

สมบัติเชิงหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินในกุ้งขาวแปซิฟิก *Litopenaeus vannamei*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Functional Properties of Genes Involved in Melanosis in Pacific White Shrimp

Litopenaeus vannamei



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สมบัติเชิงหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินใน กุ้งขาวแปซิฟิก <i>Litopenaeus vannamei</i>
โดย	น.ส.จันทรวรงค์ เรืองปถีย์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.จันทรประภา อิ่มจงใจรัก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทรประภา อิ่มจงใจรัก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐริดา โชติช่วง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา)

จันทร์วารงค์ เรื่องปดีย์ : สมบัติเชิงหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาวแปซิฟิก
Litopenaeus vannamei. (Functional Properties of Genes Involved in Melanosis in
 Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.จันทร์ประภา อิ่มจง
 ใจรัก, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ปิติ อ่ำพ่าย

ฟินอลออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมลานินเซชัน ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบ
 ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน ฟินอลออกซิเดสจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่จับจำเพาะกับทองแดง
 สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารประกอบฟินอลให้เป็นควิโนน ซึ่งสามารถเกิดพอลิเมอร์เซชันต่อไปและ
 กลายเป็นเมลานินซึ่งจุดดำเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมอาหารทะเลได้ ส่วนฮีโมไซ
 ยานินเป็นโปรตีนในกลุ่มที่จับจำเพาะกับทองแดงเช่นเดียวกับฟินอลออกซิเดส มีหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนในเลือด
 ของครัสเตเชียน และมีรายงานว่าหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟินอลออกซิเดสด้วยเช่นกัน
 แต่ยังไม่มีการระบุแน่ชัดว่าหน่วยย่อยใดของฮีโมไซยานินที่มีความสามารถดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษา
 ลักษณะสมบัติและหน้าที่ของหน่วยย่อยฮีโมไซยานินชนิดใหม่ในกุ้ง *Litopenaeus vannamei* คือ LvHcB จาก
 การศึกษาด้านชีวสารสนเทศ พบว่า open reading frame ของยีน LvHcB ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 2004 คู่
 เบส ถอดรหัสเป็นเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 650 ตัว โดยกรดอะมิโน 17 ตัว เป็นเพปไทด์ส่งสัญญาณ ลำดับกรดอะมิ
 โนของ LvHcB มีความคล้ายกับ LvHcL และ LvHcS เท่ากับ 69% และคล้าย LvproPO1 เท่ากับ
 44% LvproPO2 เท่ากับ 45% และ LvproPO3 เท่ากับ 41% นอกจากนี้ LvHcB ยังมีลักษณะของโปรตีนใน
 กลุ่มโปรตีนที่จับจำเพาะกับทองแดงเช่นกัน จากการศึกษาหน้าที่ของยีน LvHcB ในกุ้งขาวด้วยเทคนิคอาร์เอ็นเอ
 อินเตอร์เฟียร์เรนซ์ พบว่าการลดการแสดงออกของยีน LvHcB ในกุ้งขาวด้วยการฉีด อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อ
 ยีน LvHcB เข้าสู่กุ้ง ทำให้ปริมาณทรานสคริปต์ของยีน LvHcB ลดลงโดยไม่ลดปริมาณทรานสคริปต์ของยีนอื่นที่
 เกี่ยวข้องกับเมลานินซิส และยังพบว่ากุ้งที่มีการแสดงออกของยีน LvHcB ลดลงมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟินอลออก
 ซิเดสน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน GFP เมื่อตรวจสอบการเกิดเมลานินซิสโดยการวัดสี
 ด้วยระบบ CIE L* a* b* พบว่า ΔE value ของกุ้งที่ถูกลดการแสดงออกของยีนด้วย LvHcB dsRNA มีค่าสูงกว่า
 กุ้งในกลุ่ม GFP dsRNA และ sodium metabisulfite (SMS) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่
 อุณหภูมิ 4 °C จากผลการทดลองที่ได้จึงชี้ให้เห็นว่ายีน LvHcB ไม่มีความเกี่ยวข้องในการเกิดเมลานินซิส แต่มี
 บทบาทหน้าที่ในระบบโปรตีนออกซิเดสในกุ้งขาว

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6072032623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD:

Janwarang Ruangpat : Functional Properties of Genes Involved in Melanosis in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Advisor: Assoc. Prof. CHANPRAPA IMJONGJIRAK, Ph.D. Co-advisor: Piti Amparyup, Ph.D.

Phenoloxidase (PO), a member of type III copper protein family, is a key enzyme of a melanization process in crustacean innate immune responses. PO catalyzes the conversion of phenols to the highly reactive quinones, which later polymerize and cause a serious melanosis problem in seafood industries. Hemocyanin is an oxygen-transport protein in the crustacean hemolymph that belongs to the same protein family as PO. Although recent findings have demonstrated that some subunits of hemocyanins could generate PO activity, the hemocyanin-derived PO activity is still largely unknown. In this study, a novel hemocyanin gene, *LvHcB*, from shrimp *Litopenaeus vannamei* was identified and functionally characterized. The complete open reading frame of *LvHcB* cDNA consisted of 2004 bp, encoded for 650 amino acids with a 17 amino acid signal peptide. Sequence analysis showed that the deduced *LvHcB* protein appears to possess the characteristics of type III copper protein family and shares 69% and 41-45% with other shrimp hemocyanins (*LvHcL* and *LvHcS*) and prophenoloxidases (*LvproPO1*, *LvproPO2*, and *LvproPO3*), respectively. *In vivo* RNA interference (RNAi)-mediated functional analysis was then employed and the result showed that injection of double-stranded RNA (dsRNA) corresponding to the *LvHcB* gene significantly decreased the transcript level of *LvHcB* (but not other hemocyanin and proPO), and the total PO activity in shrimp hemocytes, compared to the GFP dsRNA-injected control. In addition, melanosis of shrimp was evaluated through CIE L* a* b* system. It was found that the ΔE value of shrimp treated by *LvHcB* dsRNA was significantly higher than that treated by GFP dsRNA and sodium metabisulfite (SMS), after storing at 4 °C for 7 days. These results indicate that *LvHcB* gene, but not involved in melanosis, plays a role in the proPO system in shrimp.

Field of Study: Food Technology

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาและความอนุเคราะห์อย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปิติ อ่ำพายัพ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัย และข้อชี้แนะที่มีคุณค่า รวมทั้งได้ช่วยปรับปรุงและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา ที่ได้กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนชี้แนะ ให้คำปรึกษาในการปรับปรุงและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.วัลย์พร เจริญทรัพย์ศรี ที่ได้กรุณาให้ความรู้ในกระบวนการทางอนุชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัยตลอดมานี้ รวมทั้งพี่น้อง และเพื่อน ๆ ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้ให้กำลังใจมาตลอดการวิจัยนี้

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือในการทำงานวิจัยจนสามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ได้สนับสนุนค่าเล่าเรียน ตลอดจนค่าใช้จ่ายบางส่วนในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณมารดา บิดาและน้องสาว ที่เป็นกำลังใจเสมอมาแม้จะมีการรบกวนสมาธิข้าพเจ้าอยู่เป็นระยะ ๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถอดทนต่ออุปสรรคและปัญหา และทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงในที่สุด

จันทร์วรางค์ เรืองปถีย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 กุ้งขาวแอฟริกา (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	3
2.2 เมลาโนซิส (melanosis).....	8
2.3 เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase enzyme: PO).....	13
2.4 ฮีโมไซยานิน (hemocyanin).....	16
2.5 RNA interference.....	20
2.6 ระบบสี CIE L*a*b*.....	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลาโนซิสในกุ้งขาวแอฟริกา.....	28
3.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)	28
3.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ในกุ้งที่ถูก ยับยั้งการแสดงออกของยีน.....	34
3.4 การตรวจสอบการเกิดเมลาโนซิส (melanosis) ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน.....	35
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	39

4.1 ลักษณะสมบัติของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB.....	39
4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อ (tissue distribution) ของกุ้ง	44
4.3 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายผ่านกระบวนการ RNA interference (RNAi)	46
4.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน LvHcB ด้วย semi-quantitative RT-PCR.....	47
4.5 การตรวจสอบความจำเพาะของอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA ต่อการแสดงออกยีนในกลุ่ม type III copper protein ด้วย semi-quantitative RT-PCR.....	49
4.6 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB.....	53
4.7 การตรวจสอบการเกิดเมลานินในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB	55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	61
5.1 สรุปผลการทดลอง	61
5.2 ข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม.....	62
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	77
ภาคผนวก ข ลำดับกรดนิวคลีอิกที่สมบูรณ์ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB	79
ประวัติผู้เขียน.....	81

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณและมูลค่าผลผลิตกุ้งขาวแปซิฟิกตั้งแต่ พ.ศ. 2552-2561.....	7
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (reverse transcription).....	31
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	33
3.3 โปรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน semi-quantitative RT-PCR และ RNAi.....	34
4.1 ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (PO activity) จากฮีโมลิมพ์ของกุ้งขาวแปซิฟิกที่มีการยับยั้งการ แสดงออกของยีน.....	55
4.2 ค่าความแตกต่างสีบริเวณหัวกุ้งและตัวกุ้งของแต่ละกลุ่มการทดลองหลังการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	56

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของกุ้งในตระกูล Penaeidae.....	4
2.2 แม่พิมพ์กุ้งขาวแปซิฟิก.....	5
2.3 โครงสร้างชั้น cuticle ของ arthropods.....	9
2.4 กลไก prophenoloxidase activating system ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม arthropods.....	15
2.5 ปฏิกิริยาการเกิดเมลานินซิสเกิดจากเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสออกซิไดส์โมโนฟีนอล (monophenols) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดฟีนอล (diphenol) ซึ่งถูกเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสออกซิไดส์อีกครั้งได้ผลิตภัณฑ์เป็นควิโนน (quinone) จากนั้นควิโนนเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันได้เป็นพอลิเมอร์ที่มีสีน้ำตาล.....	15
2.6 โครงสร้างของฮีโมไซยานินในอาโทรพอดและมอลลัสก์.....	18
2.7 แผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ แบบ maximum likelihood phylogeny ของฮีโมไซยานินสร้างจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนฮีโมไซยานินจำนวน 58 ยีน แสดงการจัดกลุ่มฮีโมไซยานินตาม immunological class (β α γ).....	19
2.8 RNAi ภายในเซลล์.....	21
2.9 การถ่ายถอด RNAi ระหว่างเซลล์ใน <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
2.10 Color space ของ CIE 1976 L*a*b* ประกอบด้วย 3 ค่า ได้แก่ L* หรือ lightness มีค่าอยู่ในช่วง 0-100 +a* คือค่าสีแดง -a* คือค่าสีเขียว +b* คือค่าสีเหลือง และ -b* คือค่าสีฟ้า.....	24
3.1 แผนผังสรุปขั้นตอนการวิจัย.....	37
4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ของกุ้งขาวแปซิฟิก <i>L. vannamei</i>	41
4.2 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างโปรตีน LvHcB กับฮีโมไซยานินอื่น (LvHcL1 LvHcS PleHc1 และ PleHc2) และโปรตีนฟีนอลออกซิเดส (LvproPO1 LvproPO2 และ LvproPO3).....	43
4.3 การแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcS LvHcL และ LvHcB ในเม็ดเลือด (hemocytes; HC) และตับ (hepatopancreas; HP).....	45

