ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุวิศวกรรม | โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การโคลนและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

Cloning and Sequencing of α- *Amylase* gene from Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*)

นามผู้วิจัย นางสาวจรรยาภรณ์ เพชรคง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

(รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วัน............ **เดือน** .... **พ.ศ.** ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสในกุ้งกุลาดำ
(*Penaeus monodon*)

Cloning and Sequencing of α- *Amylase* gene from Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*)

โดย

นางสาวจรรยาภรณ์ เพชรคง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จรรยาภรณ์ เพชรคง 2553: การโคลนและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D. 85 หน้า

แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยแป้งและไกลโคเจนในสัตว์ ในการศึกษานี้เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลส (α –*Amylase*, *PmAmy*) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *PmAmy* cDNA มีความยาวเท่ากับ 1647 คู่เบส โดยส่วนของ Open reading frame มีความยาวเท่ากับ 1539 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 512 เรซิดิวซ์ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ที่คำนวณได้ 56.90 กิโลดาลตัน และ 5.04 ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนที่คาดหมายนี้ประกอบไปด้วยบริเวณอนุรักษ์ทั้งหมด 9 ตำแหน่ง ได้แก่ FEW, GFAGVQVSP, DAVINH, NYGD, LNDLN, GFRIDPSKH, EVID, FIDNHD และ GYTRAMSSY เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *PmAmy* มาเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vanamei*) พบว่ามีความเหมือนกัน 95.31 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีน *PmAmy* ในเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำระยะตัวเต็มวัยอายุ 40 วัน ด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่ายีน *PmAmy* มีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) เนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกรองลงมา ได้แก่ ทางเดินอาหารส่วนต้น (fore gut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hind gut) และหัวใจ (heart) ส่วนเนื้อเยื่อที่ก้านตา (eyestalk) และเหงือก (gills) มีการแสดงออกน้อยที่สุด

____________________ ____________________ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Janyabhorn Phetkhong 2010: Cloning and Sequencing of α- *Amylase* gene from Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*). Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Lertluk Ngernsiri, Ph.D. 85 pages.

α-Amylase is a major enzyme for digestion starch and glycogen in animals. In this study, α*–amylase* (*PmAmy*) isolated from Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) was cloned and sequenced using Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) technique. The length of obtained *PmAmy* comprised of 1647 bp including a 1539 bp open reading frame, encoding a dedued protein with 512 amino acids rescidues. The calculated molecular weight and pI of *PmAmy* was 56.90 kDa and 5.04 respectively. The dedued protein contains 9 conserved domains including FEW, GFAGVQVSP, DAVINH, NYGD, LNDLN, GFRIDPSKH, EVID, FIDNHD and GYTRAMSSY. The sequence was BLAST with that of *Litopenaeus vanamei* and showed 95.31% identity. Tissues expression of the gene was investigated by RT-PCR. We found that the highest expression level was in hepatopancreas and the expression levels were moderated in foregut, midgut, hindgut and heart. *PmAmy* was also expressed in eyestalk and gills at the least level.

__________________________ __________________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เลิศลักษณ์ เงินศิริ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์ กรรมการร่วม และ อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณเกรียงศักดิ์ เผด็จภัย นักวิชาการประมง 8ว ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งฉะเชิงเทรา กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างกุ้งกุลาดำ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ และ ดร.ศศิมนัส อุณจักร และ ดร. ชลทิชา ตันติธาดาพิทักษ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและคำปรึกษาในการวิจัย ขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือในระหว่างการทดลอง

ขอขอบพระคุณสาขาพันธุวิศวกรรม ที่มอบทุนสนับสนุนวิจัยเพื่อใช้ในการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการศึกษาและทำการวิจัย

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือให้กำลังใจ ชี้แนะและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

จรรยาภรณ์ เพชรคง

กุมภาพันธ์ 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	34
ผล	34
วิจารณ์	62
สรุปและข้อเสนอแนะ	65
สรุป	65
ข้อเสนอแนะ	65
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	67
ภาคผนวก	74
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นต้นแบบ	28
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งกุลาดำเป็นต้นแบบ	31
3	ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง (Optimal Density : OD)	35
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*); ไพรเมอร์ 2 set	38
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*); ไพรเมอร์ 3’RACE-PCR	41
6	ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ตลอดสาย	43
7	ตารางแสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไมกับยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำ	49
8	ตารางแสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Genetic Distance ของกุ้งกุลาดำกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	55
9	ตารางแสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำตลอดสายกับยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	57

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะหนึ่ง (ระยะนอเพลีส)	6
2	พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สอง (ระยะโปรโตซูเอีย)	7
3	พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สาม (ระยะไมซิส)	8
4	พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สี่ (ระยะโพสลาวา)	9
5	วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ (life cycle)	11
6	ลักษณะทางกายภาพของกุ้งกุลาดำ	13
7	โครงสร้างแอลฟาอะไมเลส (พันธะ alpha-1,4 glycosidic)	14
8	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	17
9	Overview of the RACE procedure	19
10	ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส 1% ของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ (*P.monodon*)	35
11	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ set1 และ set2	37
12	แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์ของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นต้นแบบ	38
13	ขนาดของยีน *PmAmy* โดยใช้ไพรเมอร์ RACE_PSF คู่กับ UPM	40
14	แผนภาพแสดงการออกแบบไพร์เมอร์ของยีน *PmAmy* ในส่วนกลางยีน	41
15	ขนาดของยีน *PmAmy* โดยใช้ไพรเมอร์ FPM_SP คู่กับ UPM	42
16	แผนภาพแสดงการออกแบบไพร์เมอร์ของยีน *PmAmy* ตั้งแต่ start codon จนถึงปลาย polyA	43
17	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*)	44
18	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีน *PmAmy* กับยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไม	46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไมกับ *Pm*AMY ของกุ้งกุลาดำตลอดสาย	48
20	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไมกับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำตลอดสาย ตำแหน่ง Calcium binding, Chloride binding , Histidine Binding, Active site, Cysteine Residues, β - strand และ α - strand	50
21	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (multiple sequence alignment) กับยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำตลอดสาย และตำแหน่งของ conserved domains	52
22	Phylogenic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยจากการสุ่มค่า Bootstrap Value 1,000 replicates จากโปรแกรม MEGA 3.1	56
23	การศึกษาโครงสร้างโปรตีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ (*Pm*AMY)	60
24	การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส *PmAmy* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	61

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	base pair
^{o}C	degree Celsius
Da	Dalton
dNTP	deoxynucleotide-5-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
et al.	et. Alli (Latin), others
Fig.	Figure
g	gram
g	gravity force
h	hour
IPTG	Isopropyl thiogalactoside
kb	kilobase pair
l	litre
LB	Lulia-Bertani medium
M	Molar
mg	millligram
min	minute
ml	mililitre
mM	millimolar
MW	molecular weight
ng	nanogram
O.D.	optical density

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PCR	polymerase chain reaction
pI	isoelectric point
RACE – PCR	rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction
rpm	revolution per minute
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
s	second
SDS	sodium dodecyl sulphate
TAE	Tris acetate EDTA electrophoresis buffer
TE	Tris EDTA
Tm	melting temperature
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	unit
UV	ultraviolet
V	volt
w/v	weight by volume
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranosid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การโคลนและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

Cloning and Sequencing of α- *amylase* gene from Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*)

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความอุดมสมบูรณ์มากประเทศหนึ่ง อาหารที่ผลิตได้นั้นมีทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งมีปริมาณมากพอสำหรับการบริโภคภายในและส่งออกไปขายยังต่างประเทศทั่วโลก นำเงินตราจำนวนมหาศาลเข้าสู่ประเทศ สินค้าส่งออกที่สำคัญและส่งออกเป็นจำนวนมากประเภทสัตว์ที่โดดเด่นมาก คือ กุ้งกุลาดำ (Tiger prawn, *Penaeus monodon)* เป็นกุ้งทะเล ที่มีขนาด 18 – 25 เซนติเมตร จัดเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae อาศัยอยู่ในเขตร้อนและบริเวณน้ำลึก (ประจวบ, 2527) โดยกุ้งกุลาดำเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท เช่น ในปี พ.ศ. 2551 มูลค่าการส่งออกกุ้ง เป็นเงิน 75,000-85,000 ล้านบาท (สุปรีชา, 2551) ประเทศผู้นำเข้าสินค้ากุ้งสดและแช่เยือกแข็งมีกระจายอยู่ทุกทวีป เช่น เอเซีย (ญี่ปุ่น จีน สิงคโปร์ ไต้หวัน ฮ่องกงและเกาหลี) สหรัฐอเมริกา แคนาดา สหภาพยุโรป (ฝรั่งเศส อังกฤษ เยอรมัน เนเธอร์แลนด์ อิตาลี เบลเยียม สเปน และเดนมาร์ก) ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ (อภิชัย, 2544) ปัญหาสำคัญของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ โรคและการจัดการโรคที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เช่น เกิดการลอกคราบไม่พร้อมกันจึงทำให้เกิดปัญหาการกินกันเอง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งกุลาดำก็มีด้วยกันหลายปัจจัย คือ วัยของกุ้ง แสงและอุณหภูมิ ความสมบูรณ์ของอาหารก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้ง (Chang, 1995) สารอาหารที่กุ้งได้รับจากอาหารที่กินเข้าไปขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร (ประจวบ, 2537) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารที่สำคัญได้แก่ อะไมเลส (amylase), ไลเพส (lipase) และโปรติเอส (protease) เอนไซม์เหล่านี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นในส่วน hepatopancrease และกระเพาะอาหารของกุ้ง (Abramo *et al*., 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส (α-Amylase) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในระบบการย่อยอาหารของสัตว์ต่างๆ ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ α-1,4 glycoside ในอาหารพวกแป้งและไกลโคเจน (glycogen) (กล้าณรงค์ และ เกื้อกูล, 2543) นอกจากจะมีหน้าที่ในการย่อยอาหารแล้ว เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ยังมีความสำคัญต่อการลอกคราบของกุ้งด้วย (Chang, 1995) การทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลส อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งอาจจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ได้ อาจจะมีผลต่อการกระตุ้นหรือการเร่งการลอกคราบของกุ้งกุลาดำได้ อีกทั้งยังสามารถจัดการให้กุ้งกุลาดำมีการลอกคราบได้ในเวลาใกล้เคียงกัน ขนาดของกุ้งจะใกล้เคียงกันเพื่อแก้ปัญหาการกินกันเอง ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำลดลงด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระดับกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. โคลนยีนแอลฟาอะไมเลส (α- *Amylase* gene) จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

2. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลส (α- *Amylase* gene)

3. หาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (α- *Amylase* gene) ในเนื้อเยื่อต่างๆ (Tissue specific) ของกุ้งกุลาดำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำ หรือกุ้งม้าลาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* และมีชื่อสามัญว่า Tiger prawn หรือ Jumbo tiger prawn กุ้งชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Penaeidae ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวาง ลำตัวเป็นปล้องๆ โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้องๆ เปลือกหัวเกลี้ยง ไม่มีขน หนวดมีสีดำ ไม่มีลาย ฟันกรีด้านบนมี 7– 8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกรีทั้งสองด้านมีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีรยางค์อันนอก กุ้งเป็นสัตว์ขาปล้องจัดอยู่ในไฟลัมอาร์โทรโพดา

1. อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

อนุกรมวิธาน

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

Class: Malacostraca

Order: Decapoda

Suborder: Dendrobranchiata

Family: Penaeidae

Genus: Penaeus

Species: monodon

2. ถิ่นที่อยู่อาศัย

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำได้แก่ น่านน้ำแถบไต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และที่พบมากได้แก่ ออสเตรเลียและอินเดีย กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อนชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึก ห่างออกจากฝั่งและชอบพื้นทะเลที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็วมาก (อภิชัย, 2544)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การเจริญเติบโต

กุ้งกุลาดำวางไข่ในทะเล กุ้งที่มีอายุประมาณ 12 –18 เดือน จะวางไข่ในทะเลที่มีระดับความลึกประมาณ 15 – 30 เมตร ใกล้กับพื้นท้องทะเลและจะวางไข่ครั้งละประมาณ 1,000,000 – 1,200,000 ฟอง กุ้งชนิดนี้ส่วนมากจะผสมพันธุ์กันในเวลากลางคืน โดยตัวผู้จะสอดอวัยวะเพศที่เรียกว่า พีเทสมา (Petesma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า ทีไรคัม (Thelycoum) พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อเข้าไปเก็บไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในระยะหลัง เมื่อไข่แก่และสุกเต็มที่ก็จะถูกขับออกมาทางช่องเพศตรงโคนขาเดินคู่ที่สาม และจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ซึ่งจะไหลออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็กๆ ที่บริเวณขาเดินคู่ที่สี่ของตัวเมีย แม่กุ้งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 3 – 5 นาที ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ปล่อยสู่น้ำทะเลใหม่ๆ จะมีลักษณะกลม ไข่จะค่อยๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัว ภายในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง กุ้งวัยอ่อนจะพัฒนา และเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอนและว่ายเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง ตัวอ่อนจะดำรงชีวิตอยู่ในบริเวณนี้จนกระทั่งโตเต็มวัยจึงอพยพกลับสู่ทะเลเพื่อผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไปอีก (มะลิ และคณะ, 2546)

การพัฒนาการและการเปลี่ยนรูปร่างของกุ้ง

ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะหนึ่ง (ระยะนอเพลีส) เป็นลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ จะมีขนาดเล็ก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 6 ครั้งภายใน 40 – 50 ชั่วโมง ระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหาร แต่จะได้อาหารส่วนใหญ่จากถุงอาหารที่ติดตัวมาและจะดำรงชีวิตส่วนใหญ่อยู่ตามหน้าดิน

นอเพลียสที่ 1 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30 มิลลิเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม หัวโตเรียวเล็กไปทางด้านหาง มีรยางค์ 3 คู่ มีตาอันเดียวอยู่ระหว่างรยางค์คู่ที่ 1

นอเพลียสที่ 2 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.30– 0.36 มิลลิเมตร รยางค์เริ่มแบ่งออกเป็นปล้อง หนามปลายหางใหญ่ และยาวออก

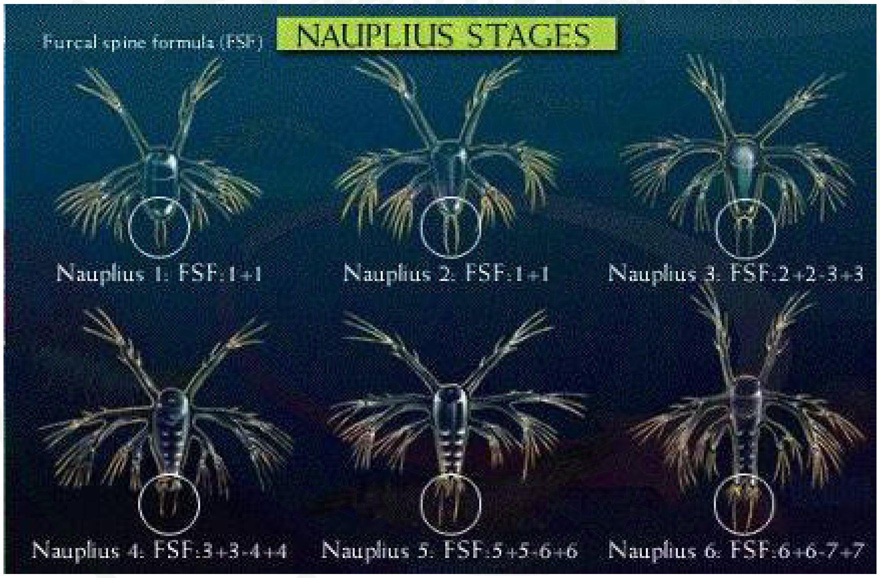
นอเพลียสที่ 3 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.36 – 0.38 มิลลิเมตร เริ่มปรากฏฐานของรยางค์ท้อง ปลายหางเรียวเล็ก มีหนาม 3 คู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอเพลียสที่ 4 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.36– 0.40 มิลลิเมตร ปลายของรยางค์ท้องแยกออกเป็นสองแฉก มีหนามที่ปลายหาง 4 คู่

นอเพลียสที่ 5 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.40– 0.44 มิลลิเมตร เริ่มมีเปลือกหัว ขากรรไกรกลม ลำตัวยาวออก ปลายหางแยกเป็น 2 แฉก

นอเพลียสที่ 6 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.42– 0.50 มิลลิเมตร เปลือกหัวใหญ่ขึ้น ขากรรไกรยาวออกมีหนามที่ปลายหาง 7 คู่



ภาพที่ 1 พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะหนึ่ง (ระยะนอเพลีส)

ที่มา: บุญเสริม (2552)

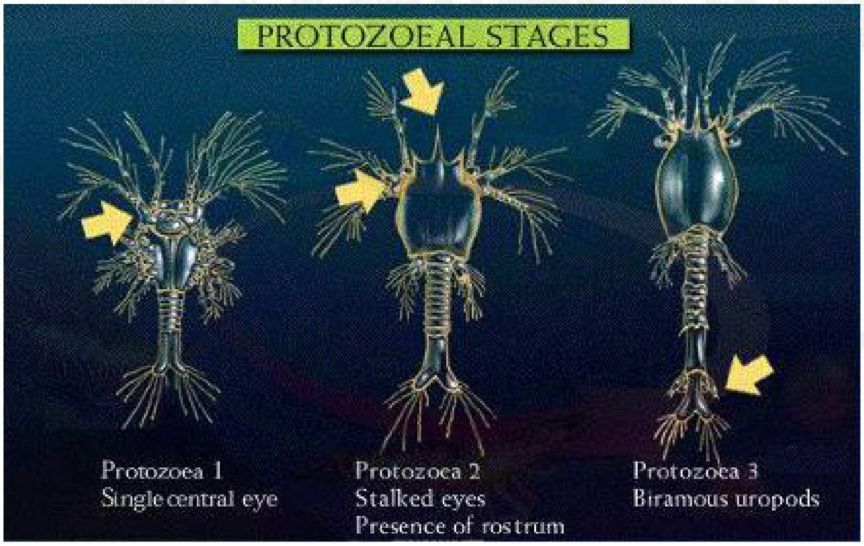
ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สอง (ระยะโปรโตซูเอีย) ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อยๆ ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำ และเริ่มกินอาหาร อาหารของลูกกุ้งในระยะนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกแพลงค์ตอนพืชเล็ก ลูกกุ้งจะว่ายเข้าหาฝั่ง และจะอยู่ในระยะที่สองประมาณ 4 วัน โดยมีการลอกคราบสามครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งจะมีรูปร่างดังนี้คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โปรโตซูเอียที่ 1 ขนาดลำตัวยาว 0.85– 1.00 มิลลิเมตร ลำตัวแบ่งออกเป็นสามส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ส่วนอกแยกเป็น 6 ปล้อง ส่วนหัวมีเปลือกคลุมตลอด ตายังอยู่ภายในเปลือกมองเห็นเป็นจุดดำ แยกออกเป็น 2 ตา แต่ยังไม่มีก้านตา รยางค์คู่ที่ 3 เปลี่ยนหน้าที่จากการช่วยในการว่ายน้ำมาทำหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ปลายหางมีหนาม 7 คู่ ระบบทางเดินอาหารเห็นได้ชัดเจนตลอดลำตัว

โปรโตซูเอียที่ 2 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 1.20 – 1.40 มิลลิเมตร ตาโผล่พ้นเปลือกหัวมีก้านตายาว กรีแหลมยื่นไปข้างหน้าและงุ้มลงด้านล่างเล็กน้อย ระหว่างตามีหนาม 1 คู่ บนเปลือกหัว เปลือกหัวเริ่มขยายออกคลุมส่วนอกและที่ส่วนท้องเริ่มแบ่งเป็น 5 ปล้อง ส่วนหางแยกเป็นสองแฉกและมีขนข้างละเจ็ดเส้น

โปรโตซูเอียที่ 3 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 1.50 – 2.00 มิลลิเมตร แพนหางชั้นนอกมีขนาดใหญ่กว่าแพนหางชั้นใน รอบๆ แพนหางมีขน และมีรยางค์ว่ายน้ำเกิดขึ้นที่ปล้องอกทั้ง 5 ปล้อง



ภาพที่ 2 พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สอง (ระยะโปรโตซูเอีย)

ที่มา: บุญเสริม (2552)

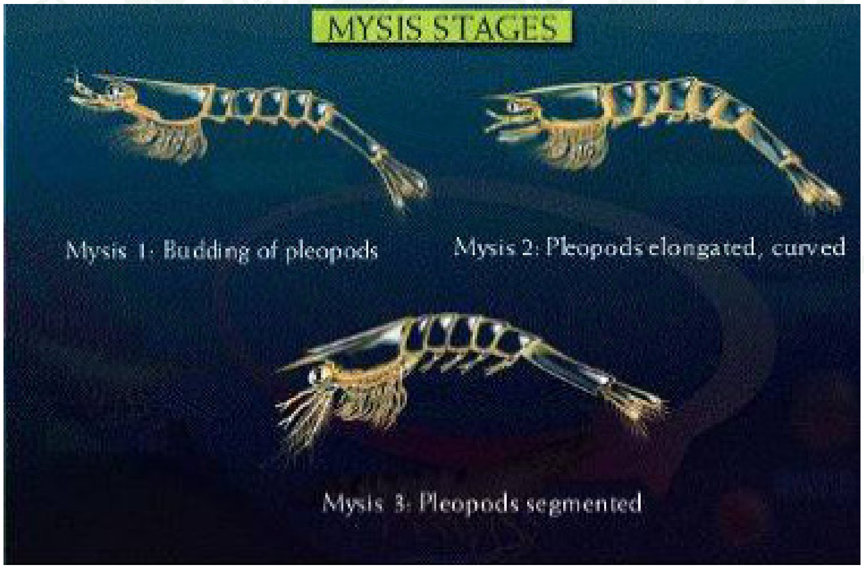
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สาม (ระยะไมซิส) ลูกกุ้งในระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น สามารถมองเห็นได้ชัด จะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลง 3 ระยะคือ

ไมซิสที่ 1 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกันรยางค์อกยังคงทำหน้าที่ว่ายน้ำ ปลายรยางค์แบ่งเป็น 2 แฉก ส่วนท้องแบ่งออกเป็น 6 ปล้อง หนามบนปล้องท้องที่ 1 และ 2 จะหายไป ปลายหางมีหนาม 8 คู่ หนวดคู่ที่ 1 เริ่มแบ่งเป็น 3 ปล้อง ปลายหางเป็นสองแฉก ลำตัวมีความยาวประมาณ 2.50 – 3.00 มิลลิเมตร

ไมซิสที่ 2 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกันอย่างสมบูรณ์ มีเปลือกหัวคลุมตลอดรยางค์คู่ที่ 1 ถึง 3 ตรงปลายเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ รยางค์ว่ายน้ำที่ปล้องท้องเจริญขึ้น หนามบนปล้องที่ 3 หายไป หางเว้าเล็กน้อย ลำตัวมีความยาวประมาณ 3.00– 3.45 มิลลิเมตร

ไมซิสที่ 3 ขาว่ายน้ำเจริญขึ้น แบ่งออกเป็น 2 ปล้อง มีฟันกรี 1- 2 อัน ที่สันกรีบน ลำตัวมีความยาวประมาณ 4.04 – 4.50 มิลลิเมตร

