa gradient thermal cycler (Takara)
31. Stratagene's Mx3000P real-time PCR system
32. Spectrophotometer, Spectronic 401 (Milton Roy)
33. Spectrophotometer: spectronic 2000 (Bausch&Lomb)
34. Automatic micropipette ขนาด P20, P200 และ P1000 (Bio-Rad)
35. Power supply power PAC 200 (Bio-Rad)
36. Electrophoresis electric, MyRun (Bioactive)
37. Gel documentation (Syngene)
38. สารเคมีสำหรับงานทางอณูชีวโมเลกุล
 - Absolute ethanol; C₂H₅OH (Merck)
 - Boric acid; H₃BO₃ (Merck)
 - Chloroform, CHCl₃ (Merck)
 - Diethyl pyrocarbonate (DEPC), C₆H₁₀O₅ (Sigma)
 - Sodium chloride; NaCl (Merck)
 - TRIZOL reagent (Molecular Research Center)
 - Ampicillin sodium salt (Bio Basic INC.)
 - Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
 - Formamide และ Formaldehyde (BDH)
 - Tris-base; Tris (hydroxymethyl) aminomethane
 - Sterile distilled water; dH₂O
 - Oligonucleotide M13 primer
 - Magnesium chloride; MgCl₂
 - GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 0.05 mg (WardMedic)
 - Isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG (Sigma)
 - 100 mM dNTP (WardMedic)
 - 5-bromo-4-cholo-3-indoyl-β-D-galactopyranoside; X-gal (Sigma)
 - Agarose (Conda)
 - Tri-Sodium Citrata Dihydrate (Scharlau)

- Ethidium bromide, EtBr
 - 2X Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene)
 - 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid; MOPS (BIO BASIC INC.)
39. ชุด Kit สำเร็จรูป
- Quick Prep[®] Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)
 - BD SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)
 - iScript[™] Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)
 - NucleoTrap Gel Extrac kit (Clontech)
 - Plasmid DNA Extraction kit (BioExcellence)
40. เอนไซม์ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) และ Vector
- *Taq* DNA polymerase (Fermentas)
 - *Eco* RI (Fermentas)
 - pGEM-T Easy vector (Promega)
41. สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย
- *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109
 - *Aeromonas hydrophila*
42. สารเคมีและอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
- Technical agar (Difco, USA)
 - Sodium chloride; NaCl (Merck)
 - Bacto tryptone (BD, France)
 - Yeast extract (Scharlau)
 - Super Optimal Culture medium (SOC medium)
 - Luria Bertani broth (LB broth) และ Luria Bertani agar (LB agar)
 - Tryptic Soy broth (TSB) และ Tryptic Soy agar (TSA)
43. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer

ตารางที่ 1 Primer และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers ที่ใช้ในการทดลอง

Oligonucleotide primers	Sequences 5' → 3'
β -actin (1) Forward	CATCGTTACTAACTGGGACG
β -actin (1) Reverse	AGGATTCCATAACCCAGGAAG
β -actin (2) Forward	TTCACCATCGGCATTGAGAGGTTC
β -actin (2) Reverse	CACGTCGCACTTCATGATGGAGTT
ALF1 (1) Forward	GGGCACACGTGTCAGTACAGCGTT
ALF1 (1) Reverse	AAGCCAGACCCTTGCTTGCTCCTC
ALF1 (2) Forward	GCACACGTGTCAGTACAGCGTTAA
ALF1 (2) Reverse	GAAGGCTTTCCTGACGAAGTCTTG
ALF2 (1) Forward	GGAAGCTCCAGTTATACTTCGACG
ALF2 (1) Reverse	CCTTCTGCAGGAAATCTTGACTG
ALF2 (2) Forward	TCAAAGGAGAAGCTCTGACC
ALF2 (2) Reverse	GGGTCACCAATTGTGCTACA
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAAC AACGCAGAGT
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
M13 Forward	AAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	AACAGCTATGACCATG

วิธีการทดลอง

1. การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Anti-lipopolysaccharide factor (ALF) ในกิ้งก่ามกรม

1.1 การสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรม จากห้องสมุด cDNAs ที่สร้างจากเม็ดเลือด (Haemocyte) และ Androgenic gland ของกิ้งก่ามกรม

ทำการสืบค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรมจากห้องสมุด cDNAs ที่สร้างจากเม็ดเลือด (Srisapoomee *et al.*, 2007. Direct submission accession number EL608988-EL610004 และ EL695504-EL696577) และ Androgenic gland ของกิ้งก่ามกรม (Srisapoomee *et al.*, 2008. Direct submission accession number GH624059-GH626155) หลังจากนั้นเมื่อพบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรมแล้ว จะทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNAs ของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรมด้วยเทคนิค 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE) และถ้าหาก cDNAs ที่พบบรรจุลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ทั้งหมดของยีนทั้งสามชนิด ก็จะทำให้การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งทางด้าน 5' และ 3' โดยใช้ M13 Forward และ M13 Reverse primers เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ของ cDNAs ของยีนทั้งสามชนิดต่อไป

1.2 การสกัด Total RNA จากเม็ดเลือดของกิ้งก่ามกรม โดยใช้ Trizol reagent

ทำการเก็บเลือดจากกิ้งก่ามกรมปกติ ขนาด 80 กรัม จำนวน 1 ตัว ตรงตำแหน่งของแองเจิลที่อยู่วิเวณอก (Ventral sinus) ที่ปล้องท้องปล้องที่ 1 ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Tri-sodium citrate dehydrate, W/V) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมเลือดกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดให้เข้ากัน จากนั้นนำสารผสมที่ได้ใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดออกจากน้ำเลือด หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม Trizol reagent (Molecular Research Center) 200 ไมโครลิตร และทำการสกัด Total RNA ตามวิธีการของบริษัท (QIAGEN Sciences) โดยบดตัวอย่างทั้งหมดให้ละเอียด หลังจากนั้น

ทำลาย Genomic DNA โดยการใส่เข็มฉีดยาดึงขึ้นลง ประมาณ 3-5 ครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอกลงไปกลับขึ้นมาประมาณ 15 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสด้านบนที่เป็นชั้นของ RNA ไปใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Isopropyl alcohol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอกลงไปกลับขึ้นมา แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นเติม 75% Ethanol 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาตะกอน RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

1.3 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยใช้ Formaldehyde agarose gel electrophoresis

ทำการเตรียม 1% Formaldehyde agarose gel โดยเตรียมใน 1X MOPS buffer นำไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม 37% Formaldehyde และ Ethidium bromide ลงในเจล ผสมให้เข้ากัน เทลงถาด ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่าง Total RNA ที่ได้โดยใช้ Total RNA 3.5 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 50% Formamide ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10X MOPS buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และ 2.2 M Formaldehyde ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง เติม Loading dye 3 ไมโครลิตรลงในหลอดตัวอย่างแต่ละหลอด แล้วทำการ load total RNA reaction ลงใน 1% Formaldehyde agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X MOPS ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ ตรวจสอบแถบของ Total RNA ที่ได้ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบของ Total RNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

1.4 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่เก็บอยู่ใน 75% Ethanol มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนของ 75% Ethanol ออก หลังจากนั้นเติม DEPC water เพื่อละลายตะกอน Total RNA แล้วแบ่งสารละลาย Total RNA ที่ได้ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ DEPC water อีก 68 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อทราบความเข้มข้นของ Total RNA และตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA โดยการหาอัตราส่วนของ $A_{260} : A_{280}$ ถ้าค่าที่วัดได้มีค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่ามี DNA ปนอยู่ แต่ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าได้ RNA บริสุทธิ์ และถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือสารฟิโนลปนอยู่ในตัวอย่าง RNA

จากนั้นทำการคำนวณหาความเข้มข้นของ RNA ได้จากสูตร (Sambrook *et al.*, 1989)

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40$$

1.5 การสกัด mRNA

ทำการสกัด mRNA จาก Total RNA โดยใช้ชุด Quick Prep® Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) ตามวิธีการของบริษัท โดยทำการเติมสารละลาย Extraction buffer 400 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Total RNA ที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน Oligo (dT)-cellulose ที่เตรียมไว้ เขย่าเบา ๆ 3 นาที หลังจากนั้นนำสารผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนที่เหลือด้วย High-salt buffer ปริมาตร 1 มิลลิตร จำนวน 5 ครั้ง หลังจากนั้นล้างตะกอนด้วย Low-salt buffer ปริมาตร 1 มิลลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายให้เติม Low-salt buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน Microspin column ที่วางอยู่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม Low-salt buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นย้าย Microspin column มาใส่หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย Elution buffer อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง จะได้ mRNA ในปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตกตะกอน mRNA ด้วยการเติมสารละลายไกลโคเจน (glycogen solution) 10 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต (Potassium acetate solution) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 95% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

1.6 การสังเคราะห์ 5' First strand cDNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ ALF cDNA โดยใช้เทคนิค 5' Rapid Amplification of cDNA Ends หรือ 5' RACE

นำ mRNA ที่ได้จากข้อ 1.5 มาทำการสังเคราะห์ 5' First strand cDNA โดยใช้ BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) ตามวิธีการของบริษัท หลังจากนั้นเมื่อได้ 5' First strand cDNA แล้ว จะนำ 5' First strand cDNA นี้มาใช้เป็น Template ในการทำปฏิกิริยา 5' RACE เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของ ALF cDNA ซึ่งจะใช้ ALF1 (1) Reverse primer (5' AAGCCAGACCCTTGCTTGCTCCTC 3') ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA โคลน BG2172 จากห้องสมุด cDNA ของกุ้งก้ามกราม (Accession No. EL609255) ร่วมกับ Universal primer (UPM) ในการทำปฏิกิริยา

โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

5' RACE First strand cDNA	2.5	ไมโครลิตร
10X Universal primer	5	ไมโครลิตร
10 µM Gene-specific primer	2	ไมโครลิตร
10X BD Advantage 2 PCR Buffer	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTP mix	1	ไมโครลิตร
5 U/UI <i>Taq</i> DNA polymerase	2	ไมโครลิตร
PCR Grade Water	32.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเป็นดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที เป็นจำนวน 5 รอบ ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 70 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที เป็นจำนวน 5 รอบ และช่วงที่สามใช้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ แล้วเก็บรักษา 5' RACE PCR Product ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผล 5' RACE PCR Product ที่ได้ ด้วยวิธีการ 1.5% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50

โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

1.7 การสกัด DNA จาก Agarose gel และการทำให้ชั้น DNA บริสุทธิ์

การสกัด DNA จาก Agarose gel และทำให้ชั้น DNA บริสุทธิ์ โดยใช้ NucleoTrap Gel Extrac kit ทำตามวิธีการของบริษัท (Clontech, USA) โดยทำการตัด Agarose gel ซึ่งมีแถบ DNA ที่ต้องการ ใต้งใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิตร เติมบัฟเฟอร์ NT1 ปริมาตร ประมาณ 300 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักของ Agarose gel 100 มิลลิกรัม นำไป Vortex หลังจากนั้นใส่ Nucleo trap suspension 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที โดย ต้องนำมา Vortex เป็นครั้งคราว หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 45 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เทของเหลว (Supernatant) ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ NT2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไป Vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 วินาที ที่ อุณหภูมิห้อง เทของเหลวทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไป Vortex และ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เทของเหลวทิ้งและ ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม บัฟเฟอร์ NE 20-50 ไมโครลิตร Vortex แล้วละลาย DNA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลาย DNA ที่ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 วินาที นำสารละลาย DNA ส่วนบนใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ หลังจากนั้นนำสารละลาย DNA 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 75% Ethanol 250 ไมโครลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทของเหลวส่วนใสด้านบนทิ้ง เหลือแต่ตะกอนขาว จากนั้นตากตะกอน แล้วเติม Distilled water 8 ไมโครลิตร Vortex ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยง แล้วเก็บรักษา DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

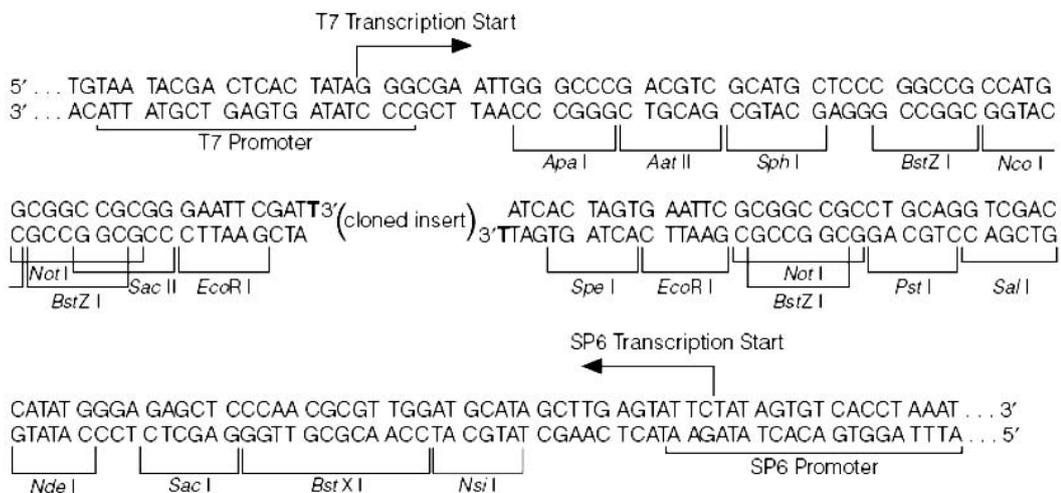
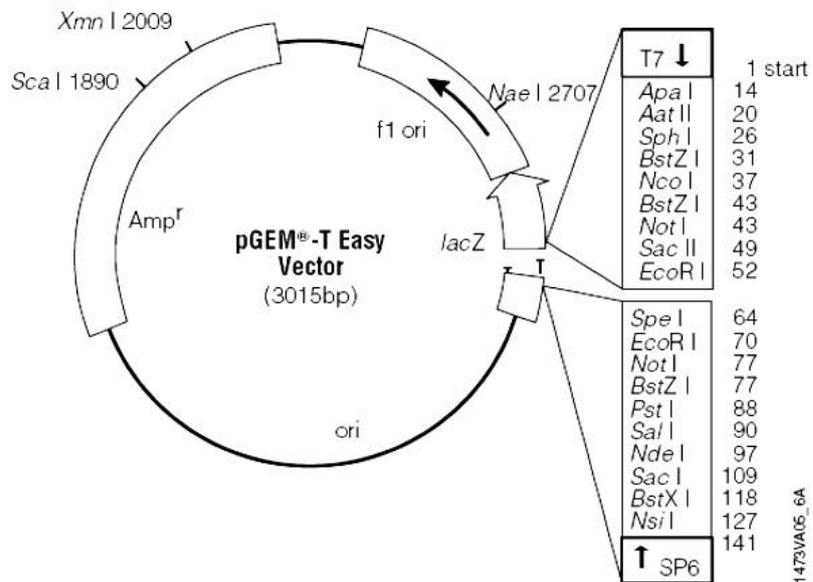
ตรวจสอบผลของ Purified product ที่ได้ ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ใน บัฟเฟอร์ 1X TBE ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้ แสงอัลตราไวโอเล็ต

1.8 การเชื่อมต่อ PCR Product กับ Cloning vector (Ligation)

การเชื่อมต่อ DNA เพื่อสร้าง Plasmid DNA สายผสม ทำได้โดยนำสารละลาย DNA ที่บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1.5 จำนวน 1.5 ไมโครลิตร ผสมกับ T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร 2X Rapid ligation buffer 2.5 ไมโครลิตร และ pGEM-T Easy vector (ภาพที่ 1) 0.5 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปรมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

1.9 การเตรียม Competent Cell

นำเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 เลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบ่งเชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ลงเลี้ยงต่อในอาหาร LB Broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่งใส่ Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 6 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม 100 mM CaCl₂ 625 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และเทของเหลวด้านบนทิ้ง เติม 100 mM CaCl₂ ที่มี 15% Glycerol 375 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ถ้ายังไม่นำไปใช้ให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 1 แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในตำแหน่ง Polylinker ของ pGEM-T Easy vector

ที่มา: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf> (2008)

1.10 การนำ DNA ลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Transformation)

ใช้วิธี Heat shock transformation โดยนำ Competent cell ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.9 จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Ligation product 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการตีเบา ๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 25 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที นำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม Super Optimal Culture medium (SOC medium) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ปิดปาก Microcentrifuge tubes ด้วย Parafilm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที (เขย่า) หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 5 นาที ลดปริมาตรของสารละลายลงให้เหลือเพียง 100 ไมโครลิตร ผสมตะกอนกับสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำสารละลาย 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงบนอาหาร LB Ampicilin, IPTG, X-Gal plate ที่ทำการเกลี่ย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropylthio- β -D-galactoside) เข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร LB Agar ไว้ก่อนแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันหรือ Micropipette tip ที่ปลอดเชื้อมาทำการคัดเลือกเอาโคโลนีที่คาดว่าจะมีชิ้น Insert คือ เลือกอเอาเฉพาะแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาว (Blue-white colony screening) มาเกลี่ยลงบนอาหาร LB Ampicilin, IPTG, X-Gal plate ใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อทำเป็น Master plates

1.11 การตรวจสอบผลของการโคลน

การตรวจสอบผลของการโคลน จะใช้เทคนิค Colony PCR ซึ่งใช้ Universal primers 2 ชนิด คือ M13 Forward และ M13 Reverse และใช้โคโลนีสีขาวของแบคทีเรียเป็น Template ซึ่งสารละลายส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตรทั้งสิ้น 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10X <i>Taq</i> Buffer ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	1.6	ไมโครลิตร
5 mM M13 forward primer	1.5	ไมโครลิตร
5 mM M13 reverse primer	1.5	ไมโครลิตร
1.25 mM MgCl_2	1.875	ไมโครลิตร
5 U/UI <i>Taq</i> DNA polymerase	0.2	ไมโครลิตร
Distilled water	6.825	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15	ไมโครลิตร

ทำการเจียโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบจาก Master plate โดยใช้ไม้จิ้มฟันหรือ Micropipette tip ที่ปลอดเชื้อ ใส่ลงสารละลายที่เตรียมไว้ แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ที่กำหนดให้ในช่วงแรกของปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลที่ได้ ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

1.12 การสกัด Plasmid เพื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้ชุดสกัด Plasmid DNA จากแบคทีเรีย ของบริษัท BioExcellence โดยนำเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีขาวจาก Master plate ที่นำไปตรวจสอบด้วย Colony PCR แล้วได้ผลบวก โดยมีขนาดของชิ้น PCR Product ใกล้เคียงกับขนาดของชิ้น Insert ไปเลี้ยงในอาหาร LB Ampicilin broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมา Vortex แบ่งใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทอาหารด้านบนทิ้ง และทำซ้ำจนเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลองที่เลี้ยงไว้หมด

หลังจากนั้นเติม Cell suspension solution 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต จากนั้นเติม Cell lysis solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา แล้วเติม Neutralisation solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนติดมาด้วย หลังจากนั้นเติม Isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการล้างตะกอนโดยเติม 70% Ethanol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แต่ต้องระวังอย่าให้ตะกอน DNA หลุดออกมาด้วย ซับ 70% Ethanol ที่เหลือค้างอยู่โดยคว่ำปากหลอดลงบนกระดาษซับ ที่จุ่มไว้จน Ethanol ระเหยออกไปหมด หลังจากนั้นเติม TE Buffer 20 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยต้องเขย่าหลอดเป็นระยะ ๆ หลังจากนั้นเก็บ Plasmid ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.13 การทำ Restriction enzyme digestion

pGEM-T Easy เป็น Vector ที่มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ชนิด *Eco* RI ซึ่งอยู่ขนาบข้างของชิ้น Insert บน Recombinant DNA จึงใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการตัด Recombinant DNA ที่ได้จากการโคลน เพื่อยืนยันผล

ซึ่งส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา มีดังนี้

Plasmid DNA	2	ไมโครลิตร
10X Buffer <i>Eco</i> RI	2	ไมโครลิตร
<i>Eco</i> RI	0.5	ไมโครลิตร
Distilled water	5.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดใน Microcentrifuge tubes ขนาด 0.6 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยวิธีการ 1% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่าง

ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

1.14 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

เลือก Plasmid ที่มีชิ้นของ Insert ขนาดความยาวใกล้เคียงกับ 5' RACE PCR Product มาทำการตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของ cDNA โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham pharmacia biotech) โดย Macrogen, Inc. (Korea)

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกิ้งก่ากรมกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ ALF cDNA ของกิ้งก่ากรม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการตัดส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vector และ Adaptor ออก โดยใช้โปรแกรม Gentyx version 7.0 หลังจากนั้นนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการตัดเอา Vector และ Adaptor ออกแล้วนั้น ไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่บันทึกไว้แล้วใน GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BlastN ที่กำหนดให้มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และต้องมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (*E-value*) น้อยกว่า 10^{-4} และใช้โปรแกรม BlastX เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันของกรดอะมิโน โดยตรงบริเวณที่เหมือนกันนั้นต้องมีจำนวนของกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 10 Residues, มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันไม่น้อยกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (*E-value*) น้อยกว่า 10^{-4} (Cao *et al.*, 2001)

หลังจากนั้นนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม BlastN และ BlastX แล้ว ให้ผลเป็นยีน ALF มาทำการ Alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF โคลนที่ได้มาจากห้องสมุด cDNA ของกิ้งก่ากรม เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ของ ALF cDNA ของกิ้งก่ากรม

2.2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกิ้งก่ามกราคม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน ALF ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ จากฐานข้อมูล GenBank Database มาทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF ของกิ้งก่ามกราคม โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.clustal.org>) และ MatGat 2.01 (<http://bitincka.com/ledion/matgat>)

จากนั้นทำการตัดส่วนของ Hydrophobic leader peptide sequence ของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ออก โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) หลังจากนั้นทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF โดยใช้โปรแกรม MEGA version 3.1 (<http://www.megasoftware.net>) ด้วยวิธี UPGMA โดยให้ค่าการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ในอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามกราคม โดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

3.1 การสกัด Total RNA จากอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามกราคม โดยใช้ Trizol reagent

ทำการเก็บเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามกราคมปกติที่มีน้ำหนักประมาณ 80 กรัม ซึ่งได้แก่ ก้านตา (Eyestalk), เหงือก (Gills), อวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad), หัวใจ (Heart), ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas), ทางเดินอาหารส่วนต้น (Foregut), ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut), ทางเดินอาหารส่วนท้าย (Hindgut), กล้ามเนื้อ (Muscle) และเนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก (Subcuticular epithelium) รวมทั้งเม็ดเลือด (Haemocytes) โดยการเก็บเม็ดเลือดนั้นจะทำการเก็บเลือดจากตำแหน่งของแองเงอเลือดที่อยู่บริเวณอก (Ventral sinus) ที่ปล้องท้องปล้องที่ 1 ให้ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Tri-sodium citrate dehydrate, W/V) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมเลือดกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดให้เข้ากัน จากนั้นนำสารผสมที่ได้ใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดออกจากน้ำเลือด หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม Trizol reagent (Molecular Research Center) 200 ไมโครลิตร ส่วนตัวอย่างอวัยวะอื่น ๆ จะใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเก็บอวัยวะต่าง ๆ ใส่ใน Microcentrifuge tubes

ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Trizol reagent 500 ไมโครลิตร และบดเนื้อเยื่อและเซลล์เม็ดเลือดที่ได้ด้วยโกรบดเนื้อเยื่อ (Homogenizer) ให้ละเอียด หลังจากนั้นทำการสกัด Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.2

3.2 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ที่ได้จากข้อ 3.1 มาทำการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.4

3.3 การสังเคราะห์ First strand cDNA จาก Total RNA ที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามกราคม

การสังเคราะห์ First strand cDNA ของ mRNA ที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้ iScript™ Select cDNA Synthesis Kit ของบริษัท (Bio-Rad, USA) ซึ่งเริ่มจากเติม Oligo (dT)₂₀ primer 1 ไมโครลิตร แล้วเติมตัวอย่าง Total RNA และ Nuclease-free water ที่แปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA ที่ได้มาจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แช่ในน้ำแข็ง 1 นาที แล้วเติม iScript Select Reaction mix 2 ไมโครลิตร และเติม iScript Reverse Transcriptase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บ First strand cDNA Product ที่ได้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ของกิ้งก่ามกราคม โดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ในอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งก่ามกราคมปกติ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ First strand cDNA ที่เตรียมได้จากอวัยวะต่าง ๆ เป็น Template และใช้ Specific Primers ของยีน ALF ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งได้แก่

ALF1 (1) Forward primer	คือ 5' GGGCACACGTGTCAGTACAGCGTT 3'
ALF1 (1) Reverse primer	คือ 5' AAGCCAGACCCTTGCTTGCTCCTC 3'