4.4 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน LvHcB ในเนื้อเยื่อตับของกุ้งที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน LvHcB แบบจำเพาะ โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR.....	49
4.5 ระดับการแสดงออกของยีน (A) LvHcS (B) LvHcL (C) LvproPO1 (D) LvproPO2 และ (E) LvproPO3 ในเนื้อเยื่อตับและเม็ดเลือดของกุ้งที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน LvHcB แบบจำเพาะ.....	52
4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดของกุ้งกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย LvHcB dsRNA และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย GFP dsRNA	54
4.7 การเกิดเมลานินซิสของกุ้งขาวแปซิฟิกวันที่ 0 (A-C) และวันที่ 7 (D-F) หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C A และ D คือกลุ่มการทดลองที่ได้รับ LvHcB dsRNA รูป B และ E ได้รับ GFP dsRNA และ รูป C และ F คือกลุ่มที่ถูกแช่ใน 2% SMS	58
4.8 ค่าความต่างสี (ΔE) บริเวณหัว (cephalothorax) ของกุ้งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	59
4.9 ค่าความต่างสี (ΔE) บริเวณตัว (abdomen) ของกุ้งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	60
ก 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร.....	78
ข 1 แสดงลำดับกรดนิวคลีอิกที่สมบูรณ์ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB (XM_027380856.1) 2693 คู่เบส.....	79

บทที่ 1

บทนำ

จุดสีดำหรือเมลานোসิส (melanosis) บนตัวกุ้งเป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตกุ้ง เนื่องจากจุดสีดำเหล่านี้เป็นลักษณะอันไม่พึงประสงค์โดยผู้บริโภค ทำให้คุณค่าทางเศรษฐกิจของกุ้งลดลง เมลานোসิสเกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ประเภทไทโรซิเนส (tyrosinase) ชนิดหนึ่ง คือ ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase ; PO) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นหลังจากการเก็บเกี่ยวกุ้ง เพื่อยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาเกษตรกรผู้ผลิตจึงมักใช้สารเคมีเป็นวิธีหลักแต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีทำได้อย่างจำกัดเนื่องจากถูกบังคับด้วยข้อกำหนดต่าง ๆ เพื่อความปลอดภัยของอาหาร ดังนั้น การค้นหาเอนไซม์ที่เป็นตัวการให้เกิดเมลานোসิสในกุ้งจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้การใช้สารมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ฮีโมไซยานิน เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ขนส่งออกซิเจนในระบบไหลเวียน (circulatory system) ของ อาร์โทรพอดและมอลลัสก์ แต่นอกจากหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนแล้ว ฮีโมไซยานินยังมีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน หนึ่งในบทบาทที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของฮีโมไซยานิน คือ กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ซึ่งคุณสมบัตินี้ของฮีโมไซยานินทำให้ฮีโมไซยานินสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดจุดดำ (melanization) ในกุ้งขาวแปซิฟิกได้ และฮีโมไซยานินสามารถเร่งการเกิดจุดดำได้เป็นเวลานานหลังจากการแช่แข็งกุ้งขาว (García-Carreño, Cota, และ Navarrete del Toro, 2008) แต่การศึกษาการทำงานของยีน ฮีโมไซยานินที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานোসิสยังมีอยู่จำกัดและยังต้องการการค้นคว้าอยู่อีกมาก

เป้าหมายของงานวิจัยชิ้นนี้ คือ ศึกษาลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานোসิสในกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค อาร์เอ็นเอ อินเทอร์เฟอเรนซ์ (RNA interference ; RNAi) เพื่อลดการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน HcB ในการทดลองได้ใช้ อาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA ; dsRNA) เพื่อลดการแสดงออกของยีน จากนั้นใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน ต่อมานำกุ้งที่ถูกลดการแสดงออกของยีนมาตรวจวัดระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และ การเกิดเมลานোসิส ผลจากการทดลองนี้คาดว่าจะทำให้ทราบหน้าที่ของยีนฮีโมไซยานิน HcB ต่อกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส และสาเหตุของการเกิดเมลานোসิสในกุ้งชัดเจนมากขึ้น นำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารทะเลที่ยั่งยืน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาลักษณะสมบัติของยีนฮีโมไซยานิน HcB ในกุ้งขาวแฉะฟิวก (*Litopenaeus vannamei*)
2. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน HcB
3. ศึกษาหน้าที่ของยีนฮีโมไซยานิน HcB โดยใช้เทคนิค RNA interference
4. ศึกษาผลของการลดการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน HcB ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และการเกิดเมลานิน



บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กุ้งขาวแปปิฟิก (*Litopenaeus vannamei*)

2.1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งขาวแปปิฟิก

Litopenaeus vannamei มีชื่อเรียกสามัญว่า Whiteleg shrimp หรือเรียกในภาษาไทยว่า กุ้งขาวแปปิฟิก ซึ่งเป็นสมาชิกของไฟลัม Arthropoda สิ่งมีชีวิตในไฟลัมนี้มีลักษณะลำตัวและขาเป็นข้อปล้อง มี โครงร่างแข็งภายนอกเป็นไคติน (chitin) (Bailey-Brock และ Moss, 1992) และมีการลอกคราบ (molting) เพื่อการเจริญเติบโต กุ้งขาวแปปิฟิกได้รับการจัดหมวดหมู่ให้เป็นสมาชิกของ ชั้นไฟลัม Crustacea ที่มีจำนวนสปีชีส์มากถึง 45,000 สปีชีส์ (Green และ Gordon, 2018) อยู่ในคลาส Malacostraca อันเป็นคลาสที่ใหญ่ที่สุดในชั้นไฟลัม Crustacea โดยสัตว์ทะเลที่เป็นอาหารของมนุษย์ส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในคลาสนี้ (Thorp และ Rogers, 2011) และกุ้งขาวแปปิฟิกได้รับการจัดให้อยู่ในออร์เดอร์ Decapoda ตระกูล Penaeidae โดยมีการจัดอนุกรมวิธานของ กุ้งขาวแปปิฟิกโดยละเอียดตามด้านล่าง ดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Metazoa

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

Class: Malacostraca

Subclass: Eumalacostraca

Order: Decapoda

Suborder: Dendrobranchiata

Superfamily: Penaeoidea

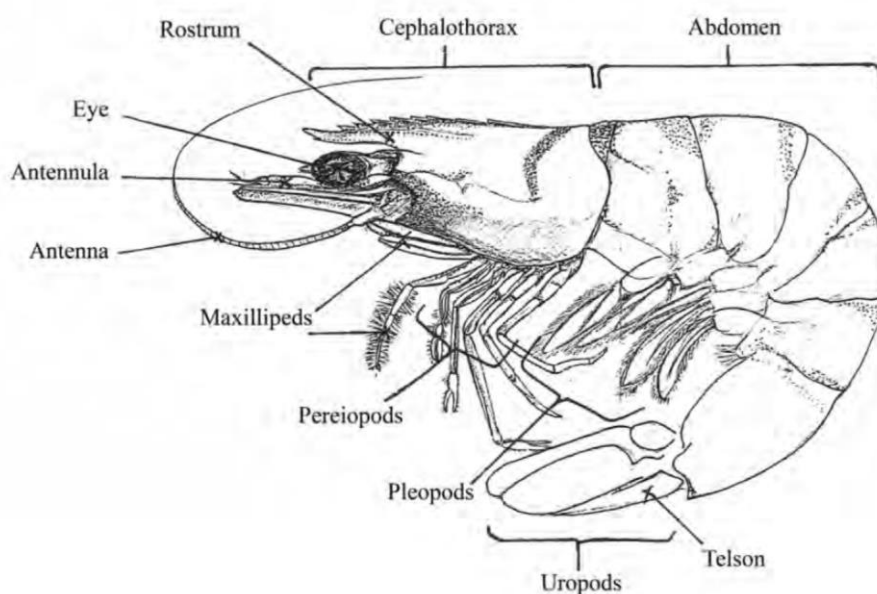
Family: Penaeidae

Genus: *Litopenaeus*

Species: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กุ้งในตระกูล Penaeidae มีลำตัวยาวและแบนด้านข้าง มีตัวและขาสีขาว ร่างกายมีลักษณะเป็น ข้อปล้อง แต่ละข้อปล้อง เรียกว่า somite บริเวณส่วนที่เรียกว่า cephalothorax มาจากการรวมกันของหัวที่มี 5 somite และ อก (thorax) 8 somites ซึ่ง cephalothorax นี้จะมี carapace มาปกคลุม (รูปที่ 2.1) กุ้งในตระกูลนี้จะมีกรี (rostrum) ที่ยาวออกมา ในกุ้งขาวจะมี ฟันกรืออยู่ด้านบน 8-9 อัน ด้านล่าง 1-3 อัน (Bailey-Brock และ Moss, 1992) นอกจากนี้ ส่วนหัวของกุ้งตระกูล Penaeidae ประกอบด้วยรยางค์คู่ของ antennules antennae mandibles maxillules และ maxillae ส่วน thorax ประกอบด้วย maxillipeds 3 คู่ ขาเดิน (pereopods) 5 คู่ โดย pereopods 3 คู่แรกมี chela ใช้เพื่อจับกินอาหารอยู่ที่ปลายรยางค์ ในขณะที่ 2 คู่หลัง ไม่มี chela ส่วนลำตัว (abdomen) ประกอบด้วย 6 somite โดยใน 5 somite แรก มีขา 5 คู่ใช้ว่ายน้ำไปด้านหลัง ขาคู่สุดท้ายคือ uropod ใน somite ที่ 6 ใช้ว่ายน้ำไปด้านหลังอย่างรวดเร็ว โดยใน somite ที่ 6 นี้มีช่องเปิดเป็นทวารหนักอยู่ด้านล่างลำตัว (Dall และคณะ, 1990) กุ้งขาวแปซิฟิกเติบโตเต็มที่พร้อมผสมพันธุ์เมื่อมีอายุ 6-7 เดือน (รูปที่ 2.2) ซึ่งตัวเมียจะมีน้ำหนักประมาณ 28 กรัมหนักกว่ากุ้งตัวผู้ที่มีน้ำหนักประมาณ 20 กรัม (FAO, 2006)