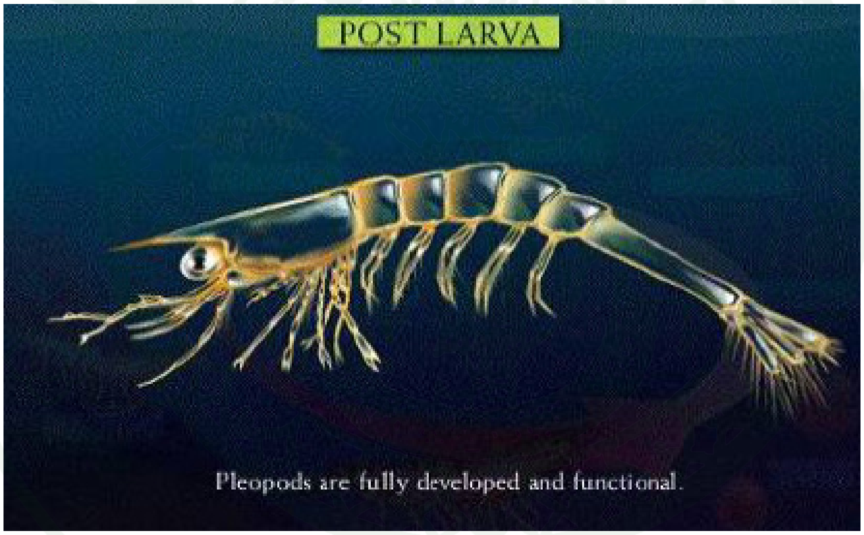


ภาพที่ 3 พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สาม (ระยะไมซิส)

ที่มา: บุญเสริม (2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สี่ (ระยะโพสลาวา) ระยะโพสลาวา คือระยะตัวอ่อนขั้นสุดท้าย ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีตัวยาวประมาณ 5.50 มิลลิเมตร ลูกกุ้งมีรยางค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย ลูกกุ้งจะวิวัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น โดยแบ่งเป็น 25 ระยะ ภายใน 25 วัน เรียกว่าโพสลาวาที่ 1 (พี 1) เรื่อยไปจนถึงโพสลาวาที่ 25 (พี 25) หลังการลอกคราบแต่ละครั้งรูปร่างลักษณะจะเปลี่ยนแปลงไปสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ลูกกุ้งจะมีสีเหลืองใส มีลายหรือจุดเกิดขึ้น กรียาวออก ไม่พบหนามบนลำตัว ลูกกุ้งจะดำรงชีวิตอยู่บริเวณป่าไม้ชายเลน หรือในแหล่งน้ำกร่อย ประมาณ 3 – 4 เดือน ก็จะเติบโตเป็นกุ้งวัยรุ่น เมื่ออายุได้ประมาณ 6 เดือน กุ้งจะลงสู่ทะเลเพื่อทำการผสมพันธุ์ต่อไป (ประจวบ, 2527)



ภาพที่ 4 พัฒนาการลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สี่ (ระยะโพสลาวา)

ที่มา: บุญเสริม (2552)

4. การลอกคราบ

กุ้งจำเป็นต้องลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต ทั้งนี้เพราะเปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถเพิ่มขนาดได้เหมือนกับเปลือกหอยหรือกระดองเต่าได้ ดังนั้นในการเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้างเป็นเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่กว่าขึ้นมาแทน กุ้งจะเริ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลอกคราบตั้งแต่ฟักออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และจะลอกคราบไปเรื่อยๆ ตลอดชีวิต ก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติโดยเฉพาะที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งตัวโดยเร็ว หลังจากลอกคราบแล้ว เมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมด ลำตัวจะขยายใหญ่ขึ้นและเปลือกจะแข็งตัวภายใน 3 –8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งอยู่ภายใต้การควบคุมของระบบประสาทส่วนกลางและฮอร์โมนสองชนิดที่อยู่ในก้านตา (Webster and Keller, 1986; Yasuda *et al*., 1994) ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออกจะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้น แต่โดยทั่วไปกุ้งจะลอกคราบช้าหรือเร็วนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ หลายอย่างด้วย เช่น วัยของกุ้ง แสงและอุณหภูมิ ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับกุ้งจะลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 20–30วัน ปัจจัยที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้ง คือ ความสมบูรณ์ของสารอาหาร (Chang,1995) การใช้แร่ธาตุและสารอาหารของกุ้งที่ได้จากอาหารขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร (ประจวบ, 2537) ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารมีความสัมพันธ์กับระยะลอกคราบของกุ้ง เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร เช่น อะไมเลส (amylase), ไลเพส (lipase) และ โปรติเอส (protease) จะสังเคราะห์จาก hepatopancrease และกระเพาะอาหารของกุ้ง (Abramo *et al*., 1997)

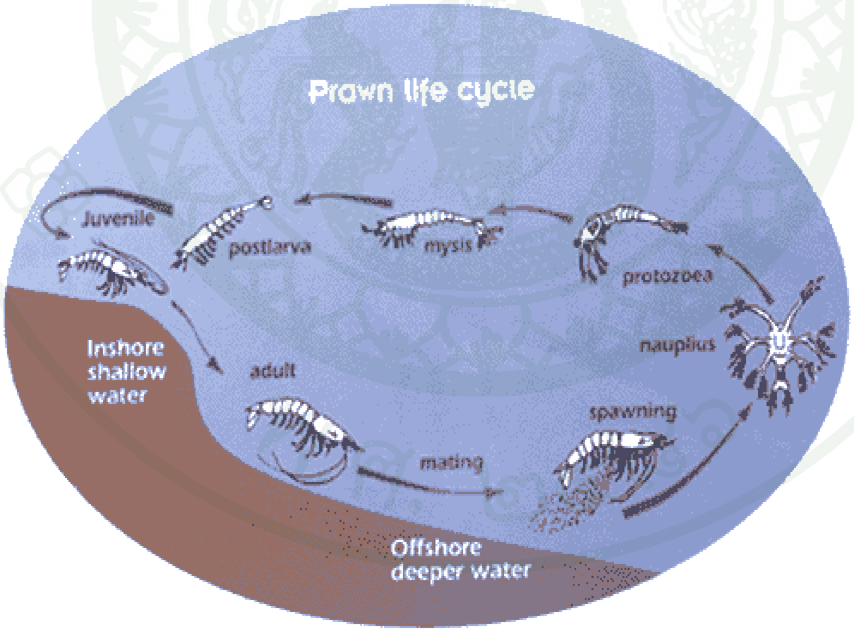
5. การเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาที่เกิดขึ้นในวงจรการลอกคราบ

5.1 ระยะก่อนการลอกคราบ (Premolt) ก่อนการลอกคราบกุ้งจะไม่กินอาหาร จะสังเกตได้ว่ากุ้งเริ่มกินอาหารไม่หมด แต่กุ้งจะดึงสารอาหารและพลังงานจากอาหารที่สะสมไว้ที่ hepatopancrease มาใช้ในการสร้างเปลือกใหม่ โดยเริ่มสร้างไคตินจากอาหารที่สะสม ไกลโคเจนที่ถูกสะสมไว้จะลดลงเนื่องจากถูกนำไปสร้างไคตินที่เป็นองค์ประกอบของเป็นเปลือกใหม่ กุ้งจะลอกคราบเร็วหรือไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่ได้รับ หากกุ้งได้รับสารอาหารและเปลี่ยนเป็นไคตินได้มากก็จะลอกคราบได้เร็ว แต่ถ้าได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ การลอกคราบ ก็จะยืดออกไป 3-5 วัน

5.2 ระยะลอกคราบ (Intermolt) ในระยะนี้กุ้งจะหยุดการเคลื่อนไหว กิจกรรมต่างๆ เริ่มลดลง ปริมาณกลูโคส, โปรตีนและไขมัน ในเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้งการรับออกซิเจนเข้าสู่ร่างกายก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย เนื่องจากกุ้งต้องใช้พลังงานมากในการลอกคราบ เมื่อลอกคราบเสร็จแล้วจะมีการดูดซึมน้ำเข้าสู่ร่างกายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยดูดซึมจากกระแสเลือดและเนื้อเยื่อของร่างกาย ระยะนี้จะใช้เวลาสั้นมากเพราะเป็นระยะที่อันตรายที่สุดในวงจรชีวิต ถ้าสารอาหารไม่เพียงพอ กุ้งลอกคราบไม่ออก ลอกคราบติด เปลือกนิ่ม และมักกินกันเอง (ประจวบ, 2527)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 ระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) หลังจากการลอกคราบสมบูรณ์แล้ว การสะสมแคลเซียมก็เริ่มต้นทันทีเพื่อช่วยเร่งการแข็งตัวของเปลือก ระยะนี้จะมีการดึงน้ำและแร่ธาตุเข้าสู่ร่างกายมากที่สุด เพื่อเพิ่มขนาดและน้ำหนักของร่างกาย มีการสะสมแคลเซียมที่ บริเวณเปลือกชั้นนอก เมื่อเปลือกเริ่มแข็งก็จะเริ่มมีการเคลื่อนไหว และเริ่มกินอาหารเพิ่มขึ้น หลังจากระยะพักจากการลอกคราบ เปลือกใหม่แข็ง หลังการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเสร็จสมบูรณ์ อาหารที่กุ้งกินในแต่ละวันจะเริ่มเพิ่มมากขึ้น อาหารที่กินเข้าไปจะถูกใช้ไปในการดำรงชีวิตประจำวัน ส่วนที่เหลือจะถูกเปลี่ยนไปให้สะสมใน hepatopancrease อยู่ในรูปของสารอาหารพวก โปรตีน ไขมัน และไกลโคเจน เพื่อเป็นอาหารและพลังงานสำรองเพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารที่จำเป็นในการสร้างเปลือกใหม่อีกครั้ง ด้วยกลไกทางธรรมชาติ กุ้งจะสามารถรับได้ว่าสารอาหารต่างๆ ที่สะสมไว้เพียงพอ สำหรับการลอกคราบ ดังนั้นการกินอาหารจะเริ่มลดลงเล็กน้อยและเตรียมเข้าสู่ระยะลอกคราบอีกครั้งเป็นวัฏจักรเช่นนี้ต่อไป (ไพโรจน์, 2538)



ภาพที่ 5 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ (life cycle)

ที่มา: ประจวบ (2527)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.ระบบทางเดินอาหารของกุ้ง

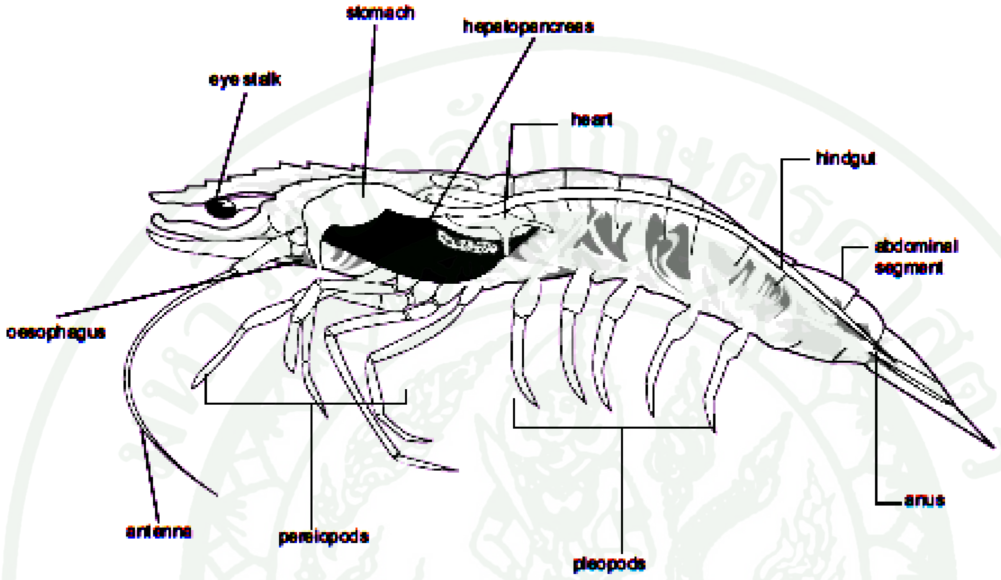
ทางเดินอาหารของกุ้งแบ่งออกเป็น 3 ส่วน เริ่มจากทางเดินอาหารส่วนหน้า (foregut) เป็นส่วนของทางเดินอาหารที่ประกอบด้วยปากอยู่ทางด้านล่างของตอนหัวมีรยางค์รอบปาก 3 คู่ ช่วยในการกินและเคี้ยวอาหารและมีต่อมน้ำลาย (salivary gland) ทำหน้าที่ผลิตน้ำย่อย ต่อจากปากเป็นหลอดอาหารสั้น ๆ นำอาหารเข้าสู่กระเพาะอาหาร ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงใหญ่ ซึ่งอยู่ที่บริเวณส่วนหัวจนถึงอก ทางตอนล่างของกระเพาะมีกล้ามเนื้อหนาช่วยในการบดอาหาร จึงเรียกส่วนนี้ว่า แกสริกมิลล์ (gastric mill) กระเพาะของกุ้งมีหน้าที่ 2 อย่างคือ เป็นที่พักและบดอาหาร ส่วนถัดมา คือทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) มีลักษณะเป็นกระเปาะอยู่ถัดจากกระเพาะอาหาร ไปทางหลังและฝังอยู่ในต่อมสร้างน้ำย่อย (hepatopancreas) และมีช่องรับน้ำย่อยด้วย ทางเดินอาหารส่วนนี้จึงทำหน้าที่ในการย่อยอาหาร ส่วนปลายของทางเดินอาหาร (hindgut) เป็นส่วนที่เรียกว่า ลำไส้เป็นท่อเล็ก ๆ พาดไปทางด้านหลังของลำตัวและไปเปิดออกที่ส่วนท้ายของส่วนท้องเรียกว่า ทวารหนัก (ภาพที่ 6) (Pérez-Farfanate and Kensley, 1997)

ต่อมสร้างน้ำย่อยหรือตับอ่อน (hepatopancreas) เป็นต่อมขนาดใหญ่มีสีเหลืองแกมแดงอยู่ในช่องอก ซึ่งเรียกกันว่า มันกุ้ง มีหน้าที่สร้างน้ำย่อยและปล่อยเข้าสู่ทางเดินอาหารตอนกลางและดูดซึมสารอาหารที่ย่อยแล้วเพื่อส่งไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายต่อไป ทางเดินอาหารของกุ้งเรียงตามลำดับได้ดังนี้

ปาก --> หลอดอาหาร --> กระเพาะอาหาร --> ต่อมสร้างน้ำย่อย -->

ทางเดินอาหารตอนกลาง --> ลำไส้ --> ทวารหนัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของกุ้งกุลาดำ (Internal and External Anatomy of a Penaeid Shrimp)

ที่มา: Pérez-Farfanate and Kensley (1997)

7. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง

แหล่งของเอนไซม์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดด้วยกัน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. Endoamylase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลของแป้ง จะตัดพันธะ alpha-1,4 glycosidic ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส

2. Exoamylase เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะ alpha-1,4 และ alpha-1,6 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ กลูโคอะไมเลส เบต้าอะไมเลส และแอลฟากลูโคซิเดส

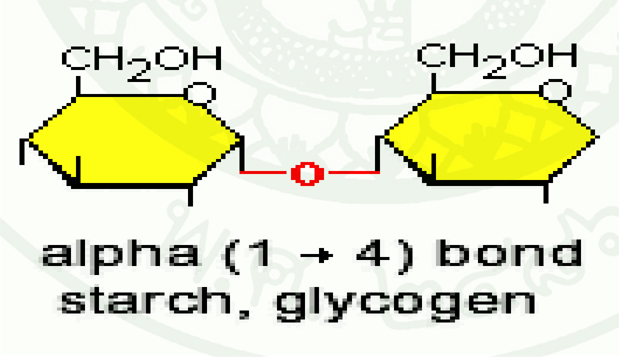
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. Debranching enzyme เป็นเอนไซม์ตัดพันธะ 1,6 glycosidic เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซอะไมเลส และพูลูแลนเนส

4. Transferase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่จับ 1,4 glycosidic ของ donor molecule และเปลี่ยนส่วนของ donor เพื่อเป็น glycosidic acceptor ซึ่งเป็นการสร้างพันธะกลูโคซิดิกใหม่ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ อะไมโลมอลเทส และไซโคลเด็กตริน กลูโคซิลทรานเฟอร์เรส (CGTase) (Nigam and Singh, 1995)

8. แอลฟาอะไมเลส (α- Amylase)

แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolase ที่ใช้ในการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่มีพันธะ alpha-1,4 glycosidic (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase: EC 3.2.1.1) (ภาพที่ 7) เช่น น้ำตาลโมเลกุลคู่ Oligosaccharide หรือ Starch (Douglas and Mitchinson, 1997) แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเข้าสลายเม็ดแป้งได้ โดยจะย่อยสารเชิงซ้อนของคาร์โบไฮเดรตที่ α -1,4 glucosidic linkages (กล้าณรงค์ และ เกื้อกูล, 2543)



ภาพที่ 7 โครงสร้างแอลฟาอะไมเลส (พันธะ alpha-1,4 glycosidic)

ที่มา: Colorado State University, (2009)

ในสัตว์จะพบเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ตับอ่อน, ต่อมน้ำลาย, Semen, อัณฑะ (testis), รังไข่ (ovary), follopian tube, กล้ามเนื้อลาย, ปอด และ adipose tissue (Marianne *et al*., 2006) จากการศึกษาเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในกลุ่มของกุ้งพบว่า กุ้งมีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สะสมคาร์โบไฮเดรตในตับอ่อน (รุจิรา, 2544) และเปลี่ยนเป็นไกลโคเจนเพื่อเปลี่ยนกลับเป็นกลูโคสสำหรับสร้างไคติน ซึ่งการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นไกลโคเจนเกิดจากการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Van Wormhoudt *et al.*, 1995) ปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสรวมในเลือดจะมีค่าสูงในระยะลอกคราบ (intermolt) และสูงสุดในตับอ่อน ในระยะก่อนการลอกคราบ (early premolt) ดังนั้นเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารมีความสำคัญต่อการลอกคราบของกุ้ง (Brito, 2000) โดยกุ้งก้ามกรามอายุ 3 เดือน ที่อยู่ในช่วงการลอกคราบระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงกว่ากุ้งที่อยู่ในช่วงการลอกคราบระยะลอกคราบ และสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในกุ้งอายุ 6 เดือนทั้งระยะก่อนการลอกคราบและระยะลอกคราบ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ค่อนข้างสูงในกุ้งอายุ 3 เดือนที่ระยะก่อนการลอกคราบ นั้นมีค่าเป็นไปในทิศทางเดียวกับค่าดัชนีน้ำหนักตับอ่อน ซึ่งเป็นค่าที่แสดงระดับการสะสมแร่ธาตุและสารอาหารที่เนื้อเยื่อตับอ่อน ซึ่งแสดงความสมบรูณ์หรือการมีแร่ธาตุแลสารอาหารสะสมในร่างกาย โดยทั่วไปในกุ้งระยะลอกคราบจะเริ่มมีการสะสมแร่ธาตุและสารอาหารจากอาหารที่กินเข้าไป โดยไขมันเกือบทั้งหมดอยู่ในรูปของกรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) ส่วนการสะสมคาร์โบไฮเดรตในตับอ่อนนั้น ในระยะลอกคราบ (intermolt) จะสะสมคาร์โบไฮเดรตจากอาหาร โดยการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Fernandez *et al*., 2001) ส่วนในระยะก่อนการลอกคราบจะมีการสะสมแร่ธาตุและสารอาหารบางส่วนจากการสลายสารประกอบในเปลือก แล้วดึงกลับมาสะสมที่ตับอ่อน และเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร เพื่อสำรองไว้สังเคราะห์เปลือกใหม่ภายหลังการลอกคราบ (Villasante *et al*., 1999) โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต เพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นไกลโคเจน สะสมไว้ในตับอ่อน สำรองไว้เปลี่ยนกลับไปเป็นกลูโคสสำหรับสร้างไคติน (Passano,1960)

ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจึงมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับค่าดัชนีน้ำหนักของตับอ่อน และสัมพันธ์กับอายุของกุ้ง เนื่องจากในกุ้งระยะโพสลาวาอายุ 3 เดือน มีการลอกคราบถี่กว่าในกุ้งระยะโพสลาวาอายุ 6 เดือน จึงมีการสะสมสารอาหารปริมาณมากอย่างรวดเร็วในตับอ่อน จึงมีการหลั่งของเอนไซม์ในการย่อยอาหารทั้ง โปรติเอส ไลเพส และเอนไซม์อะไมเลส ค่อนข้างมาก จึงพบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดมีค่าสูงในระยะก่อนการลอกคราบ (อรพินท์ และ รุ่งกานต์, 2548)

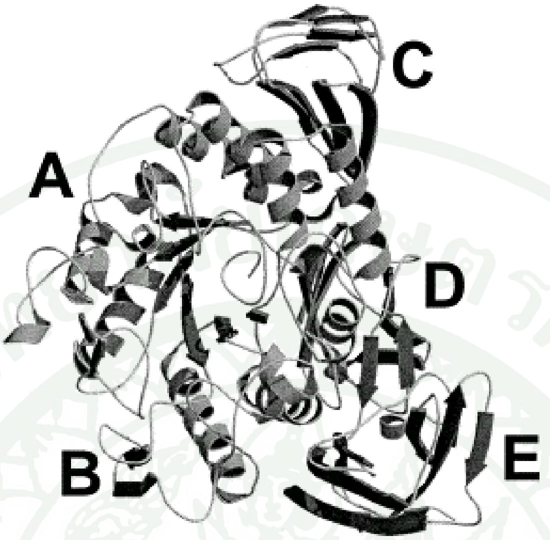
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. ยีนแอลฟาอะไมเลส (α- *Amylase* gene)

สำหรับการศึกษายีนสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มีการศึกษาในสัตว์มากมายหลายชนิด ตั้งแต่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ สัตว์ปีก สัตว์น้ำ แมลง สำหรับกุ้งมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งขาวแวนนาไม (*P.vanameii*) (Van Wormhoudt and Sellos , 1995) พบว่ามีความยาวในส่วนที่มีกำหนดการสร้างยีน (Open reading frame: ORF) เท่ากับ 1539 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งขาวแวนนาไม (*P.vanameii*) มาแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 512 อะมิโน มี 2 แบบ (Isoform) โดยจากการรายงานการศึกษาของ Le Moullac (1995) พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์หลักที่พบในส่วนของตับอ่อน ซึ่งเมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไม (*P.vanameii*) มาหามวลโมเลกุล พบว่ามีขนาดเท่ากับ 56.99 กิโลดาลตัน และเมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของคนมาหาค่ามวลโมเลกุล พบว่ามีขนาดเท่ากับ 55 กิโลดาลตัน โดย Keller *et al*. (1971) ต่อมา Strobl *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของยีนแอลฟาอะไมเลส (Primary structure) ของหนอนนก *Tenebrio molitor* (TMA) ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีขนาดเท่ากับ 471 อะมิโน โดยคิดค่ามวลโมเลกุล ได้เท่ากับ 51.3 กิโลดาลตัน และคำนวณค่า pI ได้เท่ากับ 4.3 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมาหาบริเวณอนุรักษ์ จะต้องพบบริเวณหลักๆอย่างน้อย 5 บริเวณ ซึ่ง Nakajima *et al*. (1986) และ Janececk (1992) ได้ทำการศึกษาไว้ แต่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะพบ 9 บริเวณ ได้แก่ FEW, GFAGVQVSP, DAVINH, NYND, LNDLN, GFRIDASKH, EVID, FIDNHD และ GYTRVMSSY (Van Wormhoudt and Sellos, 1995) ซึ่งจากการศึกษาของกุ้งขาวแวนนาไม (*P.vanameii*) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ conserve กับ domain หลัก มีส่วนที่ conserve ทั้ง 9 Domain เช่นกัน