และ ALF2 (2) Forward primer คือ 5' TCAAAGGAGAAGCTCTGACC 3'
 ALF2 (2) Reverse primer คือ 5' GGGTCACCAATTGTGCTACA 3'

แล้วเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin (Accession No. AY626840) ซึ่งจะใช้เป็น Internal control ซึ่งใช้ Specific primers ดังนี้

β -actin (1) Forward primer คือ 5' CATCGTTACTAACTGGGACG 3'
 β -actin (1) Reverse primer คือ 5' AGGATTCCATACCCAGGAAG 3'

โดยส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา มีดังนี้

First strand cDNA	1	ไมโครลิตร
10X <i>Taq</i> Buffer	2	ไมโครลิตร
10 μ M Forward Primer	1.5	ไมโครลิตร
10 μ M Reverse Primer	1.5	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	2	ไมโครลิตร
5 U/UI <i>Taq</i> DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	21.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	30	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดใน PCR tubes นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ Target DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเป็นดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาทีเป็นจำนวน 25 รอบ และช่วงที่สามใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเก็บรักษา PCR Products ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผล PCR Product ที่ได้ของยีน ALF และ β -actin ด้วยวิธีการ 1% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

4. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ALF ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และสาร β -glucan โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

4.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งก้ามกรามตัวเต็มวัยที่มีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 60 ตัว ที่มีน้ำหนักประมาณ 60 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50 ลิตร ในห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อทำการปรับสภาพกุ้งก่อนการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน ระหว่างนี้ให้อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวันในเวลาเช้าและเย็น และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน

4.2 การเตรียมอาหารสำหรับการใช้ในการทดลอง

นำสาร β -glucan ที่สกัดได้จากยีสต์ ชั่งน้ำหนักให้ได้ 5 กรัม ผสมน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปคลุกเคล้ากับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปน้ำหนัก 1 กิโลกรัม โดยให้กระจายให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำการเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก 30 มิลลิลิตร แล้วทำการคลุกเคล้าอีกครั้ง เพื่อให้อาหารกับน้ำมันปลาหมึกผสมกันในอัตราที่สม่ำเสมอ นำอาหารที่ได้ไปผึ่งลมให้แห้ง

ส่วนกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* นั้น จะให้อาหารที่คลุกเคล้าเฉพาะน้ำมันปลาหมึกในอัตราและวิธีเช่นเดียวกับอาหารที่ผสมด้วย β -glucan หลังจากนั้นเก็บอาหารที่เตรียมไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

4.3 การเตรียมเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สำหรับการทดลอง

เชื้อเชื้อ *A. hydrophila* สายพันธุ์ AQAH001 จากห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหาร Tryptic Soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงเช่นกัน

หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างเซลล์แบคทีเรียโดยเติมน้ำเกลือ 0.85% และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งจะทำการล้าง 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำเกลือ 0.85% เพื่อละลายตะกอนแบคทีเรีย แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.1 จะให้ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.0×10^7 Colony forming unit (CFU)/มิลลิลิตร

4.4 การวางแผนการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม

นำกุ้งก้ามกรามที่พักไว้ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว โดยให้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (Control 1) ที่ทำการฉีดน้ำเกลือ 0.85% 0.1 มิลลิลิตร บริเวณปล้องท้องปล้องที่ 3 และเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปปกติ

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ทำการกระตุ้นด้วยการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1×10^7 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บริเวณปล้องท้องปล้องที่ 3 (จะให้ความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียเป็น 10^6 CFU/ตัว) และเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปปกติ

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุม (Control 2) ที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปปกติ

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ทำการกระตุ้นด้วยการให้กินอาหารผสมสาร β -glucan 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ทำการทดลองเป็นเวลา 14 วัน โดยให้อาหารทดลองวันละ 2 ครั้ง ในอัตรา 5% ของน้ำหนักตัว จากนั้นเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้งภายหลังทำการกระตุ้นแล้ว ที่ 0, 1, 3, 7 และ 14 วัน โดยทำการเก็บเลือดจากกุ้งตัวอย่างโดยใช้กุ้งกลุ่มละ 3 ตัว (3 ซ้ำ) ในแต่ละช่วงเวลา มาทำการสกัด Total RNA และสังเคราะห์ First strand cDNAs ต่อไป

4.5 การสกัด Total RNA จากเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม โดยใช้ Trizol reagent

ทำการเก็บเลือดตรงตำแหน่งของแอ่งเลือดที่อยู่บริเวณอก (Ventral sinus) ที่ปล้องท้องปล้องที่ 1 ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 3

มิลลิลิตร ที่บรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Tri-sodium citrate dehydrate, W/V) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมเลือดกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดให้เข้ากัน จากนั้นนำสารผสมที่ได้ใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดออกจากน้ำเลือด หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม Trizol reagent (Molecular Research Center) 200 ไมโครลิตร และทำการสกัด Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.2

4.6 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่ได้จากข้อ 4.5 มาทำการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.4

4.7 การสังเคราะห์ First strand cDNA จาก Total RNA ที่ได้จากเม็ดเลือดของกิ้งก่ามกราคม

การสังเคราะห์ First strand cDNA โดยใช้ iScript™ Select cDNA Synthesis Kit ของบริษัท (Bio-Rad, USA) โดยทำตามวิธีในข้อ 3.3

4.8 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ในเม็ดเลือดของกิ้งก่ามกราคม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และสาร β -glucan โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

นำ First strand cDNA ที่ได้จากการทดลองในแต่ละช่วง มาใช้เป็น Templates และใช้ Specific primers ของยีน ALF ดังนี้

ALF1 (2) Forward primer คือ 5' GCACACGTGTCAGTACAGCGTTAA 3'

ALF1 (2) Reverse primer คือ 5' GAAGGCTTTCCTGACGAAGTCTTG 3'

และ ALF2 (1) Forward primer คือ 5' GGAAGCTCCAGTTATACTTCGACG 3'

ALF2 (1) Reverse primer คือ 5' CCTTCTGCAGGAAATCTTGGACTG 3'

แล้วทำการเปรียบเทียบกับยีน β -actin ซึ่งให้เป็น Normalizer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Specific primers ดังนี้

β -actin (2) Forward primer คือ 5' TTCACCATCGGCATTGAGAGGTTTC 3'
 β -actin (2) Reverse primer คือ 5' CACGTCGCATTTTCATCATGGAGTT 3'

โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

First strand cDNA	1	ไมโครลิตร
10 μ M Forward Primer	1	ไมโครลิตร
10 μ M Reverse Primer	1	ไมโครลิตร
2X Brilliant II SYBR Green QPCR master mix	12.5	ไมโครลิตร
Distilled water	9.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงใน 96 Well polypropylene plates จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาใน Stratagene's Mx3000P Real-time PCR system ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเป็นดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ และในช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นจำนวน 1 รอบ แล้วบันทึกผลค่า Threshold cycle หรือ C_T ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ภายหลังจากที่ได้ทำการกระตุ้น

4.9 การวิเคราะห์ผลที่ได้จาก Quantitative Real-Time PCR และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่า C_T ที่ได้ของทุก ๆ กลุ่มทดลองในแต่ละช่วงเวลา มาทำการคำนวณเพื่อหาค่า Relative expression ratio ตามวิธีการของ Livak และ Schmittgen (2001) ซึ่งค่า Relative expression ratio จะมีสูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Relative expression ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

เมื่อ ΔC_T คือความแตกต่างของค่า C_T ของยีน ALF กับค่า C_T ของยีน β -actin ในแต่ละช่วงเวลา โดยสามารถเขียนเป็นสมการในการคำนวณ ดังนี้

$$\Delta C_T = C_{T,ALF} - C_{T,\beta\text{-actin}}$$

จากนั้นนำค่า ΔC_T ที่ได้จากช่วงเวลา 0 วัน ($(\Delta C_T)_{\text{Time 0}}$) มาใช้เป็น Calibrator เพื่อปรับค่า ΔC_T ของแต่ละช่วงเวลา ($(\Delta C_T)_{\text{Time X}}$) ให้ได้ค่าที่มีมาตรฐานเดียวกัน โดยค่าที่ได้จากการคำนวณดังกล่าว เรียกว่า $\Delta\Delta C_T$

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_{\text{Time X}} - (\Delta C_T)_{\text{Time 0}}$$

นำค่า $\Delta\Delta C_T$ ที่ได้มาทำการคำนวณหาค่า Relative expression ratio ตามสูตรในการคำนวณข้างต้น

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีน ALF ในช่วงเวลาต่าง ๆ ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 และระหว่างกลุ่มที่ 3 และ 4 โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงเวลาในกลุ่มการทดลองดังกล่าว โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) (อนันตชัย, 2542)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มทำงานวิจัยเดือนสิงหาคม 2550 และสิ้นสุดงานวิจัยในเดือนมกราคม 2552

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Anti-lipopolysaccharide factor (ALF) ในกุ้งก้ามกราม

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs (Partial cDNAs) ของยีน ALF จากห้องสมุด cDNA ที่สร้างจากเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามและห้องสมุด cDNA ที่สร้างจาก Androgenic gland ของกุ้งก้ามกราม พบว่าสามารถค้นพบและสามารถแบ่งกลุ่มของยีน ALF ออกเป็น 3 Isoforms โดย Isoform ที่ 1 นั้นพบในห้องสมุด cDNA ที่สร้างจากเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม (Srisapoome *et al.*, 2007. Direct submission accession number EL608988-EL610004 และ EL695504-EL696577) ส่วน Isoform ที่ 2 และ 3 พบในห้องสมุด cDNA ที่สร้างจาก Androgenic gland ของกุ้งก้ามกราม (Srisapoome *et al.*, 2008. Direct submission accession number GH624059-GH626155)

จากนั้นจึงทำการออกแบบ Specific primer ที่มีความจำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของ cDNA ของยีน ALF Isoform 1 (ALF1) โคลนรหัส P11353 (Accession No. EL696174) ที่ได้จากห้องสมุด cDNA ที่สร้างจากเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม คือ ALF1 (1) Reverse primer [ALF1 (1) R] เพื่อใช้ในการทำ 5' RACE PCR

ผลจากการโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของ cDNA ของยีน ALF ในกุ้งก้ามกรามด้วยเทคนิค 5' RACE โดยใช้ Universal primer (UPM) ร่วมกับ [ALF1 (1) R] สามารถ Amplify และโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' โดยใช้เทคนิค RACE PCR ของยีน ALF1 ได้ โดยเมื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5' RACE PCR Product ที่ได้จาก [ALF1 (1) R] ร่วมกับ Universal primer (UPM) แล้วพบว่ามีความยาว 542 bp เมื่อนำมาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน P11353 จากห้องสมุด cDNA ที่สร้างจากเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามที่มีความยาว 588 bp ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF1 ของกุ้งก้ามกราม (Mr-ALF1) ที่มีความยาว 855 bp (ภาพที่ 2) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF1 ไปทำการ BlastN และ BlastX โดยใช้โปรแกรม Basic local alignment search tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF1 มีความคล้ายคลึงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ของ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) มากที่สุด โดยค่า E-value ที่ได้จากการ

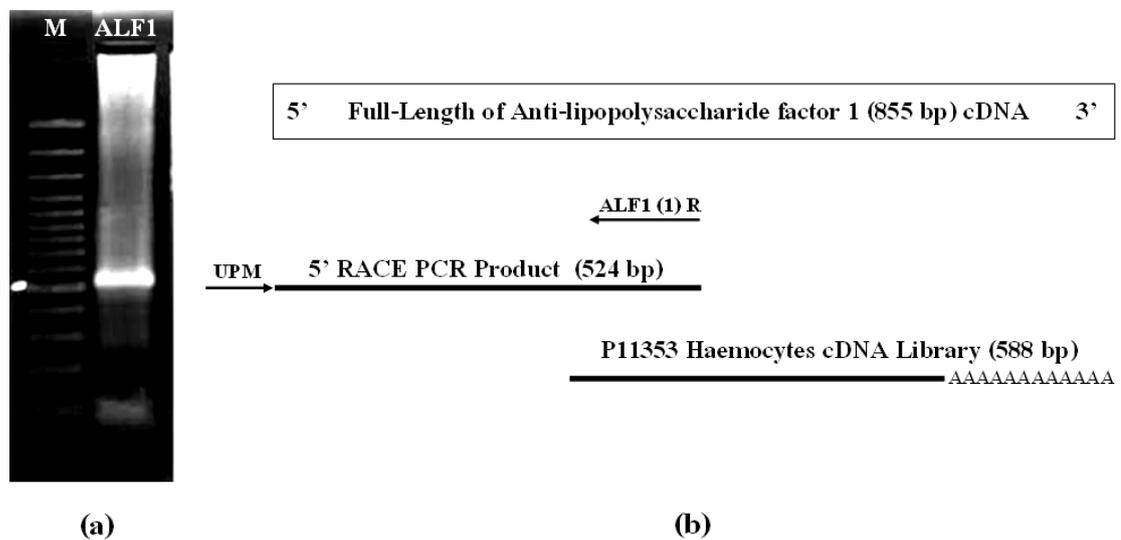
เปรียบเทียบโดยใช้ BlastN และ BlastX มีค่าเท่ากับ 0.0 และ 8.0E-46 ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ 3) และเมื่อพิจารณาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีค่า E -value เท่ากับ 0.0 ซึ่งมีค่าสูงสุดเป็นอันดับที่ 2 เมื่อใช้ BlastN และมีค่า E -value เท่ากับ 1.0E-31 ซึ่งอยู่ในอันดับที่ 5 เมื่อใช้ BlastX จะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Mr-ALF1 นี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ของกุ้งก้ามกราม ซึ่งมีผู้บันทึกไว้ใน GenBank database ก่อนหน้านี้เช่นเดียวกัน แต่เป็นเพียงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ยังไม่สมบูรณ์เท่านั้น

ตารางที่ 2 ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF1 ที่มีค่า E -value สูงสุดใน 5 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม BlastN

Putative genes	Closeset species	Accession number	E -value	Score (bits)
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Macrobrachium olfersii</i>	EU289220.1	0.0	1027
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	EU826055.1	0.0	930
Antimicrobial peptide	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	AY859500.1	1.0E-30	143
Anti-lipopolysaccharide factor 1	<i>Homarus americanus</i>	EU625516.1	2.0E-21	113
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Penaeus monodon</i>	EU617325.1	2.0E-21	113

ตารางที่ 3 ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF1 ที่มีค่า *E*-value สูงสุดใน 5 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม BlastX

Putative genes	Closeset species	Accession number	<i>E</i> -value	Score (bits)
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Macrobrachium olfersii</i>	EU289220.1	8.0E-46	187
Antimicrobial peptide	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	AY859500.1	4.0E-33	145
Anti-lipopolysaccharide factor 1	<i>Homarus americanus</i>	EU625516.1	8.0E-32	141
Anti-lipopolysaccharide factor like protein	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB210110.1	1.0E-31	140
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	EU826055.1	1.0E-31	140



ภาพที่ 2 แบบแผนของการโคลน Full-length ของ cDNA ของยีน ALF1 (Mr-ALF1) ของกุ้งก้ามกราม (a) แถบ PCR Product ที่ได้จากการใช้เทคนิค 5' RACE ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ของ cDNA ของยีน Mr-ALF1 (b) แผนภาพการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF1 ของกุ้งก้ามกราม (Mr-ALF1) พร้อมทั้งตำแหน่งของ Universal primer (UPM) และ ALF1 (1) Reverse primer [ALF1 (1) R] ที่ใช้

ในการศึกษา

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNAs ของยีน ALF Isoform 2 (ALF2) ที่ได้จากห้องสมุด cDNA ที่สร้างจาก Androgenic gland ของกุ้งก้ามกรามนั้น ได้มาจาก cDNA โคลนรหัส N264 (Accession No. GH624220) ซึ่งใช้ M13 Reverse primer ในการ Sequence ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของทางด้านปลาย 5' ที่มีความยาว 762 bp หลังจากนั้นทำการ Sequence อีกครั้งโดยใช้ M13 Forward primer ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของทางด้านปลาย 3' ที่มีความยาว 907 bp และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน ALF2 ทั้งสองเส้นมาเชื่อมต่อกัน ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF2 ของกุ้งก้ามกราม (Mr-ALF2) ที่มีความยาวทั้งสิ้น 959 bp (ภาพที่ 3) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF2 ไปทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนโดยใช้ BlastX พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF2 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Anti-lipopolysaccharide factor ของ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*) และ American lobster (*Homarus americanus*) ที่มีค่า E-value เท่ากับ 1.0E-04 และ 1.0E-27 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF2 ที่มีค่า E-value สูงสุดใน 5 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม BlastX

Putative genes	Closeset species	Accession number	E-value	Score (bits)
Anti-lipopolysaccharide factor 1	<i>Homarus americanus</i>	EU625516.1	1.0E-27	127
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Macrobrachium olfersii</i>	EU289220.1	3.0E-24	116
Anti-lipopolysaccharide factor like protein	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB210110.1	3.0E-24	116
Anti-lipopolysaccharide factor isoform 1	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	EF601051.1	3.0E-24	116
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Litopenaeus schmitti</i>	DQ991357.1	1.0E-23	114

5' Full-Length of Anti-lipopolysaccharide factor 2 (959 bp) cDNA 3'

M13 R N264 Androgenic gland cDNA Library (726 bp)

N264 Androgenic gland cDNA Library (907 bp)

M13 F

AAAAAAAAAAAAA

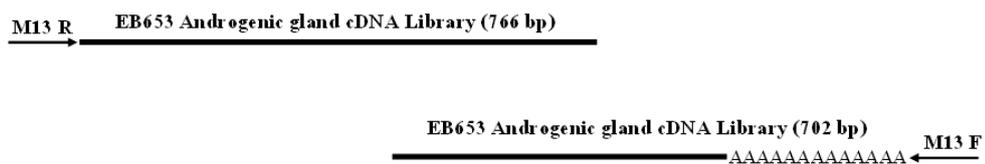
ภาพที่ 3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF2 ของกุ้งก้ามกราม (Mr-ALF2) ที่พบในห้องสมุด cDNA ของ Androgenic gland โดยการ Sequence ด้วย M13 Forward และ M13 Reverse primers

เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน ALF3 ที่ได้มาจากโคลนรหัส EB653 (Accession No. GH626033) ที่พบในห้องสมุด cDNA ของ Androgenic gland ซึ่งเมื่อใช้ M13 Reverse primer ในการ Sequence ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของด้านปลาย 5' ที่มีความยาว 766 bp และเมื่อทำการ Sequence อีกครั้งด้วย M13 Forward primer ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของด้านปลาย 3' ที่มีความยาว 702 bp หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน ALF3 ทั้งสองเส้นนี้มาเชื่อมต่อกัน ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF3 ของกุ้งก้ามกราม (Mr-ALF3) ที่มีความยาวทั้งสิ้น 833 bp (ภาพที่ 4) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF3 ไปทำการ BlastX พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF3 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Anti-lipopolysaccharide factor 2 ของ American lobster (*Homarus americanus*) มีค่า E-value เท่ากับ 1.0E-10 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Mr-ALF3 ที่มีค่า *E*-value สูงสุดใน 5 อันดับแรกโดยใช้โปรแกรม BlastX

Putative genes	Closeset species	Accession number	<i>E</i> -value	Score (bits)
Anti-lipopolysaccharide factor 2	<i>Homarus americanus</i>	EU625517.1	1.0E-10	71.2
Anti-lipopolysaccharide factor isoform 2	<i>Penaeus monodon</i>	EF523561.1	6.0E-10	68.6
Anti-lipopolysaccharide factor like protein	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB210110.1	3.0E-09	66.2
Anti-lipopolysaccharide factor 2	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB453738.1	9.0E-09	64.7
Anti-lipopolysaccharide factor	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	DQ010421.1	2.0E-08	63.9

5' Full-Length of Anti-lipopolysaccharide factor 3 (833 bp) cDNA 3'



ภาพที่ 4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF3 ของกุ้งก้ามกราม (Mr-ALF3) ที่พบในห้วงสมุด cDNA ของ Androgenic gland โดยการ Sequence ด้วย M13 Forward และ M13 Reverse primers

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรม

2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกรม (Mr-ALF1)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกรม (Mr-ALF1) ที่ได้จากข้อ 1 มาทำการตัดส่วนของ Vector และ Adaptor ออก ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกรมที่มีความยาวเท่ากับ 794 bp ซึ่งเมื่อทำการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกรมแล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF1 ที่มีความยาวเท่ากับ 794 bp นั้น จะประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open Reading Frame, ORF) มีความยาวทั้งสิ้น 345 bp และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (5' Untranslated region, 5' UTR) และทางด้านปลาย 3' ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (3' Untranslated region, 3' UTR) มีความยาวเท่ากับ 134 และ 315 bp ตามลำดับ อีกทั้งยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ATTTA หรือที่เรียกว่า AU rich element motif (ARE) อยู่ในส่วนของ 3' UTR จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งของ AU rich element motif นี้จะมีความสำคัญต่อการคงสภาพของ mRNA (mRNA stabilizing function) (Bakheet *et al.*, 2001; Nagoshi *et al.*, 2006) และยังพบตำแหน่งของ Polyadenylation signal (AATAAA) จำนวน 1 ตำแหน่ง ก่อนถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Poly A tail ประมาณ 14 bp (ภาพที่ 5)

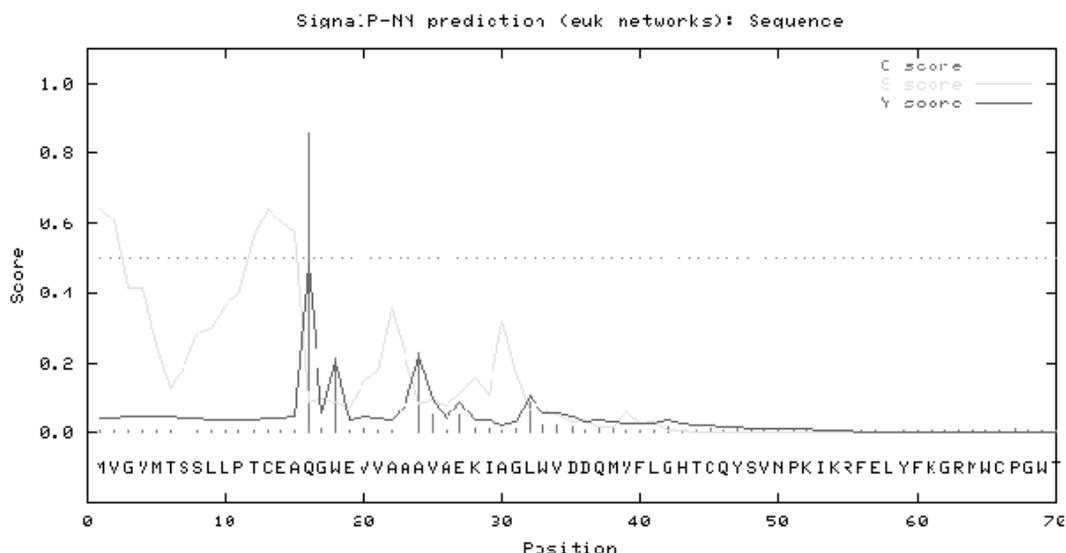
และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) ที่มีความยาวทั้งสิ้น 345 bp นี้ มาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน ทำให้ได้ลำดับของกรดอะมิโนที่มีความยาวทั้งสิ้น 114 Residues หลังจากนั้นทำการหาตำแหน่งของ Putative signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) ทำให้สามารถแบ่งโครงสร้างของโปรตีนออกเป็นส่วนของ Putative signal peptide จำนวน 15 Residues และเป็นส่วนของ Mature peptide อีก 99 Residues (ภาพที่ 6) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้จะพบกรดอะมิโน Cysteine (C) จำนวน 3 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 13, 45 และ 66 โดยกรดอะมิโน Cysteine ในตำแหน่งที่ 13 จะอยู่ในลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนของ Putative signal peptide ส่วนกรดอะมิโน Cysteine อีกสองตำแหน่งนั้นจะพบอยู่ในส่วนของ Mature peptide อีกทั้งยังพบลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งของ LPS binding motif ในบริเวณลำดับของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 45 ถึงตำแหน่งที่ 66 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนทั้งสิ้น 22 Residues โดยตำแหน่งของ LPS

binding motif ที่พบนี้จะอยู่ระหว่างกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 45 และตำแหน่งที่ 66) ที่จับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide (Andrä *et al.*, 2004) ทำให้โครงสร้างภายในโมเลกุลของยีน ALF1 เกิดเป็น Beta hairpin loop หรือที่เรียกว่า Amphipathic loop ซึ่งบริเวณ Amphipathic loop นี้จะเป็นบริเวณที่มีประจุเป็นบวกสูง (Aketagawa *et al.*, 1986; Hoess *et al.*, 1993) เนื่องจากตรงบริเวณ Amphipathic loop ของลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF1 มีกรดอะมิโน Arginine (R) และ Lysine (K) ที่เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นบวกสูงอยู่ในจำนวน 5 Residues (Brogden, 2005) ทำให้ตำแหน่งของ LPS binding motif บน Amphipathic loop นี้มีคุณสมบัติเป็น Cationic amino acid side chain (Beale *et al.*, 2008) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการเข้าจับกับผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมตรงบริเวณส่วนของ Lipid A และส่วนของ Oligosaccharide ที่มีประจุลบของหมู่ฟอสเฟต 2 หมู่ (Ren *et al.*, 2008) โดยกระบวนการในการจับกับผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมของโปรตีนในกลุ่ม AMP นั้นจะมีอยู่ด้วยกันหลายรูปแบบ (Brogden, 2005; Brown *et al.*, 2006) ซึ่งแต่ละรูปแบบจะส่งผลทำให้เกิดการแตกออกของผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยการแตกออกของผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมนี้จะเกิดขึ้นจากกระบวนการการสร้างรูบนผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Pore formation) หรือเกิดจากการที่ผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมถูกกัดกร่อนไป (Detergent-like solubilization) ด้วยโปรตีนในกลุ่ม AMP ส่งผลทำให้คุณสมบัติในการเป็น Membrane permeability ของผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเปลี่ยนแปลงไป (Izadpanah *et al.*, 2005) อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพของประจุไฟฟ้าของผนังเซลล์เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเกิดสภาพไร้ขั้วขึ้นอย่างรุนแรง (Fatal ion depolarization) และในที่สุดจะเกิดการ Lysis ของเซลล์เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมในระยะเวลาอันรวดเร็ว (Zaslhoff, 2002)

และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF1 แล้วพบว่าโปรตีนของ ALF1 ของกิ้งก่ามกราคมนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12,833.8 Da และมีค่า Theoretical isoelectric point (pI) เท่ากับ 8.91 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) ซึ่งค่า Theoretical isoelectric point หรือ pI ดังกล่าวคือค่า pH ที่ทำให้กรดอะมิโนหรือโปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (Xuhua, 2007)

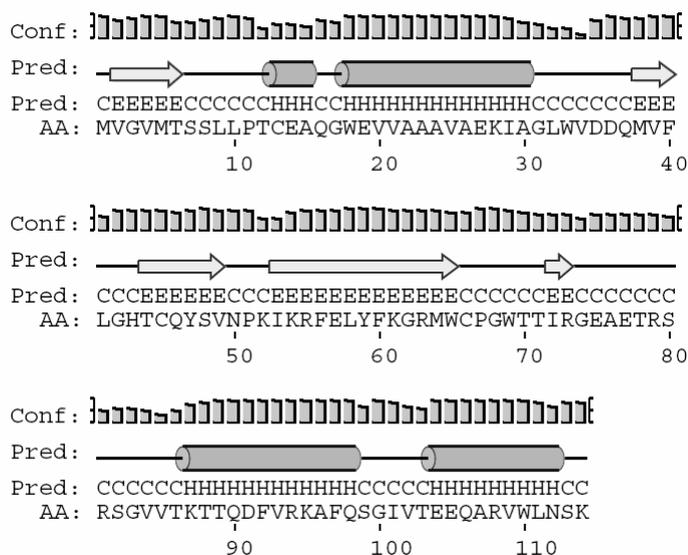
1	GAGTCGAGTCTTGACTGCGGTGCACTCACTTCTCAGGTCTGTCTCGGAAACACGAGATCA	60
61	GTTTATCAGTATTCTTGCACTGTGAACCTACGTATTGACCGAAAACGAACTGTCTGTCTG	120
121	TCTTCAGCGTCGTGATGGTTGGGGTGATGACGTCATCGTTACTTCCCCTTGTGAAGCTC	180
(1)	M V G V M T S S L L P T C E A Q	(16)
181	AGGGTTGGGAAGTTGTGGCGGCTGCTGTTGCCGAAAAGATCGCTGGTCTCTGGGTGGACG	240
(17)	G W E V V A A A V A E K I A G L W V D D	(36)
241	ACCAAATGGTATTCTTGGGGCACACGTCAGTACAGCGTTAATCCTAAAATCAAACGGT	300
(37)	Q M V F L G H T C Q Y S V N P K I K R F	(56)
301	TTGAGCTCTACTTCAAGGGCCGGATGTGGTGCCAGGATGGACTACTATCAGAGGAGAAG	360
(57)	E L Y F K G R M W C P G W T T I R G E A	(76)
361	CTGAGACTCGCAGCCGATCTGGCGTCGTTACCAAAACAACCCAAGACTTCGTCAAGAAAAG	420
(77)	E T R S R S G V V T K T T Q D F V R K A	(96)
421	CCTTCCAGTCCGGCATCGTAACTGAGGAGCAAGCAAGGGTCTGGCTTAACTCTAAATAGA	480
(97)	F Q S G I V T E E Q A R V W L N S K *	(114)
481	AAAAAGTTGTCCAGCTTCCTCCAAGAATATTCCTCTCTTCATAAGACGATCATCAGGTTT	540
541	CATTTCTCATATATTAATCCAGATGCTTCCCTTCTGAATGTTACTCAACGGCACAATCA	600
601	AGAGGCCACTGGATATACATACTTCATTAC ATTTA CTTCTCGAAACAGGAATCACTTA	660
661	TAACCTGCCTCTACCCACGAGTTGAACTTGTATAGAGCCCGCTCGTCTCGGTGTCCTCA	720
721	CCAAAAGTGGTATTCAACATGAGACTGTTTTT AATAAA ATTACCTACTGGTCAAAAAA	780
781	AAAAAAAAAAAAA	

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ากรม (Mr-ALF1) โดยวงกลมแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteines จำนวน 3 ตำแหน่ง ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงส่วนของ Putative signal peptide ตัวอักษรที่หนาแสดงถึงส่วนของ LPS binding motif ส่วนตัวอักษรที่หนาและขีดเส้นใต้จะแสดงถึงตำแหน่งของ AU rich element motif และตัวอักษรที่เป็นตัวเอียงที่หนาแสดงถึงตำแหน่งของ Polyadenylation signal (AATAAA)



ภาพที่ 6 ตำแหน่ง Putative signal peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF1 ของกุ้งก้ามกราม (Mr-ALF1) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)

เมื่อทำการทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 (Secondary structure) จาก PSIPRED Protein Structure Prediction Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) พบว่าโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน ALF1 ของกุ้งก้ามกรามจะประกอบด้วยส่วนที่เป็น α -helix (H) จำนวน 4 ส่วน ส่วนที่เป็น β -strand (E) จำนวน 5 ส่วนและโครงสร้างส่วนที่เหลือจะเป็นส่วนของ Random coil (C) (ภาพที่ 7) โดยส่วนของโครงสร้างที่เป็น α -helix นั้น จะอยู่ในส่วนปลายทางด้าน 5' ตรงบริเวณที่เป็น Putative signal peptide และพบอยู่ตรงบริเวณปลายทางด้าน 3' อีก 2 ตำแหน่ง ซึ่งบริเวณที่อยู่ตรงกลางระหว่างโครงสร้างของ α -helix ทั้งสองนี้จะเป็นส่วนของ β -strand และ Random coil โดยในบริเวณดังกล่าวจะมีตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine อยู่ 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 45 และตำแหน่งที่ 66 จับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide ทำให้โครงสร้างของโปรตีน Mr-ALF1 เป็น Amphipathic loop หรืออาจเรียกว่า Beta hairpin loop และเมื่อทำการพิจารณาเฉพาะบริเวณส่วนของ Mature peptide จะพบว่า Mr-ALF1 มีส่วนของ α -helix 3 ส่วน และส่วนของ β -strand 4 ส่วนเช่นเดียวกับโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน ALF ของ *Limulus polyphemus* (Hoess *et al.*, 1993)



ภาพที่ 7 การทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF1) โดยส่วนที่เป็น α -helix คือ H ส่วนที่เป็น β -strand คือ E และส่วนที่เป็น Random coil คือ C (ทำนายจาก <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>)

2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF2)

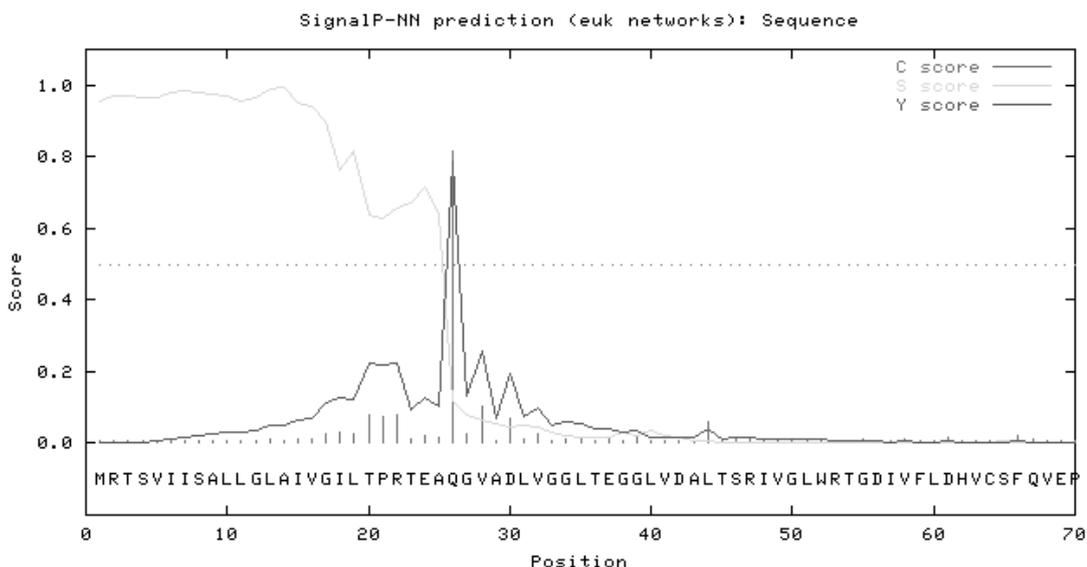
ภายหลังจากการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF2) ที่ได้จากข้อ 1 ซึ่งมีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 959 bp ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) มีความยาวทั้งสิ้น 399 bp และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (5' UTR) และทางด้านปลาย 3' ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (3' UTR) มีความยาวเท่ากับ 5 และ 555 bp ตามลำดับ อีกทั้งยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ATTTA หรือที่เรียกว่า AU rich element motif (ARE) อยู่ในส่วนของ 3' UTR จำนวน 3 ตำแหน่ง และยังพบตำแหน่งของ Polyadenylation signal (AATAAA) จำนวน 1 ตำแหน่ง ก่อนถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Poly A tail ประมาณ 14 bp (ภาพที่ 8)

และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) ที่มีความยาวทั้งสิ้น 399 bp นี้ มาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนทำให้ได้ลำดับของกรดอะมิโนที่มีความยาวทั้งสิ้น 132 Residues หลังจากนั้นทำการหาตำแหน่งของ Putative signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) ซึ่งสามารถแบ่งโครงสร้างของโปรตีน

ออกเป็นส่วนของ Putative signal peptide จำนวน 25 Residues และเป็นส่วนของ Mature peptide อีก 107 Residues (ภาพที่ 9) เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้พบว่ามีกรดอะมิโน Cysteine (C) จำนวน 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งของกรดอะมิโนในลำดับที่ 64 และ 85 ซึ่งกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองตำแหน่งนี้จะพบอยู่ในส่วนของ Mature peptide โดยกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองนี้จะสามารถจับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide และยังพบว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 64 ถึงตำแหน่งที่ 85 จัดเป็นตำแหน่งของ LPS binding motif ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนทั้งสิ้น 22 Residues อีกทั้งยังพบตำแหน่ง Glycosylation site คือ Asn-Xaa-Thr/Ser (NXT หรือ NXS) จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยที่ Asn (N) คือกรดอะมิโน Asparagine, Thr (T) คือกรดอะมิโน Threonine, Ser (S) คือกรดอะมิโน Serine และ Xaa (X) คือกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ตรงบริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 100 ถึง 102 คือ Asn-Ser-Ser (NSS) ซึ่งแตกต่างจากลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF1 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF1) ที่ไม่พบตำแหน่ง Glycosylation site เลย โดยตำแหน่ง Glycosylation site นี้เป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของน้ำตาล (Bause, 1983) ทำให้เกิดเป็น Glycoprotein ขึ้น โดยน้ำตาลที่เข้ามายึดเกาะกับโปรตีนนี้จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ N-glycosidic กับกรดอะมิโน Asparagine (Asn) เรียกตำแหน่งนี้ว่า N-Glycosylation (Gavel and von Heijne, 1990) ซึ่งการมีตำแหน่ง Glycosylation site อยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีนจะมีผลต่อการพับตัวและการทำงานอีกด้วย และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF2 แล้วพบว่าโปรตีนของ ALF2 ของกิ้งก่ามกราคมนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14,281.5 Da และมีค่า Theoretical isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.72 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)

1	AGGCAATGCGTACCTCGGTGATCATCAGTGCCTGTTAGGGCTCGCCATAGTGGGCATTT	60
(1)	<u>M R T S V I I S A L L G L A I V G I L</u>	(19)
61	TGACGCCAGAACCGAAGCCAGGGCGTGGCTGATTTGGTCGGGGCTTGACGGAAGGCG	120
(20)	<u>T P R T E A Q G V A D L V G G L T E G G</u>	(39)
121	GTCTGGTCGACGCTCTGACGTCACGGATTGTCGGGTTGTGGCGAACAGGAGACATTGTAT	180
(40)	L V D A L T S R I V G L W R T G D I V F	(59)
181	TCCTGGACCAGTCTGCAGTTTCCAGGTCGAGCCTAACCTCAGGAAGCTCCTGTTATACT	240
(60)	L D H V C S F Q V E P N L R K L L L Y F	(79)
241	TCGACGGGACATTCTGGTGCCCTGGATGGACCCCATCAAAGGAGAAGCTCTGACCCGAA	300
(80)	D G T F W C P G W T P I K G E A L T R S	(99)
301	GCAACTCTAGCGTTGTGAACAAGGCAGTCCAAGATTTCTGCAGAAGGCACTGGCTAGCG	360
(100)	<u>N S S</u> V V N K A V Q D F L Q K A L A S G	(119)
361	GCCTCGTCACCGAAAGCGAATCCAGGGCGTGGCTGAAACACTAAATAAAGTT ATTTAAAA	420
(120)	L V T E S E S R A W L K H *	(132)
421	GTCGAGAGGATCTGTTTGGCTATTGTAAGAGCGAATGCTTGAGCCGTTACAAAGGTAATC	480
481	CCATCTAATACTACTGCTACTCTGGCTACCAGAATGCTCTACAATAACATGAATCTTTT	540
541	AAGTTGTTTAAACAAGTGTGTAGCACAATTGGTGACCCCTAACCTATACCTATGAGTAGAT	600
601	AATAATTATTATTTTCCAAAAATGAGGAGAGATTGTTTTAGACATAATTCGAAATAACAG	660
661	ATCACTCTGATGCCTAATTCGCGAAAGTTATAGAAATATTATTTTATGTTTCGTTATAAAA	720
721	ATGAGTAAGATTCGTATTTCTTACAG ATTTA TGCTTTATATAGAGCATGAAGTATTTTA	780
781	AGGCTATGAGAGTACTAGACACGTTGAATTCGATTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTCTGTAAA	840
841	AGAAAT ATTTA TGGAAAGCATATTCATAGCAAAACATTTTTTATAACATGTCAGTTATTGA	900
901	TGATATGATGTAAATGAATTT AATAAA CAGTTTATTATCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ากรม (Mr-ALF2) โดยวงกลมแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteines จำนวน 2 ตำแหน่ง กรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึงตำแหน่งของ Glycosylation site จำนวน 1 ตำแหน่ง ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงส่วนของ Putative signal peptide ตัวอักษรที่หนาแสดงถึงส่วนของ LPS binding motif ส่วนตัวอักษรที่หนาและขีดเส้นใต้จะแสดงถึงตำแหน่งของ AU rich element motif และตัวอักษรที่เป็นตัวเอียงที่หนาแสดงถึงตำแหน่งของ Polyadenylation signal (AATAAA)



ภาพที่ 9 ตำแหน่ง Putative signal peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ากรม (Mr-ALF2) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)