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของกุ้งในตระกูล Penaeidae

ที่มา : Corteel และคณะ (2013)



รูปที่ 2.2 แม่พันธุ์กุ้งขาวแปซิฟิก

ที่มา : FAO (2006)

2.1.3 ถิ่นที่อยู่อาศัยเดิม

กุ้งขาวแปซิฟิกมีต้นกำเนิดในมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก บริเวณชายฝั่งของเมืองทุม (Tumbes) ประเทศเปรู (Peru) ครอบคลุมพื้นที่จนถึงเมืองโซโนรา (Sonora) ประเทศเม็กซิโก (Mexico) (Pérez Farfante และ Kensley, 1997) สภาพแวดล้อมตามธรรมชาติโดยทั่วไปที่กุ้งขาวสามารถเติบโตได้เป็นบริเวณที่น้ำมีอุณหภูมิมากกว่า 20 °C ตลอดปี (FAO, 2006) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตจะแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงอายุ สำหรับกุ้งขนาดเล็กประมาณ 1 กรัม อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 23-30 °C ในขณะที่กุ้งขนาด 12-18 กรัม อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 °C (Briggs และคณะ, 2004) กุ้งขาวแปซิฟิกยังสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มระดับต่าง ๆ ในช่วงกว้าง 0.5-45 ppt แต่ความเค็มที่เหมาะสมคือ 7-34 ppt (Wyban และ Sweeney, 1991) ซึ่งการที่กุ้งขาวสามารถอยู่ในน้ำที่มีความเค็มและอุณหภูมิได้หลายระดับทำให้กุ้งขาวแปซิฟิกกลายเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงในดินแดนแถบอื่นได้

2.1.4 การเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกในประเทศไทย

กุ้งขาวแปซิฟิกได้ถูกนำเข้ามาเพื่อทดลองเลี้ยงในเอเชียเป็นครั้งแรกในช่วงปี พ.ศ. 2521-2522 ต่อมาได้หวนได้นำเข้ากุ้งขาวเชิงพาณิชย์ในปี พ.ศ. 2539 จากนั้นไม่นาน ประเทศอื่น ๆ ในเอเชีย เช่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย เวียดนาม ไทย มาเลเซีย และ อินเดียจึงได้เริ่มนำเข้ากุ้งขาวในช่วงปี พ.ศ. 2543-2544 สาเหตุหลักที่ทำให้ประเทศเหล่านี้นำเข้ากุ้งขาวแปซิฟิก เนื่องมาจากปัญหาการเติบโตช้าและความอ่อนแอต่อโรคของกุ้งสายพันธุ์เดิม ได้แก่ *P. chinensis* ในจีน และ *P. monodon* ในประเทศอื่นของเอเชีย (Briggs และคณะ, 2004)

ในประเทศไทย ได้เริ่มนำกุ้งขาวเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ต่อมาในปี พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ปลอดเชื้อเข้ามาเลี้ยง (Specific Pathogen Free; SPF) ในปีถัดมา พ.ศ. 2546 กุ้งกุลาดำในประเทศไทยได้ประสบปัญหาที่มีขนาดเล็ก มีน้ำหนักเพียง 3-5 กรัม (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์กรมหาชน), n.d.) และราคากุ้งตกต่ำ ทำให้เกษตรกรขาดทุนจำนวนมาก ประกอบกับเกษตรกรบางกลุ่มได้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงกุ้งขาว ทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกกันมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ในปี พ.ศ. 2555 กุ้งขาวแปซิฟิกประสบปัญหาการระบาดของโรคต้ววยเฉียบพลัน (Early Mortality Syndrome; EMS) ทำให้ในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยมีน้ำหนักผลผลิตกุ้งรวมลดลงจากปี พ.ศ. 2555 มากถึงร้อยละ 46.62 และมูลค่าลดลงร้อยละ 23.22 (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2015) ซึ่งสถานการณ์การเลี้ยงกุ้งปัจจุบันในประเทศไทยกำลังดีขึ้นเรื่อย ๆ อันเป็นผลมาจากความร่วมมือระหว่างเกษตรกรผู้ผลิตและกรมประมง (กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2020)

การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมี 2 ประเภท คือ การเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาและแบบพัฒนา การเลี้ยงประเภทกึ่งพัฒนาใช้บ่อเลี้ยงที่มีขนาดโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 10 - 25 ไร่ มีการใช้เครื่องเติมอากาศ และปล่อยกุ้งในบ่อในอัตราเบาบาง อีกประเภท คือ การเลี้ยงแบบพัฒนา เป็นการเลี้ยงกุ้งที่มีการจัดการที่ดี มีการควบคุมอุณหภูมิ โรค มีระบบการถ่ายเทน้ำและให้ออกซิเจน การเลี้ยงประเภทนี้ใช้พื้นที่ 1-10 ไร่ ปล่อยกุ้งลงบ่อในอัตราหนาแน่นและให้อาหารวันละ 3-5 มื้อ ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีจำนวนฟาร์มเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนา (semi-intensive) 2,958 ฟาร์ม และแบบพัฒนา (intensive) 19,553 ฟาร์ม (กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2020)

2.1.5 สถิติผลผลิตและมูลค่าการเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย

ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยผลิตกุ้งทะเล 374,374 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปี 2560 ร้อยละ 4.08 และมูลค่า 60,976 ล้านบาท ลดลงจากปีที่แล้วร้อยละ 1.41 เฉพาะกุ้งขาวแปซิฟิก ปี พ.ศ.2561 มีผลผลิตอยู่ที่ 357,933 ตัน หรือร้อยละ 95.61 ของผลผลิตกุ้งทะเลทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าประมาณ 56,978 ล้านบาท หรือร้อยละ 93.44 ของมูลค่ากุ้งทะเลทั้งหมดในประเทศไทย (กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2020) แม้ประเทศไทยจะยังไม่สามารถผลิตกุ้งทะเลได้เท่าปี พ.ศ. 2554 ซึ่งเป็นปีที่ไทยผลิตกุ้งทะเลได้มากที่สุด

ระยะเวลา 10 ปีก็ตาม แต่ข้อมูลจาก FAO (2020) ระบุว่าปี 2561 ประเทศไทยผลิตกุ้งขาวติดอันดับ 6 ของโลก

ตารางที่ 2.1 ปริมาณและมูลค่าผลผลิตกุ้งขาวแปซิฟิกตั้งแต่ พ.ศ. 2552-2561

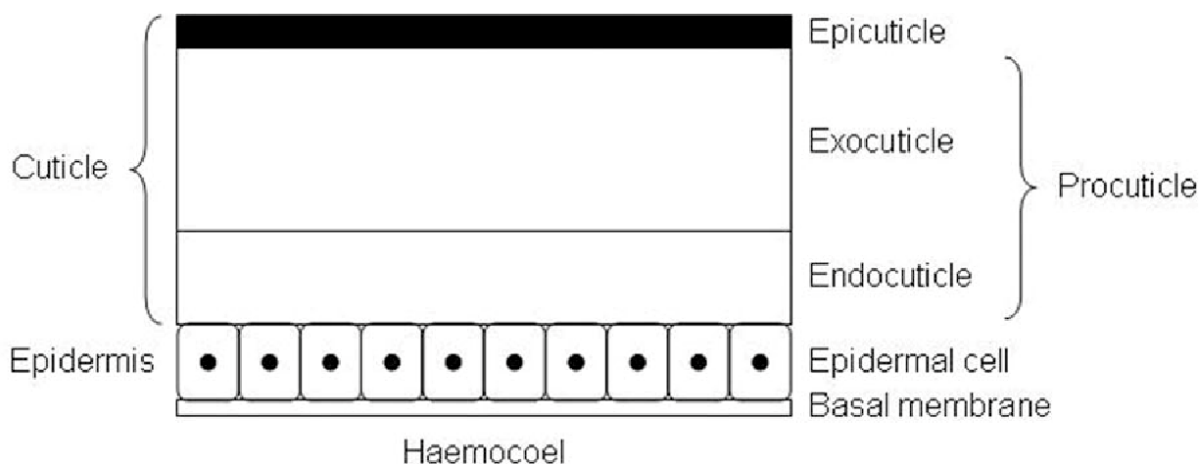
ปี	ปริมาณ ผลผลิตกุ้ง ทะเลรวม (ตัน)	มูลค่าผลผลิต กุ้งทะเลรวม (ล้านบาท)	ปริมาณ ผลผลิตกุ้งขาว แปซิฟิก (ตัน)	มูลค่าผลผลิต กุ้งขาวแปซิฟิก (ล้านบาท)	ปริมาณ ผลผลิตกุ้ง ทะเลอื่นๆ (ตัน)	มูลค่าผลผลิต กุ้งทะเลอื่น ๆ (ล้านบาท)
2552	575,097.99	61,259.39	571,188.58	60,646.80	3,909.402	612.599
2553	559,644.35	59,910.32	553,899.05	59,086.01	5,745.301	824.302
2554	611,194.18	76,351.09	603,226.72	75,059.11	7,967.458	1,291.981
2555	609,552.33	76,793.48	588,369.91	72,789.13	21,182.413	4,004.35
2556	325,395.00	58,963.75	310,705.19	55,781.87	14,689.806	3,181.883
2557	279,907.00	52,317.53	263,245.00	48,511.10	16,662	3,806.427
2558	294,740.00	47,171.71	281,918.00	44,260.62	12,822	2,911.086
2559	334,434.00	55,869.90	321,542.00	52,858.68	12,892	3,011.226
2560	359,697.00	61,850.65	346,309.00	58,627.37	13,388	3,223.272
2561	374,374.00	60,976.33	357,933.00	56,978.03	16,441	3,998.306

ที่มา: กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2020

2.2 เมลาโนซิส (melanosis)