MacGregor *et al.*, (2001) ได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่เป็น multidomain proteins ซึ่งมีโครงสร้างที่สำคัญ 5 ตำแหน่ง คือ Domain A เป็นบริเวณ catalytic domain ของ $(\alpha/\beta)_8$ – barrel, ตำแหน่ง B เป็นส่วนปลายที่ยื่นออกจากส่วน Domain, ส่วนตำแหน่ง C, D และ E เป็นสายที่สวนทางกับ β- strand domains (antiparallel) และ ตำแหน่ง E ยังสามารถจับกับโมเลกุลของแป้งได้อีกด้วย (ภาพที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ที่มา: MacGregor *et al*., (2001)

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง ในไหมจะพบเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ทั้งในระบบทางเดินอาหารและในระบบหมุนเวียนโลหิต โดยเอนไซม์ที่พบในทางเดินอาหารของไหมทำหน้าที่ในการย่อยแป้งและพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าในน้ำเลือด แต่มีงานวิจัยบางงานพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส อาจมีความสัมพันธ์กับความทนทานต่อโรค (Hirata, 1974) และจากการศึกษาระดับกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในไหมกลุ่มที่ฟักตลอดปี (polyvoltine strain) จากพันธุ์อินเดีย (Chatterjee *et al*., 1992) และพันธุ์ไทย (Promboon *et al*., 1993) พบว่าไหมกลุ่มนี้จะมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงกว่าส่วนในไหมที่ฟักปีละ 2 ครั้ง (bivoltine strain) ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าไหมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูง จะมีความต้านทานต่อโรคสูงกว่ากลุ่มที่มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่ำ (Abraham *et al*., 1992) และจากการศึกษาของ Ngernyuang, (2007) พบว่าไหมจะพบเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงทั้งในระบบทางเดินอาหารและในระบบหมุนเวียนโลหิต จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลสในไหมพันธุ์พื้นเมืองไทยด้วยวิธี 3’-Rapid Amplification of cDNA Ends (3’-RACE) พบว่ามีความยาวในส่วนที่มีกำหนดการสร้าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

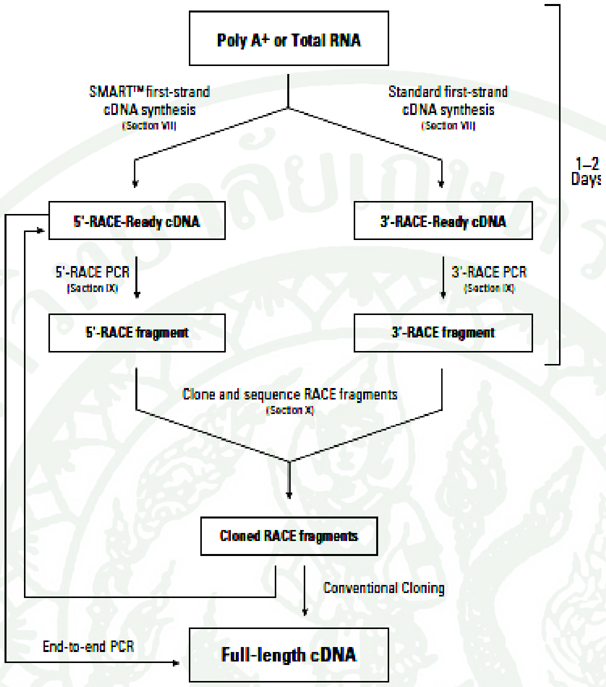
ยีน (ORF) จำนวน 1,503 คู่เบส และกรดอะมิโนที่เป็นไปได้จำนวน 500 เรซิดิวส์ เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนแอลฟาอะไมเลสของไหมอื่นๆ ในฐานข้อมูลพบว่ายีนแอลฟาอะไมเลสในไหมพันธุ์พื้นเมืองไทยนี้มีความเหมือนกับในฐานข้อมูล 97-99 % ทั้งระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน นอกจากนี้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากไหมสายพันธุ์ไทยนี้มีความเหมือนกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในแมลงอื่นๆ ในระดับกรดอะมิโน เช่น *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* และ *Ceratitis capitata* 78, 81, 79 และ 60 % ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของไหมพันธุ์พื้นเมืองนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ไหมให้มีความต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงต่อไป

ดังนั้นจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสจะมีความเหมือนกันตั้งแต่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ สัตว์ปีก สัตว์น้ำ แมลง และกุ้งขาวแวนนาไม ที่มีความใกล้ชิดกับกุ้งกุลาดำมากที่สุด หากทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสอาจเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาระดับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ได้ และอาจมีผลต่อการกระตุ้นหรือการเร่งการลอกคราบของกุ้งกุลาดำได้ อีกทั้งยังสามารถจัดการให้กุ้งกุลาดำมีการลอกคราบได้ในเวลาใกล้เคียงกัน ขนาดของกุ้งจะใกล้เคียงกันเพื่อแก้ปัญหาการกินกันเอง ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไป

10. สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้านปลายของยีนด้วยเทคนิค RACEs (Rapid Amplification of cDNA Ends)

RACEs เป็นเทคนิคที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้านปลายทั้งสองด้านของยีนเพื่อการโคลนยีนแบบสมบูรณ์ของยีนที่สนใจ โดยเป็นวิธีการใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก mRNA ส่วนหนึ่งโดยต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนก่อน (สุรินทร์, 2548) เพื่อนำไปออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน (gene specific primer) หลักการทำงานของ RACEs คือ เมื่อได้ชิ้นส่วนยีนที่สนใจ แล้วนำมาโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มจำนวนยีนทางด้าน ปลาย 5’ และ 3 ’ cDNA จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจากยีนด้าน 5’ และ 3 ’ดังกล่าว เพื่อให้ได้ความยาวตลอดสาย ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนในเวคเตอร์ที่เหมาะสมต่อไป (ภาพที่ 9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 Overview of the RACE procedure

ที่มา: Clontech Laboratories, Inc. (2007)

ข้อดีของการหาความยาวตลอดสายโดยวิธี RACEs คือใช้เวลาน้อยในการหาความยาวตลอดสายของยีน โดยไม่จำเป็นต้องทำ cDNA library ที่ต้องใช้เวลาในการทำมากเพื่อที่จะได้แต่ละชิ้นโคลนของ cDNA และเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ความผิดปกติของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ได้โดยใช้ PCR ซึ่งใช้เวลาในการทำไม่มาก สิ่งที่สำคัญคือไม่มีข้อจำกัดของโคลนที่นำมาใช้ (Carl and Gabriela, 2003)

เทคนิค RACEs เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการหาความยาวตลอดสาย โดย Zhenhua *et al.*, 2008 ใช้เทคนิคนี้ในการหาความยาวตลอดสายของยีน ZmPIS2, ZmPLC2, ZmDGK1, ZmDGK2 และ ZmDGK3 ซึ่งเกี่ยวข้องกับ signaling pathways ของ phosphoinositide และ phospholipid ที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ในปีเดียวกัน Takenaka *et al.*, (2008) ใช้ RACEs ในการหา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความยาวตลอดสายของยีน luciferases จากโคพีพอดน้ำเค็ม (marine copepod) เพื่อใช้เป็นยีนติดตามการแสดงออกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

จากงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ต้องการหาความยาวตลอดสาย มักใช้เทคนิค RACEs เนื่องจากประหยัดเวลา โดยไม่จำเป็นต้องทำ cDNA library และสามารถใช้เทคนิคนี้ได้กับทุกยีนที่สนใจ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระยะตัวเต็มวัย (adult) อายุ 40 วัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งฉะเชิงเทรา

2. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

Autoclave

Autopipette

Refrigerated centrifuge

Microcentrifuge

Electrophoresis unit: Submerged Agarose Gel Electrophoresis System

Incubator

Incubator shaker

Incubator water bath

Larminar flow

Magnetic stirrer

Microwave

pH meter

Thermal Cycler

UV Visible spectrophotometer

Vortex mixer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีและสารละลายที่จำเป็น

Absolute ethanol (C_2H_5OH) (Merck, Germany)

Acetic acid glacial (CH_3COOH) (BDH, UK)

Ammonium acetate (Merck, Germany)

Bromophenol blue (Merck, Germany)

Calcium chloride (Sigma, USA)

Chloroform (Merck, Germany)

Formaldehyde (BDH, Germany)

Glucose (Sigma, USA)

Glycerol (BDH, UK)

Hydrochloric acid (Merck, Germany)

Isoamyl alcohol (Merck, Germany)

Isopropanol (Merck, Germany)

2-mercaptoethanol (Sigma, USA)

Polyvinylpyrrolidone (Sigma, USA)

Potassium chloride (Sigma, USA)

Sodium acetate (Merck, Germany)

Sodium chloride (Merck, Germany)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Germany)

Sodium hydroxide (BDH, UK)

TRIzol reagent (Gibco BRL, USA)

Xylene cyanol FF (Sigma, USA)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย

LB Broth (Scharlau Chemie S.A., European Union)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับงานด้าน Molecular Cloning

Agarose (Amresco, USA)

Ampicillin (Sigma, USA)

5-bromo-4-chloro-3-indoyl-ß-D-galactopyranoside (X-gal) (Sigma, USA)

Chloroform (Merck, Germany)

Diethyl pyrocarbohydrate (DEPC)

100 mM dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Promega, USA)

DNA marker: lampda DNA, 1 Kb plus DNA ladder
(Frementas, USA)

Ethanol, absolute (Merck, Germany)

Ethidium bromide (EtBr) (Sigma, USA)

Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium salt dihydrate (EDTA)
(Merck, Germany)

Formaldehyde (BDH, UK)

Formamide (BDH, UK)

Isopropyl-ß-D-thiogalactoside (IPTG) (Sigma, USA)

Phenol (Sigma, USA)

Ribonuclease Inhibitor (Frementas, USA)

Tris-(hydroxy methyl)-aminomethane (Sigma, USA)

3.4 ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับงานด้าน Molecular Cloning

BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, USA)

Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)

Plasmid Miniprep Kit (Axygen, USA)

pGEM-T® easy vectors Systems (Promega, USA)

Reverse transcription System Kit (Promega, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 เอนไซม์และเอนไซม์ตัดจำเพาะ

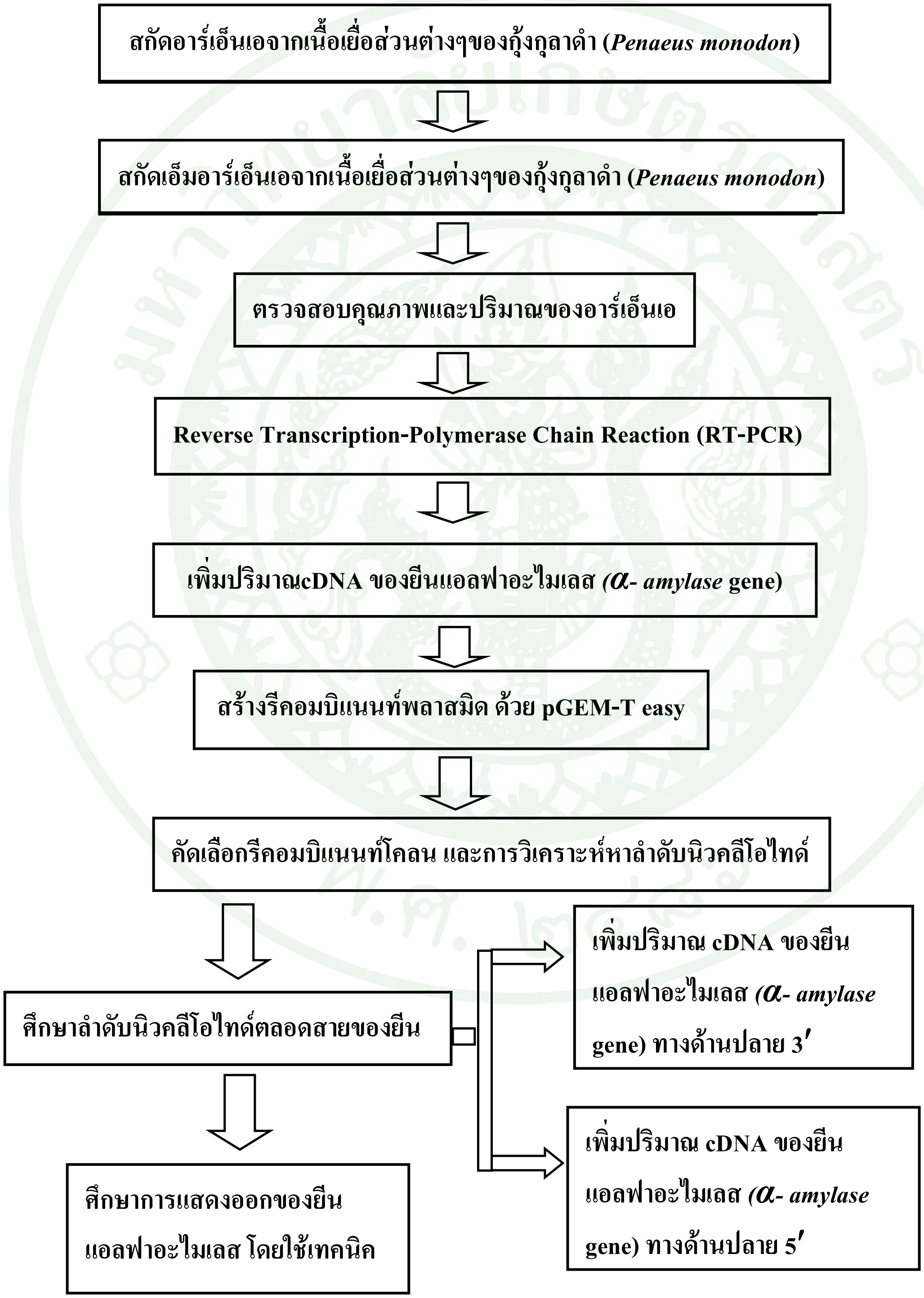
*Eco*RI Buffer (BioLabs, USA)

Restriction enzymes *Eco*RI (BioLabs, USA)

RNase A (Sigma, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. สรุปขั้นตอนการทดลอง



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. เก็บเนื้อเยื่อจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำ 1 ตัว ที่ยังมีชีวิตโดยกุ้งกุลาดำระยะตัวเต็มวัย อายุ 40 วัน มาผ่าตัดเอาส่วนของกระเพาะอาหาร ตับอ่อน ก้านตา หัวใจ และเหงือก แช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บไว้ที่ –80 ^{o}C

2. โคลนยีนอะไมเลสโดยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.1 สกัด total RNA และ mRNA จากอวัยวะส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ

สกัด total RNA จากอวัยวะส่วนต่างๆ คือ กระเพาะอาหาร ตับอ่อน ก้านตา หัวใจ และเหงือกของกุ้งกุลาดำด้วย Trizol Reagent (Gibco-BRL, USA) ตามขั้นตอนดังนี้

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำแต่ละส่วนน้ำหนักประมาณ 1 กรัม มาเติม Trizol reagent 1 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำตัวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4^{o}C ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วกลับหลอดไปมา 15 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4^{o}C ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม Isopropyl alcohol 500 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ – 20^{o}C นาน 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4^{o}C ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอโดยใช้ 75% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครลิต โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4^{o}C ทำให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 – 10 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการเติม DEPC หรือ H_2O 30 ไมโครลิตร กำจัด DNAที่อาจปนเปื้อนมาโดยการย่อย DNA ด้วย RNase-free DNa หลังจากนั้นจะทำการสกัดแยก mRNA จาก total RNA และวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ mRNA ด้วยเทคนิค spectrophotometry และเทคนิค agarose gel electrophoresis

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

2.3 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) ไปสังเคราะห์ first-strand cDNA โดยใช้ Reverse Transcription System (Promega, USA) ซึ่งจะประกอบด้วย 2 ไมโครกรัม total RNA, oligo(dT)12 mer และเอนไซม์ reverse transcriptase เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูลมาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W เลือกบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) ในการออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ (ตารางที่ 1)

นำ Complementary DNA (cDNA) ที่สังเคราะห์ได้มาเติม ส่วนประกอบต่างๆดังนี้

Reaction mixture:

10X PCR buffer	10	ไมโครลิตร
50mM $MgCl_2$	2.5	ไมโครลิตร
10mM dNTP	2	ไมโครลิตร
10 pmol primers ชนิดละ	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	1	ไมโครลิตร
cDNA template (Dilute 1:10)	10	ไมโครลิตร
Distilled water เติมจนได้ปริมาตรครบ	50	ไมโครลิตร
Total	50	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นต้นแบบ

ไพรเมอร์	ลำดับ(5′ ⟶ 3′)	ตำแหน่ง (nt)	Tm (°C)
SAmy-F	5′- GTGGGAGAGGTACCAGCCC- 3′	228 -246	55
SAmy-R	5′- AGGGCGATCTGGTTGCTG- 3′	1287 - 1304	55
FPM_SP	5′- ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTG- 3′	1- 27	68
RPM_SP	5′- CTTCATGTCCCCGGGCCACATGTGTTT - 3′	649 - 675	68

เตรียมส่วนผสมทุกอย่างเรียบร้อยแล้วนำมาเข้าเครื่อง Thermocycler ที่มีรอบการทำงานดังนี้

PCR condition :

Step ที่ 1	94 °C	2 นาที	1 รอบ
Step ที่ 2	94 °C	30 วินาที	35 รอบ
	55 °C	30 วินาที	
	68 °C	2 นาที	
Step ที่ 3	72 °C	5 นาที	1 รอบ
Step ที่ 4	4 °C	999 นาที	

วิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ โดยนำไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1% แล้วนำมาย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้

2.4 เชื่อมต่อชิ้นยีนอะไมเลสกับพลาสมิด pGEM®-T easy

การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ pGEM-T easy vector

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ของยีนแอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการทำ RT-PCR มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) นำชิ้นส่วน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®- T easy (Promega, USA) โดยใช้ส่วนประกอบดังนี้ 2x rapid ligation buffer, 50 ng pGEM-T easy vector, PCR product, 3U T4 DNA ligase ทำการผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการย้ายส่วนผสมเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* JM109 ที่มีค่า OD_{600} ประมาณ 0.4-0.6 ด้วยวิธี heat shock transformation ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำการแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที (Sambrook and Russell, 2001) แล้วทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอบนอาหารแข็งสูตร Luria-Bertani agar (LB agar) ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Isopropyl-β-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็งสูตร LB ทำการตรวจสอบพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ด้วยวิธี PCR และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

การชักนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (*E. coli*: JM109) โดยวิธี heat-shock ตามขั้นตอนดังนี้

นำ competent cell 50 ไมโครลิตร แบ่งใส่ในหลอดที่มี fragment และ control แช่ในน้ำแข็ง 20 นาที ทำการย้ายส่วนผสมเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* JM109 ที่มีค่า OD_{600} ประมาณ 0.4- 0.6 ด้วยวิธี heat shock transformation ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำการแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหาร LB 400 ไมโครลิตร และพันหลอดด้วยฟาราฟินใส่ลงในฟลาสก์นำไปบ่มในตู้ shaker ที่ 250 rpm $37^{o}C$ เป็นเวลา 1 ชม. นำอาหาร LA + Amp (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ไมโครกรัม) ไปบ่มที่ $37^{o}C$ ก่อนนำมาใช้ ผสม X – gal (ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ไมโครกรัม) กับ IPTG (ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/ไมโครกรัม) ในอัตราส่วน 5 : 1 หยดลงตรงกลาง plate (LA + AMP) นำไป spread plate รอจน plate แห้ง นำเชื้อที่บ่มไปปั่นที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้งให้เหลือก้นหลอด นำไป vortex เพื่อให้ตะกอนและอาหารเข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายลงไปอยู่ก้นหลอดทั้งหมด ดูดสารละลายทั้งหมดหยดลงตรงกลาง plate (LA + AMP + X –gal + IPTG) นำไป spread plate รอจน plate แห้ง นำไปบ่มที่ $37^{o}C$ เป็นเวลา 16 ชม. เก็บรักษาไว้ที่ $4^{o}C$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA insert) โดยวิธี colony PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยทำอิเล็คโทรโฟรีซีสโดยใช้เจลอะกาโรส 1% สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยวิธี alkaline lysis และชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป ตามขั้นตอนดังนี้

เทเชื้อใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 – 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมเชื้ออีกประมาณ 0.5 – 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารแล้วดูดอาหารที่เหลือออกจนหมด เติม Sol^{n} I 200 ไมโครลิตร นำไป vortex เพื่อให้เซลล์ละลายจนหมด เติม RNase A 3 ไมโครลิตร และนำไป vortex แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม Sol^{n} II 400 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม Sol^{n} III 200 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm $4^{o}C$ เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติม chloroform 500 ไมโครลิตร นำไป vortex ไม่ให้ติดก้นหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบน 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol 360 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm $4^{o}C$ เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม 70% เอธานอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายเอธานอลออก ทำให้ตะกอนแห้ง หลังจากนั้นเติมน้ำ 30 ไมโครลิตร เคาะให้ตะกอนละลายสลับกับการนำไป spin down นำไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1% หลังจากได้โคลนที่ต้องการแล้ว นำโคลนนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยมีส่วนผสมดังนี้

H_2O	7	ไมโครลิตร
10 X buffer	1	ไมโครลิตร
*Eco*RI Enzyme	1	ไมโครลิตร
Plasmid	1	ไมโครลิตร
Total	10	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. นำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยใช้เจลอะกาโรส 1% โดยใช้โคโลนีสีฟ้าเป็นตัว control โดยมีส่วนผสมดังนี้

H_2O	7	ไมโครลิตร
Dye	1	ไมโครลิตร
Plasmid	1	ไมโครลิตร
Total	10	ไมโครลิตร

นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ automated DNA sequencer (ABI377, PE Applied Biosystems, USA) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เพื่อนำไปใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลส

2.6 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีน

สังเคราะห์ first-strand cDNA โดยใช้ BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, USA) โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนแอลฟาอะไมเลส ซึ่งออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 2.5 นำไพรเมอร์ที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลสด้วยวิธี 5′⟶ 3′ RACEs หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของปลาย 3′ มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายโดยใช้ไพรเมอร์ FPM_SP* คู่กับ UPM* เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกันหรือไม่ ตามขั้นตอนดังนี้

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งกุลาดำเป็นต้นแบบ

ไพรเมอร์	ลำดับ(5′⟶3′)	ตำแหน่ง (nt)	Tm (°C)
RACE_PSF	5′- TCGACTTCAACGACGGCAACTGCCACAC- 3′	451 - 478	68
UPM*	5′- CTAATACGACTCACTATAGGGC - 3′	-	68
FPM_SP*	5′- ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTG- 3′	1- 27	68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

UPM* = Universal primer of SMART^{TM} RACE cDNA Amplification kit

FPM_SP* = ออกแบบจากฐานข้อมูลตั้งแต่ส่วน start codon ของ Accession number: X77318.1

RACE – PCR :