เมื่อทำการทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 (Secondary structure) จาก PSIPRED Protein Structure Prediction Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) พบว่าโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน ALF2 ของกิ้งก่ากรมจะประกอบด้วยส่วนที่เป็น α -helix (H) จำนวน 6 ส่วน ส่วนที่เป็น β -strand (E) จำนวน 6 ส่วนและโครงสร้างส่วนที่เหลือจะเป็นส่วนของ Random coil (C) (ภาพที่ 10) โดยส่วนของโครงสร้างที่เป็น α -helix นั้น จะอยู่ในส่วนปลายทางด้าน 5' ตรงบริเวณที่เป็น Putative signal peptide และยังพบอยู่ตรงบริเวณปลายทางด้าน 3' อีก 2 ตำแหน่ง ซึ่งบริเวณที่อยู่ตรงกลางระหว่างโครงสร้างของ α -helix ทั้งสองนี้จะเป็นส่วนของ β -strand และ Random coil โดยในบริเวณดังกล่าวจะมีตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine อยู่ 2 ตำแหน่งคือตำแหน่งที่ 64 และตำแหน่งที่ 85 จับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide ทำให้โครงสร้างของโปรตีน Mr-ALF2 เป็น Amphipathic loop เช่นเดียวกับยีน Mr-ALF1 ของกิ้งก่ากรม และเมื่อทำการพิจารณาเฉพาะบริเวณส่วนของ Mature peptide จะพบว่ามีส่วนของ α -helix 4 ส่วน และส่วนของ β -strand 5 ส่วน ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน Mr-ALF1 ของกิ้งก่ากรมที่มีส่วนของ α -helix 3 ส่วน และส่วนของ β -strand 4 ส่วน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) ที่มีความยาวทั้งสิ้น 366 bp นี้มาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน ทำให้ได้ลำดับของกรดอะมิโนที่มีความยาวทั้งสิ้น 121 Residues หลังจากนั้นทำการหาตำแหน่งของ Putative signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) ซึ่งสามารถแบ่งโครงสร้างของโปรตีนออกเป็นส่วนของ Putative signal peptide จำนวน 20 Residues และเป็นส่วนของ Mature peptide อีก 101 Residues (ภาพที่ 12) เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้พบว่ามีการดัดแปลงกรดอะมิโน Cysteine (C) จำนวน 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งของกรดอะมิโนในลำดับที่ 53 และ 74 ซึ่งกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองตำแหน่งนี้จะพบอยู่ในส่วนของ Mature peptide โดยกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองจะสามารถจับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide และยังพบว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 53 ถึงตำแหน่งที่ 74 นี้จัดเป็นตำแหน่งของ LPS binding motif ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนทั้งสิ้น 22 Residues เช่นเดียวกับ cDNAs ของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 อีกทั้งยังพบตำแหน่งของ Glycosylation site คือ Asn-Pro-Thr หรือ NPT (โดยที่ Asn คือกรดอะมิโน Asparagine, Pro คือกรดอะมิโน Proline และ Thr คือกรดอะมิโน Threonine) จำนวน 1 ตำแหน่ง ตรงบริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 89 ถึง 91 เช่นเดียวกับลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF2) และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF3 แล้วพบว่าโปรตีนของ ALF3 ของกิ้งก่ามกราคมนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14,038.2 Da และมีค่า Theoretical isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.82 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)

```

1   GTCGTCCGTCGGTTGAAGACCCGTATCTCTCTTGGGAAGACCGAAGGATTTAATTATCAAG   60
61  TGTATGTAAGTATATAAATCTTTGTGTTTGTCTCACTTTGTCTGCGATTAAACTTCCTTTT   120
121 AAAAGTCGCGTGACTGTTACCAAGATGCAGAAGATCCCAGCGTTGATTCTGGGCCTTTTT   180
(1)           M Q K I P A L I L G L F           (12)

181 TTCGTCTTCTCCGTGGCCAGGGGAAGCCTATAGATTGGTCAGACATCTTAAAGTCTACT   240
(13) F V F S V A Q G K P I D W S D I L K S T   (32)

241 TTCGAGTTCACCAGAAGTCAGTTGTATGTCCAGGGAGACATGGAACCTCTGGACCATTAC   300
(33) F E F T R S Q L Y V Q G D M E L L D H Y   (52)

301 TGCATATACAAGAGGACTGGCTACTTCTACAAGTGGGAGTTGCATTACAAAGCAGAAGTG   360
(53) C I Y K R T G Y F Y K W E L H Y K A E V   (72)

361 AGGTGCCCCAGGCTGGACTAACATCATCGGCACTGCAAAGAACCACAAGAACCCAACGACG   420
(73) R C P G W T N I I G T A K N H K N P T T   (92)

421 GCCGAGAGAGAAGCTACGGTGGACTTTGTTCGAAAAGTGATCGCTGCAGGCATAGTGACG   480
(93) A E R E A T V D F V R K V I A A G I V T   (112)

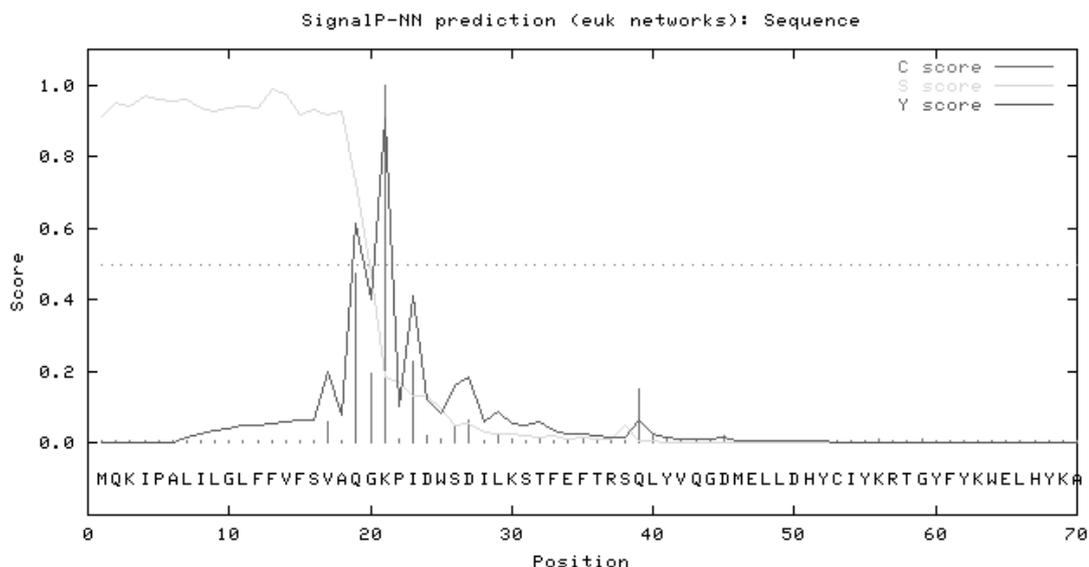
481 GAGGAAGAGGCACTGCCCTGGTTTGTGTGAGGACATCACCCGTACGCCATCAGTTGTGGG   540
(113) E E E A L P W F V *   (121)

541 AGGAATGAATATATGGGTTAAGACGGAGATATTTTCTTGGTATGACTGTCATGGAATAGA   600
601 TGAAAAATCCACTTTTTTCCCATGTAGTATAGTTCAATGGATAGAGTTCCAGATTCTATGA   660
661 TTGTTACTTTTACAGAGCCCATTCCATTTCTTCTTCTACAGACTGTCTTGTAATAATGCA   720
721 GATTATACAGAATGACTATCAATCAGTGGTGTACCCGAAAATACACAATTTGTTAATCAT   780
781 AATAAAACACTTTCTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF3 ของกุ้ง

ก้ามกราม (Mr-ALF3) โดยวงกลมแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteines จำนวน 2 ตำแหน่ง กรอบสี่เหลี่ยมแสดงถึงตำแหน่งของ Glycosylation จำนวน 1 ตำแหน่ง ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงส่วนของ Putative signal peptide ตัวอักษรที่หนาแสดงถึงส่วนของ LPS binding motif และตัวอักษรที่เป็นตัวเอียงที่หนาแสดงถึงตำแหน่งของ Polyadenylation signal (AATAAA)



ภาพที่ 12 ตำแหน่ง Putative signal peptide ของลำดับของกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน ALF3 ของกิ้งก่ามกราคม (Mr-ALF3) โดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)

เมื่อทำการทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 (Secondary structure) จาก PSIPRED Protein Structure Prediction Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) พบว่าโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน ALF3 ของกิ้งก่ามกราคมจะประกอบด้วยส่วนที่เป็น α -helix (H) จำนวน 4 ส่วน ส่วนที่เป็น β -strand (E) จำนวน 5 ส่วนและโครงสร้างส่วนที่เหลือจะเป็นส่วนของ Random coil (C) (ภาพที่ 13) โดยส่วนของโครงสร้างที่เป็น α -helix นั้น จะอยู่ในส่วนปลายทางด้าน 5' ตรงบริเวณที่เป็น Putative signal peptide และพบอยู่ตรงบริเวณปลายทางด้าน 3' อีก 2 ตำแหน่ง ซึ่งบริเวณที่อยู่ตรงกลางระหว่างโครงสร้างของ α -helix ทั้งสองนี้จะเป็นส่วนของ β -strand และ Random coil โดยในบริเวณดังกล่าวจะมีตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine อยู่ คือ ตำแหน่งที่ 53 และตำแหน่งที่ 74 จับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide ทำให้โครงสร้างของโปรตีน Mr-ALF3 เป็น Amphipathic loop เช่นเดียวกับยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม และเมื่อทำการพิจารณาเฉพาะบริเวณส่วนของ Mature peptide จะพบว่ามีส่วนของ α -helix 3 ส่วน และส่วนของ β -strand 5 ส่วน ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ของกิ้งก่ามกราคมที่ได้ทำการศึกษาไว้ข้างต้น

กรดอะมิโน Tryptophan (W) จำนวน 2 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Threonine (T) จำนวน 2 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Isoleucine (I) จำนวน 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Alanine (A) จำนวน 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Aspartic acid (D) จำนวน 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Phenylalanine (F) จำนวน 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Lysine (K) จำนวน 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Valine (V) จำนวน 1 ตำแหน่งและกรดอะมิโน Glutamic acid (E) จำนวน 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 14) ซึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms นี้ยังพบบริเวณที่มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น (W/R)CPGWT ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณของ Consensus pattern คือ (W/T)CP(G/S)W(T/A) ที่ได้มีการรายงานไว้ใน Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) (Li *et al.*, 2008) และ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) (Rosa *et al.*, 2008) เป็นต้น

Mr-ALF1	-----MVGVMTSLLPTEAQQGWEVVAAVAIAEGLWVDDQMVFL	41
Mr-ALF2	MRTSVIISALLGLAIVGILTPRTEAQQVADLVGGLTEGGLVDALTSRIVGLWRTGDIVFL	60
Mr-ALF3	-----MQKIPALILGLFFVFSVAQGKPIDWSDILKSTFEFTRSQLYVQGMELLL	49
 * *	
Disulfide bridge		
Mr-ALF1	GHTCQYSVNPKIKRFELYFKGRMWCPGWITIRGEAETRSRSGVVTK-TTQDFVRKAFQSG	100
Mr-ALF2	DHVCSEFQVEPNLRKLLLYFDGTFWCPGWTPKGEALTRSNSSVVNK-AVQDFLQKALASG	119
Mr-ALF3	DHYCIYKRTGYFYKWEIHYKAEVRCPGWITLIGTAKNHKNPTTAEREATVDFVRKVIAAG	109
	* * * * * * * * * * * * * * * * * . . . *	
Mr-ALF1	IVTEEQARVWLNK	114
Mr-ALF2	LVTESESRWLKH-	132
Mr-ALF3	IVTEEEALPWFV--	121
	. * * * *	

ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms เส้นตรงที่ปรากฏเป็นการแสดงลักษณะของการเกิดพันธะ Disulfide ระหว่างกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองตำแหน่ง (*) คือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน ส่วน (.) คือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูง อักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงบริเวณที่เป็นส่วนของ Putative signal peptides

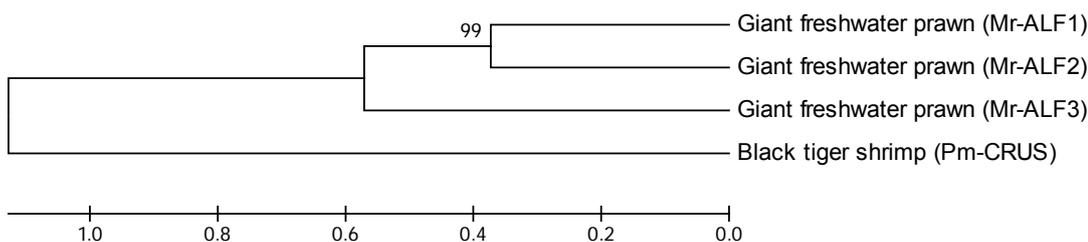
เมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF1 มีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF2 มากกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF3 เนื่องจากค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) ระหว่าง Mr-ALF1 กับ Mr-ALF2 มีค่าเท่ากับ 57.5% ส่วนลำดับของกรดอะมิโนที่มีการศึกษาทั้งค่าความ

เหมือนกันและค่าความคล้ายคลึงกันนั้น พบว่าลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF1 มีความเหมือนและความคล้ายคลึงกันกับลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF2 มากกว่าลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF3 เช่นเดียวกับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องมาจากค่าความเหมือนกันของลำดับของกรดอะมิโน (Amino acid identity) และค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโนระหว่าง Mr-ALF1 กับ Mr-ALF2 มีค่าเท่ากับ 44.4% และ 57.9% ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรามทั้งสาม Isoforms

Versus	Identities		Similarity (%)
	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	
Mr-ALF1 vs Mr-ALF2	57.5	44.4	57.9
Mr-ALF1 vs Mr-ALF3	51.1	33	46.5
Mr-ALF2 vs Mr-ALF3	49.4	28.2	46.7

และเมื่อทำการศึกษาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรามทั้งสาม Isoforms โดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 (<http://www.mega-software.net>) ตามวิธี UPGMA โดยกำหนดให้ค่าการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง พบว่า Mr-ALF1 มีความใกล้ชิดกับ Mr-ALF2 มากกว่า โดย Mr-ALF3 นี้จะแยกออกจาก 2 Isoforms แรกอย่างชัดเจน ซึ่งผลจากการศึกษาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรามทั้งสาม Isoforms (ภาพที่ 15) ในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาการเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรามทั้งสาม Isoforms ที่ได้ทำการศึกษาไว้ในขั้นต้น



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms

4. การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน และการศึกษา ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

4.1 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustacean ชนิดอื่น ๆ ที่มีการบันทึกไว้ใน GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งได้แก่ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); DQ793214, Fleishy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*); AY859500, Pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*); EF601051, EF601052, EF601053 และ EF601054, American lobster (*Homarus americanus*); EU625516 และ EU625517, Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*); P07086, White shrimp (*Litopenaeus schmitti*); DQ991357, Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*); DQ010421, Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*); DQ208701, DQ208702 และ DQ208703, Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*); AB210110, Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*); EU289220, Signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*); EF523760, Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); EU617325 และ EF523562, Mud crab (*Scylla paramamosain*); EF207786, Mud crab (*Scylla serrata*); FJ013272 และ Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*); AF227150 ตามลำดับ

โดยเริ่มจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษา มาทำการถอดรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน หลังจากนั้นทำการตัดตำแหน่งของ Putative signal peptide ออกโดยใช้โปรแกรม SignalP 3.0

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) แล้วทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.clustal.org>) และ MatGat 2.01 (<http://bitincka.com/ledion/matgat>) เช่นเดียวกับข้อ 3

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ทั้งสาม Isoforms ของกุ้ง ก้ามกรามกับยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Crustacean ชนิดอื่น ๆ พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนจำนวน 4 ชนิด ที่เหมือนกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ได้แก่กรดอะมิโน Cysteine (C)-52, 73 จำนวน 2 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Proline (P)-74 จำนวน 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Tryptophan (W)-76 จำนวน 1 ตำแหน่งและกรดอะมิโน Glycine (G)-81 จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองตำแหน่งที่ Conserved กันนี้จะจับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide ทำให้กรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองเกิดเป็นบริเวณที่เรียกว่า LPS binding motif ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของโปรตีนในกลุ่มนี้ (ภาพที่ 16)

นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่มีความ Conserved กันสูงของลำดับกรดอะมิโนของ ALF ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่เลือกมาทำการศึกษา ซึ่งบริเวณที่มีความ Conserved กันสูงนี้จะเรียกว่า Consensus pattern โดยในสิ่งมีชีวิตบางชนิดจะพบตำแหน่งของกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันออกไปจากลำดับของกรดอะมิโนในตำแหน่ง Consensus pattern ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ได้แก่ตำแหน่ง Consensus pattern ของยีน Mr-ALF3 ของกุ้งก้ามกรามในตำแหน่งของกรดอะมิโน Tryptophan (W) จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Arginine (R) และในตำแหน่งของกรดอะมิโน Tryptophan (W) เช่นเดียวกันของยีน Lst-ALF ของ Blue shrimp จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Threonine (T) ส่วนในตำแหน่งของกรดอะมิโน Glycine (G) ของยีน Lp-ALF ของ Atlantic horseshoe crab และยีน Tt-ALF ของ Chinese horseshoe crab จะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Serine (S) เช่นเดียวกัน และในตำแหน่งของกรดอะมิโน Threonine (T) ของยีน PI-ALF ของ Signal crayfish จะถูกกรดอะมิโน Alanine (A) แทนที่ในตำแหน่งดังกล่าว (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ Consensus pattern ของกุ้งก้ามกรามและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustacean ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทำการศึกษา

Scientific names	Common names	Isoforms	Consensus pattern
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Giant freshwater prawn	Mr-ALF1	WCPGWT
		Mr-ALF2	WCPGWT
		Mr-ALF3	RCPGWT
<i>Eriocheir sinensis</i>	Chinese mitten crab	Es-ALF	WCPGWT
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Fleshy prawn	Fc-ALF	WCPGWT
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp	Fp-ALF1	WCPGWT
		Fp-ALF2	WCPGWT
		Fp-ALF3	WCPGWT
		Fp-ALF4	WCPGWT
<i>Homarus americanus</i>	American lobster	Ha-ALF1	WCPGWT
		Ha-ALF2	WCPGWT
<i>Limulus polyphemus</i>	Atlantic horseshoe crab	Lp-ALF	WCPSWT
<i>Litopenaeus schmitti</i>	White shrimp	Lsc-ALF	WCPGWT
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Blue shrimp	Lst-ALF	TCPGWT
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp	Lv-ALFaak	WCPGWT
		Lv-ALFavr	WCPGWT
		Lv-ALFvvr	WCPGWT
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Kuruma prawn	Mj-ALF	WCPGWT
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Bristled river shrimp	Mo-ALF	WCPGWT
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Signal crayfish	Pl-ALF	WCPGWA
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp	Pm-ALF	WCPGWT
		Pm-ALF3	WCPGWT
<i>Scylla paramamosain</i>	Mud crab	Sp-ALF	WCPGWT
<i>Scylla serrata</i>	Mud crab	Ss-ALF	WCPGWT
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Chinese horseshoe crab	Tt-ALF	WCPSWT

Mr-ALF1	-----MVGVMTSSLLPT-CEAQQWEVV-AAVAEKIAGLWVDDQMVF	40
Mr-ALF2	MRTSVIIISALLGLAIVGILTPRTEAQGVADLVGGLTEGGL-VDALTSRIVGLWRTGDIVF	59
Mr-ALF3	-----MQKIPALILGLFFVFSVAQGKPIDWSDILKSTFEFTRSQLYVQGMEL	48
Es-ALF	-----MARLSLFLLVAVAVFTPNIPQCEAGWLDRIIGTAVDSVAEFGTTNI	47
Fc-ALF	-----MRVSVL-ASLVLVVSLVALFAPQ-CQAQQWEAV-AAAVAVKIVGLWRNEKTEL	50
Fp-ALF1	-----MRVSVL-TSLVLAVFVVPFAPQ-CQAQQWQAV-AAAVASKIVGLWRNEETEL	50
Fp-ALF2	-----LWRNEETEL	9
Fp-ALF3	-----WEAV-AAAVGSKIVGLWRNEETEL	23
Fp-ALF4	-----LWRNEETEL	9
Ha-ALF1	-----MRQSVL-VSVLVVSLVTTITPQ-CNAQQWAAV-AAAVASKVVLWQNGHVDL	50
Ha-ALF2	-----MRQCVLLVSVLVVGVLLAPFAPQ-CHAQQWETL-VAGVSSQLVSLWHQGELEL	51
Lp-ALF	-----DGIWTQLIFTLVKLNATLWQSGDFQF	26
Lsc-ALF	-----MRVSVL-TSLVVAVFLVALFAPQ-CQAQQWQAV-AAAVASKIVGLWRNEETEL	50
Lst-ALF	-----MGLSSTFVSAVLVVALVAPLAPP-CHGFSLKDLFVVPVIKDVSDLWRTGDIDL	52
Lv-ALFaak	-----MRVSVL-TSLVVAFLVALFAPQ-CQAQQWQAV-AAAVASKIVGLWRNEETEL	50
Lv-ALFavr	-----MRVSVL-TSLVVAVFLVALFAPQ-CQAQQWQAV-AAAVASKIVGLWRNEETEL	50
Lv-ALFvvr	-----MRVSVL-TSLVVVFLVALFAPQ-CQAQQWQAV-AAAVASKIVGLWRNEETEL	50
Mj-ALF	-----MMRVSV--TSMILVVVAAAFAFK-CHAQQWEAL-VPAAIEKLTGLWENGELEL	50
Mo-ALF	-----MKVSVV-FSVVMVGIMTSSLLPT-CEAQQWEAV-AAVAEKIAGLWVNDHVMVF	50
Pl-ALF	-----MRTWVLVTVLSLVVVLQQP-CQAQVPEV-VSLIISKLVNLSWSDGQVEF	47
Pm-ALF	-----M-RVSVLVVSLVALFAPQ-CQAQQWEAV-AAAVASKIVGLWRNEKTEL	45
Pm-ALF3	-----MRVSVL-VSLVLVSLVALFAPQ-CQAQQWEAV-AAAVASKIVGLWRNEKTEL	50
Sp-ALF	-----MRTKVM-AGLCVALVVMCLYMPQPCQAQ-YEAL-VASILGKLSGLWHSDDTVDF	50
Ss-ALF	-----MRTRVM-AGLCVALVVMCLYMPQPCQAQ-YEAL-VASILGKLSGLWHSDDTVDF	50
Tt-ALF	-----MEGGIWTQLALALVKNLTLWQSGDFQF	28

	Disulfide bridge	
Mr-ALF1	LGHTCQYSVNPYIKRFELYFKGRMWCPCGWTTIRGEAETRSRSGVVTKITQ-DFVRKAFQS	99
Mr-ALF2	LDHVCSEFQVEPNLRKLLLYFDGTFWCPGWTPIKGEALTRSNSVNVKAVQ-DFLQKALAS	118
Mr-ALF3	LDHYCIYKRTGYFYKWEHYKAEVRCPCGWTTIIGTAKNHKNPTTAEREAATVDFVRKVIAA	108
Es-ALF	VDQICNTRVMPYIKRFELYFRGRVWCPCGWTTIQGESLTRSRTRVNVKAVE-DFARKAVAA	106
Fc-ALF	LGHECKFTVKPYIKRFQLYYKGRMWCPCGWTAIRGEAKTRSRSGVAGRTAK-DFVRKAFQ	109
Fp-ALF1	LGHKCRFTVKPYIKRIQLYYRGMWCPCGWTPIRGEASTRSHSGVAGRTAR-DFVQKAFRD	109
Fp-ALF2	LGHKCRFTVKPYIKRIQLYYRGMWCPCGWTPIRGEASTRSHSGVAGRTAR-DFVQKAFRD	68
Fp-ALF3	LGHKCRFTVKPYIKRIQLYYRGMWCPCGWTPIRGEASTRSHSGVAGK-----	70
Fp-ALF4	LGHKCRFTVKPYIKRIQLYYRGMWCPCGWTPIRGEASTRSHSGVAGRTAR-DFVQKAFRD	68
Ha-ALF1	LDHPCRFVSKPTVRRFQLYFKGRMWCPCGWTSIRGEAKTRSRSGVVGKTTT-DFVNKAFQA	109
Ha-ALF2	MGHYCNFQVQPKIRRWQLYFVGSWMCPCGWTTIRGSAQTSRSGVVGKTTT-DFVRKAFRA	110
Lp-ALF	LDHECHYRIKPTFRRLKWKYKGFVWCPWTSITGRATKSSRSGAVEHSVR-NFVGQAKSS	85
Lsc-ALF	LGHKCRFTVKPYIKRLQLNYKGMWCPCGWTTITGEARTRSHSGVAGRTAR-DFVQKAHER	109
Lst-ALF	VGHSCTYNVKPDIQGFELYFVGSVTCPCGWTTIRGESNTRSKSGVNSAVK-DFIQKALKA	111
Lv-ALFaak	LGHKCRFTVKPYIKRLQLNYKGMWCPCGWTTIKGEARTRSHSGVAGRTAR-DFVEKAHER	109
Lv-ALFavr	LGHKCRFTVKPYIKRLQLNYKGMWCPCGWTTIRGEARTRSHSGVAGRTAR-DFVEKAHER	109
Lv-ALFvvr	LGHKCRFTVKPYIKRLQLNYKGMWCPCGWTTIRGEARTRSHSGVAGRTAR-DFVEKAHER	109
Mj-ALF	LGHYCNFYVEPKFRNWQLRFKGRMWCPCGWTTIKGEADTRSRSGVVGKTIQ-DFVKKAFSQ	109
Mo-ALF	LGHTCQYSVTPRIKLELWFKGRMWCPCGWTAIRGEADTRSRSGVVTKITQ-DFVRKAFES	109
Pl-ALF	MGHTCNYSYSPTISKFLYYKGMWCPCGWAPFSGNSKTKSRAGSIEHATR-DFVTKAIDQ	106
Pm-ALF	LGHECKFTVKPYLKRQVYKGRMWCPCGWTAIRGEASTRSGVAGKTAK-DFVRKAFQK	104
Pm-ALF3	LGHECKFTVKPYLKRQVYKGRMWCPCGWTAIRGEASTRSGVAGKTAK-DFVRKAFQK	109
Sp-ALF	MGHTCHIRRRPKFRKFLYHEGKFWCPGWTHLEGNSRTKSRSGSARDAIK-DFVYKALQN	109
Ss-ALF	MGHTCHIRRRPKFRKFLYHEGKFWCPGWTHLEGNSRTKSRSGSTREATK-DFVHKALQN	109
Tt-ALF	LGHECHYRVNPTVKRLKWKYKGFVWCPWTSITGRATKSSRSGAVEHSVR-DFVGQAKSS	87
	... * ** *	

Consensus pattern

Mr-ALF1	GIVTEEQARVWLNSK-	114
Mr-ALF2	GLVTESESRAWLKH--	132
Mr-ALF3	GIVTEEEALPWFV---	121
Es-ALF	GLMTQEDANPLLNA--	120
Fc-ALF	GLISQQANQWLNS--	123
Fp-ALF1	GLISEQDAKRWLNS--	123
Fp-ALF2	GLISEQDAKRWLNS--	82
Fp-ALF3	-----	70
Fp-ALF4	GLISEQDAKRW----	79
Ha-ALF1	GLITERDAQQWLSH--	123
Ha-ALF2	GLITQQDAQEWLDN--	124
Lp-ALF	GLITQRQAEQFISQYN	101
Lsc-ALF	GLISEQDAKRWLSS--	123
Lst-ALF	GLVTEEEAKPHLV---	124
Lv-ALFaak	GLISEQDAKRWLN---	122
Lv-ALFavr	GLISEQDAKRWLN---	122
Lv-ALFvvr	GLISEQDAKRWLN---	122
Mj-ALF	GLITEEEARAWLSQ--	123
Mo-ALF	GIVTEAQAKAWLNSK-	124
Pl-ALF	KLITAEQASAWIKN--	120
Pm-ALF	GLISQQEANQWLSS--	118
Pm-ALF3	GLISQQEANQWLSS--	123
Sp-ALF	KLITENNAAWLKG--	123
Ss-ALF	KLITKNSADAWLKG--	123
Tt-ALF	GLITEKEAQTFISQYQ	103
	

ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามกับลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ โดยที่ Es-ALF คือ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); DQ793214, Fc-ALF คือ Fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*); AY859500, Fp-ALF1, Fp-ALF2, Fp-ALF3 และ Fp-ALF4 คือ Pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*); EF601051, EF601052, EF601053 และ EF601054 ตามลำดับ Ha-ALF1 และ Ha-ALF2 คือ American lobster (*Homarus americanus*); EU625516 และ EU625517, Lp-ALF คือ Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*); P07086, Lsc-ALF คือ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*); DQ991357, Lst-ALF คือ Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*); DQ010421, Lv-ALFvvr, Lv-ALFavr และ Lv-ALFaak คือ Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*); DQ208701, DQ208702 และ DQ208703 ตามลำดับ Mj-ALF คือ Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*); AB210110, Mo-ALF คือ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*); EU289220, Pl-ALF คือ Signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*); EF523760, Pm-ALF และ Pm-ALF3 คือ Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); EU617325 และ EF523562, Sp-ALF คือ Mud crab (*Scylla paramamosain*); EF207786, Ss-ALF คือ Mud crab (*Scylla serrata*); FJ013272 และ Tt-ALF คือ Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*); AF227150 เส้นตรงที่ปรากฏเป็นการแสดงลักษณะของการเกิดพันธะ Disulfide ระหว่างกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองตำแหน่ง

กรอบสี่เหลี่ยม คือบริเวณตำแหน่งของ Consensus pattern ส่วน (*) คือ ตำแหน่งของ กรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน และ (.) คือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูง

การศึกษาความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) ของ cDNA ของ Mr-ALF1, Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 ของกุ้งก้ามกรามกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ ซึ่งได้แก่ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); DQ793214, Fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*); AY859500, Pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*); EF601051, EF601052, EF601053 และ EF601054, American lobster (*Homarus americanus*); EU625516 และ EU625517, Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*); P07086, White shrimp (*Litopenaeus schmitti*); DQ991357, Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*); DQ010421, Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*); DQ208701, DQ208702 และ DQ208703, Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*); AB210110, Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*); EU289220, Signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*); EF523760, Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); EU617325 และ EF523562, Mud crab (*Scylla paramamosain*); EF207786, Mud crab (*Scylla serrata*); FJ013272 และ Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*); AF227150 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) ของ cDNA ของยีน Mr-ALF1 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ข้างต้น มีค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 45.5-90.3% โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Bristled river shrimp (Mo-ALF) มากที่สุดถึง 90.3% รองลงมาคือ Fleshy prawn (Fc-ALF) เท่ากับ 70% และ Black tiger shrimp (Pm-ALF) เท่ากับ 66.7% ตามลำดับ และเมื่อทำการพิจารณาถึงลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF1 พบว่ามีค่าความเหมือนกันของลำดับของกรดอะมิโน (Amino acid identity) อยู่ระหว่าง 30.0-85.9% โดยพบว่ายังมีความเหมือนกันกับลำดับของกรดอะมิโนของ Bristled river shrimp (Mo-ALF) มากที่สุดถึง 85.9% รองลงมาคือ Fleshy prawn (Fc-ALF) เท่ากับ 65.7% และ American lobster (Ha-ALF1) เท่ากับ 64.6% ตามลำดับ ส่วนการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโน (Amino acid similarity) ของยีน Mr-ALF1 มีค่าอยู่ระหว่าง 48.5-92.9% โดยมีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนของ Bristled river shrimp (Mo-ALF) มากที่สุดถึง 92.9% รองลงมาคือ Fleshy prawn (Fc-ALF) เท่ากับ 81.8% และ Black tiger shrimp (Pm-ALF และ Pm-ALF3) เท่ากับ 80.8% ตามลำดับ (ตารางที่ 8) โดยค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับ

ของกรดอะมิโนที่สูงสุดใน 2 อันดับแรก คือ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) และ Fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*) จะสอดคล้องกับค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และค่าความเหมือนกันของลำดับของกรดอะมิโนใน 2 อันดับแรกเช่นเดียวกัน

และการศึกษาความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน Mr-ALF2 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ที่ได้รายงานไว้ข้างต้น พบว่ามีค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 43.3-59.1% โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ White shrimp (Lsc-ALF) มากที่สุดถึง 59.1% รองลงมาคือ Kuruma prawn (Mj-ALF) เท่ากับ 59% และ American lobster (Ha-ALF1) เท่ากับ 58.1% ตามลำดับ และเมื่อทำการพิจารณาถึงลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF2 พบว่ามีค่าความเหมือนกันของลำดับของกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 27.5-48.6% โดยพบว่ามีค่าความเหมือนกันกับลำดับของกรดอะมิโนของ Kuruma prawn (Mj-ALF) มากที่สุดถึง 48.6% รองลงมาคือ American lobster (Ha-ALF1) เท่ากับ 46.7% และ Bristled river shrimp (Mo-ALF) เท่ากับ 45.4% ตามลำดับ ส่วนการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF2 มีค่าอยู่ระหว่าง 44.9-62.6% โดยมีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนของ American lobster (Ha-ALF1 และ Ha-ALF2) และ Blue shrimp (Lst-ALF) มากที่สุดถึง 62.6% รองลงมาคือ Pink shrimp (Fp-ALF1) และ Bristled river shrimp (Mo-ALF) เท่ากับ 60.7% และ Pacific white shrimp ทั้ง 3 Isoforms (Lv-ALFvvr, Lv-ALFavr และ Lv-ALFaa) และ White shrimp (Lsc-ALF) เท่ากับ 59.8% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ส่วนการศึกษาความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน Mr-ALF3 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ดังกล่าวเช่นกัน พบว่ามีค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 38.2-54.3% โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ American lobster (Ha-ALF2) มากที่สุดถึง 54.3% รองลงมาคือ Kuruma prawn (Mj-ALF) เท่ากับ 53.7% และ Chinese mitten crab (Es-ALF) เท่ากับ 53.4% ตามลำดับ และเมื่อทำการพิจารณาถึงลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF3 พบว่ามีค่าความเหมือนกันของลำดับของกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 18.8-34.0% โดยพบว่ามีค่าความเหมือนกันกับลำดับของกรดอะมิโนของ Bristled river shrimp (Mo-ALF) มากที่สุดถึง 34.0% รองลงมาคือ Blue shrimp (Lst-ALF) เท่ากับ 32.7% และ Kuruma prawn (Mj-ALF) เท่ากับ 32.4% ตามลำดับ ส่วนการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF3 มีค่าอยู่ระหว่าง 31.7-53.5% โดยมีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนของ American lobster (Ha-ALF2) มากที่สุดถึง 53.5% รองลงมาคือ Mud crab (Ss-

ALF) เท่ากับ 52.5% และ Mud crab (Sp-ALF) และ Blue shrimp (Lst-ALF) เท่ากับ 51.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ซึ่งจากการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้ง 3 Isoforms กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ข้างต้น พบว่ายีน Mr-ALF3 จะให้ค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ความเหมือนกันและความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีบันทึกไว้แล้วใน GenBank database ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ความเหมือนกันและความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ที่ทำการเปรียบเทียบกับ ALF ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF1 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ

Scientific names	Common names	Accession number	Identity (%)		Similarity (%)
			Nucleotide	Amino acid	
<i>Eriocheir sinensis</i>	Chinese mitten crab (Es-ALF)	DQ793214	56.8	41.4	59.6
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Fleshy prawn (Fc-ALF)	AY859500	70.0	65.7	81.8
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF1)	EF601051	66.0	58.6	78.8
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF2)	EF601052	56.7	45.5	65.7
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF3)	EF601053	48.7	43.4	53.5
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF4)	EF601054	55.0	44.4	62.6
<i>Homarus americanus</i>	American lobster (Ha-ALF1)	EU625516	64.7	64.6	79.8
<i>Homarus americanus</i>	American lobster (Ha-ALF2)	EU625517	60.3	53.5	74.7
<i>Limulus polyphemus</i>	Atlantic horseshoe crab (Lp-ALF)	P07086	-	30.0	48.5
<i>Litopenaeus schmitti</i>	White shrimp (Lsc-ALF)	DQ991357	65.7	56.6	77.8
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Blue shrimp (Lst-ALF)	DQ010421	54.8	42.0	66.7
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFvvr)	DQ208701	66.0	58.6	76.8
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFavr)	DQ208702	66.3	58.6	76.8

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Scientific names	Common names	Accession number	Identity (%)		Similarity (%)
			Nucleotide	Amino acid	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFaak)	DQ208703	65.7	57.6	76.8
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Kuruma prawn (Mj-ALF)	AB210110	64.0	60.6	77.8
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Bristled river shrimp (Mo-ALF)	EU289220	90.3	85.9	92.9
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Signal crayfish (Pl-ALF)	EF523760	58.4	43.4	63.6
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp (Pm-ALF)	EU617325	66.7	61.6	80.8
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp (Pm-ALF3)	EF523562	66.3	61.6	80.8
<i>Scylla paramamosain</i>	Mud crab (Sp-ALF)	EF207786	56.1	42.4	62.6
<i>Scylla serrata</i>	Mud crab (Ss-ALF)	FJ013272	57.2	42.4	64.6
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Chinese horseshoe crab (Tt-ALF)	AF227150	45.5	35.0	54.5

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF2 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ

Scientific names	Common names	Accession number	Identity (%)		Similarity (%)
			Nucleotide	Amino acid	
<i>Eriocheir sinensis</i>	Chinese mitten crab (Es-ALF)	DQ793214	55.5	40.2	58.9
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Fleshy prawn (Fc-ALF)	AY859500	57.3	38.3	55.1
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF1)	EF601051	57.9	42.1	60.7
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF2)	EF601052	50.0	34.6	51.4
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF3)	EF601053	43.3	34.3	44.9
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF4)	EF601054	48.5	34.6	50.5
<i>Homarus americanus</i>	American lobster (Ha-ALF1)	EU625516	58.1	46.7	62.6
<i>Homarus americanus</i>	American lobster (Ha-ALF2)	EU625517	56.3	42.1	62.6
<i>Limulus polyphemus</i>	Atlantic horseshoe crab (Lp-ALF)	P07086	-	27.5	45.8
<i>Litopenaeus schmitti</i>	White shrimp (Lsc-ALF)	DQ991357	59.1	42.1	59.8
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Blue shrimp (Lst-ALF)	DQ010421	56.5	43.9	62.6
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFvvr)	DQ208701	57.9	41.1	59.8
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFavr)	DQ208702	57.6	40.2	59.8

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Scientific names	Common names	Accession number	Identity (%)		Similarity (%)
			Nucleotide	Amino acid	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFaak)	DQ208703	57.6	40.2	59.8
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Kuruma prawn (Mj-ALF)	AB210110	59.0	48.6	59.8
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Bristled river shrimp (Mo-ALF)	EU289220	57.9	45.4	60.7
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Signal crayfish (Pl-ALF)	EF523760	50.8	31.8	53.3
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp (Pm-ALF)	EU617325	56.4	41.1	56.1
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp (Pm-ALF3)	EF523562	56.7	41.1	56.1
<i>Scylla paramamosain</i>	Mud crab (Sp-ALF)	EF207786	51.7	37.4	56.1
<i>Scylla serrata</i>	Mud crab (Ss-ALF)	FJ013272	52.8	36.4	57.0
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Chinese horseshoe crab (Tt-ALF)	AF227150	44.9	29.4	44.9

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF3 กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ

Scientific names	Common names	Accession number	Identity (%)		Similarity (%)
			Nucleotide	Amino acid	
<i>Eriocheir sinensis</i>	Chinese mitten crab (Es-ALF)	DQ793214	53.4	29.4	49.5
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	Fleshy prawn (Fc-ALF)	AY859500	49.2	30.4	47.5
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF1)	EF601051	48.6	28.4	47.5
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF2)	EF601052	42.7	27.5	43.6
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF3)	EF601053	38.2	18.8	31.7
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	Pink shrimp (Fp-ALF4)	EF601054	42.8	28.7	44.6
<i>Homarus americanus</i>	American lobster (Ha-ALF1)	EU625516	50.5	29.4	48.5
<i>Homarus americanus</i>	American lobster (Ha-ALF2)	EU625517	54.3	31.4	53.5
<i>Limulus polyphemus</i>	Atlantic horseshoe crab (Lp-ALF)	P07086	-	22.1	38.6
<i>Litopenaeus schmitti</i>	White shrimp (Lsc-ALF)	DQ991357	51.4	30.4	48.5
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Blue shrimp (Lst-ALF)	DQ010421	51.3	32.7	51.5
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFvvr)	DQ208701	51.3	29.7	47.5
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFavr)	DQ208702	51.3	29.7	47.5

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Scientific names	Common names	Accession number	Identity (%)		Similarity (%)
			Nucleotide	Amino acid	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (Lv-ALFaak)	DQ208703	51.3	29.7	47.5
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Kuruma prawn (Mj-ALF)	AB210110	53.7	32.4	49.5
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Bristled river shrimp (Mo-ALF)	EU289220	48.1	34.0	43.6
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Signal crayfish (Pl-ALF)	EF523760	51.4	29.1	47.5
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp (Pm-ALF)	EU617325	49.0	28.4	45.5
<i>Penaeus monodon</i>	Black tiger shrimp (Pm-ALF3)	EF523562	48.7	28.4	45.5
<i>Scylla paramamosain</i>	Mud crab (Sp-ALF)	EF207786	52.7	25.5	51.5
<i>Scylla serrata</i>	Mud crab (Ss-ALF)	FJ013272	52.2	26.5	52.5
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Chinese horseshoe crab (Tt-ALF)	AF227150	44.5	23.1	37.6

4.2 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ Mr-ALF1, Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 ของกุ้งก้ามกรามกับยีนในกลุ่มของ AMP ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ ที่มีบันทึกไว้ใน GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งได้แก่ยีน Anti-lipopolysaccharide factor (ALF) ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ Es-ALF คือ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); DQ793214, Fc-ALF คือ Fleishy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*); AY859500, Fp-ALF1, Fp-ALF2, Fp-ALF3 และ Fp-ALF4 คือ Pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*); EF601051, EF601052, EF601053 และ EF601054, Ha-ALF1 และ Ha-ALF2 คือ American lobster (*Homarus americanus*); EU625516 และ EU625517, Lp-ALF คือ Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*); P07086, Lsc-ALF คือ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*); DQ991357, Lst-ALF คือ Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*); DQ010421, Lv-ALFvvr, Lv-ALFavr และ Lv-ALFaak คือ Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*); DQ208701, DQ208702 และ DQ208703, Mj-ALF คือ Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*); AB210110, Mo-ALF คือ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*); EU289220, PI-ALF คือ Signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*); EF523760, Pm-ALF และ Pm-ALF3 คือ Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); EU617325 และ EF523562, Sp-ALF คือ Mud crab (*Scylla paramamosain*); EF207786, Ss-ALF คือ Mud crab (*Scylla serrata*); FJ013272, Tt-ALF คือ Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*); AF227150 ส่วนยีน Penaeidin (PEN) ได้แก่ Fb-PEN คือ Pinkspotted shrimp (*Farfantepenaeus brasiliensis*); EF450745, Fs-PEN คือ Southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*); EF450742, Pm-PEN คือ Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); AF475082 และ Fc-PEN คือ Fleishy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*); AY669323 และยีน Crustin (CRUS) ได้แก่ Pm-CRUS คือ Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); EF654658, Fc-CRUS คือ Fleishy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*); AY871268, Ls-CRUS คือ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*); EF182748, Fb-CRUS คือ Pinkspotted shrimp (*Farfantepenaeus brasiliensis*); EF601055, Fp-CRUS คือ Pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*); EF182747 และ Fs-CRUS คือ Southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*); EF450744 ตามลำดับ

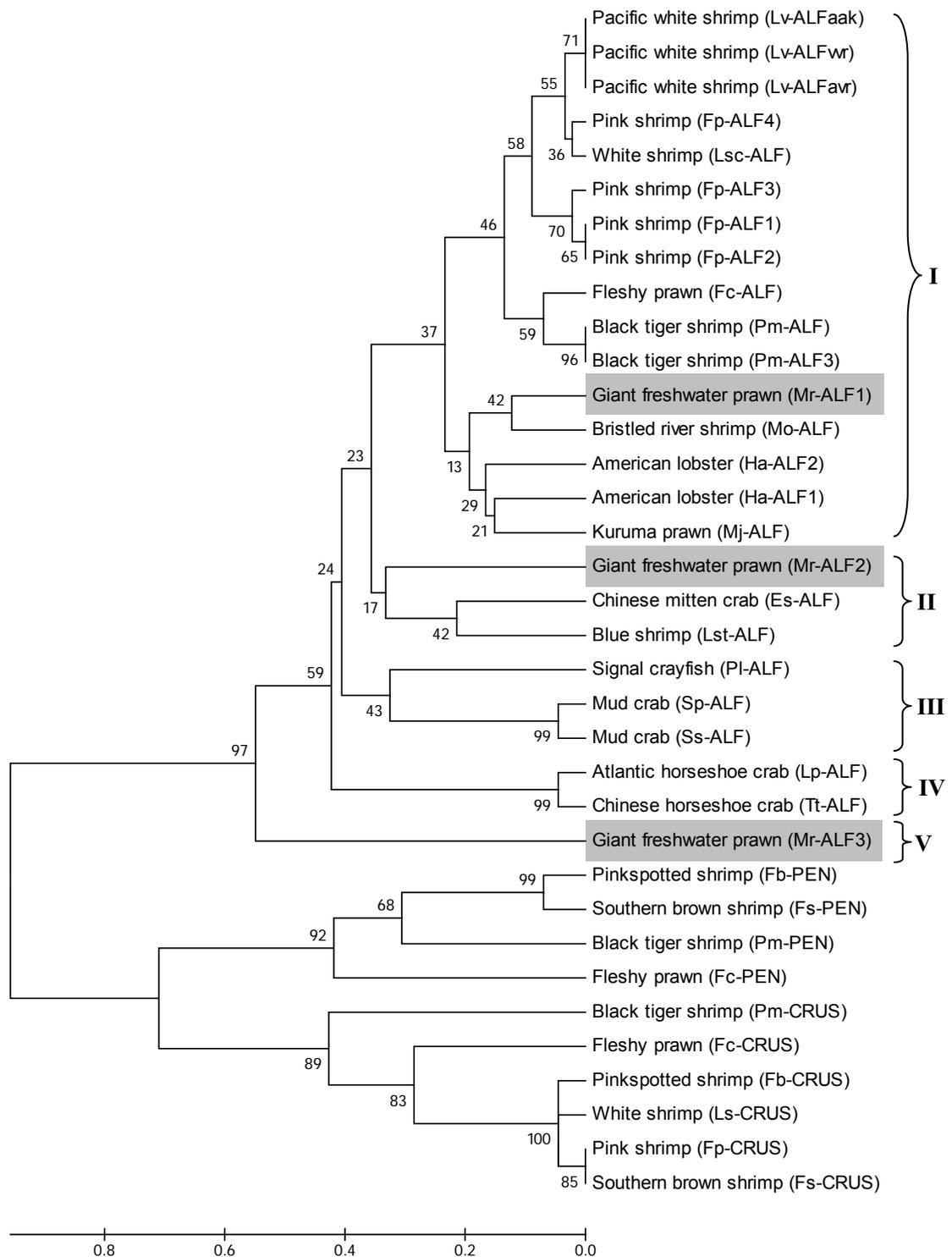
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่มของ AMP ข้างต้น มาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 (<http://www.megasoftware.net>) ตามวิธี UPGMA โดยกำหนดให้

ค่าการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง พบว่า Phylogenetic tree ที่ได้จะแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแยกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่อย่างชัดเจน โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยกลุ่มของยีน ALF ทั้งหมดและกลุ่มที่สองประกอบด้วยกลุ่มของยีน Crustin และยีน Penaeidin ซึ่งทั้งยีน Crustin และยีน Penaeidin นั้น จัดเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของ AMP เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการพิจารณาเฉพาะกลุ่มของยีน ALF ด้วยกันเองพบว่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustacean ที่เลือกมาทำการศึกษาย่อยออกเป็น 5 กลุ่ม โดยในกลุ่มแรกนั้นยังสามารถแบ่งออกกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มย่อย ซึ่งกลุ่มย่อยกลุ่มแรกคือกลุ่มของยีน ALF ของกุ้งทะเลที่อยู่ใน Family Penaeidae ทั้งหมด ส่วนยีน Mr-ALF1 ของกุ้งก้ามกรามถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มย่อยกลุ่มที่ 2 ซึ่งยีน Mr-ALF1 นี้จะมีความใกล้ชิดกับยีน ALF ของ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) มากที่สุด ร่วมกับ American lobster (*Homarus americanus*) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Nephropidae และ Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Penaeidae ทั้งนี้เนื่องจาก Bristled river shrimp จัดเป็นกุ้งน้ำจืดที่อยู่ใน Family Palaemonidae Genus *Macrobrachium* เช่นเดียวกับกุ้งก้ามกราม จึงทำให้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามและ Bristled river shrimp มีความใกล้ชิดกัน อีกทั้งยังสอดคล้องกับผลการศึกษาค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ความเหมือนกันและความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโนที่ได้ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ ที่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน Mr-ALF1 มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ความเหมือนกันและความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโนกับ Bristled river shrimp มากที่สุด

ในส่วนของการศึกษาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Mr-ALF2 ของกุ้งก้ามกรามนั้น พบว่ายีน Mr-ALF2 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของยีน ALF กลุ่มที่ 2 ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนใกล้ชิดกับยีน ALF ของ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) และ Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) มากที่สุด ส่วนการศึกษาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Mr-ALF3 ของกุ้งก้ามกราม ยีน Mr-ALF3 จะจัดอยู่ในกลุ่มของยีน ALF กลุ่มที่ 5 ซึ่ง Mr-ALF3 นี้จะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนแยกออกจากกลุ่มของยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Crustaceans ที่เลือกมาทำการศึกษาอีก 4 กลุ่มอย่างชัดเจน (ภาพที่ 17) จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีน ALF ของสัตว์แต่ละชนิดในกลุ่ม Crustacean จะมีอยู่หลาย Isoforms เช่นใน Pink shrimp พบยีน ALF มากถึง 4 Isoforms คือ Fp-ALF1, Fp-ALF2, Fp-ALF3 และ Fp-ALF4 ส่วน Pacific white shrimp จะพบยีน ALF ถึง 3 Isoforms คือ Lv-ALFaak, Lv-ALFavr และ Lv-ALFvvr และพบยีน ALF ที่มี 2 Isoforms คือยีน ALF ของ Black tiger shrimp (Pm-ALF และ Pm-ALF3) และยีน ALF ของ American lobster คือ Ha-ALF1 และ Ha-ALF2 ซึ่งรวมทั้งยีน ALF ของ

กึ่งก้ามกรามในการศึกษาครั้งนี้ที่มีอยู่ 3 Isoforms ด้วยกัน ซึ่งในแต่ละ Isoform น่าจะมีหน้าที่ในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่แตกต่างกันออกไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Mr-ALF3 นั้น เมื่อพิจารณาถึงข้อมูลของความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการสร้าง Phylogenetic tree แล้ว พบว่า Mr-ALF3 ที่พบในกึ่งก้ามกรามจากการศึกษาครั้งนี้ น่าจะเป็นยีน ALF ชนิดใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนในสัตว์กลุ่ม Crustacean

โดยทั่วไปหน้าที่ในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมของยีน ALF นอกจากจะมีบทบาทในการยับยั้งเจริญเติบโตและต่อต้านการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) แล้ว ยีน ALF ยังมีหน้าที่ในการยับยั้งและต่อต้านการบุกรุกของเชื้อรา (Antifungal activity) เช่นการศึกษาของ Somboonwivat *et al.* (2005) ที่ได้ทำการศึกษาหน้าที่การทำงานของ Recombinant protein ของยีน ALF ของกึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ด้วยวิธี Anti-microbial activity พบว่า Recombinant protein ของยีน ALF (rALFPm3) มีความสามารถในการต่อต้านการบุกรุกของเชื้อราเส้นใย (Filamentous fungi) โดยพบว่ามีค่า MIC ในเชื้อราเส้นใยทั้ง *Fusarium oxysporum* และ *Penicillium crustosum* มีค่าเท่ากับ 1.56-3.12 และ 12.5-25 ไมโครโมล ตามลำดับ ซึ่งกลไกในการต่อต้านเชื้อราเส้นใยของ rALFPm3 ของกึ่งกุลาดำคาดว่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของกระบวนการ Spore germination หรือทำให้ Hyphae เกิดการเจริญเติบโตช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ de la Vega *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน ALF ของ Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) โดยทำการ Knockdown ยีน LvALF และทำการเปรียบเทียบอัตราการตายเมื่อทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Fusarium oxysporum* 7.5×10^5 Spores กับกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ พบว่าในกลุ่มทดลองจะมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ Mr-ALF1, Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 กับยีน AMP ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Crustaceans ชนิดอื่น ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ใน GenBank database ซึ่ง Es-ALF คือ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); DQ793214, Fc-ALF คือ Fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*); AY859500, Fp-ALF1, Fp-ALF2, Fp-ALF3

และ Fp-ALF4 คือ Pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*); EF601051, EF601052, EF601053 และ EF601054, Ha-ALF1 และ Ha-ALF2 คือ American lobster (*Homarus americanus*); EU625516 และ EU625517, Lp-ALF คือ Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*); P07086, Lsc-ALF คือ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*); DQ991357, Lst-ALF คือ Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*); DQ010421, Lv-ALFvvr, Lv-ALFavr และ Lv-ALFaak คือ Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*); DQ208701, DQ208702 และ DQ208703, Mj-ALF คือ Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*); AB210110, Mo-ALF คือ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*); EU289220, Pi-ALF คือ Signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*); EF523760, Pm-ALF และ Pm-ALF3 คือ Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); EU617325 และ EF523562, Sp-ALF คือ Mud crab (*Scylla paramamosain*); EF207786, Ss-ALF คือ Mud crab (*Scylla serrata*); FJ013272 และ Tt-ALF คือ Chinese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*); AF227150 เป็นต้น

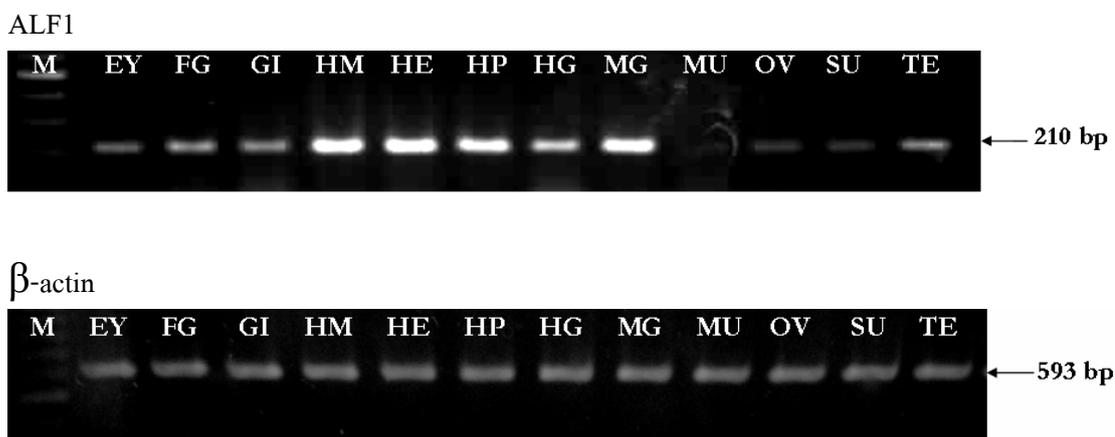
5. การศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ในส่วนของการศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม จะทำการศึกษาเฉพาะ Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 เท่านั้น เนื่องจาก Mr-ALF3 เพิ่งถูกค้นพบในช่วงหลังของการศึกษาจึงไม่ได้นำมาทำการศึกษาของการแสดงออกเช่นเดียวกับสอง Isoforms แรก

5.1 การศึกษาการแสดงออกของ Mr-ALF1 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม

จากการศึกษาการแสดงออกของ Mr-ALF1 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามปกติ ซึ่งได้แก่ก้านตา (Eyestalk), เหงือก (Gills), อวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad), หัวใจ (Heart), ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas), ทางเดินอาหารส่วนต้น (Foregut), ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut), ทางเดินอาหารส่วนท้าย (Hindgut), กล้ามเนื้อ (Muscle) และเนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือก (Subcuticular epithelium) รวมทั้งเม็ดเลือด (Haemocytes) โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าการแสดงออกของ Mr-ALF1 มีการแสดงออกมากที่สุดในเม็ดเลือด หัวใจ ทางเดินอาหารส่วนกลางและตับและตับอ่อน และเนื้อเยื่อกลุ่มที่มีการแสดงออกรองลงมาคือทางเดินอาหารส่วนต้น ทางเดินอาหารส่วนท้าย อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเหงือก ส่วนกลุ่มของเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกเบาบางคือ ก้านตา อวัยวะ

สืบพันธุ์เพศเมียและเนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก ส่วนกล้ามเนื้อนั้นเป็นอวัยวะเดียวที่ไม่พบการแสดงออกเลย โดยการศึกษาในครั้งนี้จะใช้การแสดงออกของยีน β -actin ที่เป็น Internal control ซึ่งพบการแสดงออกในทุก ๆ อวัยวะของกุ้งก้ามกราม (ภาพที่ 18)



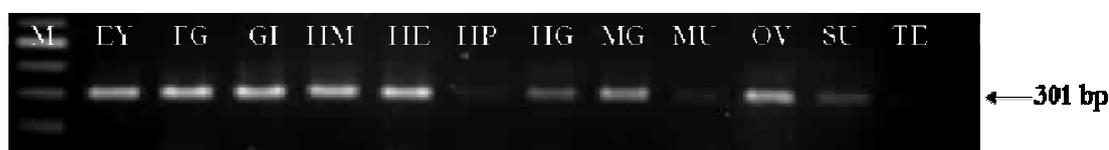
ภาพที่ 18 การแสดงออกของ Mr-ALF1 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย M คือ 100 bp ladders marker, EY คือ ก้านตา (Eyestalk), FG คือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (Foregut), GI คือ เหงือก (Gills), HM คือ เม็ดเลือด (Haemocytes), HE คือ หัวใจ (Heart), HP คือ ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas), HG คือ ทางเดินอาหารส่วนท้าย (Hindgut), MG คือ ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut), MU คือ กล้ามเนื้อ (Muscle), OV คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (Ovary), SU คือ เนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก (Subcuticular epithelium) และ TE คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Testis) ตามลำดับ

5.2 การศึกษาการแสดงออกของ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม

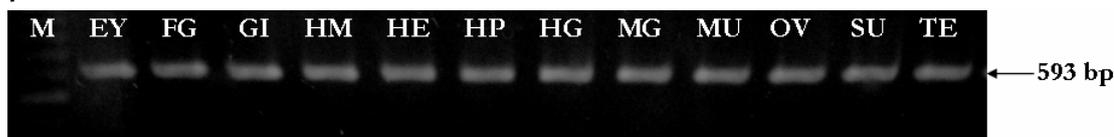
จากการศึกษาการแสดงออกของ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามปกติ ซึ่งได้แก่ก้านตา (Eyestalk), เหงือก (Gills), อวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad), หัวใจ (Heart), ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas), ทางเดินอาหารส่วนต้น (Foregut), ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut), ทางเดินอาหารส่วนท้าย (Hindgut), กล้ามเนื้อ (Muscle) และเนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก (Subcuticular epithelium) รวมทั้งเม็ดเลือด (Haemocytes) โดยใช้เทคนิค RT-PCR เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ Mr-ALF2 กับ Mr-ALF1 พบว่า Mr-ALF2 มีการแสดงออกค่อนข้างเบาบางกว่าและยังพบว่ามีรูปแบบการแสดงออกที่ต่างไปจากการแสดงออกของ Mr-ALF1 อย่างเห็นได้ชัด โดย

พบว่า Mr-ALF2 มีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อที่ได้จากก้านตา ทางเดินอาหารส่วนต้น เหนืออก เม็ดเลือดและหัวใจ ส่วนกลุ่มของเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกรองลงมาคือทางเดินอาหารส่วนท้าย ทางเดินอาหารส่วนกลางและอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และกลุ่มของเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกเบาบางคือตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้นั้นจะไม่พบการแสดงออกเลย โดยการศึกษาในครั้งนี้จะใช้การแสดงผลของยีน β -actin ที่เป็น Internal control ซึ่งพบการแสดงออกในทุก ๆ อวัยวะของกุ้งก้ามกราม (ภาพที่ 19)

ALF2



β -actin



ภาพที่ 19 การแสดงออกของ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย M คือ 100 bp ladders marker, EY คือ ก้านตา (Eyestalk), FG คือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (Foregut), GI คือ เหนืออก (Gills), HM คือ เม็ดเลือด (Haemocytes), HE คือ หัวใจ (Heart), HP คือ ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas), HG คือ ทางเดินอาหารส่วนท้าย (Hindgut), MG คือ ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Midgut), MU คือ กล้ามเนื้อ (Muscle), OV คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (Ovary), SU คือ เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก (Subcuticular epithelium) และ TE คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Testis) ตามลำดับ

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามข้างต้นนั้น พบว่ายีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 จะมีการแสดงออกในเกือบทุกอวัยวะของกุ้งก้ามกราม แต่อวัยวะที่มีการแสดงออกมากที่สุดของยีนทั้งสองชนิดนี้ คือ เม็ดเลือดและหัวใจ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ทำการศึกษารหัสแสดงออกของยีน ALF ของ Mud crab (*Scylla paramamosain*) ในอวัยวะต่าง ๆ พบว่ายีน Sp-ALF มีการแสดงออกมากที่สุดใน Haemocytes,

ถ้าได้และกล่ามนี้อีก ตามลำดับ (Imjongjirak *et al.*, 2007) ส่วนในการศึกษาของ Somboonwivat *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษาระยะยาวของการแสดงออกของยีน ALF ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry พบว่าอวัยวะที่พบมีโปรตีนของยีน Pm-ALF3 มากที่สุด คือ Haemocytes และในการศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ของกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านมา ยังพบเช่นกันว่า Haemocytes จะเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ALF มากที่สุด (Supungul *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Nagoshi *et al.*, 2006)

ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าอวัยวะหลักที่มีหน้าที่ในการผลิตโปรตีนของยีน ALF คือกลุ่มของเซลล์ Haemocytes เนื่องจาก Haemocytes ที่หมุนเวียนอยู่ในร่างกายเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีหน้าที่หลักในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ Cellular และ Humoral immune response ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustacean ซึ่งเมื่อเกิดการติดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย ร่างกายของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม Crustacean จะมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมด้วยการทำงานของหลาย ๆ กระบวนการร่วมกัน เช่น การแข็งตัวของเลือด (Blood clotting) และการทำงานของโปรตีนบางชนิดในกระบวนการ Prophenoloxidase สามารถทำให้เกิดการสร้าง Melanin (Melanin formation หรือ Melanization) และเกิดกระบวนการ Opzonization ซึ่งเป็นระบบการป้องกันตัวที่พบได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไปเช่นกัน (ชัยชาญ, 2545 อ้างถึง Lackie, 1980) นอกจากนี้ Haemocytes ของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ยังมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการสังเคราะห์สารในกลุ่มของ AMP อีกด้วย (จารุวรรณ, 2550) โดยเมื่อเกิดการหลั่งโปรตีนของยีน ALF ออกมา โปรตีนของยีน ALF ยึดจับกับโครงสร้างของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ทำให้เซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมไม่สามารถที่จะยึดเกาะกับเซลล์ภายในร่างกายได้ (เสาวลักษณ์, 2550) อีกทั้งยังสามารถทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเกิดเป็นรู ส่งผลทำให้เกิดการ Lysis ของเซลล์ตามมา (Bachère, 2000; Hancock and Sahl, 2006) ด้วยเหตุผลจากการศึกษาดังกล่าวจึงเป็นหลักฐานที่ใช้ยืนยันได้ว่ายีน ALF เป็นยีนที่มีคุณสมบัติในการป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมภายในระบบหมุนเวียนโลหิตที่มีความสำคัญมากในสัตว์ในกลุ่ม Crustacean (Zhoa and Wang, 2006)

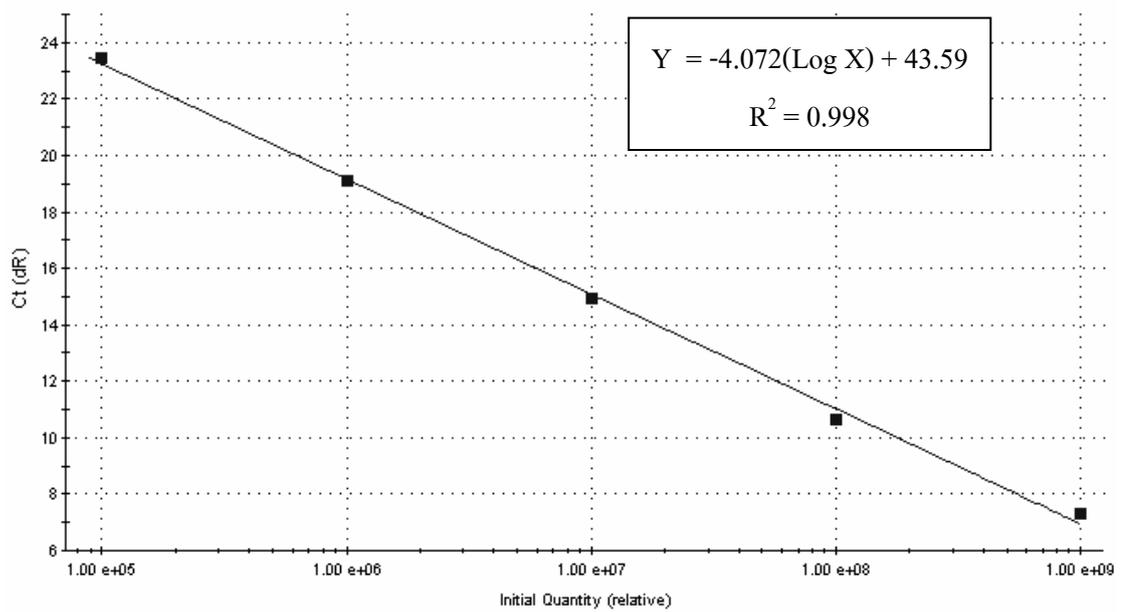
6. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ALF ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และสาร β -glucan โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกรามข้างต้น ทำให้ทราบว่าเม็ดเลือดเป็นกลุ่มเซลล์หลักที่มีการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 มากที่สุด ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ALF ของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และสาร β -glucan ในการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกเอาเม็ดเลือดมาใช้เป็นกลุ่มเซลล์หลักในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ALF ซึ่งในการศึกษาจะทำการศึกษาเฉพาะ Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 เท่านั้น

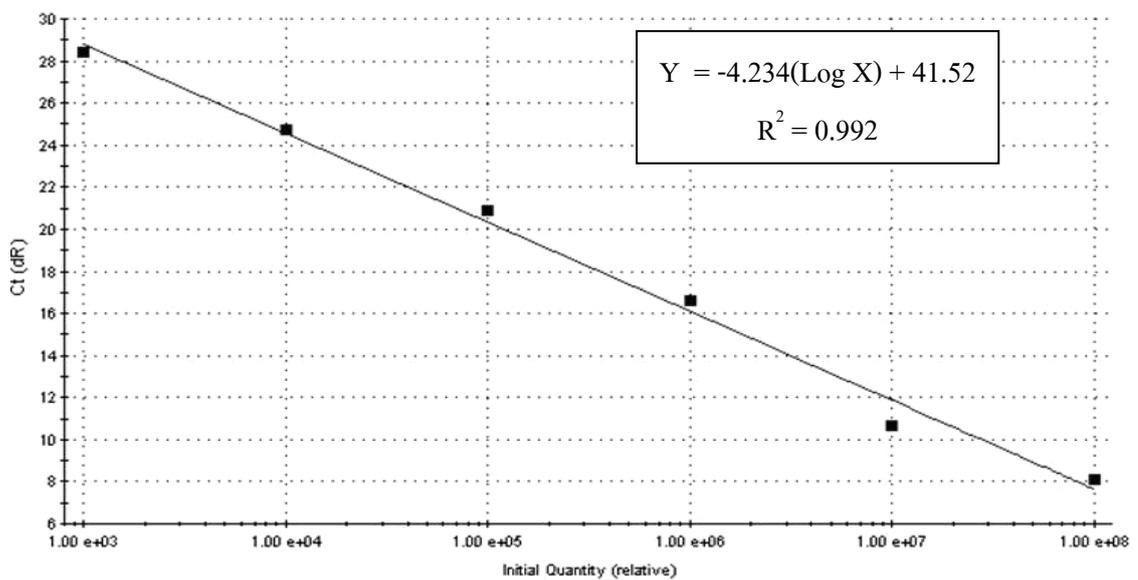
การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และสาร β -glucan ในครั้งนี้จะใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR ในการศึกษา โดยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR นั้นจำเป็นที่จะต้องสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) ของยีนแต่ละชนิดที่นำมาทำการศึกษาก่อน เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาค่า PCR Efficiency จากสูตร

$$\text{PCR Efficiency (E)} = 10^{(-1/\text{slope})}$$

ซึ่งค่า PCR Efficiency (E) ที่ดีควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.60-2.10 (Pfaffl, 2004) โดยค่า PCR Efficiency (E) ของยีน Mr-ALF1 ของกุ้งก้ามกรามที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 1.76 และค่า PCR Efficiency (E) ของยีน Mr-ALF2 ของกุ้งก้ามกรามมีค่าเท่ากับ 1.72 (ภาพที่ 20 และภาพที่ 21 ตามลำดับ)



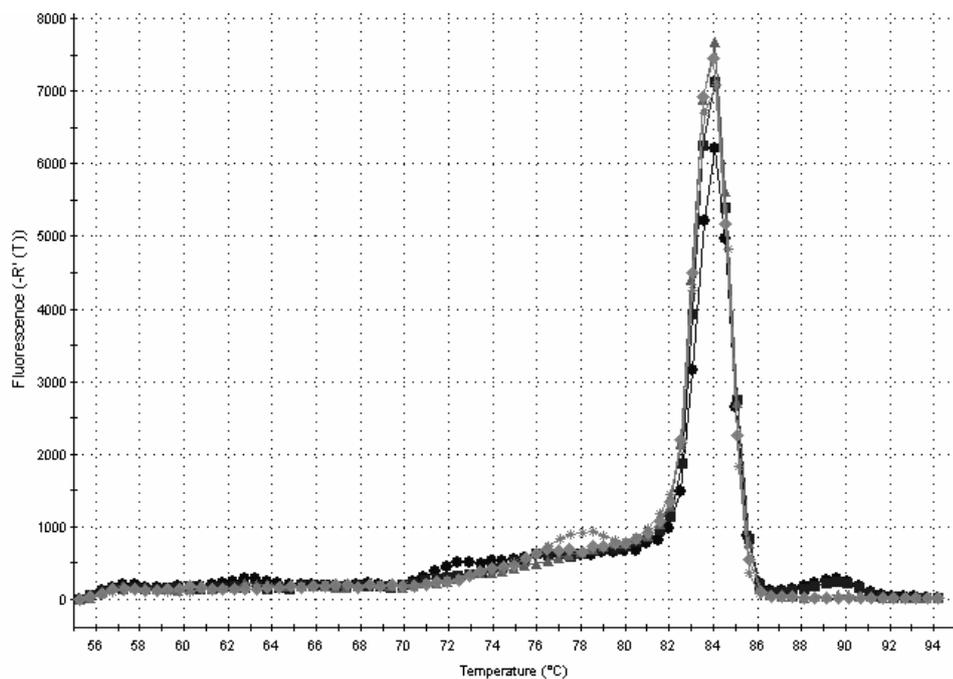
ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 ของ กุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR



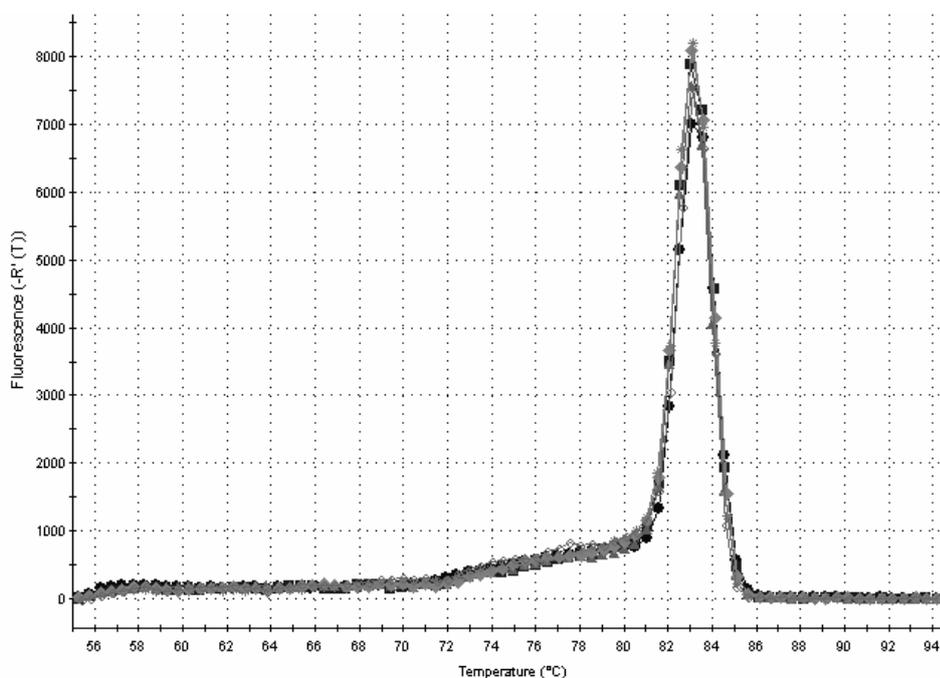
ภาพที่ 21 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ของ กุ้งก้ามกราม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรมโดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR นั้น นอกจากจะทำการพิจารณากราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของยีนที่นำมาทำการศึกษาแล้ว ยังต้องทำการพิจารณา Dissociation curve เพื่อให้ทราบความจำเพาะเจาะจงของผลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR โดยจะทำการพิจารณาจากอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลว (Melting temperature หรือ T_m) ที่ควรมีจุดสูงสุดเพียง 1 จุดเท่านั้น เพราะในการเพิ่มจำนวนของ DNA ที่เกิดขึ้นจะต้องเป็นกระบวนการที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและต้องไม่มีการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนอื่นใด (Non-specific product) หรือจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจาก Primer dimers (กุลยา, 2547)

ซึ่งเมื่อทำการพิจารณา Dissociation curve ของ Specific primers ของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ของกิ้งก่ามกรมที่นำมาทำการศึกษาทั้งสอง พบว่า Dissociation curve ของ Primers ที่จำเพาะต่อยีน Mr-ALF1 ของกิ้งก่ามกรมที่ได้จากการศึกษามีอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลวเท่ากับ 84 องศาเซลเซียส และไม่มีส่วนของ Primer dimers เกิดขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Primers ที่ใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 [ALF1 (2) F และ ALF1 (2) R Primers] ของกิ้งก่ามกรมนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน Mr-ALF1 เท่านั้น (ภาพที่ 22) ส่วน Dissociation curve ของ Specific primers ของยีน Mr-ALF2 ของกิ้งก่ามกรมมีอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลวเท่ากับ 83 องศาเซลเซียส และไม่มีส่วนที่เป็น Primer dimers เกิดขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Primers ที่ใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 [ALF2 (1) F และ ALF2 (1) R Primers] ของกิ้งก่ามกรมนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน Mr-ALF2 เช่นเดียวกับยีน Mr-ALF1 เท่านั้นเช่นกัน (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 22 Dissociation curve ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 ของกิ้งก่ามกราคม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

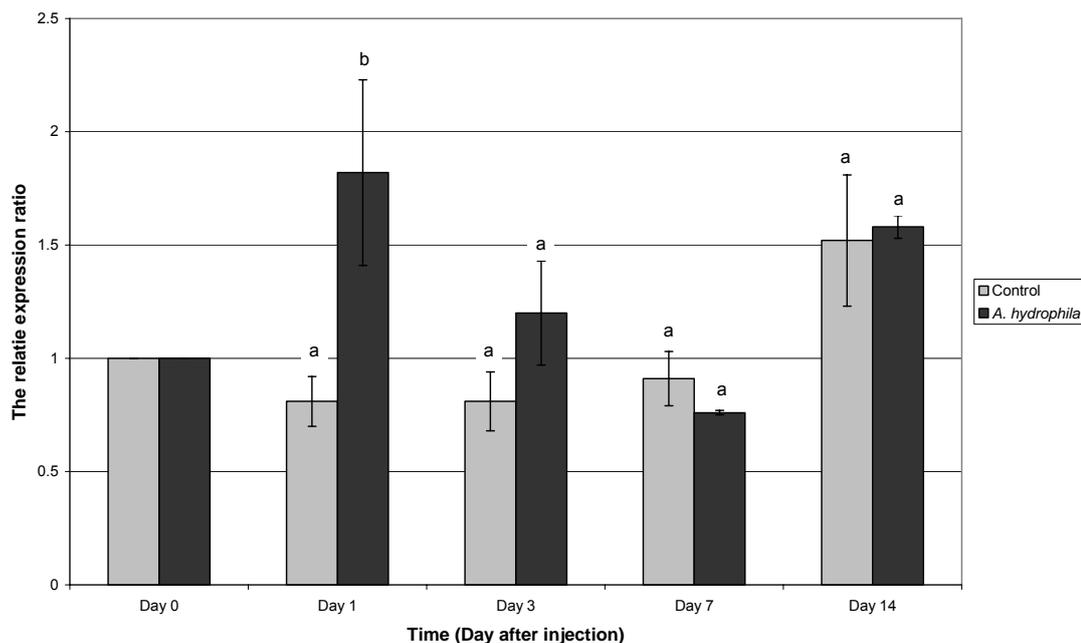


ภาพที่ 23 Dissociation curve ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ของกิ้งก่ามกราคม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

6.1 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

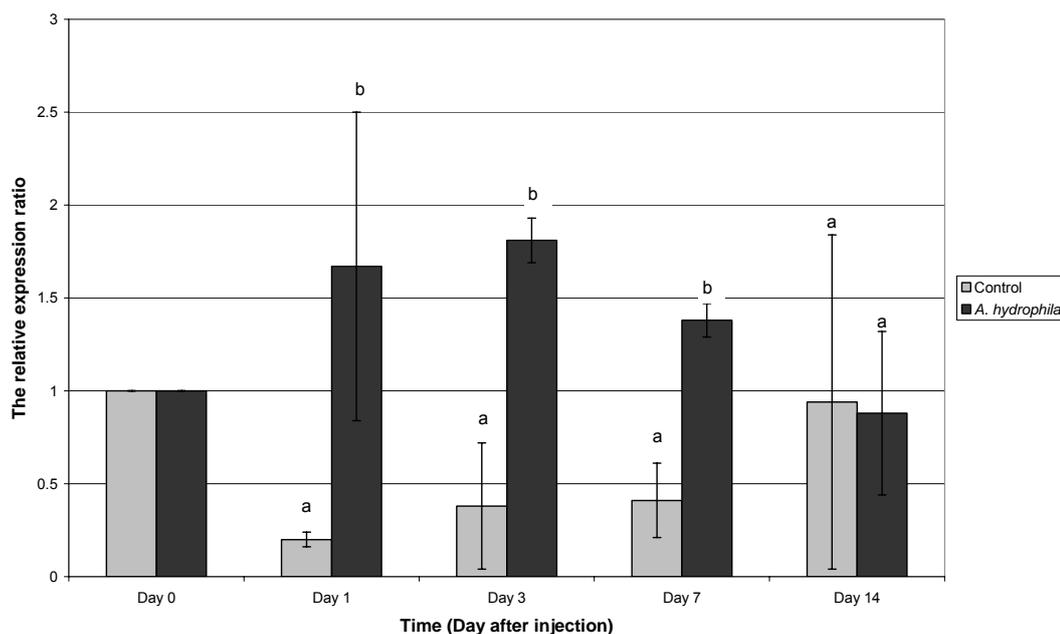
จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย 1×10^6 CFU พบว่าการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 หลังจากทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* แล้วเป็นเวลา 1 วัน มีระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 เพิ่มขึ้น โดยค่า Relative expression ratio ของกลุ่มทดลองมีค่าเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับการฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% เพียงอย่างเดียวประมาณ 2 เท่า ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) และในระยะเวลาต่อมา ระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 จะมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อยในวันที่ 3 และวันที่ 7 โดยไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ของค่า Relative expression ratio ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ส่วนในวันที่ 14 ของการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 จะเพิ่มสูงขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ของค่า Relative expression ratio ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับวันที่ 3 และวันที่ 7 ตามลำดับแต่อย่างใด (ภาพที่ 24)

ส่วนการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย 1×10^6 CFU เช่นเดียวกัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 จะมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 1 และวันที่ 3 ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า Relative expression ratio ของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม พบว่าค่า Relative expression ratio ของกลุ่มทดลองจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 8 เท่าและ 4 เท่าตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ในวันที่ 7 จะมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อย โดยค่า Relative expression ratio ของกลุ่มทดลองยังมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 3 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามในวันที่ 14 ระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 จะมีการแสดงออกของยีนลดต่ำลง แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า Relative expression ratio ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ระหว่างกุ้งทั้งสองกลุ่ม (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 24 การแสดงออกของยีน Mr-ALF1 ในเม็ดเลือดของกึ่งก้ามกราม ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) ที่ทำการฉีดน้ำเกลือ 0.85% [อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)]

ผลของการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกึ่งก้ามกราม ภายหลังจากทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ขึ้นต้น ได้แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 จะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุมประมาณ 2 เท่า ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ของกึ่งก้ามกรามในวันที่ 1, 3 และ 7 ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* นั้นจะมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) มีค่าประมาณ 8, 4 และ 3 เท่า ตามลำดับ



ภาพที่ 25 การแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ในเมื่อดเลือดของกึ่งก้ามกราม ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) ที่ทำการฉีดน้ำเกลือ 0.85% [อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)]

จากการศึกษาดังกล่าวเมื่อทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ของกึ่งก้ามกรามด้วยการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* เข้าในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งก้ามกรามจะมีกลไกในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immune response) อาศัยการทำงานร่วมกันอย่างใกล้ชิดของระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (Cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำในเลือด (Humoral immunity) โดยระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำในเลือดนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการหลั่งโปรตีนในกลุ่มของยีน AMP ออกมา รวมทั้งโปรตีนอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้โปรตีนเหล่านี้ในการต่อต้านและยับยั้งทำงานของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ซึ่ง ALF จัดเป็นโปรตีนในกลุ่มของยีน AMP เช่นเดียวกัน อีกทั้งยังมีคุณสมบัติเป็น Cationic ที่ทำหน้าที่ในการจับและยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแกรมลบ ชนิด R อย่างรุนแรง (Morita *et al.*, 1985) ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ของกึ่งก้ามกรามจึงคัดเลือกเอาเชื้อ *A. hydrophila* มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าว เนื่องจาก *A. hydrophila* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มี Lipopolysaccharide (LPS) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ส่วนใหญ่ ซึ่งโปรตีนของยีน ALF จะเข้าจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบตรงบริเวณส่วนของ Lipid A

และส่วนของ Oligosaccharide ที่มีประจุลบของหมู่ฟอสเฟต 2 หมู่ (Ren *et al.*, 2008) จึงทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเกิดเป็นรูและส่งผลให้เกิดการ Lysis ของเซลล์เชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมตามมา (Bachère, 2000; Hancock and Sahl, 2006) และระยะเวลาที่เซลล์เม็ดเลือดใช้ในการหลั่งโปรตีนของยีน ALF ออกมาเพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาภายในร่างกายนั้นจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะสังเกตได้จากระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในวันที่ 1 ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2 เท่าและ 8 เท่า ตามลำดับ โดยการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ALF ของ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*, Es-ALF) โดยทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีน Es-ALF ด้วยการฉีดเชื้อ *Vibrio anguillarum* และใช้เทคนิค Quantitative real-time RT-PCR ในการศึกษา พบว่ายีน Es-ALF จะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 2 ประมาณ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดในชั่วโมงที่ 12 คือประมาณ 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน จึงอาจสรุปได้ว่ายีน ALF เป็นยีนที่มีความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าไปในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว หรือที่เรียกว่า “Acute-phase protein” โดยเฉพาะช่วงแรก ๆ ของการป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม

เช่นเดียวกับการศึกษาของ de Lorgeril *et al.* (2008) ซึ่งทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนในกลุ่ม AMP และประสิทธิภาพในการคัดเลือกกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อ *Vibrio* โดยทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม AMP ได้แก่ Penacidin 2 (PEN2), PEN3, ALF, Crustin, Lysozyme และ Putative cysteine-rich peptide เป็นต้น ซึ่งจะทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยการแช่เชื้อ *Vibrio penaeicida* สายพันธุ์ AM101 ที่มีความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1×10^3 CFU ใน Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) ทั้งสองกลุ่มโดยกลุ่มแรกคือกุ้งปกติ (กลุ่มควบคุม) ส่วนกลุ่มที่สองคือกุ้งที่รอดตายจากการติดเชื้อ *Vibrio* มาแล้ว (กลุ่มคัดเลือก) และผลของการใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR พบว่าเมื่อทำการแช่กุ้งทดลองด้วยเชื้อ *Vibrio penaeicida* แล้ว การแสดงออกของยีน ALF ของกลุ่มควบคุมจะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นและสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 และการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะลดต่ำลงในชั่วโมงที่ 24 ส่วนการแสดงออกของยีน ALF ในกลุ่มคัดเลือกพบว่าการแสดงออกของยีนจะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 12 และจะมีการแสดงออกเพิ่มสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งจะแตกต่างจากการแสดงออกของยีน ALF ของกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน

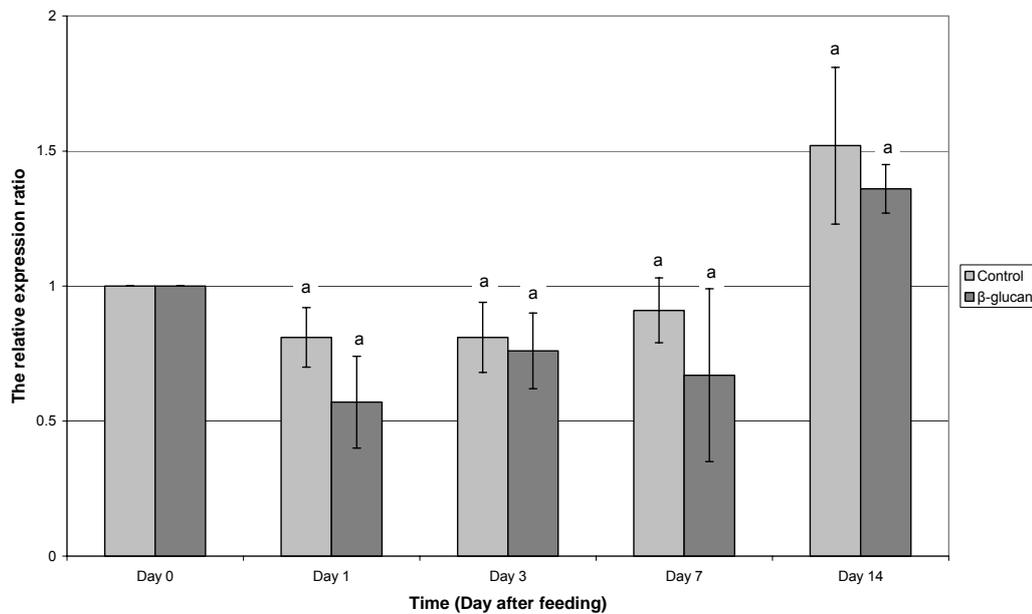
ขณะที่การศึกษาของ Beala *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษาคูณลักษณะและการตอบสนองต่อเชื้อ *Vibrio fluvialis* ของยีน ALF ใน American lobster (*Homarus americanus*) ด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR โดยเมื่อทำการฉีดเชื้อ *Vibrio fluvialis* แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Ha-ALF1 ในเนื้อเยื่อเหงือกจะมีระดับการแสดงออกสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.001$) และไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน Ha-ALF1 ในเม็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \geq 0.001$) ส่วนระดับการแสดงออกของยีน Ha-ALF2 พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการแสดงออกของยีน Ha-ALF2 ทั้งในเม็ดเลือดและเนื้อเยื่อเหงือก เป็นต้น และในการศึกษาการแสดงออกของยีน ALF ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ซึ่งทำการศึกษาคูณลักษณะของการแสดงออกของยีน Pm-ALF2 กับ Pm-ALF3 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยเมื่อทำการฉีดเชื้อ *Vibrio haveyi* แล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ายีน ALF ทั้งสองจะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85% (Thamtada *et al.*, 2008)

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่ายีน Mr-ALF1 จะมีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมในช่วงแรก ๆ ของการศึกษา ซึ่งสังเกตได้จากยีน Mr-ALF1 จะมีการแสดงออกมากในวันที่ 1 ของการศึกษา แต่จะแตกต่างจากการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ที่มีการแสดงออกมากในวันที่ 1 และมีการแสดงออกต่อเนื่องในวันที่ 3 และ 7 ซึ่งจะเห็นว่ายีน Mr-ALF2 จะมีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมในช่วงแรก ๆ และต่อเนื่องไปอีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมโดยการหลั่ง ALF ของกุ้งก้ามกรามนั้น จะมียีน ALF หลาย Isoforms ซึ่งแต่ละ Isoforms จะทำหน้าที่รับผิดชอบในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกันไป

6.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากการให้อาหารผสมสาร β -glucan โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากทำการให้อาหารผสมสาร β -glucan ในอัตรา 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 ของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากให้อาหารผสมสาร β -glucan ในวันที่ 1, 3 และ 7 มีการเปลี่ยนแปลงลดต่ำลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปปกติ ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า Relative expression ratio ของ

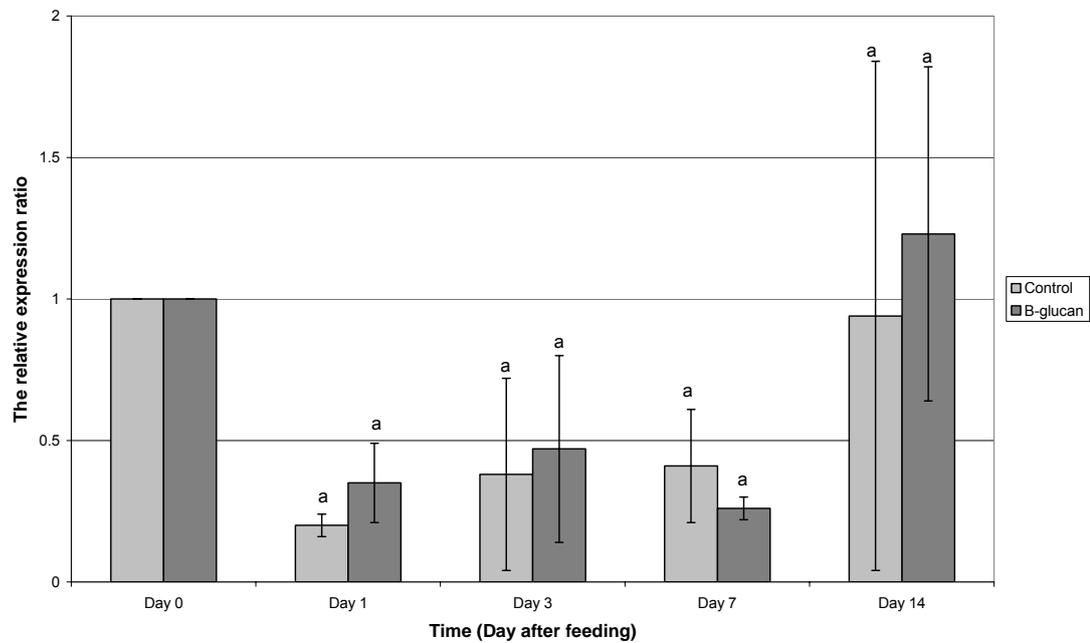
กลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \geq 0.05$) และระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 ในวันที่ 14 จะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างค่า Relative expression ratio ของกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) เช่นเดียวกันกับในวันที่ 1, 3 และวันที่ 7 (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 การแสดงออกของยีน Mr-ALF1 ในเม็ดเลือดของกึ่งก้ามกรามภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นการให้กินอาหารผสมสาร β -glucan 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) ที่ให้กินอาหารกึ่งก้ามกรามสำเร็จรูปปกติ [อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)]

ส่วนการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกึ่งก้ามกรามภายหลังจากการให้กินอาหารผสมสาร β -glucan ในอัตรา 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เช่นเดียวกันพบว่าในวันที่ 1, 3 และ 7 ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยการให้กินอาหารผสมสาร β -glucan แล้วพบระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ในกึ่งทั้งสองกลุ่มจะมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง แต่ในกึ่งทดลองจะมีค่าสูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้กินอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างค่า Relative expression ratio ของกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในวันที่ 14 ของการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 จะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดลองและจะมี

ระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 สูงกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย ซึ่งไม่พบความแตกต่างระหว่างค่า Relative expression ratio ของกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 การแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ในเมื่อดเลือดของกึ่งก้ามกรามภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นการให้กินอาหารผสมสาร β -glucan 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) ที่ให้กินอาหารกึ่งก้ามกรามสำเร็จรูปปกติ [อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)]

ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเมื่อดเลือดของกึ่งก้ามกราม ภายหลังจากให้กึ่งกินอาหารผสมสาร β -glucan ในอัตรา 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR แล้วพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ของกึ่งก้ามกรามทั้งสอง Isoforms มีรูปแบบของการแสดงออกคล้ายคลึงกัน โดยการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 จะลดต่ำลงในวันที่ 1 ภายหลังจากที่ให้กินอาหารผสมสาร β -glucan 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หลังจากนั้นในวันที่ 3 การแสดงออกของยีน ALF ทั้งสอง Isoforms จะเพิ่มสูงขึ้นและกลับมามีการแสดงออกที่ลดต่ำลงอีกครั้งในวันที่ 7 ภายหลังจากที่ให้กินอาหารผสมสาร β -glucan แต่การแสดงออกของยีน ALF ทั้งสอง Isoforms นี้จะกลับมามีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นและเพิ่มสูงที่สุดในวันที่ 14 ภายหลังจากที่ให้กินอาหารผสมสาร β -glucan แต่ก็ไม่แตกต่าง

กันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ทั้งสอง Isoforms ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นกึ่งทดลองด้วยการให้อาหารผสมสาร β -glucan ในครั้งนี้จะสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ที่ให้อาหารผสมสาร β -1, 3-glucan 2 กรัมและ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ เช่น Lysozyme, Crustin และ Penaeidin เป็นต้น ด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR พบว่าทั้งยีน Crustin และยีน Penaeidin ที่จัดเป็นยีนในกลุ่มของ AMP เช่นเดียวกับยีน ALF นั้น จะมีเฉพาะยีน Penaeidin เท่านั้นที่มีการแสดงออกลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 12 ภายหลังจากที่ได้รับกระตุ้นโดยการให้อาหารผสมสาร β -1, 3-glucan ทั้งสองระดับความเข้มข้น ขณะที่การแสดงออกของยีน Crustin ก็มีแนวโน้มของระดับการแสดงออกของยีนที่ลดต่ำลงเช่นเดียวกันแต่ก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P \geq 0.05$) ในชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 12 ส่วนการศึกษาของ Hauton *et al.* (2007) ที่ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันของ Lobster (*Homarus gammarus*) ในระยะ Post-larvar VI ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน Crustin ที่จัดเป็นยีนในกลุ่มของ AMP นั้น มีการแสดงออกของยีนลดต่ำลงในวันที่ 2 และเพิ่มสูงขึ้นจนค่อนข้างคงที่ในวันที่ 8 ของการศึกษา และไม่พบระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ภายหลังจากที่ให้อาหารผสม β -1, 3-glucan 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 36 วัน

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lu *et al.* (2009) ที่ทำการศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ซึ่งทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีน AMP ด้วยการฉีด Lipopolysaccharide ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 1, 0.1 หรือ 0.05 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำการฉีดสารละลาย PBS พบว่าการแสดงออกของยีน AMP ในชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 6 นั้นมีการแสดงออกของยีนลดต่ำลง และจะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 12 ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มควบคุม

นอกจากนี้จากการศึกษาของจรรูวรรณ (2550) ทำการศึกษาผลของการเสริม β -glucan ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ได้รับ β -glucan ในระดับ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยใช้เทคนิค Conventional RT-PCR นั้น พบว่าการแสดงออกของยีน AMP จะมีการแสดงออกลดต่ำลงในวันที่ 1 หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของ

ยีน AMP จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นมากที่สุดในวันที่ 3 และวันที่ 7 และจะมีการแสดงออกลดลงอีกครั้งในวันที่ 10 และวันที่ 14 ตามลำดับ

ซึ่งจากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน ALF ทั้งสอง Isoforms ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และสาร β -glucan ในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าการแสดงออกยีน ALF ทั้งสอง Isoforms ของกุ้งก้ามกรามจะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และเกิดการตอบสนองต่อเชื้อ *A. hydrophila* ที่เข้าสู่ภายในร่างกายอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสอง Isoforms ด้วยสาร β -glucan นั้นไม่พบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) เลย แสดงให้เห็นว่ายีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้ง 2 Isoforms จะมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าสถานะปกติเฉพาะในช่วงเวลาที่มีการติดเชื้อโรครภายในร่างกายเท่านั้น โดยร่างกายจะนำเอาโปรตีน ALF ที่สังเคราะห์ได้มาใช้ต่อต้านและยับยั้งทำงานของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม แต่ในทางตรงกันข้ามระดับการแสดงออกของยีน ALF ของกุ้งในกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมสาร β -glucan จะมีระดับการแสดงออกของยีนไม่มีเปลี่ยนแปลงไปจากสถานะปกติ

โดยทั่วไป β -glucan เป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มของ Polysaccharide ที่แยกได้จากโครงสร้างของผนังเซลล์ของยีสต์และรา และจัดเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดหนึ่งที่มีกลไกการทำงานในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างกว้างขวาง (Vetvicka *et al.*, 2004) ด้วยเหตุนี้จึงคาดว่า β -glucan น่าจะมีส่วนช่วยทำให้ระดับการแสดงออกของยีน ALF เพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม แต่ผลที่ได้จากการศึกษาข้างต้นไม่เป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ เนื่องจากเมื่อให้กุ้งกินอาหารที่ผสม β -glucan แล้วพบว่าระดับการแสดงออกของยีนทั้ง Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 จะไม่พบระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นไปได้ว่า β -glucan มีความสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Degranulation ของเซลล์เม็ดเลือดที่มีการหมุนเวียนอยู่ในกระแสเลือด ซึ่งมีผลให้เกิดการปลดปล่อยสารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเม็ด Granules ออกมาต้านทานเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ซึ่งโดยทั่วไปได้แก่ Prophenoloxidase (proPO), Peroxinectin และ Antimicrobial peptides (Smith *et al.*, 2003; Hauton *et al.*, 2005) แต่ไม่มีส่วนช่วยในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ mRNA Transcription ของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามมากยิ่งขึ้น จึงทำให้ไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน ALF ทั้ง 2 Isoforms ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hauton *et al.* (2005) ที่ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ Prophenoloxidase (proPO), β -1, 3-glucan binding protein (β GBP) และ β -actin (β -act) ใน

Granulocytes ของ European lobster (*Homarus gammarus*) เมื่อนำไปบ่มกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ β -glucan ในชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 24 พบว่าระดับการแสดงออกของยีน proPO เมื่อทำการบ่มด้วยสาร β -glucan 0.0025% จะไม่มีความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ทั้งในชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 24 เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของยีน β GBP ที่เมื่อทำการบ่มด้วยสาร β -glucan 0.0025% ก็ไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน β GBP ในกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมทั้งในชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 24 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอาหารกุ้งมีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่นในการศึกษาของ Chang *et al.* (2000) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ β -glucan ที่สกัดได้จากยีสต์ *Schizophyllum commune* ผสมอาหารในอัตรา 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมที่ให้กินเป็นเวลา 40 วัน พบว่า β -glucan จะสามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมีการเกิดกระบวนการ Phagocytosis กระบวนการในการสร้าง O_2^- และการเกิด Cell adhesion ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.001$) อีกทั้งยังพบว่าการเสริม β -glucan สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันสูงสุดในวันที่ 24 ภายหลังจากเริ่มให้กินอาหารผสม β -glucan

Chang *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาผลของการให้อาหารผสม β -glucan ที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* ในอัตราส่วน 0, 1, 2, 10 และ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้ลูกกุ้งกุลาดำในระยะ Juvenile กินเป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นจะทำการฉีดเชื้อ WSSV และทำการสุ่มเก็บเลือดกุ้งในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 เพื่อตรวจวัด Total haemocyte count (THC), Phagocytosis, Phenoloxidase (PO), Superoxide anion (O_2^-), และ Superoxide dismutase (SOD) และบันทึกอัตราการรอดตายของกุ้ง ซึ่งจากการทดลองพบว่าลูกกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม β -glucan ในระดับที่ต่ำกว่า 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะตายหมดในวันที่ 12 ภายหลังจากการได้รับเชื้อไวรัส ส่วนลูกกุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสม β -glucan ในระดับที่ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ามีอัตราการรอดตายในวันที่ 9 สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น ๆ และเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อ WSSV ในลูกกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม β -glucan ในอัตรา 2, 10 และ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ด้วยเทคนิค PCR พบว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเท่ากับ 55, 65 และ 65% ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าภายหลังจากหยุดให้อาหารผสม β -glucan และทำการฉีดเชื้อ WSSV ค่า THC, PO, O_2^- และ SOD จะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วอีกด้วย

และในการศึกษาของ Sahoo *et al.* (2008) ที่ได้ทำการศึกษาผลของการให้อาหารผสม β -1, 3-glucan ในกิ้งก่ามกรม (*Macrobrachium rosenbergii*) ในอัตราต่าง ๆ คือ 0, 500, 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่าปริมาณ Total haemocytes count (THC) ในวันที่ 14 ในกิ้งก่ามกรมกลุ่มที่กินอาหารผสม β -1, 3-glucan ในอัตรา 1,500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่ามากที่สุด และแตกต่างจากกิ้งก่ามกรมอื่น ๆ และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 7 ของการทดลองกิ้งก่ามกรมที่ได้รับ β -1, 3-glucan ในอัตรา 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่า Phenoloxidase activity (PO) สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในวันที่ 14 ของการทดลองจะมีเฉพาะกิ้งก่ามกรมที่ได้รับ β -1, 3-glucan ในอัตรา 1,500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่านั้นที่มีค่า PO activity สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อทำการทดสอบความคุ้มโรคของกิ้งก่ามกรมด้วยการฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* จะพบว่ากิ้งก่ามกรมในกลุ่มที่ให้อาหารผสม β -1, 3-glucan ในอัตรา 1,500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการตายน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่น ๆ ($P < 0.05$) ทั้งในวันที่ 7 และ 14 ซึ่งจากการศึกษานี้จะสรุปได้ว่าการให้อาหารผสม β -1, 3-glucan ในอัตรา 1,500 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน จะช่วยเสริมในระบบภูมิคุ้มกันและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรียอีกด้วย

จากข้อมูลดังกล่าวและข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ อาจสรุปได้ว่าการเสริม β -glucan ในอาหารนั้น อาจมีส่วนกระตุ้นการปลดปล่อยสารที่มีคุณสมบัติในการต้านทานเชื้อโรคในขบวนการ Degranulation ในเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งก่ามกรม โดยอาศัย Pattern recognition protein ในการรับรู้และจดจำโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม รวมทั้งยังเพิ่มความว่องไวของ Phagocytes ในการจับกินเชื้อโรคให้สูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างหรือการแสดงออกของยีน ALF ของกิ้งก่ามกรมแต่อย่างใด

อย่างไรก็ตามการกระตุ้นกิ้งก่ามกรมด้วยเชื้อโรคที่มีชีวิต อาจจะมีกลไกการตอบสนองที่แตกต่างไป เนื่องจากเชื้อโรคในสภาพที่มีชีวิตจะมีความสามารถสร้างสารพิษหรือโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่มีส่วนทำให้เชื้อโรคดังกล่าวนั้นสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนภายในตัวกิ้งก่ามกรม ซึ่งสารที่เชื้อโรคผลิตออกมานั้นอาจสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่ามกรมโดยผ่านวิถีการกระตุ้น (Pathway) แบบอื่นในร่างกายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกระตุ้นผ่าน Toll receptors ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมในระบบ Innate immunity ที่สามารถพบได้ในสัตว์ชั้นสูงในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการค้นพบโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Toll receptor ของสัตว์ชั้นสูงในกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

เช่นใน *Drosophila* โดย Zamboni *et al.* (2005) ที่ค้นพบ Toll-like receptor ที่มีความสำคัญในการรับรู้และการตอบสนองต่อเชื้อโรค นอกจากนี้สัตว์ในกลุ่ม Crustaceans ก็ยังสามารถค้นพบโครงสร้างที่เป็น Toll-like receptor เช่นกัน เช่นการศึกษาของ Inamori *et al.* (2004) ที่ค้นพบใน Horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*), Yang *et al.* (2007) ที่ค้นพบใน Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) และ Yang *et al.* (2008) ที่ค้นพบใน Chinese shrimp (*Penaeopenaeus chinensis*) จากหลักฐานดังกล่าวทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่าในสัตว์กลุ่ม Crustacean น่าจะมีระบบ Toll pathway ที่ใช้ในการรับรู้และตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆ เช่นเดียวกันกับสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไป นอกจากกลไกการรับรู้เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยใช้ Pattern recognition protein ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF ของกุ้งก้ามกราม สามารถค้นพบ cDNA ที่บรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน ALF ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกในกุ้งชนิดนี้ โดยยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามแบ่งออกเป็น 3 Isoforms และเมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน ALF ของกุ้งก้ามกรามทั้งสาม Isoforms คือ Mr-ALF1, Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 มีความยาวทั้งสิ้นเท่ากับ 794, 959 และ 833 bp ตามลำดับ โดยส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) มีความยาวเท่ากับ 345, 399 และ 366 bp และเมื่อนำมาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้กรดอะมิโนที่มีความยาวเท่ากับ 114, 132 และ 121 Residues ตามลำดับ

2. เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากการถอดรหัส จะพบว่าลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF ทั้งสาม Isoforms จะมีตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine จำนวน 2 ตำแหน่งในส่วนของ Mature peptide ที่จะจับกันเกิดเป็นพันธะ Disulfide อีกทั้งกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณระหว่างกรดอะมิโน Cysteine ทั้งสองจะเป็นบริเวณสำคัญที่ใช้ในการจับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมคือตำแหน่งของ LPS binding motif และยังพบบริเวณที่มีความ Conserved กันสูงหรืออาจเรียกได้ว่าเป็นบริเวณของ Consensus pattern คือบริเวณที่มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น (W/T/R)CP(G/S)W(T/A) อย่างไรก็ตามลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF ทั้งสาม Isoforms จะมีความแตกต่างกันในลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF2 และ Mr-ALF3 มีตำแหน่งของ Glycosylation site อยู่ภายใน ขณะที่จะไม่พบตำแหน่งของ Glycosylation site อยู่ภายในลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF1 เลย

3. ในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Mr-ALF ทั้งสาม Isoforms ของกุ้งก้ามกรามกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF1 จะมีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์และความเหมือนกันกับลำดับของกรดอะมิโนของ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) มากที่สุดถึง 90.3% และ 85.9% ตามลำดับ ส่วน Mr-ALF2 นั้นมีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์และความเหมือนกันกับลำดับของกรดอะมิโนของ White shrimp (*Litopenaeus schmitti*) มากที่สุด 59.1% และ Kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) มากที่สุด 48.6% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของ Mr-ALF3 จะพบว่ามีความเหมือนกันกับ

ลำดับนิวคลีโอไทด์และความเหมือนกันกับลำดับของกรดอะมิโนของ American lobster (*Ha-ALF2*, *Homarus americanus*) มากที่สุด 54.3% และ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) มากที่สุด 34% ตามลำดับ

4. เมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Mr-ALF ทั้งสาม Isoforms ของกุ้งก้ามกราม โดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนในกลุ่ม AMP จะแยกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่อย่างชัดเจน โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยกลุ่มของยีน ALF ทั้งหมดและกลุ่มที่สองประกอบด้วยกลุ่มของยีน Crustin และยีน Penaeidin ซึ่งจัดเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของ AMP เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเฉพาะในกลุ่มของยีน ALF ด้วยกันเองพบว่ายีน Mr-ALF1 จะมีความใกล้ชิดกับยีน ALF ของ Bristled river shrimp (*Macrobrachium olfersii*) มากที่สุด เนื่องจาก Bristled river shrimp จัดเป็นกุ้งน้ำจืดที่อยู่ใน Family Palaemonidae Genus *Macrobrachium* เช่นเดียวกับกุ้งก้ามกราม ส่วนยีน Mr-ALF2 จะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนใกล้ชิดกับยีน ALF ของ Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) และ Blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) มากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Mr-ALF3 จะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนแยกออกจากกลุ่มของยีน ALF ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Crustaceans ที่เลือกมาทำการศึกษาย่างชัดเจน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน Mr-ALF3 น่าจะเป็นยีนในกลุ่ม ALF ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน

5. ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่ายีน Mr-ALF1 ของกุ้งก้ามกรามมีการแสดงออกมากที่สุด ในเม็ดเลือดและเนื้อเยื่อหัวใจ ทางเดินอาหาร ส่วนกลางและตับและตับอ่อน ส่วนการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ของกุ้งก้ามกรามมีการแสดงออกมากที่สุด ในเนื้อเยื่อกลุ่มของก้านตา ทางเดินอาหารส่วนต้น เหงือก เม็ดเลือดและหัวใจ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลคล้ายกับการศึกษาใน Crustacean ชนิดอื่น ๆ

6. จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม ภายหลังจากทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่าในวันที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 จะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุม ประมาณ 2 เท่า ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF2 ของกุ้งก้ามกรามในวันที่ 1, 3 และ 7 ภายหลังจากที่ทำการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* นั้นจะมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุม

อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) มีค่าประมาณ 8, 4 และ 3 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ของกิ้งก่ามกราคมจะมีหน้าที่รับผิดชอบในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่แตกต่างกัน โดยยีน Mr-ALF1 จะมีความสำคัญในการตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมช่วงแรก ๆ ส่วนยีน Mr-ALF2 นั้นนอกจากจะมีการแสดงออกในช่วงแรก ๆ แล้วยังมีผลต่อเนื่องอีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยการให้กินอาหารผสมสาร β -glucan 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน Mr-ALF1 และ Mr-ALF2 ในกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงการเสริม β -glucan ในอาหารไม่ได้ส่งผลต่อการกระตุ้นกระบวนการ mRNA transcription ของยีน ALFs ในกิ้งก่ามกราคมแต่อย่างใด

ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงคุณลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน ALF ของกิ้งก่ามกราคมอย่างน้อย 3 Isoforms รวมถึงลักษณะการแสดงออกของยีน ALF ในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่ทำให้เรามีความเข้าใจในกลไกการทำงานและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกิ้งก่ามกราคมได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลที่เกิดขึ้นจากการวิจัยยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อยอด โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโมเลกุลอื่น ๆ อาทิ เช่นการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน ALF ของกิ้งก่ามกราคม ไปทำการสังเคราะห์ Recombinant Protein ของยีน ALF ของกิ้งก่ามกราคม แล้วนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างความต้านทานโรคของกิ้งก่า ซึ่งจะเป็นการนำเอาความรู้ที่ได้ไปพัฒนาวิธีการในการป้องกันและรักษาโรคในกิ้งก่ามกราคม ให้สามารถนำไปใช้ในวงการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราคมต่อไปได้อย่างเป็นรูปธรรมในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด ประจำปี 2548. เอกสารฉบับที่ 8/2550.