เมลาโนซิส หรือ จุดดำ เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ชื่อ ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของสารกลุ่มฟีนอล (phenols) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารกลุ่มควิโนน และตามด้วยการเกิด polymerization ระหว่างควิโนน ฟีนอล และกรดอะมิโน ได้ผลิตภัณฑ์ต่อมาเป็นโมเลกุลสีน้ำตาล เรียกว่า เมลานิน (melanin) ซึ่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่เกิดขึ้นภายหลังนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยา เมลานินที่ถูกสร้างขึ้นในลำดับสุดท้ายของปฏิกิริยานี้ เป็นเม็ดสีที่มีลักษณะเป็น heterogeneous polymer และเป็นเม็ดสีที่ปรากฏทั่วไปในสิ่งมีชีวิตแทบทุกอาณาจักร (kingdom) และมีความหลากหลายทั้งในด้านโครงสร้าง แหล่งกำเนิด องค์ประกอบ ขนาด รวมทั้งหน้าที่ที่ต่างกันออกไปในแต่ละชนิดสิ่งมีชีวิต เมลานินที่พบในสัตว์ส่วนใหญ่คือ eumelanin มีสีดำน้ำตาล และ pheomelanin มีสีส้มแดง เมลานินทั้งสองชนิดมาจากการไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของ *L*-tyrosine (Solano, 2014) ในสิ่งมีชีวิต เมลานินมีหน้าที่ที่หลากหลาย เมลานินมีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์ (Söderhäll และ Ajaxon, 1982; Ourth และ Renis, 1993) และเมลานินยังทำให้เกิดการ encapsulate ปรสิตที่เข้ามาในร่างกายของ host ได้ (Kumar และคณะ, 2003) รวมทั้งปิดบาดแผลบน cuticle ด้วย melanin plug (Plaiستow และคณะ, 2003) ในไฟลัมอาร์โทรพอด เมลานินช่วยให้ cuticle แข็งแรงมากขึ้นและทำให้ปกป้องตัวเองจากอันตรายตามธรรมชาติ เช่น ปรสิต ได้ (St. Leger, Cooper, และ Charnley, 1988; Hajek และ St. Leger, 1994) การแข็งตัวของเปลือกของอาร์โทรพอดอาศัยการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่อยู่ใต้ชั้น epicuticle (รูปที่ 2.3) เอนไซม์จะทำหน้าที่เร่งการสังเคราะห์ quinone และนำไปสู่การสะสมของเมลานินในชั้น exocuticle (รูปที่ 2.3) และทำให้เกิด sclerotization ซึ่งเป็นการ cross-link กันระหว่างเมลานิน โปรตีน และไคติน เปลือกของอาร์โทรพอดจึงแข็งแรงขึ้น (Sugumaran, 1998) และนอกจากนี้ สิ่งมีชีวิตในกลุ่มครัสเตเชียนยังอาศัยการสะสมแคลเซียมในเปลือกชั้น exo- และ endocuticle (รูปที่ 2.3) ทำให้เปลือกของอาร์โทรพอดทนทานต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (Andersen, Peter, และ Roepstorff 1996; Andersen, 2010; Terwilliger, 1999) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่มีการทำงานอยู่ที่เปลือกของอาร์โทรพอดมาจากการสังเคราะห์ภายในเซลล์ฮีโมไซโตโดยถูกขนส่งมาที่ cuticle ผ่านชั้น epidermis (รูปที่ 2.3) ในรูปของ zymogen เรียกว่าโพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) (Ashida และ Brey, 1995) ซึ่งต่อมาได้พบว่านอกจากฟีนอลออกซิเดสแล้วฮีโมไซยานินก็มีการสะสมอยู่ที่เปลือกของครัสเตเชียน

เช่นเดียวกัน (Adachi และคณะ, 2005) โดยบริเวณที่มักพบเมลาโนซิส คือ เซฟาโลทอแรกซ์ (cephalothorax) และข้อต่อต่าง ๆ บนตัวกุ้ง (Ogawa และคณะ, 1984)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างชั้น cuticle ของ arthropods

ที่มา: Moret และ Moreau (2012)

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเมลาโนซิส

เมลาโนซิสแม้ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคแต่สื่อถึงกุ้งที่มีคุณภาพต่ำทั้งในด้านรูปลักษณ์ภายนอก รวมถึงความสดใหม่ของผลผลิต มีอายุเก็บรักษาสัปดาห์ และไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทำให้คุณค่าทางเศรษฐกิจของกุ้งลดลง การเกิดเมลาโนซิสมีปัจจัยมากมายเข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งในด้านสายพันธุ์ รวมถึงช่วงการลอกคราบ (molting cycle) ของครัสเตเชียน นอกจากนี้ เมลาโนซิสอาจเป็นผลมาจากการจัดการกุ้งในระหว่างและหลังการเก็บเกี่ยวกุ้งที่ไม่ดี ทำให้มีจุดดำมากขึ้น (Bartolo และ Birk, 1998) เมลาโนซิสสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วภายใน 2-3 ชั่วโมงหลังการเก็บเกี่ยวและสัมผัสกับออกซิเจน (Gokoglu และ Yerlikaya, 2008) ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเกิดเมลาโนซิส ได้แก่

สายพันธุ์ เพศ

ระดับความรุนแรงของการเกิดเมลาโนซิสมีความแตกต่างกันในครัสเตเชียนแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น ปริมาณสารตั้งต้นในปฏิกิริยา ปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หรือระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งได้มีงานวิจัยพบว่า pink shrimp (*Penaeus duorarum*) ที่มีการเกิดเมลาโนซิสอย่างรวดเร็วมี PO activity สูงกว่ากุ้งขาวแปซิฟิก (Montero, Ávalos, และ Pérez-Mateos, 2001; Simpson, Marshall, และ Otwell, 1987) และงานวิจัยอีกชิ้นระบุว่าบริเวณหาง

ของ South african lobster (*Palinurus gilchristi*) มีเมลานินน้อยกว่า Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) เนื่องจากมีความเข้มข้นของกรดอะมิโนไทโรซีนที่เป็นสารตั้งต้นของเมลานินต่ำกว่า (Koburger, Miller, และ Otwell, 1985) นอกจากนี้ปัจจัยด้านสายพันธุ์แล้ว เพศของ ครัสเตเชียนก็มีความเกี่ยวข้องด้วยเช่นกัน เช่น fairy shrimp (*Streptocephalus dichotomus*) เพศผู้มี PO activity เพียงหนึ่งในสามของเพศเมียเท่านั้น (Plaiستow และคณะ, 2003) ในขณะที่ rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*) เพศผู้พบว่ามี PO activity เป็นสองเท่าของเพศเมีย (Bono และคณะ, 2010)

การลอกคราบ (molting cycle)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีความเกี่ยวข้องกับการลอกคราบของอาโทรพอด เนื่องจากในการทำให้เปลือกของอาโทรพอดแข็งขึ้น (sclerotization) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจำเป็นต้องเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารกลุ่มฟีนอลเพื่อเพิ่มสารตั้งต้นที่เป็นส่วนหนึ่งของ sclerotization ดังนั้น ครัสเตเชียนในระยะ premolt จึงมีเอนไซม์ในเลือดสูงขึ้น (Summers, 1967) มีการสะสมและสังเคราะห์สารตั้งต้นของเมลานินเพิ่มมากขึ้น และ PO activity เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน (Cobb, 1977) ซึ่งงานวิจัยเหล่านี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferrer และคณะ (1989) ที่พบว่า cuticle ของ lobster *P. argus* ในระยะ late premolt มีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในปริมาณสูง และมีปริมาณต่ำลงในระยะ intermolt และ early premolt และงานวิจัยของ Ogawa และคณะ (1983) ได้พบว่า ในระยะ late premolt ของ *P. laevicauda* มีการเกิดเมลานินมากที่สุด ต่อมาในปี 1994 Ali และคณะ พบว่าเมื่อนำหางของ *P. argus* ที่อยู่ในระยะ intermolt มาเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 12 วัน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ PO activity ในชั้น cuticle แต่ *P. argus* ที่อยู่ในระยะ late premolt มี PO activity ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการเก็บรักษาในน้ำแข็ง 12 วัน อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปในขณะที่กุ้งลอกคราบและหลังลอกคราบใหม่ ๆ เกษตรกรจะพยายามหลีกเลี่ยงการจับกุ้งเนื่องจากกุ้งมีเปลือกนิ่มทำให้มีมูลค่าต่ำ (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2013)

การเก็บเกี่ยวผลผลิต

จากงานวิจัยของ Bartolo และ Birk (1998) รายงานว่าการจับครัสเตเชียนที่รุนแรงทำให้ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) เกิดความเสียหาย เช่น ก้ามหลุด และมีผลให้เกิดเมลานินสีเพิ่มขึ้นหลังจากนำ lobster มาแช่เย็นในน้ำแข็ง ในปี 1983 Ogawa และคณะพบว่า

การสร้างบาดแผลใน *P. japonicus* ขณะมีชีวิตทำให้เกิดเมลานินสีบริเวณบาดแผลภายในหนึ่งวัน หลังการแช่เย็น และหากบาดแผลนั้นมีขนาดใหญ่การเกิดเมลานินสีหลังการแช่เย็นในน้ำแข็งก็จะมีมากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งทำให้ คาดว่าออกซิเจนและความเครียดเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดเมลานินสี

2.2.2 การควบคุมเมลานินสี

การควบคุมเมลานินสีและการป้องกันการเน่าเสียมักใช้วิธีการแช่กุ้งให้เย็นทันทีหลังนำกุ้งออกจากบ่อเลี้ยง (Martínez-Alvarezและคณะ, 2007) แต่การใช้ความเย็นทำได้เพียงชะลอการเกิดเมลานินสี เท่านั้น ดังนั้น เกษตรกรจึงจำเป็นต้องใช้สารเคมีร่วมด้วย ซึ่งการใช้สารเคมีต้องใช้ในปริมาณจำกัดภายใต้การควบคุมของกฎหมาย การป้องกันการเกิดเมลานินสีจำเป็นต้องควบคุมตัวแปรในสภาวะการเก็บรักษา เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อุณหภูมิ และสารเคมียับยั้งฟีนอลออกซิเดส (Nirmal และ Benjakul, 2012) สารเคมีที่ใช้เพื่อควบคุมเมลานินสีอย่างแพร่หลายคือ โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (sodium metabisulphite ; SMS) วิธีการโดยทั่วไปคือ หลังจากรับนำกุ้งออกจากบ่อเลี้ยงให้แช่กุ้งในซัลไฟต์และสารต้านเมลานินสีอื่นทันทีเพื่อยับยั้งการทำงานของฟีนอลออกซิเดสอย่างรวดเร็ว (Carmen และคณะ, 2005; Martínez-Alvarez, Montero และ Gómez-Guillén, 2005) แต่สารเคมีไม่สามารถหยุดเมลานินสีได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง (Gonçalves และ de Oliveira, 2016) องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration: FDA) ได้ประกาศปริมาณซัลไฟต์ให้มีในเนื้อกุ้งได้ไม่เกิน 100 ppm เช่นเดียวกับประกาศกระทรวงสาธารณสุขได้ระบุไว้ในปี พ.ศ. 2527 ความว่า เนื้อกุ้งดิบมีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) ได้ไม่เกิน 100 ppm และในเนื้อกุ้งสุกไม่เกิน 30 ppm โดยปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้มาจากการคำนวณปริมาณสารกลุ่มซัลไฟต์ด้วยตัวแปร (factor) ที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนด สารกลุ่มซัลไฟต์ที่ต้องนำมาคำนวณ ได้แก่ sulfur dioxide, sodium sulfite, sodium hydrogen sulfite, sodium metabisulfite, potassium sulfite, potassium metabisulfite และ sodium thiosulfate (กระทรวงสาธารณสุข, 2018) ซึ่งจากงานวิจัยของ Otwell และ Marshall (1986) รายงานว่า การแช่กุ้ง *P. duorarum* หรือ pink shrimp ในโซเดียมไบซัลไฟต์ 1.25% เป็นเวลา 1 นาทีนั้น สามารถชะลอการเกิดเมลานินสีได้ โดยในวันที่ 12 ของการเก็บรักษาพบเมลานินสีบนตัวกุ้งเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่การใช้ 2.5% โซเดียมไบซัลไฟต์ไม่พบเมลานินสีบนตัวกุ้งเลยในวันที่ 12 ของการเก็บรักษา ซึ่งจากงานของ Andrade และคณะ (2015) ได้กล่าวถึงการแช่กุ้งขาวแปซิฟิกใน SMS เข้มข้น 1 2 3 และ 4% พบว่ากุ้งขาวที่แช่ใน 1 และ 2% SMS มีปริมาณ SO₂ ในกล้ามเนื้อไม่ถึง 100 ppm และในปี 2002 Rotllant และ