การทำปฏิกิริยา PCR แบบ Touch down

นำ Complementary DNA (cDNA) ที่สกัดได้มาเติม ส่วนประกอบต่างๆดังนี้

Reaction mixture :

10X Advantage 2 PCR Buffer	5 ไมโครลิตร
10mM dNTP mix	1 ไมโครลิตร
50x Advantage 2 Polymerase mix	5 ไมโครลิตร (เติมเป็นลำดับสุดท้าย)
PCR – grade water	34.5 ไมโครลิตร
Total	41.5 ไมโครลิตร

5' RACE – PCR Reaction

10X UPM (Universal primer)	5 ไมโครลิตร
10 pmol RACE_PSR primer	1 ไมโครลิตร
5'-RACE cDNA	2.5 ไมโครลิตร
Total	50 ไมโครลิตร

3' RACE – PCR Reaction

10X UPM (Universal primer)	5 ไมโครลิตร
10 pmol RACE_PSF primer	1 ไมโครลิตร
3'-RACE cDNA	2.5 ไมโครลิตร
Total	50 ไมโครลิตร

หลังจากเตรียมส่วนประกอบทุกอย่างเรียบร้อยแล้วนำมาเข้าเครื่อง Thermocycler ที่มีรอบการทำงานดังนี้

Touch down -PCR condition :

Step ที่ 1	94 ^{O}C	30	วินาที	
	77 ^{O}C	3	นาที	
Step ที่ 2	94 ^{O}C	30	วินาที	5 รอบ
	70 ^{O}C	30	วินาที	
	72 ^{O}C	3	นาที	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Step ที่ 3	94 ^{O}C	30	วินาที	25 รอบ
	68 ^{O}C	30	วินาที	
	72 ^{O}C	3	นาที	
Step ที่ 4	4 ^{O}C	999	นาที	

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1%และย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์

2.7 ศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส โดยใช้เทคนิค RT-PCR

สกัด RNA จากเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆ ได้แก่ กระเพาะอาหารตอนต้น ตอนกลาง ตอนปลาย ตับอ่อน ก้านตา หัวใจและเหงือก เพื่อดูว่าสามารถแสดงออกได้ในเนื้อเยื่อใดบ้าง โดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบ และใช้การแสดงออกของยีนเบต้าแอคติน (housekeeping gene: β - actin) เปรียบเทียบอ้างอิง ดังรายละเอียดข้างต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

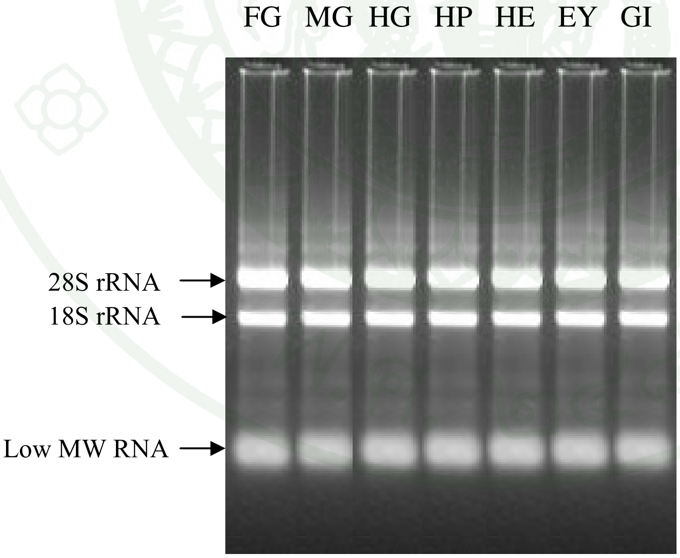
1. การสกัดอาร์เอ็นเอของกุ้งกุลาดำ

การสกัดอาร์เอ็นเอของกุ้งกุลาดำจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วนต้น (Foregut), กระเพาะอาหารตอนกลาง (Midgut), กระเพาะอาหารส่วนปลาย (Hindgut), ตับอ่อน (Hepatopancreast), หัวใจ (Heart), ก้านตา (Eyestalk) และเหงือก (Gill) ด้วยวิธี Trizol Reagent จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วย 2 วิธี คือ การวัดค่าดูดกลืนแสง (Optimal Density : OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และที่ 280 นาโนเมตร และเมื่อนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis) พบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณ 681.36 - 114.46 ng/µl เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่ได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร พบว่ามีค่าความบริสุทธิ์สูงเท่ากับ 1.83 – 2.06 เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ OD260/280 มาตรฐานเท่ากับ 1.80 – 2.00 ถือว่าอาร์เอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง (ตารางที่ 3) นำอาร์เอ็นที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส 1% พบว่าอาร์เอ็นเอมีคุณภาพดีไม่เสียสภาพ (ภาพที่ 10)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง (Optimal Density : OD)

เนื้อเยื่อ	OD260	OD280	OD260/280	ความเข้มข้น (dilution 100) ng/μl
กระเพาะอาหารส่วนต้น	0.34	0.17	2.00	681.36
กระเพาะอาหารตอนกลาง	0.06	0.03	1.88	114.46
กระเพาะอาหารส่วนปลาย	0.17	0.09	1.99	345.64
ตับอ่อน	0.20	0.10	2.06	411.88
หัวใจ	0.10	0.06	1.83	209.04
ก้านตา	0.16	0.09	1.89	323.44
เหงือก	0.20	0.10	2.00	396.86



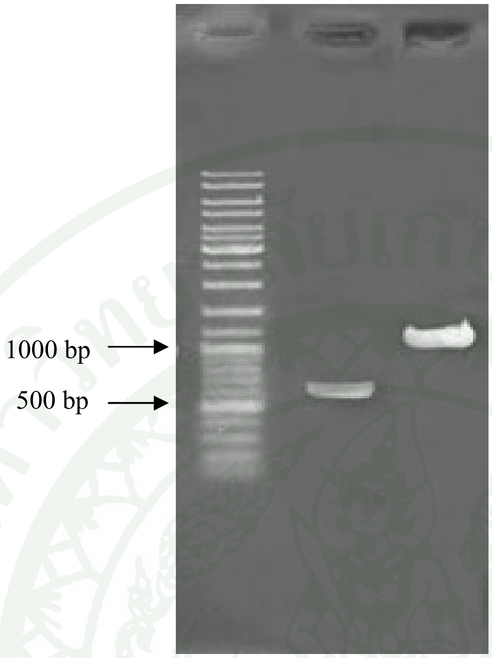
ภาพที่ 10 ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1% ของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ (*P.monodon*); ช่องที่ 1 คือ กระเพาะอาหารส่วนต้น (FG), ช่องที่ 2 คือ กระเพาะอาหารส่วนกลาง (MG), ช่องที่ 3 คือ กระเพาะอาหารส่วนปลาย (HG), ช่องที่ 4 คือ ตับอ่อน (HP), ช่องที่ 5 คือ หัวใจ (HE), ช่องที่ 6 คือ ก้านตา (EY) และช่องที่ 7 คือ เหงือก (GI)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลสด้วยวิธี PCR

นำอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) มาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโดยใช้โปรแกรม Oligos จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสในกุ้งขาวแวนนาไม (Accession number: X77318.1) (ภาพที่ 12) ที่มีความจำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลส คือ set1 (ตารางที่ 4) โดยนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสโดยใช้โปรแกรมที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน denaturation ที่ 94 ^{O}C 30 วินาที annealing ที่ 55^{O}C 30 วินาที และ extension ที่ 72 ^{O}C 2 นาที นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1% พบว่า ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 11) และ set2 (ตารางที่ 4) โดยนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสโดยใช้โปรแกรมที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน denaturation ที่ 94 ^{O}C 30 วินาที annealing ที่ 68^{O}C 30 วินาที และ extension ที่ 72 ^{O}C 2 นาที นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1% ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1100 คู่เบส (ภาพที่ 11)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ set1 และ set2 ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1%, ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, ช่องที่ 2 คือ ชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ set1 ขนาด 700 คู่เบส, ช่องที่ 3 คือ ชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ set2 ขนาด 1100 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

> *P.vanameii* (Accession number: X77318.1)

```
FPM_SP ──────────────────►
ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTGCTGTTGGCTGCGGCCGCACAGGCGCAGTGGGATCCCAACTCTAGCAATG
GACAGGTTATCGTCCACTTGTTTGAGTGGAAGTGGTCGGACATCGCCGCCGAATGCGAGAACTTCTTGGGTCCTCG
                                                                      SAmy F1
AGGATTCGCCGGCGTTCAGGTATCACCGCCTAACGAATACGTGGAGGTGTACCAGGGAGACGTGAAGCGGCCGTGG
─────────────────►
TGGGAGAGGTACCAGCCCGTCTCCTATAAACTCGTCACTCGCTCCGGTGACGAAAATGCTTTCAAAGACATGGTCA
CACGCTGCAACAACGTGGGAGTCAGGATCTACGTCGACGCTGTGATAAACCACATGTCAGGGGGATGGCCGATGGG
CACAGGAGCCTCCGGGGGGTCCTCCTTCGACTCGGGCGCGGAGTCCTACCCCGGGGTTCCTTACTCCGCTTTCGAC
TTCAACGACGGCAACTGCCACACCGGGTCCGGGAACATTGAAAACTACGGCGACGCCAATCAGGTGCGCAACTGCA
AACTGGTTGGGCTGAACGACCTGAACCAAGGCACTGACTACGTGCGAGGTAAGATCAGGGAATTCATGAACAAGCT
CATCAGCTACGGTGTCGCCGGCTTCCGCATCGACGCCAGCAAACACATGTGGCCCGGGGACATGAAGGCCATTTTT
GATAGCCTGGACAACCTCAACACGGATTTCTTCAAGGCCGGTGCCAGACCTTTCATCTTCCAAGAAGTCATCGACT
TGGGTGGCGAAGCCATATCCAGCGGAGAATATGTTGGCAACGGTCGTGTGACGGAGTTCCGGTACGGCAAGTACCT
GGGCGAGGCCTTCCGCGGCAACAACCAGCTGAAGTACCTCAACAACTTCGGCGAAGGCTGGGGCATGATAGACCGC
CATGACGCACTCGTCTTCATTGACAACCACGACAACCAGCGCGGCCATGGTGCCGGAGGAGACATGATCCTTACCT
                                                                     ◄────
TCCGTGTCTCTAAGTGGTACAAGATGGCTACTGCATACATGCTGGCTTGGCCTTACGGCTACACTCGCGTGATGTC
──────────── RPM_PM
GTCGTACTACTGGGACCAATGGTGGGAGAATGGCCAGGATAAGAACGACTGGATCGGACCTCCTCACGACGGCAGC
TTCAACATCATCAGCCCGAGCTTCAACGCCGACGGCAGCTGCGGGAACGGCTGGATCTGCGAGCACCGCTGGAGGC
                                                                    ◄─────
AGATCTACAACATGGTGGAATTCCGGAATGTTGCCCATGGGACGGACATGAACGACTGGTGGGATAACGGCAGCAA
───── SAmy R1
CCAGATCGCCTTCTGCAGAGGCAACAAGGGCTTCCTGGCCATCAACAACGACGGATGGGATCTGAAGGAGACGCTG
CAGACTTGCCTTCCTGCGGGTACGTACTGCGACGTCATCTCCGGGTCGAAGAACGGAGGCTCCTGCACGGGCAAGA
GCGTGACTGTGGGCGGCGACGGAAAGGCCTACATCGAGATCACGACCATGGAAGACGACGGCGTGCTTGCTATCCA
TGCCAACTCGAAACTGTAA
```

ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์ของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นต้นแบบ

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*); ไพรเมอร์ 2 set

Primer	Sequence (5′ ⟶ 3′)
SAmy F1	GTGGGAGAGGTACCAGCCC
SAmy R1	AAGGCGATCTGGTTGCTG
FPM_SP	ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTG
RPM_PM	CTTCATGTCCCCGGGCCACATGTGTTT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสบางส่วนที่เชื่อมต่อกับ pGEM-T easy vector

นำชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T easy vector และนำไปเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ JM109 คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวบน LB-agar plate ที่มี X-gal + IPTG มาตรวจสอบ พลาสมิดลูกผสม ด้วยวิธี alkaline lysis และชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองคล้ายกับยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไม (Accession number: X77318.1) หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PmAmy* ทั้งสองส่วนมารวมกันโดยใช้โปรแกรม CAP3 (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์จำนวน 1304 คู่เบส เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า Contig 1

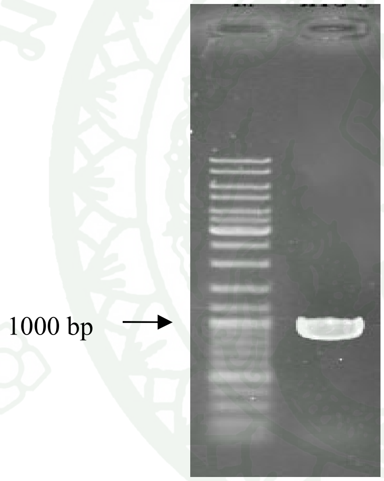
4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาย 3' UTR ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ด้วยวิธี RACE - PCR

นำ cDNA ของเนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) มาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของปลาย 3′UTR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบจากส่วนที่จำเพาะเจาะจงกับชิ้นยีนแอลฟาอะไมเลสในกุ้งกุลาดำ (ภาพที่ 14) โดยใช้โปรแกรม Oligos ซึ่งตำแหน่งที่วางไพรเมอร์นั้นจะเริ่มต้นจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 452 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ Forward (ตารางที่ 5) ส่วนไพรเมอร์ที่เป็น Reverse เป็นไพรเมอร์ที่ได้จากชุดสำเร็จ (BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit) นำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบ Touch down ที่มีอุณหภูมิใน step ที่ 1 ขั้นตอน denaturation ที่ $94^{O}C$ 30 วินาที annealing ที่ $72^{O}C$ 3 นาที, step ที่ 2 denaturation ที่ $94^{O}C$ 30 วินาที annealing ที่ $70^{O}C$ 30 วินาที extension ที่ $72^{O}C$ 3 นาที และ step ที่ 3 denaturation ที่ $94^{O}C$ 30 วินาที annealing ที่ $70^{O}C$ 30 วินาที extension ที่ $68^{O}C$ 3 นาที นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1% ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส (ภาพที่ 13) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T easy vector และนำไปเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวมาตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม ด้วยวิธี alkaline lysis และชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป นำพลาสมิดที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Macrogen ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไม (Accession number: X77318.1)

นำดีเอ็นเอส่วน Contig 1 มารวมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ได้ดีเอ็นเอส่วนของด้านปลาย 3′ โดยใช้โปรแกรม CAP3 (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php) มีขนาด 1647 คู่เบส ส่วนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของด้านปลาย 5′ ยังไม่ประสบความสำเร็จ



ภาพที่ 13 ขนาดของยีน *PmAmy* โดยใช้ไพรเมอร์ RACE_PSF คู่กับ UPM ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1%, ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, ช่องที่ 2 คือ ยีน *PmAmy* โดยใช้ไพรเมอร์ RACE_PSF คู่กับ UPM ขนาด 950 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>P.monodon partial

```
ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTGCTGTTGGCTGCGGCCACACAAGCCCAGTGGGATCCCAACTCCAGCAATG
GACAAGTAATCGTCCACTTGTTTGAATGGAAGTGGTCGGACATCGCCGCGGAATGCGAGAACTTCTTGGGTCCTCG
AGGATTCGCCGGCGTTCAGGTATCACCACCTAACGAGTATGTGGAGGTGTACCAAGGAGACGTGCAACGACCGTGG
TGGGAGAGGTACCAGCCCGTCTCCTATAAACTCGTCACTCGTTCCGGTGACGAAAATGCTTTCAAAGACATGGTCA
CACGCTGCAACAATGTGGGAGTTAGGATCTACGTCGACGCTGTGATAAACCACATGTCTGGCGGATGGCCTCTGGG
                                                                    RACE_PSF
CACAGGAGCCTCCGGTGGGTCCTCCTTCGACTCGGGCGCACAGTCCTACCCCGGCGTTCCTTTCTCCGCCTTCGAC
 ------------------->
TTCAACGACGGCAACTGCCACACCGGTTCCGGGAACATTGAAAACTACGGCGACGCCAATCAGGTGCGCAACTGCA
AATTGGTTGGACTGAACGACCTGAACCAAGCCACTGACTACGTCCGAGGGAAAATCAGGGAATTCATGAACAAGCT
CATCGGCTACGGGGTCGCCGGCTTCCGCATCGACCCCAGCAAACACATGTGGCCCGGGGACATGAAGCCCATTTTC
GATAGCCTGAACgACCTCAATACAGATTTCTTCAAGGCCGGGGCCAGACCTTTCATCTTCCAAGAAGTCATTGACC
TGGGTGGCGAAGCCATATCCAGCCAAGAGTATGTTGGCAACGGTCGTGcGACGGAGTTCAGGTACGGCAAGTACCT
GGGCGAAGCCTTCCGCGGCAACAACCAGCcGAAATACCTCAACAACTTCGGCGAAGGTTGGGGCAcGATGGACCGG
CATGACGCATTGGCCTTCATcGACAAtCAtGACAACCAGAGAGGCCATGGTGCTGGAGGAGACAcGATCCTTACTT
TCCGTGTCTCTAAGTGGTACAAGATGGCCACCGCATACATGCTGGCaTGGCCTTACGGaTACACCCGaGcGATGTC
GTCGTACTACTGGGACCAATGGTGGGAGAATGGCCAGGATAAGAACGACTGGATCGGACCTCCTCACGACGGCAGC
TTCAACATCATCAGCCCGAGCTTCAACGCTGACGGCAGCTGCGAGAACGGCTGGATCTGCGAGCACCGCTGGAGGC
AGATTTACAACATGGTGGAGTTCCGTAATGTTGCCCATGGTACGGACAcGAACGACTGGTGGGACAACGGCAGCAA
CCAGATCGCCTT
```

ภาพที่ 14 การออกแบบไพร์เมอร์ของยีน *PmAmy* ในส่วนกลางยีน

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*); ไพรเมอร์ 3' RACE-PCR

Primer	Sequence (5′ → 3′)
RACE_PSF	TCGACTTCAACGACGGCAACTGCCACAC
UPM*	CTAATACGACTCACTATAGGGC

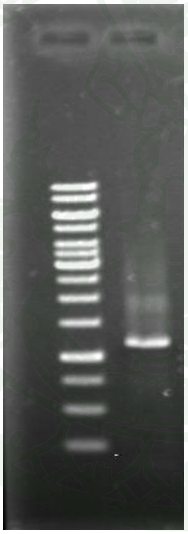
UPM* = Universal primer of SMART™ RACE cDNA Amplification kit

5. การเพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ตลอดสายด้วยวิธี RACE - PCR

หลังจากได้ชิ้นของดีเอ็นเอ 3 ชิ้นแบบมาต่อกัน พบว่า เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้ จึงได้ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสตลอดสายโดยใช้ cDNA ของเนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) มาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ Forward ของ set 2 คู่กับ Reverse ของ UPM

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Universal primer of SMART^{TM} RACE cDNA Amplification kit) (ตารางที่ 6) ที่มีความจำเพาะต่อยีน (ภาพที่ 16) โดยเมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบ Touch down ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ลดอุณหภูมิของ annealing ลงที่ละ step โดยอุณหภูมิใน step ที่ 1 ขั้นตอน denaturation ที่ 94^{O}C 30 วินาที annealing ที่ 72^{O}C 3 นาที, step ที่ 2 denaturation ที่ 94^{O}C 30 วินาที annealing ที่ 70^{O}C 30 วินาทีextension ที่ 72^{O}C 3 นาที และ step ที่ 3 denaturation ที่ 94^{O}C 30 วินาที annealing ที่ 68^{O}C 30 วินาทีextension ที่ 70^{O}C 3 นาที ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้มีความจำเพาะต่อยีน *PmAmy* โดยสามารถเพิ่มปริมาณยีนในส่วนของ start codon จนถึงปลาย poly A ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำ PCR Product ที่ได้มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1% จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1700 คู่เบส (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ขนาดของยีน *PmAmy* โดยใช้ไพรเมอร์ FPM_SP คู่กับ UPM ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1%, ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, ช่องที่ 2 คือ ยีน *PmAmy* โดยใช้ไพรเมอร์ FPM_SP คู่กับ UPM ขนาด 1700 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>P.monodon mRNA

```
FPM_SP ──────────────►
ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTGCTGTTGGCTGCGGCCACACAAGCCCAGTGGGATCCCAACTCCAGCAATG
GACAAGTAATCGTCCACTTGTTTGAATGGAAGTGGTCGGACATCGCCGCGGAATGCGAGAACTTCTTGGGTCCTCG
AGGATTCGCCGGCGTTCAGGTATCACCACCTAACGAGTATGTGGAGGTGTACCAAGGAGACGTGCAACGACCGTGG
TGGGAGAGGTACCAGCCCGTCTCCTATAAACTCGTCACTCGTTCCGGTGACGAAAATGCTTTCAAAGACATGGTCA
CACGCTGCAACAATGTGGGAGTTAGGATCTACGTCGACGCTGTGATAAACCACATGTCTGGCGGATGGCCTCTGGG
CACAGGAGCCTCCGGTGGGTCCTCCTTCGACTCGGGCGCACAGTCCTACCCCGGCGTTCCTTTCTCCGCCTTCGAC
TTCAACGACGGCAACTGCCACACCGGTTCCGGGAACATTGAAAACTACGGCGACGCCAATCAGGTGCGCAACTGCA
AATTGGTTGGACTGAACGACCTGAACCAAGCCACTGACTACGTCCGAGGGAAAATCAGGGAATTCATGAACAAGCT
CATCGGCTACGGGGTCGCCGGCTTCCGCATCGACCCCAGCAAACACATGTGGCCCGGGGACATGAAGCCCATTTTC
GATAGCCTGAACgACCTCAATACAGATTTCTTCAAGGCCGGGGCCAGACCTTTCATCTTCCAAGAAGTCATTGACC
TGGGTGGCGAAGCCATATCCAGCCAAGAGTATGTTGGCAACGGTCGTGcGACGGAGTTCAGGTACGGCAAGTACCT
GGGCGAAGCCTTCCGCGGCAACAACCAGCcGAAATACCTCAACAACTTCGGCGAAGGTTGGGGCAcGATGGACCGG
CATGACGCATTGGCCTTCATcGACAAtCAtGACAACCAGAGAGGCCATGGTGCTGGAGGAGACAcGATCCTTACTT
TCCGTGTCTCTAAGTGGTACAAGATGGCCACCGCATACATGCTGGCaTGGCCTTACGGaTACACCCGaGcGATGTC
GTCGTACTACTGGGACCAATGGTGGGAGAATGGCCAGGATAAGAACGACTGGATCGGACCTCCTCACGACGGCAGC
TTCAACATCATCAGCCCGAGCTTCAACGCTGACGGCAGCTGCGAGAACGGCTGGATCTGCGAGCACCGCTGGAGGC
AGATTTACAACATGGTGGAGTTCCGTAATGTTGCCCATGGTACGGACAcGAACGACTGGTGGGACAACGGCAGCAA
CCAGATCGCCTTCTGCAGAGGCAACAAGGGCTTCCTGGCCATCAATAACGACGGATGGGATCTGAAGGAGACGCTG
CAGACTTGCCTCCCTGCGGGTACGTACTGTGACGTCATCTCCGGAGGCGGAGACGGAGGCTCCTGCACGGGCAAGA
GCGTGACTGTGGGCGGCGACGGAAAGGCCTACATCGAGATTACGACCATGGAAGACGACGGAGTGCTTGCTATCCA
TGCCAACTCCAAACTGTGATCTGTCGGACGCCAGAGAAAGGAACTTGTCGTCTTATTGGGAATCATTTCATCGTCA
TCAAATAAAAAGAGCATTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

ภาพที่ 16 การออกแบบไพร์เมอร์ของยีน *PmAmy* ตั้งแต่ start codon จนถึงปลาย polyA

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ตลอดสาย

Primer	Sequence (5′→3′)
FPM_SP	ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTG
UPM*	CTAATACGACTCACTATAGGGC

UPM* = Universal primer of SMART™ RACE cDNA Amplification kit

6. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*)

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ที่มีขนาดประมาณ 1700 คู่เบส มาเชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T easy vector และนำไปเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวมาตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม ด้วยวิธี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

alkaline lysis และชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป ส่งพลาสมิดลูกผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ฐานข้อมูลจาก GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PmAmy* (ภาพที่ 17) มีความเหมือนกับยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไม (Accession number: X77318.1) (ภาพที่ 18) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 100 ตำแหน่ง ทำให้มีความเหมือนกับยีนแอลฟาอะไมเลส ของกุ้งขาวแวนนาไม 93.50 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนของรหัสสังเคราะห์โปรตีน (Open reading frame) มีความยาว 1539 bp เมื่อแปลงเป็นกรดอะมิโนประกอบด้วย 512 เรซิดิวส์ (ภาพที่ 17) เมื่อเปลี่ยนลำดับ นิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า ผลจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน 24 ตำแหน่ง (ตารางที่ 7) และมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของกุ้งขาวแวนนาไม คิดเป็น 95.31 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 19) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนในภาพที่ 19 มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI โดยใช้โปรแกรม Expasy (http://au.expasy.org) สามารถคำนวณได้เท่ากับ 56.90 kDa และ 5.04 ตามลำดับ จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนมาหา Conserve Domain ที่สำคัญของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิต พบว่า ลำดับกรดอะมิโนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำมีโปรตีน Conserve Domain ถึง 9 Domain ซึ่งประกอบไปด้วย FEW, GFAGVQVSP, DAVINH, NYGD, LNDLN, GFRIDPSKH, EVID, FIDNHD และ GYTRAMSSY (ภาพที่ 19)