กัณฑ์รีย์ เจริญทวี. 2550. ความหลากหลายทางไมโครแซทเทลไลท์พันธุกรรมในประชากรกุ้งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักและธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กิจการ สุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ Rudolf Hoffmann. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.

กุลยา สมบูรณ์วิวัฒน์. 2547. การระบุยีนของสารต้านจุลชีพและลักษณะสมบัติของแอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ แฟกเตอร์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จักรพงษ์ นีละมนต์. 2549. ผลของไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และ Extra Small Virus (XSV) ในแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามต่อคุณภาพลูกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารุวรรณ ชินกร. 2550. ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิราพร เกสรจันทร์, สิทธิ บุญยรัตผลิน และ อุษณีย์ เจษฎาไกรสร. 2530. โรคดาวเรืองในกุ้งก้ามกราม. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 67/2530. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

- ชลอ ลิมสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิติ ชูเชิด ชลอ ลิมสุวรรณ ศุภมาส ศรีวงศ์พุก นิธิศ ภัทรกุลชัย Flegel, T. W. และ K. Yoganandhan. 2548. โรคไวรัสที่ทำให้ความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. เอกสารเผยแพร่สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง.
- บรรจง เทียนสังข์ศรี. 2535. หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พิสิษฐ์ อุไรรงค์. 2550. การวิเคราะห์ผลตอบแทนทางการเงินของการลงทุนเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในจังหวัดสุพรรณบุรี. วารสารการประมง 60 (4): 318-327.
- พุทธรัตน์ เป้าประเสริฐกุล. 2550. การเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส MrNV และ XSV ของกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. วารสารการประมง 60 (4): 301- 309.
- ไพบุลย์ วรสาธินท์. 2544. หลักการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม, น. 51-59. ใน รายงานการประชุมความร่วมมือทางวิชาการระหว่างกองประมงน้ำจืดและกองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- ยนต์ มุสิก. 2529. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เรืองวิษณุ ยूनพันธ์. 2544. ชีวิตวิทยาของกุ้งก้ามกราม, น. 1-12. ใน โครงการฝึกอบรมเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงและอนุบาลกุ้งก้ามกราม. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- วณิชยา น้อยวังคลัง. 2544. อนุกรมวิธานของกุ้งน้ำจืดสกุล *Macrobrachium* Bate, 1868 ในลุ่มน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วัชรียา ภูรีวิโรจน์กุล. 2549. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิไลรัตน์ อนุรักษ์โอฬาร. 2544. การโคลนและการแสดงออกของยีนแอนติไลโปพอลิแซคคาไรต์แฟลคเตอร์จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศุภมาส ศรีวงศ์พุก. 2549. ผลกระทบของการติดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus และ Extra Small Virus ต่อการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) อัตราการรอดตายและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมพงษ์ สุวรรณทศ. 2546. กลวิธีการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. เอกสารแนะนำ. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 47 น.
- เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง. 2550. การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคนในอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนันตชัย เขื่อนธรรม. 2542. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เอกรินทร์ อังชะกุลวิสุทธิ. 2546. การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของแอนติไลโปพอลิแซคคาไรต์แฟลคเตอร์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- Aketagawa, J., T. Miyata, S. Ohtsubo, T. Nakamura, T. Morita, H. Hayashida, S. Iwanaga, T. Takao and Y. Shimonishi. 1986. Primary structure of *Limulus* anticoagulant anti-lipoplysaccharide factor. **J. Biochem.** 261: 7357-7365.
- Andrä, J., M. Lamata, G. M. De Tejada, R. Bratels, M. H. J. Kock and K. Brandenburg. 2004. Cyclic antimicrobial peptides based on *Limulus* anti-lipoplysaccharide factor for neutralization of lipopolysaccharide. **Biochem. Pharm.** 68: 1297-1307.
- Bachère, E., D. Destoumieux and P. Bulet. 2000. Panaeidin, antimicrobial peptide of shrimp: a comparison with other effect of innate immunity. **Aquaculture** 191: 71-88.
- _____, Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. De Lorgeril, J. Garnier and B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.** 198: 149-168.
- Bakheet, T., M. Frevel, B. R. Williams, W. Greer and K. S. Khabar. 2001. ARED: human AU rich element containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded protein. **Nucleic Acids Res.** 29: 246-254.
- Bartlett, T. C., B. J. Cuthbertson, E. F. Shepard, R. W. Chapman, P. S. Gross and G. W. Warr. 2002. Crustins, homologues of 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Mar. Biotechnol. (NY)** 4: 278-293.
- Bauchau, A. G. 1981. Crustacean, pp. 385-420. *In* N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley, eds. **Invertebr. Blood Cell.** Academic Press, London.
- Bause, E. 1983. Structural requirements of *N*-glycosylation of proteins. **J. Biochem.** 209: 331-336.

- Beale, K. M., D. W. Towle, N. Jayasundara, C. M. Smith, J. D. Shields, H. J. Small and S. J. Greenwood. 2008. Anti-lipopolysaccharide factors in the American lobster *Homarus americanus*: molecular characterization and transcriptional response to *Vibrio fluvialis* challenge. **Comp. Biochem. Physio.** Part D3: 263-269.
- Brown, K. A. and R. E. W. Hancock. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr. Opin. Immunol.** 18: 24-30.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature Rev.** 3: 238-250.
- Bulet, P., C. Hetru, J. L. Dimarcq and D. Hoffmann. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. Comp. Immunol.** 23: 329-344.
- _____, R. Stöcklin and L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.** 198: 169–184.
- Cao, D., A. Kocabas, Z. Ju, A. Karsi, P. Li, A. Patterson and Z. Liu. 2001. Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of genes and expression profiles of the head kidney. **Anim. Genet.** 32: 169-188.
- Chang, C. F., H. Y. Chen, M. S. Su and I. C. Liao. 2000. Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.** 10: 505-514.
- _____, _____, _____ and _____. 2003. Dietary β -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 297-310.

- Cruciani, R. A., J. L. Barker, M. Zasloff, H. C. Chen and O. Colamonici. 1991. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88: 3792-3796.
- Destoumieux, D., P. Bulet and D. Loew. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biochem.** 272: 28398-28406.
- Destoumieux-Garzon, D., D. Saulniner, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet and E. Bachere. 2001. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **J. Biochem.** 276: 47070-47077.
- Engström, Y. 1999. Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. **Dev. Comp. Immunol.** 23: 345-358.
- Fragkiadakis, G. A. and E. K. Stratakis. 1997. The lectin from the crustacean *Litocarcinus depurator* recognizes O-acetylsialic acids. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.** 117:545-552.
- Galvel, Y., G. von Heijne. 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. **Protein Eng.** 3: 433-442.
- Gargioni, R. and M. A. Barracco. 1998. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **J. Morphol.** 236: 209-221.
- Gross, P. S., T. C. Bartlett, C. L. Browdy, R. W. Chapman and G. W. Warr. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 565-577.

- Hancock, R. E. W. and G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.** 8: 402-410.
- _____ and H. G. Sahl. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.** 24: 1551-1557.
- Hauton, C., V. Brockton and V. J. Smith. 2007. Changes in immune gene expression and resistance to bacterial infection in lobster (*Homarus gammarus*) post-larval stage VI following acute on chronic exposure to immune stimulating compounds. **Mol. Immunol.** 44: 443-450.
- _____, J. A. Hammond and V. J. Smith. 2005. Real-time PCR quantification of the in vitro effects of crustacean immunostimulants on gene expression in lobster (*Homarus gammarus*) granular haemocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 29: 33-42.
- Hoess, A., S. Watson, G. R. Siber and R. Liddington. 1993. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5 °A resolution. **EMBO J.** 12: 3351-3356.
- Houlthuis, L. B. 1995. Note on Indo-West Pacific crustacea decapoda III to IX. **Zool. Meded.** 69: 139-151.
- Imjongjirak, C., P. Amparyup, A. Tassanakajon and S. Sittipraneed. 2007. Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. **Mol. Immunol.** 44 (12): 3195-3203.
- Inamori, K. I., S. Arika and S. I. Kawabata. 2004. A toll-like receptor in horseshoe crabs. **Immunol. Rev.** 198: 106-115.

- Iwanaga, S., S. Kawabata and T. Muta. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. **J. Biochem.** 123: 1-15.
- Izadpanah, A. and R. L. Gallo. 2005. Antimicrobial peptide. **J. Am. Acad. Dermatol.** 52: 381-390.
- Jomori, T. and S. Natori. 1992. Function of the lipopolysaccharide-binding protein of *Periplaneta americana* as an opsonin. **FEBS Lett.** 296: 283-286.
- Khoo, L., D. W. Robinette and E. J. Noga. 1999. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. **Mar. Biotechnol.** 1: 44-51.
- Lackie, A. M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitol.** 80: 393-412.
- Li, C., J. Zhao, L. Song, C. Mu, H. Zhang, Y. Gai, L. Qiu, Y. Yu, D. Ni and K. Xing. 2008. Molecular cloning, genomic organization and functional analysis of anti-lipopolysaccharide factor from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Dev. Comp. Immunol.** 32: 784-794.
- Liu, F., Y. Liu, F. Li, B. Dong and J. Xiang. 2005. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Mar. Biotechnol.** 7: 600-608.
- Liu, J., W. J. Yang, X. J. Zhu, N. K. Karouna-Renier and R. K. Rao. 2004. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Cell Stress Chaperones** 9: 313-323.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods** 25: 402-408.

- Lorgeril, J. de, Y. Gueguen, C. Goarant, E. Goyard, C. Mugnier, J. Fievet, D. Piquemal and E. Bachère. 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Mol. Immunol.** 45: 3438-3445.
- Lu, K. Y., Y. T. Huang, H. H. Lee and H. H. Sung. 2006. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated *in vivo* by CpG oligodeoxynucleotides. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 274-284.
- _____, H. J. Sung, C. L. Liu and H. H. Sung. 2009. Differentially enhanced gene expression in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii* challenged *in vivo* with lipopolysaccharide. **J. Inver. Pathol.** 100: 9-15.
- Marques, A., J. Dhont, P. Sorgeloos and P. Bossier. 2006. Immunostimulatory nature of β -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge test. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 682-692.
- Matsuzaki, K. 2001. Mechanisms of innate immunity based on antimicrobial peptides. **Tanpakushitsu Kakusan Koso** 46: 2060-2065.
- Morita, T., S. Ohtsubo, T. Nakamura, S. Tanaka, S. Iwanaga, K. Ohashi and M. Niwa. 1985. Isolation and biological activities of *Limulus* anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). **J. Biochem.** 97: 1611-1620.
- Murakami, T., M. Niwa, F. Tokunaga, T. Miyata and S. Iwanaga. 1991. Direct virus inactivation of tachyplesin I and isopeptides from horseshoe crab hemocytes. **Chemotherapy** 37: 327-334.

- Muta, T., T. Miyata, F. Tokunaga, T. Nakamura and S. Iwanaga. 1987. Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. **J. Biochem.** 101: 1321-1330.
- _____, T. Nakamura, H. Furunaka, F. Tokunaga, T. Miyata, M. Niwa and S. Iwanaga. 1990. Primary structures and functions of anti-lipopolysaccharide factor and tachyplesin peptide found in horseshoe crab hemocytes. **Adv. Exp. Med. Biol.** 256: 273-285.
- Nagoshi, H., H. Inagawa, K. Morii, H. Harada, C. Kohchi, T. Nishizawa, Y. Taniguchi, M. Uenobe, T. Honda, M. Kondoh, Y. Takahashi and G. I. Soma. 2006. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Mol. Immunol.** 43: 2061-2069.
- Nakamura T., H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao and Y. Shimonishi. 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. **J. Biochem.** 263: 16709-16713.
- Ohashi, K., M. Niwa, T. Nakamura, T. Morita and S. Iwanaga. 1984. Anti-LPS factor in the horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. Its hemolytic activity on the red blood cell sensitized with lipopolysaccharide. **FEBS Lett.** 176: 207-210.
- Okumura, T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 22: 68-76.
- Pan, J., A. Kurosky, B. Xu, A. K. Chopra, D. H. Coppenhaver, I. P. Singh and S. Baron. 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. **Antiviral Res.** 48: 39-47.

- Patat, S. A., R. B. Carnegie, C. Kingsbury, P. S. Gross, R. Chapman and K. L. Schey. 2004. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. **Eur. J. Biochem.** 271: 4825-4833.
- Pfaffl, M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR, pp. 87-112. *In* S. A. Bustin, eds. **A-Z of quantitative PCR**. International University Line, La Jolla, California.
- Phatarpekar, P. V., V. D. Kenkre, R. A. Sreepada, U. M. Desai and C. T. Achuthankutty. 2002. Bacterial flora associated with larval rearing of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture** 203: 279-291.
- Qian, D., Z. Shi, S. Zhang, Z. Cao, W. Liu, L. Li and Y. Xie. 2003. Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Fish Dis.** 26: 521-527.
- Ratcliffe, N. A., A. F. Rowley, S. W. Fitzgerald and C. P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytol.** 97: 183-350.
- Rattanachai, A., I. Hirono, T. Ohira, Y. Takahashi and T. Aoki. 2005. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **Fish Shellfish Immunol.** 18: 39-48.
- Relf, J. M., J. R. Chisholm, G. D. Kemp and V. J. Smith. 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem.** 264: 350-357.
- Ren, J. D., J. S. Gu, H. F. Gao, P. Y. Xia and G. X. Xiao. 2008. A synthetic cyclic peptide derived from *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor neutralizes endotoxin *in vitro* and *in vivo*. **Int. Immunopharmacol.** 8: 775-781.

- Ried, C., C. Wahl, T. Miethke, G. Wellnhofer, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener and A. Hoess. 1996. High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor. **J. Biochem.** 271: 28120-28127.
- Rosa, R. D., P. H. Stoco and M. A. Barracco. 2008. Cloning and characterisation of cDNA sequences encoding for anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) in Brazilian palaemonid and penaeid shrimps. **Fish Shellfish Immunol.** 25: 693-696.
- Sahoo, P. K., A. Das, S. Mohanty, B. R. Mohanty, B. R. Pillai and J. Mohanty. 2008. Dietary β -1, 3-glucan improves the immunity and disease resistance of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Aquac. Res.** 39: 1574-1578.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York.
- Shai, Y. and Z. Oren. 2001. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptide. **Peptides** 22: 1629-1641.
- Smith, V. J., J. H. Brown and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 71-90.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. Fish Dis.** 2: 3-23.
- _____ and T. Unestam. 1979. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. **Can. J. Microbiol.** 25: 406-414.

- Somboonwiwat, K., M. Marcos, A. Tassanakajon, S. Klibunga, A. Aumelas, B. Romestand, Y. Gueguen, H. Boze, G. Moulin and E. Bachère. 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 29: 841-851.
- _____, E. Bachère, V. Rimphanitchayakit and A. Tassanakajon. 2008. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALF_{Pm3}) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. **Dev. Comp. Immunol.** 32: 1170-1176.
- Srisapoome, P., S. Onming and N. Areechon. 2007. Gene library construction and sequence analysis of immune-related gene expressed from haemocyte of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated with beta-glucan supplemented feed. NCBI GenBank database, Direct submission.
- _____, N. Paankhao and V. Rungsin. 2008. Gene expression analysis in androgenic gland of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) by Expressed Sequence Tags (ESTs) Technique. NCBI GenBank database, Direct submission.
- Sritunyalucksana, K. and K. Söderhäll. 2000. The proPO and clotting system in crustacean. **Aquaculture** 191: 53-69.
- Sudhakaran, R., S. S. Musthaq., P. Haribabu., S. C. Mukherjee., C. Gopal and A. S. S. Hameed. 2006. Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). **Aquaculture** 257: 136-141.
- Sung, H. H., H. J. Chang, C. H. Her, C. J. Chang and Y. L. Song. 1998. Phenoloxidase activity of hemocyte derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Invertebr. Pathol.** 71: 26-33.

- Supungul, P., S. Klinbunga, R. Pichyangkura, I. Hirono, T. Aoki and A. Tassanakajon. 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Dis. Aquat. Org.** 61: 123-135.
- Tanaka, S., T. Nakamura, T. Morita and S. Iwanaga. 1982. *Limulus* anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of *Limulus* coagulation system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 105: 717-723.
- Tharntada, S., K. Somboonwiwat, V. Rimphanitchayakit and A. Tassanakajon. 2008. Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. **Fish Shellfish Immunol.** 24: 46-54.
- Unestam, T. and K. Söderhäll. 1997. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. **Nature** 267: 45-46.
- Vargas-Albores, F., F. Jiménez-Vega and K. Söderhäll. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhance the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Dev. Comp. Immunol.** 20: 299-306.
- _____ and G. Yepiz-Plascencia. 2000. β -glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.
- _____, G. Yepiz-Plascencia, F. Jimenez-Vega and A. Avila-Villa. 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.** 138: 415-422.
- Vega, E. de la, N. A. O. Leary, J. E. Shockey, J. Robalino, C. Payne, C. L. Browdy, G. W. Warr and P. S. Gross. 2008. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Mol. Immunol.** 45: 1916-1925.

- Vetvicka, V. and P. Sima. 2004. β -Glucan in invertebrates. **ISJ**. 1: 60-65.
- Vizioli, J. and M. Salzet. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. **Trends Pharmacol. Sci.** 23: 494-496.
- Wang, Y. C., P. S. Chang and H. Y. Chen. 2008. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -1, 3-glucan. **Fish Shellfish Immunol.** 24: 113-121.
- Xuhua, X. 2007. **Bioinformatics and the Cell; Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and Transcriptomics.** Springer, USA. 207 p.
- Yang, L. S., Z. X. Yin, J. X. Liao, X. D. Huang, C. J. Guo, S. P. Weng, S. M. Chan, X. Q. Yu and J. G. He. 2007. A toll receptor in shrimp. **Mol. Immunol.** 44: 1999-2008.
- _____, C., J. Zhang, F. Li, H. Ma, Q. Zhang, T. A. Jose Priya, X. Zhang and J. Xiang. 2008. A toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *vibrio anguillarum* infection. **Fish Shellfish Immunol.** 24: 564-574.
- Zambon, R. A., M. Nandakumar, V. N. Vakharia and L. P. Wu. 2005. The toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 102: 7257-7262.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature Rev.** 415: 389-395.
- Zhang, X., C. Huang and Q. Qin. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. **Antiviral Res.** 61: 93-99.
- Zhao, X. F. and J. X. Wang. 2008. The antimicrobial peptides of the immune response of shrimp. **ISJ**. 5: 162-179.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานทางด้าน Molecular cloning

10X TBE (ต่อลิตร)

108 กรัมของ Tris-base

55 กรัมของ Boric acid

40 มิลลิลิตรของ 0.5 M Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

10X MOP buffer

200 mM 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid (MOPS)

50 mM Sodium acetate

10 mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

ปรับ pH ให้ได้ 6.5-7.0 ด้วย NaOH ห้ามนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave)

100 mM IPTG

2.38 กรัมของ Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

50 mg/ml X-gal

100 มิลลิลิตรของ 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)

2 มิลลิลิตรของ N,N-dimethyl-formamide

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Luria-Bertani (LB) Broth (ต่อลิตร)

10 กรัมของ Sodium chloride (NaCl)

10 กรัมของ Tryptone

5 กรัมของ Yeast extract

จากนั้นทำการเติม deionized H₂O ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

Luria-Bertani (LB) Agar (ต่อลิตร)

เตรียม LB Broth ปริมาตร 1 ลิตร

เติม 20 กรัมของ Agar

นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตรและปล่อยให้แข็งตัว จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

LB-Ampicillin Agar (ต่อลิตร)

เตรียม LB Agar ปริมาตร 1 ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และปล่อยให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม Ampicillin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตรและปล่อยให้แข็งตัว จากนั้นจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

Super optimal culture medium (SOC medium) (100 มิลลิลิตร)

2 กรัมของ Tryptone

0.5 กรัมของ Yeast extract

1 มิลลิลิตรของ 1M Sodium chloride (NaCl)

0.25 มิลลิลิตรของ 1M KCl

จากนั้นทำการเติม deionized H₂O ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 97 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม

1 มิลลิลิตรของ 2M Mg²⁺ Stock

1 มิลลิลิตรของ 2M Glucose

และนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวนวนิตย์ คล่องแคล่ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 4 มิถุนายน 2526
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ประมง) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-