คณะ ได้ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์และการแช่แข็งที่มีต่อการเกิดเมลานินในกุ้ง *Aristeus antennatus* หรือ rose shrimp พบว่าการแช่กุ้งในโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์เข้มข้น 2.4% ทำให้มี SO₂ ตกค้างในกล้ามเนื้อกุ้ง 77-78 ppm ซึ่งไม่พบความแตกต่างของ SO₂ ในกล้ามเนื้อเมื่อแช่กุ้งใน SMS ที่ 5 นาที และ 10 นาที ซึ่งปริมาณ SO₂ เป็นไปตามประกาศของ FDA และกระทรวงสาธารณสุขของไทย อย่างไรก็ตาม นอกจากนี้ Marshall และ Otwell (1986) ได้ทดสอบวิธีการทำอาหารว่ามีผลต่อปริมาณ SO₂ ในเนื้อกุ้งหรือไม่ Marshall และ Otwell พบว่ากุ้งที่ผ่านการแช่ 1.25% SMS เป็นเวลา 1 นาที เมื่อนำมาปรุงสุกด้วยการย่าง ทอด และต้ม ไม่ทำให้ปริมาณ SO₂ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($\alpha=0.05$) แต่การผัดสามารถลดปริมาณ SO₂ ไปได้ 51% เนื่องจากอุณหภูมิการผัดที่สูงกว่า และพบว่าการล้างกุ้งไม่สามารถลดปริมาณ SO₂ ในเนื้อกุ้งได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ปริมาณ SO₂ ที่ตกค้างในเนื้อกุ้งสุกมีเกินค่ามาตรฐาน 30 ppm หากนำกุ้งดิบที่มีสารกลุ่มซัลไฟต์เจือปนเกินค่ามาตรฐานมาปรุงอาหาร

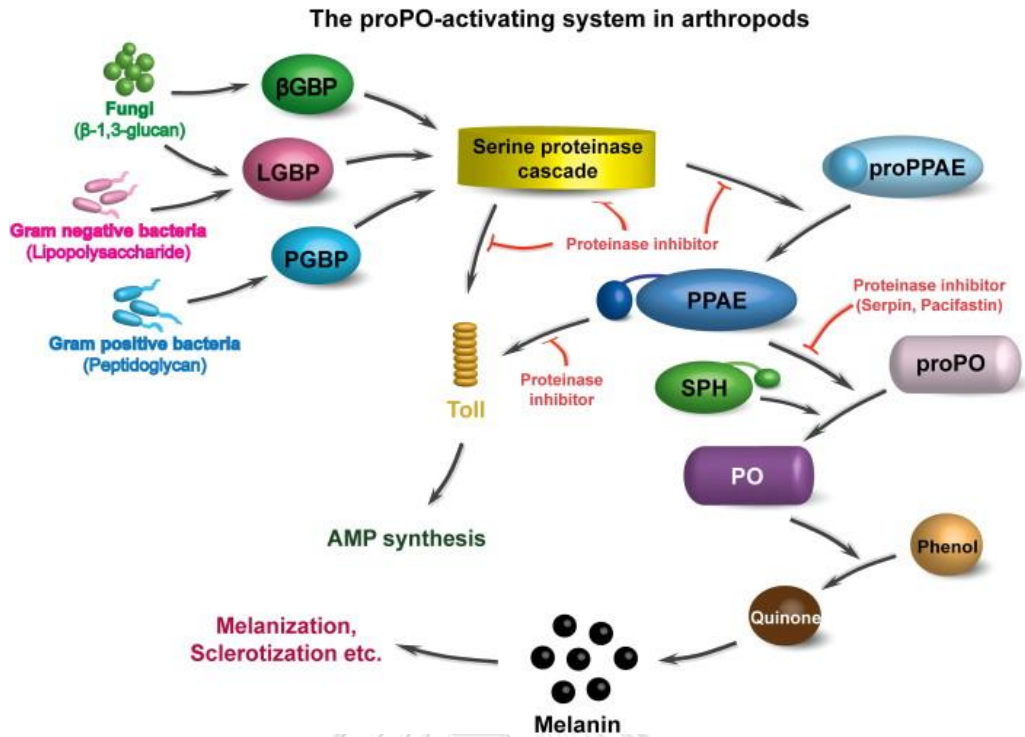
การใช้ซัลไฟต์ผิดวิธีทำให้ประสิทธิภาพของซัลไฟต์ลดลง ตัวอย่างพฤติกรรมการใช้ซัลไฟต์ป้องกันเมลานินในกุ้งอย่างไม่ถูกต้อง ได้แก่ การโรยผงซัลไฟต์บนตัวกุ้ง การใช้กระบอกฉีดน้ำพ่นสารละลาย ซัลไฟต์ลงบนตัวกุ้ง การแช่กุ้งในสารละลายซัลไฟต์ซ้ำหลายครั้ง และการละลายซัลไฟต์เยอะเกินไป การใช้สารเคมีที่ผิดวิธีนี้ทำให้กุ้งมีสารซัลไฟต์ตกค้างเกินค่าที่กำหนด และทำให้ซัลไฟต์กระจายไม่ทั่วถึงและไม่สม่ำเสมอ เมื่อมีซัลไฟต์บนตัวกุ้งเยอะเกินไปอาจทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) ซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิตหากอยู่ในพื้นที่จำกัดและไม่ถ่ายเท นอกจากนี้กุ้งที่มีซัลไฟต์ตกค้างมากจะมีลักษณะโปร่งแสง บวม ลื่น และยากต่อการทำอาหาร (Louisiana Fisheries Forward, 2018)

ข้อเสียของสารเมตาไบซัลไฟต์ คือ การทำให้เกิดภูมิแพ้ อาการแพ้สามารถเกิดได้อย่างรุนแรงหรืออาการหอบที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ (Vally และ Misso, 2012) นอกจากนี้ซัลไฟต์ยังอาจก่อให้เกิดการหายใจลำบาก หรืออาการเขียวคล้ำตามร่างกายจากการขาดออกซิเจน (cyanosis) หรือน้ำท่วมปอด (pulmonary edema) (Atkinson, Sim และ Grant, 1994) นอกจากนี้เมตาไบซัลไฟต์แล้ว สารเคมีอื่นที่ได้รับความนิยมในการควบคุมเมลานิน คือ โฟเฮกซิลเรซอร์ซินอล (4-hexylresorcinol ; 4-HR) เนื่องจากปริมาณขั้นต่ำที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ผลน้อยกว่าเมตาไบซัลไฟต์ เป็นสารที่มีความเสถียรมากกว่า และมีผลกระทบต่อร่างกายของมนุษย์น้อยกว่าเมตาไบซัลไฟต์ แต่ 4-HR มีราคาแพงกว่าและอาจส่งผลที่ไม่ดีต่อประสาทสัมผัส (Haard และ Simpson, 2000)

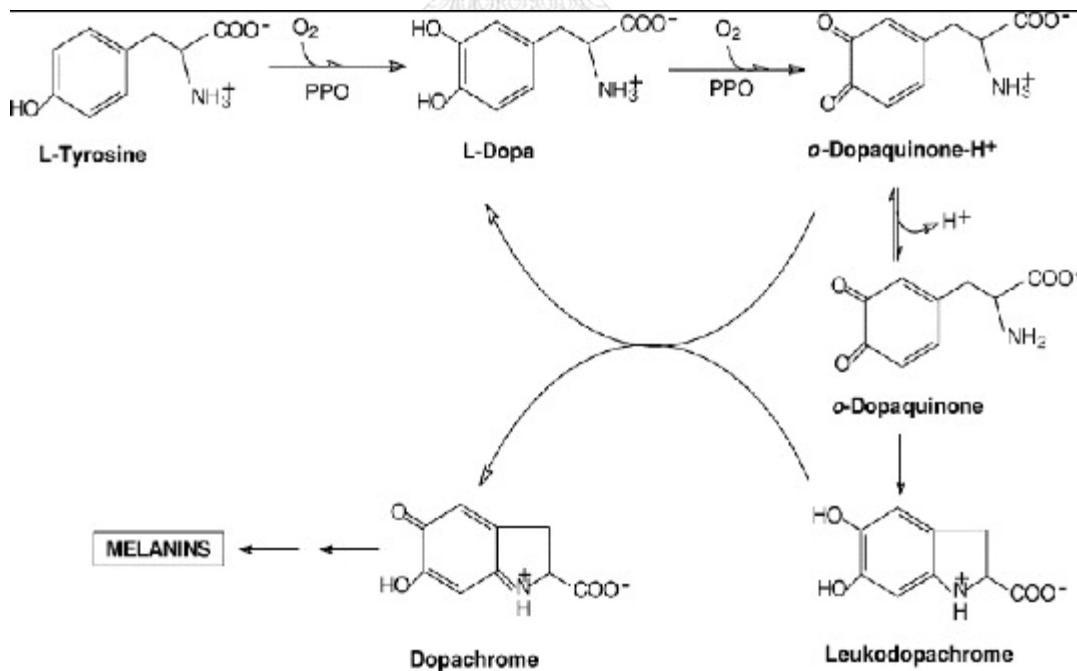
2.3 เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase enzyme: PO)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการเกิดเมลานินซิส และเป็นส่วนหนึ่งของโครงข่ายปฏิกิริยาที่ซับซ้อน เรียกว่า prophenoloxidase-activating system (proPO system) ระบบ proPO เป็นส่วนหนึ่งของกลไกภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดของกุ้ง กลไกของ proPO system จะผลิต intermediate ที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาสูง เช่น สารกลุ่มควิโนน reactive oxygen (ROS) หรือ reactive nitrogen (RON) ซึ่ง intermediate เหล่านี้มีคุณสมบัติที่เป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์แปลกปลอมที่เข้ามาภายในช่องว่างลำตัวของ host การทำงานของ proPO system จะเริ่มต้นเมื่อ host ได้รับการกระตุ้นด้วยเศษชิ้นส่วนของผนังเซลล์จากเซลล์จุลินทรีย์ เช่น ลิพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ของแบคทีเรียแกรมลบ เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) แบคทีเรียแกรมบวก และ บีตาวันทริกลูแคน (β -1,3-glucan) ของสิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดรา เศษชิ้นส่วนของเซลล์จากสิ่งมีชีวิตแปลกปลอมจะถูกตรวจจับด้วย pattern-recognition protein (PRPs) ซึ่งทำให้ serine protease ทำงาน และนำไปสู่การทำงานของ proPO-activating enzyme (PPAE) ที่มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของโพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) ให้กลายเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) (รูปที่ 2.4) เอนไซม์ชนิดนี้เร่งปฏิกิริยาการสร้าง intermediates ที่ทำให้เกิดเมลานินซิส รวมถึงสารประกอบ ควิโนน (quinones) (รูปที่ 2.5) และเอนไซม์นี้ยังมีบทบาทในการฆ่าจุลินทรีย์เชื้อโรค การแข็งตัวของเปลือก และการรักษาบาดแผล (Amparyup, Charoensapsri และ Tassanakajon, 2013) แต่ระบบ proPO นี้จำเป็นต้องมีการควบคุมอย่างดีเพื่อให้สามารถจัดการกับเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยสร้างความเสียหายต่อเซลล์เจ้าบ้านให้น้อยที่สุด เนื่องจาก intermediate บางชนิด เช่น ควิโนน ออกซิเจน และไนโตรเจนซึ่งไวต่อการทำปฏิกิริยา เป็นอันตรายและสามารถทำลายเซลล์ของเจ้าบ้านได้หากผลิตออกมาในปริมาณมากเกินไป ดังนั้น เพื่อควบคุมระบบ proPO ตัวยับยั้งเอนไซม์ (proteinase inhibitors) เรียกว่า melanization-inhibiting protein (MIP) จึงจำเป็นต่อการควบคุมการทำงานของระบบ proPO (Amparyup, Charoensapsri และ Tassanakajon, 2013; Cerenius, Lee และ Söderhäll, 2008; Nappi และ Christensen, 2005)