```
      ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTGCTGTTGGCTGCGGCCACACAAGCCCAGTGGGAT   60
  1    M  L  R  V  A  P  L  V  V  L  L  A  A  A  T  Q  A  Q  W  D
      CCCAACTCCAGCAATGGACAAGTAATCGTCCACTTGTTTGAATGGAAGTGGTCGGACATC   120
 21    P  N  S  S  N  G  Q  V  I  V  H  L  F  E  W  K  W  S  D  I
      GCCGCGGAATGCGAGAACTTCTTGGGTCCTCGAGGATTCGCCGGCGTTCAGGTATCACCA   180
 41    A  A  E  C  E  N  F  L  G  P  R  G  F  A  G  V  Q  V  S  P
      CCTAACGAGTATGTGGAGGTGTACCAAGGAGACGTGCAACGACCGTGGTGGGAGAGGTAC   240
       P  N  E  Y  V  E  V  Y  Q  G  D  V  Q  R  P  W  W  E  R  Y
      CAGCCCGTCTCCTATAAACTCGTCACTCGTTCCGGTGACGAAAATGCTTTCAAAGACATG   300
 81    Q  P  V  S  Y  K  L  V  T  R  S  G  D  E  N  A  F  K  D  M
      GTCACACGCTGCAACAATGTGGGAGTTAGGATCTACGTCGACGCTGTGATAAACCACATG   360
101    V  T  R  C  N  N  V  G  V  R  I  Y  V  D  A  V  I  N  H  M
      TCTGGCGGATGGCCTCTGGGCACAGGAGCCTCCGGTGGGTCCTCCTTCGACTCGGGCGCA   420
       S  G  G  W  P  L  G  T  G  A  S  G  G  S  S  F  D  S  G  A
      CAGTCCTACCCCGGCGTTCCTTTCTCCGCCTTCGACTTCAACGACGGCAACTGCCACACC   480
141    Q  S  Y  P  G  V  P  F  S  A  F  D  F  N  D  G  N  C  H  T
```

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) โดยแถบสีแดงแสดงตำแหน่งของ signal peptide แถบสีเขียวแสดงตำแหน่งของ conserved domains ตัวอักษรสีน้ำเงินแสดงตำแหน่งของ start codon; **ATG** ตัวอักษรสีชมพูแสดงตำแหน่งของ stop codon; **TGA** ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ signaling polyadenylation; **AATAAA** ตัวอักษรเอียงแสดงตำแหน่งของ PolyA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
     GGTTCCGGGAACATTGAAAACTACGGCGACGCCAATCAGGTGCGCAACTGCAAATTGGTT    540
161   G  S  G  N  I  E  N  Y  G  D  A  N  Q  V  R  N  C  K  L  V
     GGACTGAACGACCTGAACCAAGCCACTGACTACGTCCGAGGGAAAATCAGGGAATTCATG    600
181  G  L  N  D  L  N  Q  A  T  D  Y  V  R  G  K  I  R  E  F  M
     AACAAGCTCATCGGCTACGGGGTCGCCGGCTTCCGCATCGACCCCAGCAAACACATGTGG    660
201   N  K  L  I  G  Y  G  V  A  G  F  R  I  D  P  S  K  H  M  W
     CCCGGGGACATGAAGCCCATTTTCGATAGCCTGAACGACCTCAATACAGATTTCTTCAAG    720
221   P  G  D  M  K  P  I  F  D  S  L  N  D  L  N  T  D  F  F  K
     GCCGGGGCCAGACCTTTCATCTTCCAAGAAGTCATTGACCTGGGTGGCGAAGCCATATCC    780
241   A  G  A  R  P  F  I  F  Q  E  V  I  D  L  G  G  E  A  I  S
     AGCCAAGAGTATGTTGGCAACGGTCGTGCGACGGAGTTCAGGTACGGCAAGTACCTGGGC    840
261   S  Q  E  Y  V  G  N  G  R  A  T  E  F  R  Y  G  K  Y  L  G
     GAAGCCTTCCGCGGCAACAACCAGCCGAAATACCTCAACAACTTCGGCGAAGGTTGGGGC    900
281   E  A  F  R  G  N  N  Q  P  K  Y  L  N  N  F  G  E  G  W  G

     ACGATGGACCGGCATGACGCATTGGCCTTCATCGACAATCATGACAACCAGAGAGGCCAT    960
301   T  M  D  R  H  D  A  L  A  F  I  D  N  H  D  N  Q  R  G  H
     GGTGCTGGAGGAGACACGATCCTTACTTTCCGTGTCTCTAAGTGGTACAAGATGGCCACC    1020
321   G  A  G  G  D  T  I  L  T  F  R  V  S  K  W  Y  K  M  A  T
      GCATACATGCTGGCATGGCCTTACGGATACACCCGAGCGATGTCGTCGTACTACTGGGAC   1080
341   A  Y  M  L  A  W  P  Y  G  Y  T  R  A  M  S  S  Y  Y  W  D
     CAATGGTGGGAGAATGGCCAGGATAAGAACGACTGGATCGGACCTCCTCACGACGGCAGC    1140
361   Q  W  W  E  N  G  Q  D  K  N  D  W  I  G  P  P  H  D  G  S
     TTCAACATCATCAGCCCGAGCTTCAACGCTGACGGCAGCTGCGAGAACGGCTGGATCTGC    1200
381   F  N  I  I  S  P  S  F  N  A  D  G  S  C  E  N  G  W  I  C
     GAGCACCGCTGGAGGCAGATTTACAACATGGTGGAGTTCCGTAATGTTGCCCATGGTACG    1260
      E  H  R  W  R  Q  I  Y  N  M  V  E  F  R  N  V  A  H  G  T
     GACACGAACGACTGGTGGGACAACGGCAGCAACCAGATCGCCTTCTGCAGAGGCAACAAG    1320
421   D  T  N  D  W  W  D  N  G  S  N  Q  I  A  F  C  R  G  N  K
     GGCTTCCTGGCCATCAATAACGACGGATGGGATCTGAAGGAGACGCTGCAGACTTGCCTC    1380
441   G  F  L  A  I  N  N  D  G  W  D  L  K  E  T  L  Q  T  C  L
     CCTGCGGGTACGTACTGTGACGTCATCTCCGGAGGCGGAGACGGAGGCTCCTGCACGGGC    1440
461   P  A  G  T  Y  C  D  V  I  S  G  G  G  D  G  G  S  C  T  G
     AAGAGCGTGACTGTGGGCGGCGACGGAAAGGCCTACATCGAGATTACGACCATGGAAGAC    1500
481   K  S  V  T  V  G  G  D  G  K  A  Y  I  E  I  T  T  M  E  D
     GACGGAGTGCTTGCTATCCATGCCAACTCCAAACTGTGATCTGTCGGACGCCAGAGAAAG    1560
501   D  G  V  L  A  I  H  A  N  S  K  L Stop
     GAACTTGTCGTCTTATTGGGAATCATTTCATCGTCATCAAATAAAAAGAGCATTTCCAAA    1620
     AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                     1647
```

ภาพที่ 17 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
P.monodon_mRNA      ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTGCTGTTGGCTGCGGCCACACAAGCCCAGTGGGAT   60
P.vanameii          ATGCTGAGGGTCGCGCCTCTGGTAGTGCTGTTGGCTGCGGCCGCACAGGCGCAGTGGGAT
                    ****************************************** **** ** *********

P.monodon_mRNA      CCCAACTCCAGCAATGGACAAGTAATCGTCCACTTGTTTGAATGGAAGTGGTCGGACATC   120
P.vanameii          CCCAACTCTAGCAATGGACAGGTTATCGTCCACTTGTTTGAGTGGAAGTGGTCGGACATC
                    ******** *********** ** ***************** ******************

P.monodon_mRNA      GCCGCGGAATGCGAGAACTTCTTGGGTCCTCGAGGATTCGCCGGCGTTCAGGTATCACCA   180
P.vanameii          GCCGCCGAATGCGAGAACTTCTTGGGTCCTCGAGGATTCGCCGGCGTTCAGGTATCACCG
                    ***** *****************************************************

P.monodon_mRNA      CCTAACGAGTATGTGGAGGTGTACCAAGGAGACGTGCAACGACCGTGGTGGGAGAGGTAC   240
P.vanameii          CCTAACGAATACGTGGAGGTGTACCAGGGAGACGTGAAGCGGCCGTGGTGGGAGAGGTAC
                    ******** ** ************** ********* * ** ******************

P.monodon_mRNA      CAGCCCGTCTCCTATAAACTCGTCACTCGTTCCGGTGACGAAAATGCTTTCAAAGACATG   300
P.vanameii          CAGCCCGTCTCCTATAAACTCGTCACTCGCTCCGGTGACGAAAATGCTTTCAAAGACATG
                    ***************************** ******************************

P.monodon_mRNA      GTCACACGCTGCAACAATGTGGGAGTTAGGATCTACGTCGACGCTGTGATAAACCACATG   360
P.vanameii          GTCACACGCTGCAACAACGTGGGAGTCAGGATCTACGTCGACGCTGTGATAAACCACATG
                    ***************** ******** *********************************

P.monodon_mRNA      TCTGGCGGATGGCCTCTGGGCACAGGAGCCTCCGGTGGGTCCTCCTTCGACTCGGGCGCA   420
P.vanameii          TCAGGGGGATGGCCGATGGGCACAGGAGCCTCCGGGGGGTCCTCCTTCGACTCGGGCGCG
                    ** ** ********  ******************* ***********************

P.monodon_mRNA      CAGTCCTACCCCGGCGTTCCTTTCTCCGCCTTCGACTTCAACGACGGCAACTGCCACACC   480
P.vanameii          GAGTCCTACCCCGGGGTTCCTTACTCCGCTTTCGACTTCAACGACGGCAACTGCCACACC
                     ************* ******* ****** ******************************

P.monodon_mRNA      GGTTCCGGGAACATTGAAAACTACGGCGACGCCAATCAGGTGCGCAACTGCAAATTGGTT   540
P.vanameii          GGGTCCGGGAACATTGAAAACTACGGCGACGCCAATCAGGTGCGCAACTGCAAACTGGTT
                    ** *************************************************** *****

P.monodon_mRNA      GGACTGAACGACCTGAACCAAGCCACTGACTACGTCCGAGGGAAAATCAGGGAATTCATG   600
P.vanameii          GGGCTGAACGACCTGAACCAAGGCACTGACTACGTGCGAGGTAAGATCAGGGAATTCATG
                    ** ******************* ************ ***** ** ***************

P.monodon_mRNA      AACAAGCTCATCGGCTACGGGGTCGCCGGCTTCCGCATCGACCCCAGCAAACACATGTGG   660
P.vanameii          AACAAGCTCATCAGCTACGGTGTCGCCGGCTTCCGCATCGACGCCAGCAAACACATGTGG
                    ************ ******* ********************* *****************

P.monodon_mRNA      CCCGGGGACATGAAGCCCATTTTCGATAGCCTGAACGACCTCAATACAGATTTCTTCAAG   720
P.vanameii          CCCGGGGACATGAAGGCCATTTTTGATAGCCTGGACAACCTCAACACGGATTTCTTCAAG
                    *************** ******* ********* ** ******* ** ************

P.monodon_mRNA      GCCGGGGCCAGACCTTTCATCTTCCAAGAAGTCATTGACCTGGGTGGCGAAGCCATATCC   780
P.vanameii          GCCGGTGCCAGACCTTTCATCTTCCAAGAAGTCATCGACTTGGGTGGCGAAGCCATATCC
                    ***** ***************************** *** ********************

P.monodon_mRNA      AGCCAAGAGTATGTTGGCAACGGTCGTGCGACGGAGTTCAGGTACGGCAAGTACCTGGGC   840
P.vanameii          AGCGGAGAATATGTTGGCAACGGTCGTGTGACGGAGTTCCGGTACGGCAAGTACCTGGGC
                    ***  *** ******************* ********** ********************

P.monodon_mRNA      GAAGCCTTCCGCGGCAACAACCAGCCGAAATACCTCAACAACTTCGGCGAAGGTTGGGGC   900
P.vanameii          GAGGCCTTCCGCGGCAACAACCAGCTGAAGTACCTCAACAACTTCGGCGAAGGCTGGGGC
                    ** ********************** *** *********************** ******
```

ภาพที่ 18 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีน *PmAmy* กับยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไม

```
P.monodon_mRNA      ACGATGGACCGGCATGACGCATTGGCCTTCATCGACAATCATGACAACCAGAGAGGCCAT   960
P.vanameii          ATGATAGACCGCCATGACGCACTCGTCTTCATTGACAACCACGACAACCAGCGCGGCCAT
                    * *** ***** ********* * * ****** ***** ** ********* * ******

P.monodon_mRNA      GGTGCTGGAGGAGACACGATCCTTACTTTCCGTGTCTCTAAGTGGTACAAGATGGCCACC  1020
P.vanameii          GGTGCCGGAGGAGACATGATCCTTACCTTCCGTGTCTCTAAGTGGTACAAGATGGCTACT
                    ***** ********** ********* ***************************** ** 

P.monodon_mRNA      GCATACATGCTGGCATGGCCTTACGGATACACCCGAGCGATGTCGTCGTACTACTGGGAC  1080
P.vanameii          GCATACATGCTGGCTTGGCCTTACGGCTACACTCGCGTGATGTCGTCGTACTACTGGGAC
                    ************** *********** ***** ** * **********************

P.monodon_mRNA      CAATGGTGGGAGAATGGCCAGGATAAGAACGACTGGATCGGACCTCCTCACGACGGCAGC  1140
P.vanameii          CAATGGTGGGAGAATGGCCAGGATAAGAACGACTGGATCGGACCTCCTCACGACGGCAGC
                    ************************************************************

P.monodon_mRNA      TTCAACATCATCAGCCCGAGCTTCAACGCTGACGGCAGCTGCGAGAACGGCTGGATCTGC  1200
P.vanameii          TTCAACATCATCAGCCCGAGCTTCAACGCCGACGGCAGCTGCGGGAACGGCTGGATCTGC
                    ***************************** ************* ****************

P.monodon_mRNA      GAGCACCGCTGGAGGCAGATTTACAACATGGTGGAGTTCCGTAATGTTGCCCATGGTACG  1260
P.vanameii          GAGCACCGCTGGAGGCAGATCTACAACATGGTGGAATTCCGGAATGTTGCCCATGGGACG
                    ******************** ************** ***** ************** ***

P.monodon_mRNA      GACACGAACGACTGGTGGGACAACGGCAGCAACCAGATCGCCTTCTGCAGAGGCAACAAG  1320
P.vanameii          GACATGAACGACTGGTGGGATAACGGCAGCAACCAGATCGCCTTCTGCAGAGGCAACAAG
                    **** *************** ***************************************

P.monodon_mRNA      GGCTTCCTGGCCATCAATAACGACGGATGGGATCTGAAGGAGACGCTGCAGACTTGCCTC  1380
P.vanameii          GGCTTCCTGGCCATCAACAACGACGGATGGGATCTGAAGGAGACGCTGCAGACTTGCCTT
                    ***************** ***************************************** 

P.monodon_mRNA      CCTGCGGGTACGTACTGTGACGTCATCTCCGGAGGCGGAGACGGAGGCTCCTGCACGGGC  1440
P.vanameii          CCTGCGGGTACGTACTGCGACGTCATCTCCGGGTCGAAGAACGGAGGCTCCTGCACGGGC
                    ***************** **************        ********************

P.monodon_mRNA      AAGAGCGTGACTGTGGGCGGCGACGGAAAGGCCTACATCGAGATTACGACCATGGAAGAC  1500
P.vanameii          AAGAGCGTGACTGTGGGCGGCGACGGAAAGGCCTACATCGAGATCACGACCATGGAAGAC
                    ******************************************** ***************

P.monodon_mRNA      GACGGAGTGCTTGCTATCCATGCCAACTCCAAACTGTGA                       1539
P.vanameii          GACGGCGTGCTTGCTATCCATGCCAACTCGAAACTGTAA
                    ***** *********************** ******* *
```

ภาพที่ 18 (ต่อ)

```
P.monodon    MLRVAPLVVLLAAATQAQWDPNSSNGQVIVHLFEWKWSDIAAECENFLGPRGFAGVQVSP  60
P.vanameii   MLRVAPLVVLLAAAAQAQWDPNSSNGQVIVHLFEWKWSDIAAECENFLGPRGFAGVQVSP
             **************:*********************************************

P.monodon    PNEYVEVYQGDVQRPWWERYQPVSYKLVTRSGDENAFKDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHM 120
P.vanameii   PNEYVEVYQGDVKRPWWERYQPVSYKLVTRSGDENAFKDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHM
             ************:***********************************************

P.monodon    SGGWPLGTGASGGSSFDSGAQSYPGVPFSAFDFNDGNCHTGSGNIENYGDANQVRNCKLV 180
P.vanameii   SGGWPMGTGASGGSSFDSGAESYPGVPYSAFDFNDGNCHTGSGNIENYGDANQVRNCKLV
             *****:**************:******:********************************

P.monodon    GLNDLNQATDYVRGKIREFMNKLIGYGVAGFRIDPSKHMWPGDMKPIFDSLNDLNTDFFK 240
P.vanameii   GLNDLNQGTDYVRGKIREFMNKLISYGVAGFRIDASKHMWPGDMKAIFDSLDNLNTDFFK
             *******.****************.*********.**********.*****::*******

P.monodon    AGARPFIFQEVIDLGGEAISSQEYVGNGRATEFRYGKYLGEAFRGNNQPKYLNNFGEGWG 300
P.vanameii   AGARPFIFQEVIDLGGEAISSGEYVGNGRVTEFRYGKYLGEAFRGNNQLKYLNNFGEGWG
             ********************* *******.****************** ***********

P.monodon    TMDRHDALAFIDNHDNQRGHGAGGDTILTFRVSKWYKMATAYMLAWPYGYTRAMSSYYWD 360
P.vanameii   MIDRHDALVFIDNHDNQRGHGAGGDMILTFRVSKWYKMATAYMLAWPYGYTRVMSSYYWD
              :******.**************** **************************.*******

P.monodon    QWWENGQDKNDWIGPPHDGSFNIISPSFNADGSCENGWICEHRWRQIYNMVEFRNVAHGT 420
P.vanameii   QWWENGQDKNDWIGPPHDGSFNIISPSFNADGSCGNGWICEHRWRQIYNMVEFRNVAHGT
             ********************************** *************************

P.monodon    DTNDWWDNGSNQIAFCRGNKGFLAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGGGDGGSCTG 480
P.vanameii   DMNDWWDNGSNQIAFCRGNKGFLAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGSKNGGSCTG
             * *************************************************. :******

P.monodon    KSVTVGGDGKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL                             512
P.vanameii   KSVTVGGDGKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL
             ********************************
```

ภาพที่ 19 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไมกับ *Pm*AMY ของกุ้งกุลาดำตลอดสายโดยตัวอักษรสีแดงแสดงถึงตำแหน่งของ Cleavage site และตัวอักษรน้ำเงินแสดงถึงตำแหน่งของ α-*Amylase* domains

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ตารางแสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไมกับยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำ

ลำดับกรดอะมิโน	***α-Amylase* (*P.vanameii*)**	***α-Amylase* (*Pm*AMY)**
15	A	T
73	K	Q
126	M	L
141	E	Q
148	Y	F
188	G	A
205	S	G
215	A	P
226	A	P
232	D	N
233	N	D
262	G	Q
270	V	A
289	L	P
301	M	T
302	I	M
309	V	A
326	M	T
353	V	A
395	G	E
422	M	T
472	S	G
473	K	G
474	N	D

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การหาตำแหน่งจับของ คลอไรด์ (Chloride Binding) แคลเซียม (Calcium Binding) ฮิสติดีน (Histidine Binding) บริเวณเร่ง (Active site) Cysteine Residues และ α/β – Barrel ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำ

ยีนแอลฟาอะไมเลสจัดอยู่ใน family ที่ 13 ของ glycosyl hydrolases ซึ่งโครงสร้างยีน *PmAmy* มี 8 stranded (α/β - Barrel) (ภาพที่ 20) จากโปรแกรม CDD (http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/shtml) ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ พบตำแหน่งจับของแคลเซียม ประกอบไปด้วย แอสพาราจีน (N105) , อาร์จินีน (R175), กรดแอสพาร์ติค (D184) และ ฮิสติดีน (H218) ตำแหน่งจับของคลอไรด์ ประกอบไปด้วย อาร์จินีน (R212, R352)และแอสพาราจีน (N313) ตำแหน่งจับของฮิสติดีน ประกอบไปด้วย H119, H218 และ H314 และตำแหน่งบริเวณเร่ง ประกอบไปด้วย กรดแอสพาร์ติค (D214, D315) และกรดกลูตามิค (E250) ตามลำดับ และพบจำนวนกรดอะมิโนซิสเตอีน ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง ตำแหน่งที่ C44, C104, C158, C177, C394, C400, C436, C459, C466 และ C478 (ภาพที่ 20)

```
P.monodon    MLRVAPLVVLLAAATQAQWDPNSSNGQVIVHLFEWKWSDIAAECENFLGPRGFAGVQVSP   60
P.vanameii   MLRVAPLVVLLAAAAQAQWDPNSSNGQVIVHLFEWKWSDIAAECENFLGPRGFAGVQVSP
             **************:*********************************************
                                     β1         α1              β2