ในกิ้ง mRNA และโปรตีนของยีน proPO มีการแสดงออกและสังเคราะห์ที่เซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) (Ai และคณะ, 2009; Cerenius และ Soderhall, 2004) เมื่อถอดรหัสเป็นโปรตีน proPO จะยังไม่ทำงานและไม่มีกรดอะมิโนที่เป็น signal peptide เนื่องจาก proPO เป็นเอนไซม์ที่ถูกควบคุมการทำงานอย่างเคร่งครัด และจะถูกเปลี่ยนเป็นฟีนอลออกซิเดสและส่งออกนอกเซลล์เมื่อมีการกระตุ้น proPO system เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สองชนิด ได้แก่ monophenolase (EC 1.14.18.1) และ diphenolase (EC 1.10.3.1) (García-Molina และคณะ, 2005) และเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ ซึ่งฟีนอลออกซิเดสมี active site ที่ประกอบด้วย Cu อยู่สองตำแหน่ง การจับกับออกซิเจนของ Cu ทำให้ ฟีนอลออกซิเดสมีสามสถานะ ได้แก่ oxy-PO met-PO และ deoxy-PO การเร่งปฏิกิริยาของฟีนอลออกซิเดสเริ่มจาก Oxy-PO จับกับสารตั้งต้น monophenol ที่ตำแหน่ง Cu หนึ่งตำแหน่ง จากนั้นจึงเกิด hydroxylation ของ monophenol ด้วยออกซิเจนในหมู่ peroxide ที่จับอยู่กับอะตอม Cu ได้เป็นโครงสร้างที่ฟีนอลออกซิเดส (met-PO) จับอยู่กับ diphenol และจากนั้นเกิด oxidation ต่อจนได้ quinones ฟีนอลออกซิเดส สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ diphenol และได้ผลิตภัณฑ์เป็น quinone เช่นกัน ซึ่งปฏิกิริยา oxidation ในขั้นนี้สามารถเกิดได้รวดเร็วกว่าปฏิกิริยา hydroxylation ในขั้นแรก โดย diphenol สามารถทำปฏิกิริยากับ oxy-PO และ met-PO ได้ เมื่อ diphenol ทำปฏิกิริยากับ met-PO จะทำให้ ฟีนอลออกซิเดสกลับไปอยู่ในสภาพ deoxy-PO (Nirmal และคณะ, 2015; Rodríguez-López และ คณะ, 1992; Solomon, Sundaram และ Machonkin, 1996)



รูปที่ 2.4 กลไก prophenoloxidase activating system ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม arthropods
ที่มา : Amparyup และคณะ (2013)



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเกิดเมลานินซิสเกิดจากเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสออกซิไดส์โมโนฟีนอล (monophenols) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดฟีนอล (diphenol) ซึ่งถูกเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

ออกซิโดสีกครั้งได้ผลิตภัณฑ์เป็นควิโนน (quinone) จากนั้นควิโนนเกิดพอลิเมอไรเซชัน
ได้เป็นพอลิเมอร์ที่มีสีน้ำตาล

ที่มา: Nirmal และคณะ, (2015)

ปัจจุบันมีการค้นพบยีน proPO แล้วในกุ้งสามยีน คือ proPO1 proPO2 และ proPO3 ยีน
proPO1 และ proPO2 มีการแสดงออกในเซลล์ฮีโมไซโตของกุ้งหลายชนิดรวมถึงกุ้งขาวแปซิฟิก (Ai
และคณะ, 2008; Ai และคณะ, 2009; Amparyup, Charoensapsri และ Tassanakajon, 2009;
Masuda และคณะ, 2012) ส่วนยีน proPO3 มีการแสดงออกที่ตับ (hepatopancreas) (Masuda
และคณะ, 2012) ในขณะที่โปรตีนของ proPO3 มีรายงานว่าพบในเลือด (hemolymph) ของ
กุ้งครุมา (*Marsupenaeus japonicus*) อย่างไรก็ตามยีน proPO3 ยังไม่เคยมีรายงานว่าพบใน
กุ้งขาวแปซิฟิก

2.4 ฮีโมไซยานิน (hemocyanin)

ฮีโมไซยานิน เป็นโปรตีนที่จับจำเพาะกับทองแดง มีหน้าที่ขนส่งออกซิเจนในเลือดของ
สิ่งมีชีวิตกลุ่มมอลลัสก์และอาร์โทรพอด (Burmester, 2002) ฮีโมไซยานินยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ
การลอกคราบและการแข็งตัวของเปลือกเช่นเดียวกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและฮีโมไซยานิน
สามารถทำหน้าที่ใน proPO system เมื่อถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ฮีโมไซยานินมี
การแสดงออกของ mRNA ที่ตับ ส่วนโปรตีนฮีโมไซยานินจะถูกส่งไปทำงานในระบบเลือดของกุ้ง
(Sellos, Lemoine และ Van Wormhoudt, 1997)

2.4.1 โครงสร้างของฮีโมไซยานิน

หนึ่งหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินประกอบด้วยสามโดเมน (protein domain) ได้แก่ โดเมน N
(I) โดเมน M (II) และโดเมน C (III) (รูปที่ 2.6) บริเวณโดเมน N ของหน่วยย่อยฮีโมไซยานินมี
โครงสร้างเป็น α -helices จำนวน 5-6 helices ในโดเมน M มีโครงสร้างเป็น 4-alpha helix
bundle และมีอะตอม Cu สองอะตอม เรียกว่า copper-binding site A และ B ซึ่งมีหน้าที่จับกับ
อะตอมของออกซิเจน และ Cu แต่ละอะตอมทำพันธะอยู่กับกรดอะมิโน histidine 3 ตัว ซึ่ง
โครงสร้างนี้เป็นลักษณะที่มีการอนุรักษ์อยู่ในเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดสด้วยเช่นกัน (Decker และ
Jaenicke, 2004; Terwilliger, Ryan, และ Phillips, 2006) ส่วนบริเวณโดเมน C มีโครงสร้างเป็น
 β -barrel ที่ขนานกัน 7 สาย หน่วยย่อยฮีโมไซยานินสามารถรวมตัวกันเป็นโครงสร้าง hexamer

และ/หรือ hexamer ที่ประกอบกันเป็น 2-hexamer 4-hexamer 6-hexamer 8-hexamer (Markl และ Decker, 1992) อะตอม Cu ในสถานะที่เกาะกับออกซิเจน หรือ Cu (II) เป็นสถานะที่ทำให้ฮีโมไซยานินมีสีฟ้า จากงานวิจัยของ Jaenicke และ Decker (2003) กล่าวว่า ฮีโมไซยานินมีประจุลบทั้งนี้เพื่อป้องกันการสร้างปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่นในฮีโมลิมฟ์ ในขณะที่ฟีนอลออกซิเดสมีประจุน้อยมากทำให้การละลายน้ำต่ำและช่วยให้มีอันตรกิริยากับผิวเซลล์ของ pathogen ได้ดี

2.4.2 ชนิดของหน่วยย่อยฮีโมไซยานิน

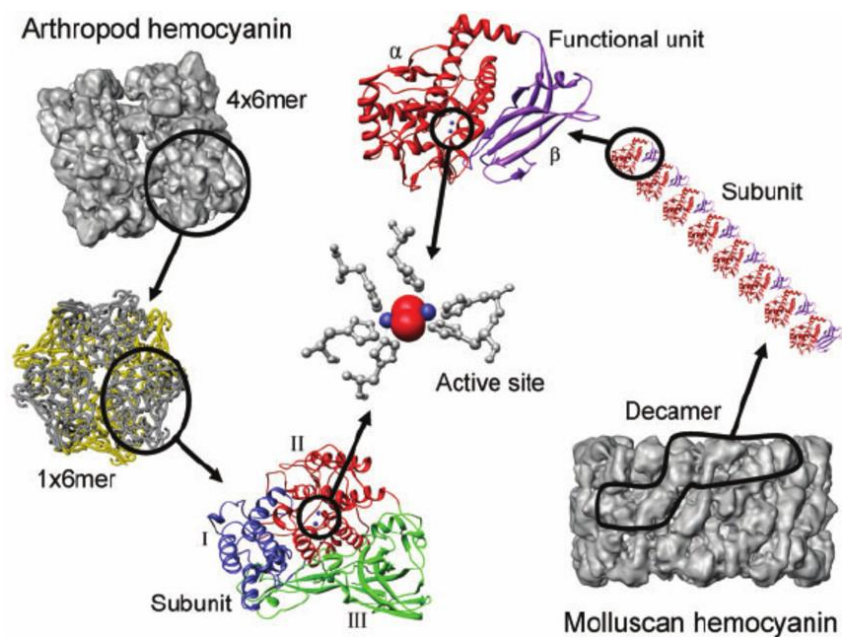
ชนิดของหน่วยย่อยฮีโมไซยานินของสิ่งมีชีวิตในคลาสมาลาคอสตราคา (Class Malacostraca) สามารถแบ่งได้เป็นสามชนิดตามลักษณะทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological class) ได้แก่ ชนิดแอลฟา (α) ชนิดบีตา (β) ชนิดแกมมา (γ) (รูปที่ 2.7) ในเชิงวิวัฒนาการของคลาสมาลาคอสตราคา ฮีโมไซยานินชนิด β เป็นชนิดแรกที่ปรากฏขึ้นมาในช่วง 520 ล้านปีก่อนซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่ซัพไฟลัมยูมาลาคอสตราคา (subphylum Eumalacostraca) แยกกับซัพไฟลัมไฟโลคาริดา (subphylum Phyllocarida) จากนั้นฮีโมไซยานินชนิด α และชนิด γ ได้เกิดขึ้นมาในช่วง 400 ล้านปีก่อน ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่สิ่งมีชีวิตในออร์เดอร์เดคาพอด (Order Decapod) ได้ถือกำเนิดขึ้น (Scherbaum และคณะ, 2010)