P.monodon    PNEYVEVYQGDVQRPWWERYQPVSYKLVTRSGDENAFKDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHM  120
P.vanameii   PNEYVEVYQGDVKRPWWERYQPVSYKLVTRSGDENAFKDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHM
             ************:***********************************************
                                                   α2          β3

P.monodon    SGGWPLGTGASGGSSFDSGAQSYPGVPFSAFDFNDGNCHTGSGNIENYGDANQVRNCKLV  180
P.vanameii   SGGWPMGTGASGGSSFDSGAESYPGVPYSAFDFNDGNCHTGSGNIENYGDANQVRNCKLV
             *****:**************:******:********************************
```

ภาพที่ 20 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไมกับ *α Amylase* (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำตลอดสายโดยแถบสีเขียวคือตำแหน่งของ Calcium binding แถบสีชมพูคือตำแหน่งของ Chloride binding เส้นเหนือตัวอักษรคือ Histidine binding แถบสีเหลืองแสดงถึงตำแหน่งของ Active site แถบสีแดงคือ Cysteine Residues ตัวอักษรสีแดงขีดเส้นใต้คือ β - strand และ ตัวอักษรสีน้ำเงินขีดเส้นใต้คือ α - strand

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
P.monodon    GLNDLNQATDYVRGKIREFMNKLIGYGVAGFRIDPSKHMWPGDMKPIFDSLNDLNTDFFK 240
P.vanameii   GLNDLNQGTDYVRGKIREFMNKLISYGVAGFRIDASKHMWPGDMKAIFDSLDNLNTDFFK
             *******.****************.*********.**********.*****::*******
                          α3                β4           α4

P.monodon    AGARPFIFQEVIDLGGEAISSQEYVGNGRATEFRYGKYLGEAFRGNNQPKYLNNFGEGWG 300
P.vanameii   AGARPFIFQEVIDLGGEAISSGEYVGNGRVTEFRYGKYLGEAFRGNNQLKYLNNFGEGWG
             ********************* *******.****************** ***********
                  β5         α5        β6         α6a           α6b

P.monodon    TMDRHDALAFIDNHDNQRGHGAGGDTILTFRVSKWYKMATAYMLAWPYGYTRAMSSYYWD 360
P.vanameii   MIDRHDALVFIDNHDNQRGHGAGGDMILTFRVSKWYKMATAYMLAWPYGYTRVMSSYYWD
              :******.**************** **************************.*******
                     β7                            α7           β8

P.monodon    QWWENGQDKNDWIGPPHDGSFNIISPSFNADGSCENGWICEHRWRQIYNMVEFRNVAHGT 420
P.vanameii   QWWENGQDKNDWIGPPHDGSFNIISPSFNADGSCGNGWICEHRWRQIYNMVEFRNVAHGT
             ********************************** *************************
                                                                   α8

P.monodon    DTNDWWDNGSNQIAFCRGNKGFLAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGGGDGGSCTG 480
P.vanameii   DMNDWWDNGSNQIAFCRGNKGFLAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGSKNGGSCTG
             * *************************************************. :******

P.monodon    KSVTVGGDGKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL                             512
P.vanameii   KSVTVGGDGKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL
             ********************************
```

ภาพที่ 20 (ต่อ)

8. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำตลอดสายกับยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*), ปลาซีกเดียว (*Pseudopleuonectes americanus*), ปลาแซลมอน (*Salmo salar*), ปลาตูหนาญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*), กบ (*Xenopus laevis*),ไหม(*Bombyx mori* strain Nanglai), แมลงหวี่ (*Drosophila melanogas*), แมลงวันทอง (*Ceratitis capitata*), ด้วงอิฐ (*Zabrotes subfasciatu*), หนอนกระทู้ (*Spodoptera frugiperda*), ปลาปักเป้าจุดเขียว (*Tetraodon nigroviridis*), หมู (*Sus scrofa*) และคน (*Homo sapiens sapiens*) พบว่า ผลจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในหลายๆตำแหน่ง (ภาพที่ 21) ส่งผลให้เกิดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยจากการสุ่มค่า Bootstrap Value 1,000 replicates จากโปรแกรม MEGA 3.1 พบว่า Phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่ได้ประกอบด้วย 11 interior branch โดยมีผลการทดสอบ bootstrap อยู่

ระหว่าง 64 – 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22) เมื่อนำมาหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic Distance) (ตารางที่ 8) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (% Identity) พบว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมและค่าความเหมือนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 9)

```
Penaeus_monodon                     -------MLRVAPLVVLLAAATQAQWDPNSSNGQVIVHLFEWKWSDIAAE
Litopenaeus_vannamei_X77318         -------MLRVAPLVVLLAAAAQAQWDPNSSNGQVIVHLFEWKWSDIAAE
Homo_sapiens_NM_000699              --------MKFFLLLFTIGFCWAQYSPNTQQGRTSIVHLFEWRWVDIALE
Sus_scrofa_NM_214195.1              --------MKLFLLLSAFGFCWAQYAPQTQSGRTSIVHLFEWRWVDIALE
Xenopus_laevis_BC056841             --------MKLLLLLVTIGLCSAQYNPNTQSGRTSIVHLFEWKWVDIAAE
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728      --------MRFFILVTLFGLSLAQHTPHFKHGRTSIVHLFEWRWTDIAAE
Pseudopleuonectes_americanus_A      --------MKWFILVALFGLGLAQHNPHIKKGRTAIVHLFEWRWADIAAE
Salmo_salar_DQ331024                --------MKYLVLLTLLGLSQAYHNPHAKHGRQAIVHLFEWKWNDIAAE
Anguilla_japonica_AB070721          --------MGIFILALVLGVSLAQHDPHMKHGRTSIVHLFEWRWADIADE
Drosophila_melanogaster_BAB325      MFLAKSIVCLSLLAVAN-----AQFDTNYASGRSGMVHLFEWKWDDIAAE
Ceratitis_capitata_AAO13691         MFLSKVSLCLTLIFVLCSRNIEAQFNPNYASGRTTMVHLFEWKWDDIAVE
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2      -------MFRYILLLSAVTLALAYKNPHYASGRTTMVHLFEWKWDDIAAE
Spodoptera_frugiperda_AAO13754      -------MFRLILCLAAVTLALAYKNPHYASGRTTMVHLFEWKWDDIARE
                                                                   .   :******:* *** *

Penaeus_monodon                     CENFLGPRGFAGVQVSPPNEYVEVYQGDVQRPWWERYQPVSYKLVTRSGD
Litopenaeus_vannamei_X77318         CENFLGPRGFAGVQVSPPNEYVEVYQGDVKRPWWERYQPVSYKLVTRSGD
Homo_sapiens_NM_000699              CERYLAPKGFGGVQVSPPNENVAIYN--PFRPWWERYQPVSYKLCTRSGN
Sus_scrofa_NM_214195.1              CERYLGPKGFGGVQVSPPNENIVVTN--PSRPWWERYQPVSYKLCTRSGN
Xenopus_laevis_BC056841             CERYLGPNGFGGVQISPPNENIVVTN--PYRPWWERYQPISYKLCTRSGN
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728      CERFLGPNGFAGVQISPPNEHIILDS--PWRPWWQRYQPIGYNLCSRSGS
Pseudopleuonectes_americanus_A      CERYLGPNGFGGVQISPPNEHIMLDN--PWRPWWMRYQPISYNLCSRSGS
Salmo_salar_DQ331024                CERFLAPKGYAGVQISPPAESILLTS--PWRPWWERYQPISYNLCSRSGN
Anguilla_japonica_AB070721          CERYLAPNGFAGVQISPPSESIVLQN--PWRPWYERYQPISYNLCSRSGT
Drosophila_melanogaster_BAB325      CENFLGPNGYAGVQVSPVNENAVKDSR----PWWERYQPISYKLETRSGN
Ceratitis_capitata_AAO13691         CENFLGPKGFGGVQVSPVNENVVAASR----PWWERYQPISYLLTTRSGN
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2      CERFLGPRGFGGIQVSPPNENLVIWSRN--RPWWERYQPISYRLVTRSGN
Spodoptera_frugiperda_AAO13754      CETFLGPRGYGGIQISPPNENLAIWSRQ--RPWWERYQPISYRLVTRSGN
                                    ** :*.*.*:.*:*:**  *     .     **: ****:.* * :***

Penaeus_monodon                     ENAFKDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHMSG-GWPLGTGASGGSSFDSGAQS
Litopenaeus_vannamei_X77318         ENAFKDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHMSG-GWPMGTGASGGSSFDSGAES
Homo_sapiens_NM_000699              EDEFRNMVTRCNNVGVRIYVDAVINHMCGNAVSAGTSSTCGSYFNPGSRD
Sus_scrofa_NM_214195.1              ENEFRDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHMCGSGAAAGTGTTCGSYCNPGNRE
Xenopus_laevis_BC056841             EQQFRDMVTRCNNVGVYIYVDAIINHMCGSGGGAGTHSTCGSYFNAGSRD
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728      ENELRDMITRCNNVGVNIYVDVVINHMCRASSGEGTHSSCGSWFNAGTKD
Pseudopleuonectes_americanus_A      EDELRDMITRCNNVGVNIYVDAVINHMCGASGGEGTHSSCGSWFDAGKKD
Salmo_salar_DQ331024                ENELRDMITRCNNVGVNIYVDAVINHMCGAGGGEGTHSTCGTYFNAKKMD
Anguilla_japonica_AB070721          EKELRDMVTRCNNVGVNIYVDAVINHMCGAGGGEGKHSSCGSYFNSHKKD
Drosophila_melanogaster_BAB325      EEQFASMVKRCNAVGVRTYVDVVFNHMAADGG-TYGTG--GSTASPSSKT
Ceratitis_capitata_AAO13691         EQQFADMVRRCNNVGVRIFVDVVFNHMTGDNVNARGTG--GSTADPSNKS
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2      ENQFSNMVRRCNNVGVRIYVDAIINHMTGTWNENVGTG--GSTANFENWH
Spodoptera_frugiperda_AAO13754      EQQFANMVRKCNDAGVRIYVDAIINHMTGTWNENTGTG--GSTADFGNWG
                                    *. : .*: :** .**  :**.::***             *:  .

Penaeus_monodon                     YPGVPFSAFDFNDGNCHTGSGNIENYGDAN-QVRNCKLVGLNDLNQATDY
Litopenaeus_vannamei_X77318         YPGVPYSAFDFNDGNCHTGSGNIENYGDAN-QVRNCKLVGLNDLNQGTDY
Homo_sapiens_NM_000699              FPAVPYSGWDFNDGKCKTGSGDIENYNDAT-QVRDCRLTGLLDLALEKDY
Sus_scrofa_NM_214195.1              FPAVPYSAWDFNDGKCKTASGGIESYNDPY-QVRDCQLVGLLDLALEKDY
Xenopus_laevis_BC056841             FP-VPYSGLDFNDGKCRTGSGEIENYGDAN-QVRNCRLVGLLDLAMEKDY
```

ภาพที่ 21 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน α-*Amylase* ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (multiple sequence aligment) กับยีน α-*Amylase* (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำตลอดสาย โดยแถบสีฟ้าแสดงถึงตำแหน่งของ conserved domains

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728       FPSVSYSYLDFNDHKCRTGSGNIESYDADVNQVRDCRLENLLDLALEKDY
Pseudopleuronectes_americanus_A      FPSVPFSNCDFNDNKCRTGSGNIENYGDAN-QVRDCRLVSLLDLALEKDY
Salmo_salar_DQ331024                 FPSIPFSSFDFNQGKCKTASGDIENYNDIN-QVRDCRLVSLLDLALEKDY
Anguilla_japonica_AB070721           FPAVPYSSWDFNDGKCKTNSGEIENYHDIF-QVRDCRLVSLLDLNLQKDY
Drosophila_melanogaster_BAB325       YPGVPYSSLDFNPTCAISN-------YNDANEVRNCELVGLRDLNQGNSY
Ceratitis_capitata_AAO13691          FPAVPYSNLDFHPTCSINN-------YNDKYEVRNCELVGLKDLDQSKSW
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2       YPAVPYGRNDFNWPHCVITG---SDYNCCPDRVRNCELSGLKDLNQGSDY
Spodoptera_frugiperda_AAO13754       YPGVPYGRNDFNWPHCVIQG---HDYGCCADRVRNCELSGLKDLNQGNEY
                                     :* :.:.  **:   .               .**:*.* .* **   ..:

Penaeus_monodon                      VRGKIREFMNKLIGYGVAGFRIDPSKHMWPGDMKPIFDSLNDLN-TDFFK
Litopenaeus_vannamei_X77318          VRGKIREFMNKLISYGVAGFRIDASKHMWPGDMKAIFDSLDNLN-TDFFK
Homo_sapiens_NM_000699               VRSKIAEYMNHLIDIGVAGFRLDASKHMWPGDIKAILDKLHNLN-SNWFP
Sus_scrofa_NM_214195.1               VRSMIADYLNKLIDIGVAGFRIDASKHMWPGDIKAVLDKLHNLN-TNWFP
Xenopus_laevis_BC056841              VRGKIAEYMNNLINIGVAGFRLDAAKHMWPGDLKAISDRLNNLN-TKWFP
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728       VRGKVADYMNRLVDMGVAGFRVDACKHMWPGDLSAVYGRLNNLN-TNWFP
Pseudopleuronectes_americanus_A      VRGKVTDFLNVLIDMGVAGFRVDACKHMWPGDLAAVYGGLHNLN-TKWWS
Salmo_salar_DQ331024                 VRGKVADYMNKLIDMGVAGFRVDASKHMWPGDLTVIYGSLHNLN-TRWFN
Anguilla_japonica_AB070721           VRDKVAEYMNTLIDMGVAGFRVDACKHMWPGDLQAVSSRLHNLN-TSWFP
Drosophila_melanogaster_BAB325       VQDKVVEFLDHLIDLGVAGFRVDAAKHMWPADLAVIYGRLKNLNTDHGFA
Ceratitis_capitata_AAO13691          VQDRVVDFLNHLISLGVAGFRVDAAKHMWPEDLEKIYNRVNNLSTTHGFD
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2       VRQQILNYMNRLIDMGVAGFRIDAAKHMWPHDLRVIYDRLRNLNTAHGFP

Spodoptera_frugiperda_AAO13754       VRQQIVNYMNHLINLGVAGFRIDAGKHMWPGDLRVIYDRVHNLNTAHGFP
                                     *:  : :::: *:. ******:*. ***** *:  : . : :*.    :

Penaeus_monodon                      AGARPFIFQEVIDLGGEAISSQEYVGNGRATEFRYGKYLGEAFRGNN--Q
Litopenaeus_vannamei_X77318          AGARPFIFQEVIDLGGEAISSGEYVGNGRVTEFRYGKYLGEAFRGNN--Q
Homo_sapiens_NM_000699               AGSKPFIYQEVIDLGGEPIKSSDYFGNGRVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEK
Sus_scrofa_NM_214195.1               AGSRPFIFQEVIDLGGEAIQSSEYFGNGRVTEFKYGAKLGTVVRKWSGEK
Xenopus_laevis_BC056841              AGARPFIFQEVIDLGGEAISVNEYFGVGRVTEFKYGAKLGGVIRKWNGEK
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728       GGSRPFIYQEVIDLGSELITAKEYFHLGRVTEFKYGAKLGTVFRKWNNEK
Pseudopleuronectes_americanus_A      AGSRPFIFQEVIDLGGESITTKEYVNLGRVTEFKYGAKLGTVFRKWNGEK
Salmo_salar_DQ331024                 GGSRPFIFQEVIDMGGEAIQTSEYFPLGRVTEFKYGAKIGTVFRKWNGEK
Anguilla_japonica_AB070721           SNSKPFIYQEVIDLGGEPITASDYTGIGRVTEFKYSSKLGTVIRKWNGEK
Drosophila_melanogaster_BAB325       SGSKAYIVQEVIDMGGEAISKSEYTGLGAITEFRHSDSIGKVFRGKD--Q
Ceratitis_capitata_AAO13691          TGARPFIFQEVIDLGGEAVSKNEYTNLGVVTEFAHSNSIGKVFRGKD--Q
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2       SGARPYIYQEVIDLGGEAISRNEYTPLAAVTEFRFGLELSQAFQRRN--Q
Spodoptera_frugiperda_AAO13754       SGARPYIYQEVIDLGGEVISRDEYTPLAAVTEFKFGMELSRAFNRGN--Q
                                      .::.:* *****:*.* :   :*   .  ***  ..  :.  ...  .  :

Penaeus_monodon                      PKYLNNFGEGWGTMDRHDALAFIDNHDNQRGHGAGGDTILTFRVSKWYKM
Litopenaeus_vannamei_X77318          LKYLNNFGEGWGMIDRHDALVFIDNHDNQRGHGAGGDMILTFRVSKWYKM
Homo_sapiens_NM_000699               MSYLKNWGEGWGFVPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKM
Sus_scrofa_NM_214195.1               MSYLKNWGEGWGFMPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKV
Xenopus_laevis_BC056841              MAYLRNWGEGWGFMPNDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKM
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728       LMYTKNWGEGWGFMPNGNAVVFIDNHDNQRGHGAGGAAIVTFWDFRLHKM
Pseudopleuronectes_americanus_A      LCYTRNWGEGWGFMSDGNAVVFVDNHDNQRGHGAGGAAIVTFWDPRPHKM
Salmo_salar_DQ331024                 LSYTKNWGEGWGFMPDGNALVFIDNHDNQRGHGGGGSAILTFWDARIYKM
Anguilla_japonica_AB070721           MAYLRTWGEGWGFMTSGNALVFVDNHDNQRGHGAGGSSVITFWDPRIYKM
Drosophila_melanogaster_BAB325       LQYLTNWGTAWGFAASDRSLVFVDNHDNQRGHGAGGADVLTYKVPKQYKM
Ceratitis_capitata_AAO13691          LRWLINWGPQWGFLNSDRALIFVDNHDNQRGHGAGGADILNYKTSKQYKM
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2       LRWLVNWGPQWGLLASGDALTFIDNHDNQRGHGAG-GNILTYKQSRQYKG
Spodoptera_frugiperda_AAO13754       LRWLHNFGPAWGLLASGDSLTFIDNHDNQRGHGAG-GNILTYKNAKQYKG
                                       :  .:*  **      :: *:**********.*   ::.:   : :*

Penaeus_monodon                      ATAYMLAWPYGYTRAMSSYYWDQWWENGQDKNDWIGPPHDGSFNIISPSF
Litopenaeus_vannamei_X77318          ATAYMLAWPYGYTRVMSSYYWDQWWENGQDKNDWIGPPHDGSFNIISPSF
Homo_sapiens_NM_000699               AVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWPRQFQNGNDVNDWVGPPNNN-GVIKEVTI
Sus_scrofa_NM_214195.1               AVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWARNFVNGQDVNDWIGPPNNN-GVIKEVTI
Xenopus_laevis_BC056841              GVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWTRNISNGKDQNDWIGPPTNSDGSIKSVPI
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728       AVAYMLAHPYGVTRVMSSFRWNRHIVNGKDQNDWMGPPSHPDGSTKSVPI
Pseudopleuronectes_americanus_A      AVAYMLAHPYGVTRVMSSFRWNRHIVNGKDQNDWMGPPSHSDGSTKSVPI
Salmo_salar_DQ331024                 AVAYMLAHPYGVARVMSSFRWN-------RTDDWQGPPSHEDGSTKDVHV
```

ภาพที่ 21 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
Anguilla_japonica_AB070721            ATGFMLAHPYGVTRVMSSFRWNRHIVDGKDQNDWMGPPSYPDGSTKPVLI
Drosophila_melanogaster_BAB325        ASAFMLAHPFGTPRVMSSFSFT---------DTDQGPPTTDGHNIASPIF
Ceratitis_capitata_AAO13691           ASAFMLAHPFGITRVMSSFAFD---------NTDQGPPTTDGQNIASPIF
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2        AIAFMLAHPYGYPQLMSSFAFT---------DTEAGPPMNSRGDITSPTI
Spodoptera_frugiperda_AAO13754        AIAFMLAHPYGWPQLMSSFDFH---------DTEAGPPMDSSGNIISPSI
                                      . .:*** *:* .: ***: :           :   ***          .

Penaeus_monodon                       NADGSCENGWICEHRWRQIYNMVEFRNVAHGTDTNDWWDNGSNQIAFCRG
Litopenaeus_vannamei_X77318           NADGSCGNGWICEHRWRQIYNMVEFRNVAHGTDMNDWWDNGSNQIAFCRG
Homo_sapiens_NM_000699                NPDTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVIFRNVVDGQPFTNWYDNGSNQVAFGRG
Sus_scrofa_NM_214195.1                NADTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVWFRNVVDGQPFANWWANGSNQVAFGRG
Xenopus_laevis_BC056841               NADATCGDNWVCEHRWRQIKNMVIFRNVVNGQPFSNWWDNGSNQVAFGRG
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728        NPDETCGDGWVCEHRWRQIKNMVIFRNVVNGQPHSNWWDNNSNQVAFGRG
Pseudopleuonectes_americanus_A        NPDQTCGDGWVCEHRWRQITNMVKFRNVVDGQPHSNWWDNQSNQVAFGRG
Salmo_salar_DQ331024                  NADDTCGDGWVCEHRWRQITNMATFRNVVTGQPHSNWWDNGSNQVAFGRG
Anguilla_japonica_AB070721            NPDTTCGDNWVCEHRWRQIRNMVIFRNVVNNQPISHWWDNGSNQVAFGRG
Drosophila_melanogaster_BAB325        NSDNSCSGGWVCEHRWRQIYNMVAFRNAVGSDEIQNWWDNGSNQISFSRG
Ceratitis_capitata_AAO13691           NDDNSCSGGWVCEHRWRQIYNMVGFRNIVAGTAIQNWVDNGSNQIAFCRG
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2        NADNSCGNGWICEHRWRQIHNMVVFRNTAGNGALTNWWDNGSNQIAFCRG
Spodoptera_frugiperda_AAO13754        NSDQSCGNGWICEHRWRQIYSMVAFRNQAGNSALSNWWDNGGNQIAFCRG
                                      * *  :*  ..*:******** .*. ***  . .     .*   *  .**::* **

Penaeus_monodon                       NKGFLAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGGGDGGSCTGKSVTVGGD
Litopenaeus_vannamei_X77318           NKGFLAINNDGWDLKETLQTCLPAGTYCDVISGSKNGGSCTGKSVTVGGD
Homo_sapiens_NM_000699                NRGFIVFNNDDWSFSLTLQTGLPAGTYCDVISGDKINGNCTGIKIYVSDD
Sus_scrofa_NM_214195.1                NRGFIVFNNDDWQLSSTLQTGLPGGTYCDVISGDKVGNSCTGIKVYVSSD
Xenopus_laevis_BC056841               NKGFIVFNNDDRYLDATLNTGLPSGTYCDVISGQKEGSRCTGRQINVDGN
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728        NRGFIIFNNDDWDLDVTLNTGLPAGTYCDVISGQKEGGRCTGKQIHVGAD
Pseudopleuonectes_americanus_A        NRGFIVFNNDDWDLDETLNTGMPGGTYCDVISGQKEGGRCTGKQIQVGGD
Salmo_salar_DQ331024                  NRGFIVFNNDDWQLDVTLNTGMPGGAYCDVISGQRDGGRCTGKTINVGDD
Anguilla_japonica_AB070721            NRGFIVFNNDDRHLDMTLNTGLPGGTYCDIISGQKEGSRCSGKQVTVDSD
Drosophila_melanogaster_BAB325        SRGFVAFNNDNYDLNSSLQTGLPAGTYCDVISGSKSGSSCTGKTVTVGSD
Ceratitis_capitata_AAO13691           SKGFVAFNGDSYDLNTSLQTCLPAGTYCDIISGVKSDSGCTGKRVEVGSD
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2        NQAFIAFNNDAWDMDQTLQTCLPAGTYCDIISGARSGNRCTGKSIVVGSD
Spodoptera_frugiperda_AAO13754        NAGFVAFNNEYWDLNETLQTCLPAGTYCDVISGEKSGSNCTGKRVTVGGD
                                      . .*: :*.:   :. :*:* :*.*:***:***   .. *:*  : *. :

Penaeus_monodon                       GKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL-------
Litopenaeus_vannamei_X77318           GKAYIEITTMEDDGVLAIHANSKL-------
Homo_sapiens_NM_000699                GKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKL-------
Sus_scrofa_NM_214195.1                GTAQFSISNSAEDPFIAIHAESKL-------
Xenopus_laevis_BC056841               GFARFQISNTDEDPFAAIHVNAKL-------
Tetraodon_nigroviridis_AJ42728        GRAHFRISNRDEDPFVAIHAESKL-------
Pseudopleuonectes_americanus_A        GRAHFKISSRDEDPFVAIHAESKL-------
Salmo_salar_DQ331024                  GRAHFKISNTDEDPMVAIHADSKL-------
Anguilla_japonica_AB070721            GRAHFNISNMDEDPFIAIHVDSKL-------
Drosophila_melanogaster_BAB325        GRASINIGSSEDDGVLAIHVNAKL-------
Ceratitis_capitata_AAO13691           GRATISITQAEEDGTLAIHFESKL-------
Bombyx_mori_strain_Nanglai_GQ2        GRALIIHRSNEYDMMVAIHRGADSRL-----
Spodoptera_frugiperda_AAO13754        GRAHISLGANEFDMVLAIHTGPEVRIFVALS
                                      * * :       *    ***   ..
```

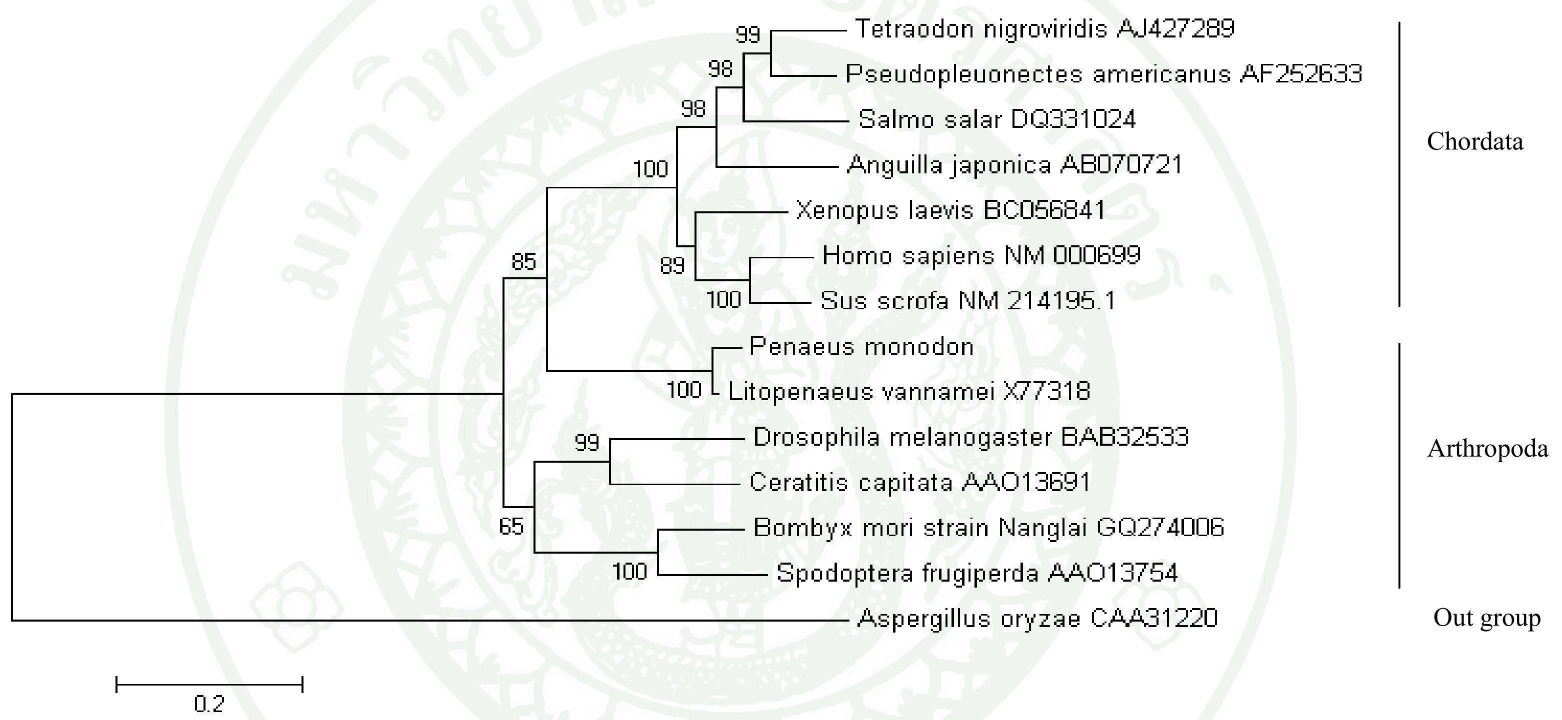
ภาพที่ 21 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Genetic Distance ของกุ้งกุลาดำกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 *Drosophila melanogaster*	0.000													
2 *Ceratitis capitata*	0.197	0.000												
3 *Bombyx mori strain Nanglai*	0.346	0.336	0.000											
4 *Spodoptera frugiperda*	0.346	0.351	0.109	0.000										
5 *Penaeus monodon*	0.430	0.422	0.398	0.396	0.000									
6 *Litopenaeus vannamei*	0.413	0.409	0.381	0.379	0.000	0.000								
7 *Homo sapiens*	0.441	0.428	0.404	0.423	0.339	0.323	0.000							
8 *Sus scrofa*	0.437	0.425	0.399	0.429	0.336	0.322	0.054	0.000						
9 *Xenopus laevis*	0.421	0.416	0.397	0.415	0.322	0.309	0.129	0.132	0.000					
10 *Tetraodon nigroviridis*	0.442	0.443	0.405	0.433	0.360	0.347	0.196	0.202	0.165	0.000				
11*Pseudopleuonectes americanus*	0.442	0.437	0.417	0.428	0.337	0.325	0.197	0.199	0.155	0.063	0.000			
12 *Salmo salar*	0.431	0.438	0.383	0.417	0.355	0.346	0.208	0.207	0.183	0.136	0.122	0.000		
13 *Anguilla japonica*	0.434	0.449	0.426	0.448	0.377	0.362	0.183	0.196	0.154	0.139	0.133	0.166	0.000	
14 *Aspergillus oryzae*	0.886	0.890	0.895	0.899	0.906	0.903	0.908	0.900	0.893	0.911	0.909	0.898	0.903	0.000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 22 Phylogenic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยวิธี Neighbor – Joining (NJ) จากการสุ่มค่า Bootstrap Value 1,000 replicates จากโปรแกรม MEGA 3.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำตลอดสาย กับยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

สิ่งมีชีวิต (Species)	Accession number	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity)	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)
กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)	X77318	95.31	0.000
ปลาซีกเดียว (*Pseudopleuonectes americanus*)	AF252633	56.25	0.337
ปลาแซลมอน (*Salmo salar*)	DQ331024	55.05	0.355
ปลาตูหนาญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*)	AB070721	52.34	0.377
กบ (*Xenopus laevis*)	BC056841	58.51	0.322
ไหม (*Bombyx mori* strain Nanglai)	GQ274006	53.40	0.430
แมลงหวี่ (*Drosophila melanogas*)	BAB32533	54.66	0.398
หนอนกระทู้ (*Spodoptera frugiperda*)	AAO13754	53.66	0.396
ปลาปักเป้าจุดเขียว (*Tetraodon nigroviridis*)	AJ427289	54.10	0.360
แมลงวันทอง (*Ceratitis capitata*)	AAO13691.1	53.60	0.422

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 (ต่อ)

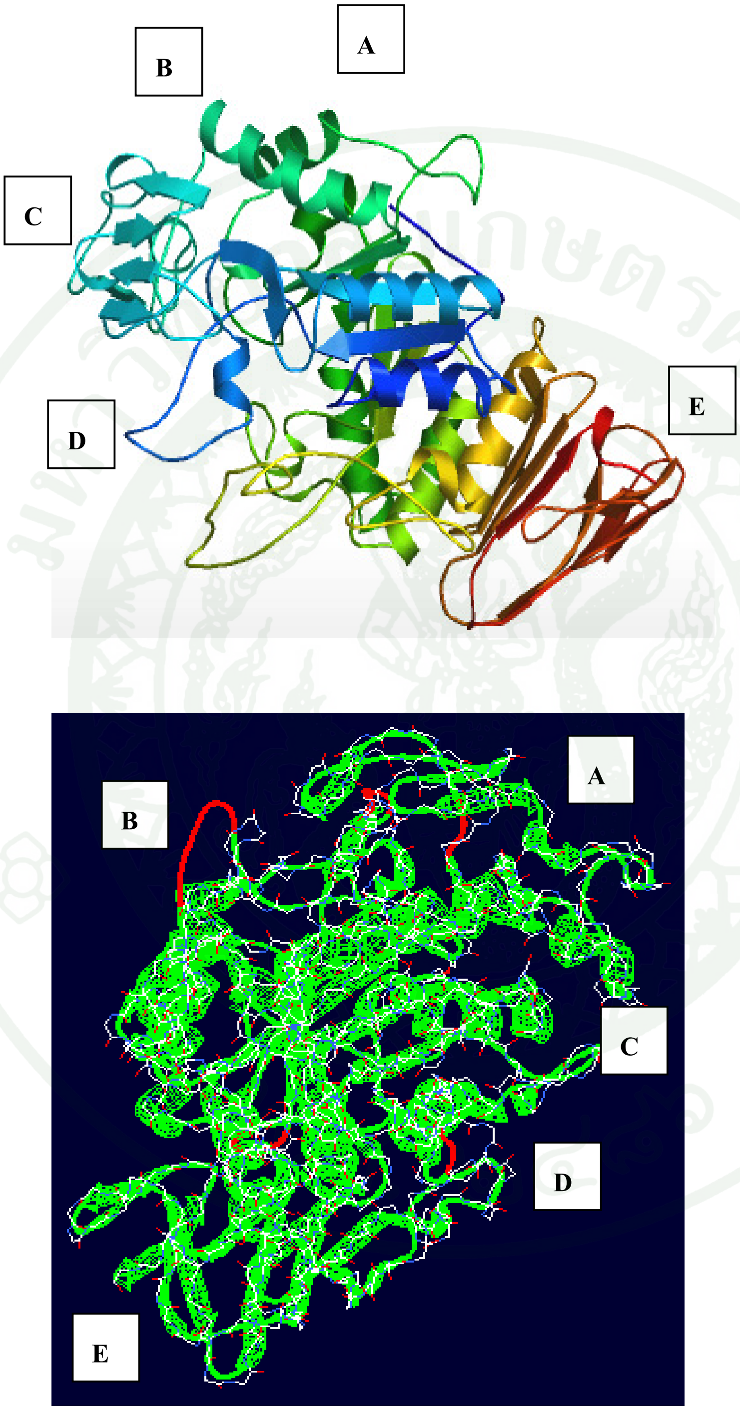
สิ่งมีชีวิต (species)	**Accession number**	**เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity)**	**ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)**
หมู (*Sus scrofa*)	NM214195	58.12	0.336
คน (*Homo sapiens sapiens*)	NM000699	56.56	0.339
เชื้อรา (*Aspergillus oryzae*)	CAA31220	13.03	0.906

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. การศึกษาโครงสร้างโปรตีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ (*Pm*AMY)

จากการศึกษาโครงสร้างโปรตีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ โดยใช้โปรแกรม SWISS–MODEL (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1) พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่เป็น multidomain protein แต่มี catalytic domain ทั่วไปที่อยู่ในรูปของ $(\alpha/\beta)_8$ – barrel โดย barrel ที่มี parallel β-strands แล้วถูกล้อมรอบด้วย 8 helices เรียกว่า Domain A Domain B โดยทั่วไปโครงสร้างเป็นลูป (loop) เชื่อมกับ β-strands กับสาย helices ที่อยู่ถัดไป ซึ่งเป็นตัวที่นำกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณเร่ง (active site) บางส่วนของลูปที่มีความยาวเพียงพอสามารถที่จะเชื่อมกับทางด้านขวาของลูป กรณีที่เกิดขึ้นนี้สามารถตรวจสอบโครงสร้างดังกล่าวได้โดย Crystallography และจะพบว่ามีลูปขนาดใหญ่เกิดขึ้นระหว่าง β-strands 3 สาย และ helices 3 สาย ซึ่งแยกออกมาอย่างเห็นได้ชัด กลุ่มของเอนไซม์ใน family ที่ 13 นี้ มี Domain C ซึ่ง Domain นี้ประกอบด้วย β-strands ทำหน้าที่ให้เกิดความเสถียรของ catalytic domain โดยจะทำการบดบังไฮโดรโฟบิคเรสซิดิวส์ (hydrophobic residues) ของ Domain A จากตัวทำละลายหรืออาจสรุปได้ว่า Domain C ช่วยในการจับกับสารตั้งต้น Domain D หน้าที่ของ Domain D ยังไม่ทราบแน่ชัด และ Domain E เป็น Domain ที่พบในเอนไซม์ที่ย่อยแป้งตัวอื่น ไม่เพียงแต่ใน family ที่ 13 Domain นี้มีความสำคัญในการจับกับแป้งที่มีรูปร่างเป็นแกรนูล (granular) และ คาดว่าสามารถยื่นเข้าไปข้างในกลายเป็นบริเวณเร่งของ cyclodextrin glucanotransferase ได้ (ภาพที่ 23)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

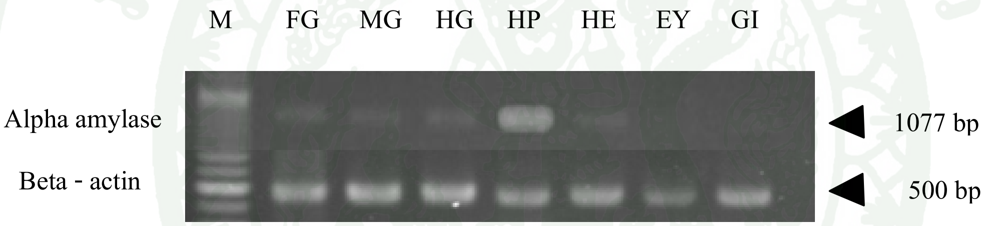


ภาพที่ 23 โครงสร้าง Ribbon model ของโปรตีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำ (*Pm*AMY)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. การศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อต่างๆ (Tissue specific) โดยใช้เทคนิค RT-PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส *PmAmy* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่ายีน *PmAmy* มีการแสดงออกมากที่สุดคือ เนื้อเยื่อในส่วนของตับอ่อน(hepatopancreas) เนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกรองลงมา ได้แก่ ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut) และหัวใจ (heart) ส่วนเนื้อเยื่อที่ก้านตา (eyestalk) และเหงือก (gill) มีการแสดงออกน้อยที่สุด (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส *PmAmy* ขนาด 1077 คู่เบสได้แก่ ช่องที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, ช่องที่ 2 คือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (FG), ช่อง ที่ 3 คือ ทางเดินอาหารส่วนกลาง (MG), ช่องที่ 4 คือ ทางเดินอาหารส่วนปลาย (HG), ช่องที่ 5 คือ ตับอ่อน (HP), ช่องที่ 6 คือ หัวใจ (HE), ช่องที่ 7 คือ ก้านตา (EY), ช่องที่ 8 คือ เหงือก (GI)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลส (*Penaeus monodon* α-Amylase :*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำ พบว่ายีนมีขนาด 1,647 คู่เบส (ตั้งแต่ start codon จนถึง polyA) โดยมีส่วนที่จะสังเคราะห์เป็นยีน (ORF) มีขนาด 1,539 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sellos and Van Wormhoudt (1992) ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่ามีความยาวในส่วนที่จะสังเคราะห์เป็นยีน เท่ากับ 1,539 คู่เบส เท่ากับ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *PmAmy* มาแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 512 อะมิโน เท่ากับลำดับกรดอะมิโนของกุ้งขาวแวนนาไม โดยจากการรายงานการศึกษาของ Le Moullac (1995) พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์หลักที่พบในส่วนของ hepatopancreas ซึ่งเมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของ กุ้งขาวแวนนาไม มาหามวลโมเลกุล (MW) 56.99 กิโลดาลตัน และเมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของคนมาหาค่ามวลโมเลกุล พบว่ามีขนาดเท่ากับ 55 กิโลดาลตัน โดย Keller *et al*., (1971) ซึ่งจากการศึกษาของ Keller *et al*., (1971) สอดคล้องกับค่ามวลโมเลกุลของ *PmAmy* คือ 56.90 กิโลดาลตัน และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า pI โดยใช้โปรแกรม Expasy (http://au.expasy.org) พบว่ามีค่า pI เท่ากับ 5.04 โดย Strobl *et al*., (1997) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของยีนแอลฟาอะไมเลส (Primary structure) ของหนอนนก *Tenebrio molitor* (TMA) ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีขนาดเท่ากับ 471 อะมิโน โดยคิดค่ามวลโมเลกุล ได้เท่ากับ 51.3 กิโลดาลตัน และคำนวณค่า pI ได้เท่ากับ 4.3 ซึ่งมีค่า pI ที่ใกล้เคียงกับค่า pI ของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) Nikapitiya *et al*., (2009) ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยเป๋าฮื้อ พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 1650 คู่เบส แปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 511 อะมิโน นำมาหาค่ามวลโมเลกุล (Mw) เท่ากับ 54 กิโลดาลตัน และคำนวณค่า pI เท่ากับ 8.3 และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะต้องพบ Domain หลักอย่างน้อย 5 Domain ซึ่ง Nakajima *et al*.,(1986) และ Janececk (1992) ได้ทำการศึกษาไว้ แต่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะพบประมาณ 9 Domain ได้แก่ FEW, GFAGVQVSP, DAVINH, NYND, LNDLN, GFRIDASKH, EVID, FIDNHD และ GYTRVMSSY (Van Wormhoudt and Sellos, 1995) โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ conserve กับ domain หลัก พบทั้งหมด 9 Domain เช่นกัน ซึ่ง domain ทั้ง 9 นี้ยังสอดคล้องกับ conserve domain ที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแสดงออกของยีน *PmAmy* ในกุ้งกุลาดำ จะพบในหลายเนื้อเยื่อด้วยกัน คือ เนื้อเยื่อในส่วนของตับอ่อน (hepatopancreas), ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut), ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut), ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut), หัวใจ (heart), ส่วนเนื้อเยื่อที่ก้านตา (eyestalk) และเหงือก (gill) ซึ่งยีน *PmAmy* มีการแสดงออกในทางเดินอาหาร จากการศึกษาของ Darnis *et al*., (1999) ได้ทำการศึกษาการโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิของยีนแอลฟาอะไมเลส (Primary structure) พบว่ามีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในส่วนของตับสูง ในมนุษย์ หนู mouse และ หนู rat เช่นเดียวกับรายงานของ Huvet *et al*., (2003) ได้ทำการศึกษาผลของการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของหอยนางรม พบว่าการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสสูงที่สุดในส่วนของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Levy *et al*., (1985) ได้ทำการศึกษาการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสใน *Drosophila* พบว่าในส่วนของทางเดินอาหารส่วนกลางของ *Drosophila* ในระยะตัวอ่อน (lavar) และระยะตัวเต็มวัย (adult) จะพบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสมากที่สุด และ Doyon *et al*., (2002) พบว่าการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในบริเวณตับ (pancreatic) ของหนู rat และยังคาดการณ์ว่าแอลฟาอะไมเลสในส่วนนี้น่าจะเป็นส่วนที่สำคัญในการเกิด post – translation folding สำหรับการศึกษายีนแอลฟาอะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มาเปรียบเทียบกัน พบว่าหมู (pig) หรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆก็มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อในส่วนของตับคล้ายคลึงกัน (Bompard-Gilles *et al*.,1996) และเมื่อนำลำดับของกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับกลุ่มของแมลง ก็พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนที่คล้ายกัน แต่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ต่างกันออกไป (Strobl *et al*., 1997) แต่มีผลการทดลองได้ศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (*PmAmy*) ในส่วนของต่อมน้ำลาย, ก้านตา, เหงือก, Semen, testis, ovary, follopian tube, กล้ามเนื้อลาย, ปอด และ adipose tissue (Marianne *et al*., 2006)

จากการศึกษาโครงสร้างโปรตีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งกุลาดำพบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่เป็น multidomain protein แต่มี catalytic domain ทั่วไปที่อยู่ในรูปของ $(\alpha/\beta)_8$ – barrel โดย barrel ที่มี parallel β-strands แล้วถูกล้อมรอบด้วย 8 helices เรียกว่า Domain A (Katsuya *et al*, 1998) Domain B โดยทั่วไปโครงสร้างเป็นลูป (loop) เชื่อมกับ β -strands กับสาย helices ที่อยู่ถัดไป ซึ่งเป็นตัวที่นำกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณเร่ง (active site) บางส่วนของลูปที่มีความยาวเพียงพอสามารถที่จะเชื่อมกับทางด้านขวาของลูป กรณีที่เกิดขึ้นนี้สามารถตรวจสอบโครงสร้างดังกล่าวได้โดย Crystallography และจะพบว่ามีลูปขนาดใหญ่เกิดขึ้นระหว่าง β -strands 3 สาย และ helices 3 สาย ซึ่งแยกออกมาอย่างเห็นได้ชัด (Janecek *et al*., 1997 and Park *et al*.,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2000) กลุ่มของเอนไซม์ใน family ที่ 13 นี้ มี Domain C ซึ่ง Domain นี้ประกอบด้วย β -strands ทำหน้าที่ให้เกิดความเสถียรของ catalytic domain โดยจะทำการบดบังไฮโดรโฟบิคเรสซิดิวส์ (hydrophobic residues) ของ Domain A จากตัวทำละลายหรืออาจสรุปได้ว่า Domain C ช่วยในการจับกับสารตั้งต้น (Dauter *et al*.,1999 and Lawson *et al*., 1994) Domain D หน้าที่ของ Domain D ยังไม่ทราบแน่ชัด และ Domain E เป็น Domain ที่พบในเอนไซม์ที่ย่อยแป้งตัวอื่น ไม่เพียงแต่ใน family ที่ 13 Domain (Jespersen *et al*., 1991) นี้มีความสำคัญในการจับกับแป้งที่มีรูปร่างเป็นแกรนูล (granular) และ คาดว่าสามารถยื่นเข้าไปข้างในกลายเป็นบริเวณเร่ง
ของ cyclodextrin glucanotransferase ได้ (Hofmann *et al*., 1989)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ และการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาในระดับสูงต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งกุลาดำ(*Penaeus monodon*) ของยีน α*-Amylase* (*PmAmy*) โดยการสังเคราะห์ cDNA ด้านปลาย 3’ และ 5’ ของยีนด้วยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) พบว่าความยาวของยีน *PmAmy* ของกุ้งกุลาดำที่โคลนได้ 2 โคลน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาต่อกันได้ความยาว 1647 bp โดยส่วนของรหัสสังเคราะห์โปรตีน (Open reading frame) มีความยาว 1539 bp เมื่อแปลงเป็นกรดอะมิโนประกอบด้วย 512 เรซิดิวส์ สายโพลีเปปไทด์ประกอบด้วย conserve domain 9 ตำแหน่ง ได้แก่ FEW, GFAGVQVSP, DAVINH, NYGD, LNDLN, GFRIDPSKH, EVID, FIDNHD และ GYTRAMSSY เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *PmAmy* มาเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vanamei*) พบว่ามีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 95.31 โดยสายโพลีเปปไทด์ของ *PmAmy* มีน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI ที่คำนวณได้ เท่ากับ 56.899 kDa และ 5.04 ตามลำดับ ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีน *PmAmy* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่ายีน *PmAmy* มีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) เนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกรองลงมา ได้แก่ ทางเดินอาหารส่วนต้น (fore gut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hind gut) และหัวใจ (heart) ส่วนเนื้อเยื่อที่ก้านตา (eyestalk) และเหงือก (gills) มีการแสดงออกน้อยที่สุด

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองครั้งนี้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน α*-Amylase* (*PmAmy*) ของกุ้งกุลาดำที่ได้นั้นเป็นส่วนของ Open reading frame จนถึง ด้านปลาย 3′ ยังขาดในส่วนของด้านปลาย 5′ ถ้าได้ในส่วนของด้านปลาย 5′ จะทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาในระดับกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไปได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาการแสดงออกของยีน *PmAmy* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ควรเพิ่มในส่วนของเลือดกุ้ง (hemolymph) เพราะว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีการแสดงออกในระบบหมุนวียนโลหิต ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับความทนทานต่อโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. **เทคโนโลยีแป้ง**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประจวบ หลำอุบล. 2527. **เอกสารคำสอนวิชากุ้ง**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไพโรจน์ พวงลดา. 2538. **ระยะเวลาการลอกคราบของกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มะลิ บุณยรัตนผลิน, นิพนธ์ ศิริพันธุ์ และศิริ ทุกข์วินาศ. 2546. **การเลี้ยงกุ้งทะเลระบบอินทรีย์**. กรมประมง. กรุงเทพฯ.