2.4.3 การแสดงออกในระดับโปรตีนของฮีโมไซยานิน

โครงสร้างโอลิโกเมอร์ของฮีโมไซยานินในกุ้งขาวประกอบด้วยสองประเภท คือ 2-hexamer และ hexamer โดยฮีโมไซยานินมากถึง 95-99% เป็น hexamer ในขณะที่สัดส่วนฮีโมไซยานินที่เหลือเป็น 2-hexamer นอกจากนี้ การแสดงออกในระดับโปรตีนของฮีโมไซยานินในกุ้งขาว พบว่า หน่วยย่อยฮีโมไซยานิน ขนาดเล็ก (HcS) ชนิด γ ที่มีน้ำหนัก 75 kDa เป็นหน่วยย่อยที่มีปริมาณมากที่สุดในการเลือดของกุ้งขาว ในส่วนของฮีโมไซยานินที่มีโครงสร้างแบบ 2-hexamer มีสัดส่วนของ HcS ต่อหน่วยย่อยฮีโมไซยานิน ขนาดใหญ่ (HcL) คือ 2.05:1 ส่วนฮีโมไซยานินที่มีโครงสร้างแบบ hexamer มีสัดส่วน HcS ต่อ HcL อยู่ที่ 1.04:1 (Wang และคณะ, 2019)

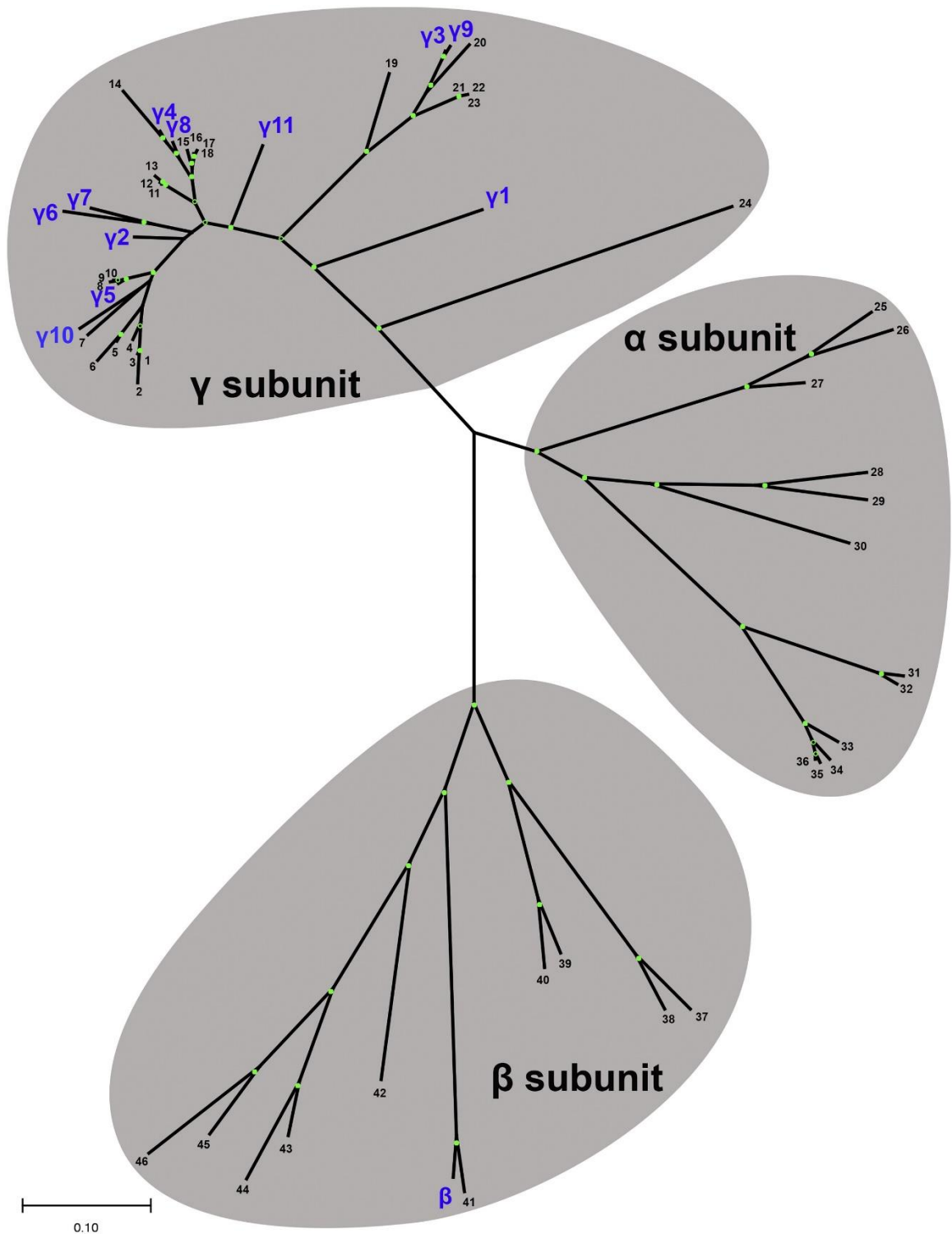
ในปี ค.ศ. 2015 Johnson และคณะ ได้พบฮีโมไซยานินชนิด β เป็นครั้งแรกในกุ้งขาว *L. vannamei* และยังเป็นครั้งแรกในตระกูล Penaeoidea ต่อมาได้พบว่ายีน HcB ในกุ้งขาวได้มีการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วย แต่มีปริมาณโปรตีนน้อยมาก คิดเป็น $0.16\% \pm 0.07\%$ NSAF (normalized spectral abundance factor) ของฮีโมไซยานินที่มีโครงสร้างแบบ hexamer และ

0.02 ± 0.02% NSAF เท่านั้นของกลุ่ที่มีโครงสร้างแบบ 2-hexamer (Wang และคณะ, 2019) และเมื่อไม่นานมานี้ HcB ได้ถูกพบในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ด้วยเช่นกัน ซึ่งลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับ HcB ของกุ้งขาวมากถึง 92.6% (Mendoza-Porras และคณะ, 2020)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของฮีโมไซยานินในอาโทรพอดและมอลลัสก์

ที่มา: Decker และคณะ (2007)



รูปที่ 2.7 แผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ แบบ maximum likelihood phylogeny ของ ฮีโมไจยานินสร้างจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนฮีโมไจยานินจำนวน 58 ยีน แสดง การจัดกลุ่มฮีโมไจยานินตาม immunological class (β α γ) ตัวอักษรสีฟ้าใน แผนภาพแสดงถึงโปรตีนที่ตรวจพบในงานวิจัยของ Mendoza-Porras และคณะ

(2020) และตัวเลขในรูปคือหน่วยย่อยฮีโมไซยานินที่มีรายงานในงานวิจัยอื่น (Johnson และคณะ, 2016) Bootstrap proportion (ได้จากการคำนวณ 1000 ซ้ำการทดลอง) มีค่ามากกว่า 70% แสดงด้วยจุดทึบสีเขียว และหากมีค่าระหว่าง 50% ถึง 70% จะแสดงด้วยวงกลมเปิดสีเขียว ตัวเลขในแผนภาพระบุถึงชนิดสิ่งมีชีวิต ดังนี้ 1–6, 11–13, 15–18, 21–23, 41 ได้แก่ กุ้ง *L. vannamei* หมายเลข 7 และ 19 ได้แก่ กุ้ง *Penaeus japonicus* หมายเลข 8–10 ได้แก่ กุ้ง *P. monodon* หมายเลข 14 ได้แก่ กุ้ง *P. chinensis* หมายเลข 20 ได้แก่ กุ้ง *P. merguensis* หมายเลข 25–27 ได้แก่ กุ้งชนิดอื่น ๆ หมายเลข 24, 28–36, 42 ได้แก่ spiny และ clawed lobsters หมายเลข 37–40 ได้แก่ stomatopods หมายเลข 43–46 ได้แก่ปู

ที่มา: Mendoza-Porras และคณะ (2020)

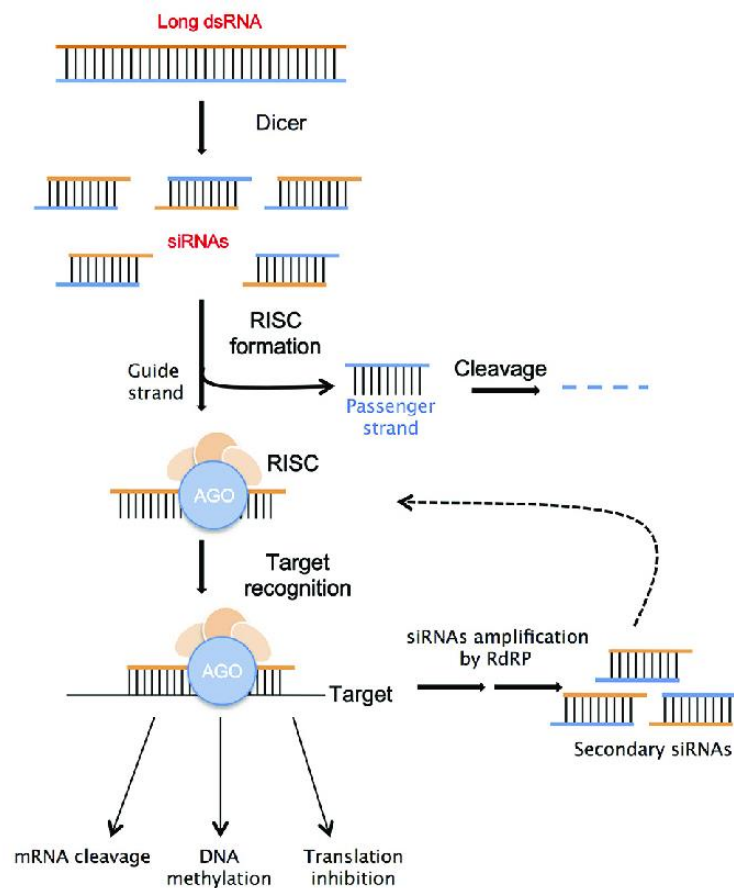
2.4.4 ยีนฮีโมไซยานิน HcB ในสิ่งมีชีวิตอื่น