รุจิรา สุทธิธรรม. 2544. **คุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุปรีชา กลิ่นพูน.2551. ร่างยุทธศาสตร์กุ้งไทย 2. **AQUABIZ**. 2: 8 - 12

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชัย พฤษศิริสมบัติ. 2544. **การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius, 1798**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพินท์ จินตสถาพร และ รุ่งกานต์ กล้าหาญ. 2548. **ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ใน hepatopancrease กับระยะลอกคราบในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Abraham, E.G., J. Nagaraju and R.K., Datta. 1992. Biochemmical studies of amylase in the silkworm, *Bombyx mori* L.: comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains. **Insect Biochem Mol. Biol**. 22(8): 867-873.

Abramo, L.R.D., D.E. Conklin and D.M. Akiyama. 1997. **Crustacean Nutrition**. Advances in World Aquaculture. Volume 6. USA.

Bompard-Gilles, C., P. Rousseau, P. RougeÂ and F. Payan. 1996. Substrate mimicry in the active center of a mammalian a-amylase: structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. **Structure**. 4: 1441-1452.

Brito, R., M.E. Chimal, G. Gaxiola and C. Rosas. 2000. Growth, metabolic rate, and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets. **Exp Marine Biol Ecol**. 255 : 21-36

Carl, W and S. Gabriela. 2003. **PCR Primer: Laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Chang, E.S. 1995. Physioiligical and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans : an overview. **Exp Marine Biol Ecol**. 193 : 1-14.

Chatterjee, S. N., C.G.P. Rao, G.K. Chatterjee and S. K. Aswata. 1992. Genetic variability of amylase activity in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., and its significance. **Sericologia**. 31(4): 671-685.

Colorado State University. 2009. **Alpha (1⟶4) bond starch, glycogen**. Available Source: http://www.vivo.colostate.edu, June 3, 2009.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Darnis, S., N. Juge, X.J. Guo, G. Marchis-Mouren, A. Puigserver and , J.C. Chaix. 1999. Molecular cloning and primary structure analysis of procine pancreatic α-amylase. **Biochem. Biophys. Acta**. 1430: 281-289.

Douglas, C.W and C. Mitchinson. 1997. Enzymes involved in the processing of Staarch to sugars. **Trend Biotechnol**. 15: 349 – 352.

Doyon, Y., W. Home, P. Duall and D. LeBel. 2002. Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic α-amylase secretion and activity. **Biochem J**. 362: 259-264.

Dauter, Z., M. Dauter, A.M. Brzozowski, S. Christensen, T.V. Borchert, L. Beier, K.S. Wilson and G.J. Davies. 1999. X-ray structure of Novamyl, the five-domain 'maltogenic' α –amylase from Bacillus stearothermophilus: maltose and acarbose complexes at 1.7 A^{o} resolution. **Biochemistry**. 38: 8385-8392.

Fernandez, A.V. G., F.L.G. Carreno, M.A.N. del Toro and J.L. Fenucci. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda,Penaeidae) : partial characterization and relationship with molting. **Comp Biochem Physiol B.** 130 : 331 - 338.

Hirata, Y. 1974. Relations between the amylase activity of the larval digestive juice amylase and several quantitative characters in *ae* strains of silkworm, *Bombyx mori*. **J. Seric. Sci. Jpn**. 43:384-390.

Hofmann, B.E., H. Bender and G.E. Schulz. 1989. Three-dimensional structure of cyclodextrin glucosyltransferase from Bacillus circulans at 3.4 A^{o} resolution. **J. Mol. Biol**. 209: 793-800.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Huveta, A., J.-Y. Daniela, C. Quéréa, S. Duboisa, M. Prudencea, A. Van Wormhoudtb, D. Sellosb, J.-F. Samaina and J. Moala. 2003. Tissue expression of two α-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. **Aquaculture**. 228: 321-333.

Janecek, S. 1992. Sequence similarities in $(\alpha/\beta)_8$-barrel enzymes revealed by conserved regions of α -amylase. **FEBS**. 316: 23-26.

______, B. Svensson and B. Henrissat. 1997. Domain evolution in the α -amylase family. **J. Mol. Evol**. 45: 322-331.

Jespersen, H.M., E.A. MacGregor, M.R. Sierks and B. Svensson. 1991. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. **Biochem. J**. 280: 51-55.

Katsuya, Y., Y. Mezaki, M. Kubota and Y. Matsuura.1998.Three-dimensional structure of Pseudomonas isoamylase at 2.2 A^{o} resolution. **J. Mol. Biol**. 281: 885-897.

Keller, P., DL. Kaufman, BJ. Allan and BL. Williams. 1971. Isoenzymes of human parotid α – amylase. **Biochemistry**. 10: 4867-4874.

Le Moullac, G. 1995. Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). These EPHE, 120 p

Levy, J.N., R.M. Gemmill and W.W. Doane. 1985. Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Drosophila melanogaster*. II. Clone organization and verification. **Genetics**. 110: 313-324.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lawson, C.L., R. van Montfort, B. Strokopytov, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, G.E. de Vries, D. Penninga, L. Dijkhuizen and B.W. Dijkstra. 1994. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251 in a maltose-dependent crystal form. **J. Mol.Biol**. 236: 590-600.

MacGregor, E.A., S. Janecek and B. Svensson. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α-amylase family of enzymes. **Biochem. Biophys. Acta**. 1546: 1-20.

Marianne, K.F., E. Lilleeng, A. Sundby and Å. Krogdahl. 2006. Cloning and characterization of α -amylase from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Comp Biochem Physiol**. 145: 479 - 492

Nakajima, R., T. Imanaka and S. Aiba. 1986. Comparison of amino acid sequence of eleven α -amylase. **Appl Microbiol Biotechnol**. 23: 353-360.

Nigam P. and D. Singh. 1995. Enzyme and microbial system involved in starch processing. **Enz Microbial Technol**. 17: 770-778

Nikapitiya, C., C. Oh, I. Whang, C. Kim, Y. Lee, S. Kim and J. Lee. 2009. Molecular characterization, gene expression analysis and biochemical properties of α-amylase from the disk abalone, Haliotis discus discus. **Comp Biochem Physiol B**. 152: 271–281

Ngernyuang, N. 2007. **Full-Length *Alpha-Amylase* cDNA of Local Silkworm, *Bombyx mori***. M.S. Thesis, Kasetsart University

Park, K.H., T.J. Kim, T.K. Cheong, J.W. Kim, B.H. Oh and B. Svensson. 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. **Biochim Biophys Acta**. 1478: 165-185.

Passano, L.M. 1960. The physiology of crustacean vol. 1. Academic Press. New York. 44 – 536.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pérez-Farfante, I and B. Kensley. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world (Keys and Diagnoses for the Families and Genera). Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

Promboon, A., A. Engkakul, L. Ngernsiri and P. Saksoong. 1993. Amylase of the polyvoltine silkworm (*Bombyx mori*): variation of activity in the Thai local race. **Sericologia**. 33(4): 603-609.

Sellos, D and A. Van Wormhoudt. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hapatopancreas of the shrimp *Penaeus vanamei* (Crustacea, Decapoda). **FEBS**. 309: 219-224.

Strobl, S., F.-X. Gomis-RuÈ th, K. Maskos, G. Frank, R. Huber and R. Glockshuber. 1997. The α-amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. **FEBS**. 409: 109±114.

Takenaka, Y., H. Masuda, A. Yamaguchi, S. Nishikawa, Y. Shigeri, Y. Yoshida and H. Mizuno. 2008. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica*. **Gene**. 425: 28–35.

Van Wormhoudt, A., G. Bourreau and G. Le Moullac. 1995. Amylase polymorphism in crustacean Decapoda: electrophoretic and immunological studies. **Biochem System Ecol.** 23: 139-149.

______ and D. Sellos, 1995. Cloning and sequencing analysis of three amylase cDNAs in the shrimp *Penaeus vanamei* (Crustacea decapoda): Evolution Aspects. **J Mol Evol**. 42: 543-551.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Villasante V.F., I. Fernandez, R.M. Preciado, M. Oliva, D. Tova and H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzyme during the molting stage of the arched swimming *Callinectes Arcautus* orday, 1863. (Crustacea : decapoda: portunidae). **Bull marine Sci**. 65: 1 – 9.

Webster, S.G and R. Keller. 1996. Purification , characterization and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapod). **J Comp Physiol**. 156: 617 – 624

Yasuda, A., Y. Yansuda, T. Fujita and Y. Naya. 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*) : multiplicity of molecular forms by stereo-inversion and diverse functions. **Gen Comp Endocrinol**. 95: 387 - 398

Zhenhua, S., N. Linyuan, Y. Guidong, Y. Aifang and Z. Juren. 2008**.** Cloning and expression analysis of some genes involved in the phosphoinositide and phospholipid signaling pathways from maize (*Zea mays* L.)**. Gene**. 426: 47–56**.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสกัด total RNA โดยใช้วิธี Trizol reagent

1. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำแต่ละส่วนปริมาณ 1 g มาเติม Trizol reagent 1 ml บดตัวอย่างให้ละเอียด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C

3. ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform 200 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วกลับหลอดไปมา 15 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที

4. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C

5. ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม Isopropyl alcohol 500 µl และนำไปบ่มที่ – 20°C นาน 60 นาที

6. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C

7. ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอโดยใช้ 75% ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 100 µl โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C

8. air dry ตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 – 10 นาที

9. ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการเติม DEPC หรือ H_2O 30 µl

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA

1. การทำปฏิกิริยา PCR

นำ Complementary DNA (cDNA) ที่สังเคราะห์ได้มาเติม ส่วนประกอบต่างๆดังนี้

Reaction mixture:

10X PCR buffer	10 µl
50mM $MgCl_2$	2.5 µl
10mM dNTP	2 µl
10 pmol primers (each 1 µl) ชนิดละ	1 µl
Taq DNA polymerase	1 µl
cDNA template (Dilute 1:10)	10 µl
Distilled water เติมจนได้ปริมาตรครบ	50 µl
Total	50 µl

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลังจากเตรียมส่วนประกอบทุกอย่างเรียบร้อยแล้วนำมาเข้าเครื่อง Thermocycler

RACE – PCR

2. การทำปฏิกิริยา PCR แบบ Touch down

นำ Complementary DNA (cDNA) ที่สกัดได้มาเติม ส่วนประกอบต่างๆดังนี้

Reaction mixture :

10X Advantage 2 PCR Buffer	5 µl	
10mM dNTP mix	1 µl	
50x Advantage 2 Polymerase mix	5 µl	(เติมเป็นลำดับสุดท้าย)
PCR – grade water	34.5 µl	
Total	41.5 µl	

5' RACE – PCR Reaction		**3' RACE – PCR Reaction**	
10X UPM (Universal primer)	5 µl	10X UPM (Universal primer)	5 µl
10 pmol RACE_PSR primer	1 µl	10 pmol RACE_PSF primer	1 µl
5'-RACE cDNA	2.5 µl	3'-RACE cDNA	2.5 µl
Total	50 µl	Total	50 µl

หลังจากเตรียมส่วนประกอบทุกอย่างเรียบร้อยแล้วนำมาเข้าเครื่อง Thermocycler

อะกาโรสเจล อิเล็คโตรโฟรีซีส

<u>สารละลาย</u>

1. 50X TAE Buffer (1,000ml)

Tris base	242	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	ml

ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. เอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 μg/ml

เอธิเดียมโบรไมด์	250	μg
dH_2O	500	ml
เก็บในขวดสีน้ำตาล		

วิธีการ

1. ประกอบถาดหล่อเจลเข้ากับซี่หวี (comb) เพื่อให้เจลที่แข็งตัวมีช่อง (wells) ซึ่งใช้สำหรับหยอดตัวอย่าง

2. ชั่งอะกาโรส (Fistbase,) 0.4 g ผสมกับบัฟเฟอร์ 1 X TAE ปริมาตร 40 ml จะได้อะกาโรสความเข้มข้น 1.0%

3. ละลายอะกาโรสโดยนำเข้า microwave นานประมาณ 1 นาที เมื่อเดือดให้นำออกมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำเข้า microwave อีกครั้ง ทำซ้ำดังกล่าวอีก 2-3 ครั้ง จนกระทั่งอะกาโรสละลายจนเป็นสารละลายใส

4. ปล่อยสารละลายเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น นำไปเทลงบนถาดหล่อเจลโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ทิ้งไว้จนกระทั้งเจลแข็งตัวและเย็น

5. ดึงซี่หวีออกจากเจล ค่อยๆดังแผ่นเจลขึ้น นำไปวางใน eletrophoresis chamber โดยหันด้านช่องหยอดตัวอย่างไปทางขั้วลบ

6. เติมบัฟเฟอร์ 1 X TAE เติมลง eletrophoresis chamber จนท่วมผิวหน้าเจลขึ้นมาประมาณ 2 mm

7. ผสม loading dye กับตัวอย่างดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอมาตรฐาน อัตราส่วน 2.0 : 10 μl บนแผ่นพาราฟิน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นลง 3 – 4 ครั้ง แล้วนำไปหยอดลงในช่องหยอดตัวอย่าง

8. ปิดฝา eletrophoresis chamber ต่อขั้วไฟฟ้า แล้วเปิดสวิตซ์ปล่อยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100V โดยให้กระแสไฟฟ้าไหลจากขั้วลบไปหาขั้วบวกตามความยาวของแผ่นเจล

9. สังเกตสีของ loading dye เมื่อสีเคลื่อนที่ไปจนถึงด้านปลายของแผ่นเจลให้หยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า

10. นำแผ่นเจลออกไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่านาน 3 นาที (ระวังไม่ให้เอธิเดียมโบรไมด์โดนร่างกาย)

11. นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้ Gel document Gene Genius

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Completent Cell

<u>สารเคมี</u>

1. PEG 40% stock

PEG	0.4	g
dH_2O	1,000	ml

2. 1M Mg_2Cl (1,000 ml)

Mg_2Cl	203.3	g
dH_2O	800	ml

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml นำไปกรอง และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

3. 10N NaOH

NaOH	400	g
dH_2O	800	ml

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

4. LB (1,000 ml)

LB broth	25	g
dH_2O	1,000	ml

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

5. TSS solution (100 ml)

10% PEG	10	g
5% Dimethyl sulfoxide	5	ml
20 mM Mg_2Cl	2	ml

เติม LB ให้ได้ 100 ml และนำไปกรอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. *E.Coli*

ดูดเชื้อ 30 µl ใน LB 3 ml

นำไปบ่มในตู้ shaker ที่ 250 rpm 37°C เป็นเวลา 16 ชม.

Dilute เชื้อในอัตราส่วน 1 : 100

บ่มในตู้ shaker ที่ 250 rpm 37°C เป็นเวลา 2.5 ชม.

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD.) ให้ได้ค่าประมาณ 0.4 – 0.6

<u>วิธีการเตรียม completent cell</u>

1. นำเชื้อ *E.Coli* ที่เลี้ยงจากข้อ 6. ใส่ในหลอด Centrifuge ขนาด 15 ml
2. นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
3. นำไปปั่นที่ 4,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
4. เทอาหารในหลอดทิ้ง
5. เติม Tss solution 5 ml แล้วนำไป vortex แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
6. นำไปปั่นที่ 4,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
7. เทส่วนใสทิ้ง
8. เติม Tss solution 1 ml แล้วนำไป vortex
9. แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดละ 200 µl 5 หลอด (หลอดที่เหลือควรเก็บรักษาไว้ที่ -80 °C ซึ่งสามารถเก็บได้นานถึง 1 เดือน)

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการกับเวคเตอร์ (ligation)

<u>สารเคมีและวิธีการ</u>

1. 2 X Buffer 2.5 µl
2. p-GEM-T easy 0.5 µl
3. PCR Product 2 µl
4. T4 – DNA ligase 1 µl

นำไปบ่มที่ 4°C ข้ามคืน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Transformation

สารเคมี

1. LB (1,000 ml)

LB broth	25	g
dH_2O	1,000	ml

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

2. LA (1,000 ml)

LB	1,000	ml
Agar	15	g

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

3. LA + AMP (1,000 ml)

LA + AMP	1,000	ml
AMP	500	µl

4. X - gal (1 ml)

X – gal	20	mg
Dimethyformamide	1	ml

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่ -20°C

5. IPTG (10 ml)

IPTG	0.2383	g
dH_2O	10	ml

นำไปกรอง เก็บรักษาที่ -20°C

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>วิธีการ</u>

1. นำ completent cell 50 µl แบ่งใส่ในหลอดที่มี fragment และ control

2. นำไปบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที

3. แช่ในน้ำแข็ง 2 นาที

4. เติมอาหาร LB 400 µl และพันหลอดด้วยพาราฟิน ใส่ลงในฟลาสก์

5. นำไปบ่มในตู้ shaker ที่ 250 rpm 37°C เป็นเวลา 1 ชม.

6. นำอาหาร LA + Amp (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ไมโครกรัม) ไปบ่มที่ 37°C ก่อนนำมาใช้

7. ผสม X – gal (ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ไมโครกรัม) กับ IPTG (ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม/ไมโครกรัม) ในอัตราส่วน 5 : 1 หยดลงตรงกลาง plate (LA + AMP) นำไป spread plate รอจน plate แห้ง

8. นำเชื้อที่บ่มไปปั่นที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

9. เทอาหารทิ้งให้เหลือก้นหลอด นำไป vortex เพื่อให้ตะกอนและอาหารเข้ากัน

10. นำไป deep spin เพื่อให้สารละลายลงไปอยู่ก้นหลอดทั้งหมด

11. ดูดสารละลายทั้งหมดหยดลงตรงกลาง plate (LA + AMP + X –gal + IPTG) นำไป spread plate รอจน plate แห้ง นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชม.

12. ถ้ายังไม่ได้นำมาใช้ ให้เก็บรักษาไว้ที่ 4°C

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis

สารเคมี

1. Solⁿ I (GTE)

1M glucose

Glucose	18	g
dH_2O	100	ml

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

GTE (40 ml)

50 mM Glucose	2	ml
25mM Tris- HCl (pH 8.0)	1	ml
10 mM EDTA	0.8	ml

2. Solⁿ II (1.4 ml)

0.2 N NaOH	30	µl
1% SDS	75	µl
dH_2O	1,395	µl

3. Solⁿ III (100 ml)

5M KOAC	60	ml
Glacial acetic acid	11.5	ml
dH_2O	28.5	ml

4. Alcohol 70%

Alcohol 95%	73.7	ml
dH_2O	26.3	ml

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. เทเชื้อจากหลอด 15 ml ใส่หลอด 1.5 ml ประมาณ 1 – 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2. เทส่วนใสทิ้ง เติมเชื้ออีกประมาณ 0.5 – 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

3. เทอาหารแล้วดูดอาหารที่เหลือออกจนหมด

4. เติม Sol^{n} I 200 µl นำไป vortex เพื่อให้เซลล์ละลายจนหมด

5. เติม RNase A 3 µl และนำไป vortex แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

6. เติม Sol^{n} II 400 µl แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

7. เติม Sol^{n} III 200 µl แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4^{o}C เป็นเวลา 15 นาที

9. ดูดส่วนใสใส่หลอด 1.5 ml 200 µl 3 ครั้ง

10. เติม chloroform 500 µl นำไป vortex ไม่ให้ติดก้นหลอด

11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

12. ดูดส่วนใสด้านบน 600 µl ใสหลอดใหม่แล้วเติม isopropanol 360 µl เขย่าให้เข้ากัน

13. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 4^{o}C เป็นเวลา 5 นาที

14. ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม 70% ethanol 1 ml ผสมให้เข้ากัน

15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลาย ethanol ออก

16. นำไปทำให้แห้งด้วย speed vacumm หลังจากนั้นเติมน้ำ 30 µl เคาะให้ตะกอนละลายสลับกับการนำไป spin down

17. นำไป Run agarose gel

18. หลังจากได้ clone ที่ต้องการแล้ว นำ clone นั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยมีส่วนผสมดังนี้

H_2O	7	µl
10 X buffer	1	µl
*Eco*RI Enzyme	1	µl
Plasmid	1	µl
Total	10	µl

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

19. นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม.

20. นำไป Run agarose gel โดยใช้ uncut เป็นตัว control โดยมีส่วนผสมดังนี้

H_2O	7	µl
Dye	1	µl
Plasmid	1	µl
Total	10	µl

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวจรรยาภรณ์ เพชรคง
	Miss Janyaphorn Phetkhong
เกิดวัน ที่	3 มิถุนายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดระนอง
ประวัติการศึกษา	วท.บ (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ (พ.ศ. 2548)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2549)

ผลงานทางวิชาการ

Janyabhorn Phetkhong , Pattana Srifah Huehne and Lertluk Ngernsiri . 2009. Cloning and Sequencing α- *Amylase* gene of Black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *In* **Proceedings of the 35th Congress on Science and Technology of Thailand.** October 15-17, 2009. The Tide Resort (Bangsaen Beach), Chonburi, Thailand.

Janyabhorn Phetkhong , Pattana Srifah Huehne and Lertluk Ngernsiri . 2009. Cloning and Sequencing α- *Amylase* gene of Black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *In* **Proceedings of the 48th Annual Conference.** February 3-6, 2010. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์