ฮีโมไซยานินชนิด β มีการพบแล้วในกุ้งตระกูล Penaeoidea ได้แก่ กุ้งขาว *L. vannamei* กุ้งสีน้ำตาล *Farfantepenaeus aztecus* (Johnson และคณะ, 2016) กุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Mendoza-porras และคณะ, 2020) ซึ่งในกุ้งทั้งสามชนิดนี้ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ของ HcB มาก่อน และพบเพียงฮีโมไซยานินชนิด β และ γ เท่านั้น (Johnson และคณะ, 2015) อย่างไรก็ตาม ในออร์เดอร์ Decapoda มีรายงานว่าฮีโมไซยานิน 1 ของ signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* เป็นฮีโมไซยานิน ชนิด β ซึ่งเมื่อสายเพปไทด์ถูกตัดบริเวณฝั่ง C จะได้เพปไทด์ที่เรียกว่า astacidin ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย (Lee, Lee และ Söderhäll, 2003) นอกจากนี้ฮีโมไซยานินชนิด β ได้ถูกพบใน red swamp crayfish *Procambarus clarkii* โดยฮีโมไซยานิน 1 มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Staphylococcus aureus* และยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสด้วย (Qin และคณะ, 2018; Zeng, 2016)

2.5 RNA interference

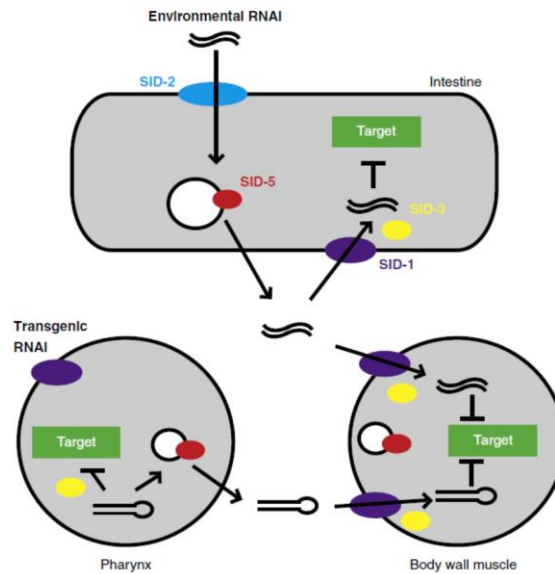
เทคนิค RNA interference เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในขั้นตอนหลังการทรานสคริปชัน (post-transcription) วิธีการนี้ใช้กลไกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในเซลล์ของกุ้ง กล่าวคือ อาร์เอ็นเอสายคู่ที่ฉีดเข้าไปในตัวกุ้งจะถูกเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสสาม (ribonuclease III) หรือ Dicer ย่อยเป็นชิ้นอาร์เอ็นเอสายสั้น ๆ เรียกว่า small interfering RNAs (siRNAs) (Hammond และ คณะ, 2000) ในขั้นต่อมา กลุ่มโปรตีน RNA-induced silencing complex

(RISC) จะมาจับและคลี่สาย siRNA ให้เหลือเพียงสายเดียว จากนั้น siRNA จะพากลุ่มโปรตีนไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายและตัดสายเอ็มอาร์เอ็นเอนั้นทำให้ไม่สามารถเข้าสู่การแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีนต่อไปได้ (รูปที่ 2.8) (Agrawal และคณะ, 2003; Martinez และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.8 RNAi ภายในเซลล์

ที่มา: Limera และคณะ (2017)



รูปที่ 2.9 การถ่ายทอด RNAi ระหว่างเซลล์ใน *Caenorhabditis elegans*

ที่มา: Rocheleau (2012)

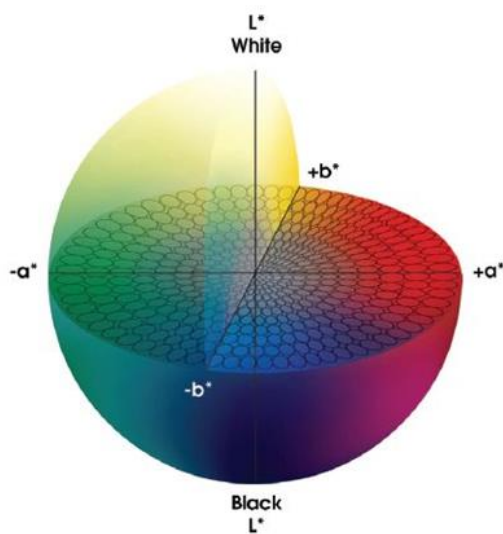
กลไก RNAi สามารถเริ่มทำงานเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับ dsRNA (double-stranded RNA) จากสิ่งแวดล้อม เช่น จากการกินแบคทีเรียที่สามารถสร้าง dsRNA ได้ (Timmons, Court, และ Fire, 2001) หรือ ตัวอย่างเช่น การแช่ *Caenorhabditis elegans* ใน dsRNA (Tabara, Grishok, และ Mello, 1998) RNAi ในขั้นนี้เรียกว่า environmental RNAi ซึ่งใน *C. elegans* โปรตีนที่ทำหน้าที่รับ dsRNA จากสิ่งแวดล้อมเข้าเซลล์คือ โปรตีนชนิด transmembrane เรียกว่า SID-2 โปรตีนชนิดนี้มีการแสดงออกอยู่ที่ผนังลำไส้และทำหน้าที่รับ dsRNA เข้าเซลล์ด้วยวิธี endocytosis โปรตีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับกลไก RNAi ได้แก่ SID-1 และ SID-3 โปรตีนทั้งสองชนิดมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรับ silencing signals และจำเป็นต่อการทำงานของกลไก RNAi ภายในเซลล์ ในปี 2003 Feinberg และ Hunter ได้อธิบายว่าโปรตีน SID-1 ทำหน้าที่เป็นช่อง (channel) ให้ dsRNA แพร่ผ่านเข้ามาได้ โดย dsRNA ที่มีความยาวมากพอจะเกิดอันตรกิริยากับ glycoprotein บน cell membrane dsRNA ที่ยาวจะสามารถยึดเกาะกับ glycoprotein ได้แข็งแรงกว่าสายสั้น เมื่อมี dsRNA สายยาวหลายโมเลกุลมาเกาะรวมกันจะทำให้ความเข้มข้นของ dsRNA บริเวณรอบ channel เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและแพร่เข้าเซลล์ในที่สุด ซึ่งทั้งคู่ได้ทำการทดลองและพบว่า dsRNA ขนาด 500 bp ที่ความเข้มข้น 0.01-0.001 $\mu\text{g/ml}$ สามารถลดการแสดงออกของยีนได้เทียบเท่า dsRNA ขนาด 100 bp เข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งความเข้มข้นของ 500-bp dsRNA ต่ำกว่า 100 bp-dsRNA ถึง 100-1000 เท่า นอกจาก SID-2 SID-1 และ SID-3 แล้ว โปรตีน SID-5 ก็พบว่าจำเป็นต่อการส่ง silencing signals สู่เซลล์ ทั้ง SID-1 SID-3 และ SID-5 ต่างเป็นส่วนหนึ่งของ systemic RNAi ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถส่ง

silencing signals ระหว่างเนื้อเยื่อที่อยู่ห่างไกลกันได้ (รูปที่ 2.9) (Rocheleau, 2012) นอกจากนี้ *C. elegans* แล้ว ในกิ้งขาวแปซิฟิกนั้นก็พบว่ามียีน SID-1 เช่นเดียวกัน Maruekawong และคณะ (2018) พบว่ากิ้งขาวที่ได้รับการกระตุ้นการทำงานของ SID-1 ด้วยการฉีด dsRNA สายยาว เมื่อนำมาฉีด dsRNA ครั้งที่สองด้วย dsRNA จำเพาะต่อยีน STAT และ CHC ผลการลดการแสดงออกของ STAT และ CHC มีมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้น SID-1

RNA interference เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาการทำงานของยีน เพราะ RNAi เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงทำให้สามารถเลือกยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตามต้องการได้อย่างจำเพาะ และมีขั้นตอนการทำที่ไม่ซับซ้อน สามารถดำเนินการทดลองได้อย่างรวดเร็ว (Krishnan และคณะ, 2009; Voorhoeve และ Agami, 2003) RNAi เป็นวิธีที่นิยมมากในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเมลานินเซชัน (melanization) ของระบบ proPO จากงานวิจัยในปี 2009 การยับยั้งการแสดงออกของยีน proPO ใน *M. japonicus* ทำให้กิ้งมีแบคทีเรียและอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น (Fagutao และคณะ, 2009) นอกจากนี้ RNAi ยังใช้เพื่อการลดการแสดงออกของยีน *PmproPO1* และ/หรือ *PmproPO2* ในกิ้งกุลาดำ *P. monodon* ทำให้กิ้งอ่อนแอต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มากขึ้น (Amparyup และคณะ, 2009) ดังนั้น RNAi จึงเป็นเทคนิคที่เชื่อถือได้และมีการใช้ในงานวิจัยมากมายอย่างต่อเนื่อง

2.6 ระบบสี CIE L*a*b*

ในปี 1976 the International Commission on Illumination (CIE: Commission Internationale d'Eclairage) ได้สร้างโมเดลทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายสีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตามนุษย์เป็นตัวเลข ระบบสี CIELAB ประกอบด้วยค่า lightness (L^*) มีค่าต่ำสุดคือ 0 (สีดำ) จนถึง 100 (สีขาว) ค่า a^* ที่มีช่วงสีตั้งแต่สีเขียว ($-a^*$) จนถึงสีตรงข้ามคือสีแดง ($+a^*$) และค่าที่สามคือ b^* ที่มีสีตั้งแต่ช่วงสีฟ้า ($-b^*$) จนถึงสีเหลือง ($+b^*$) บริเวณที่แกนทั้งสามตัดคือสีเทา (รูปที่ 2.10) ดังนั้นสีที่อยู่ใกล้จุดกึ่งกลางทรงกลมจะมีความอิ่มตัว (saturation) ของสีน้อยและเมื่อเข้าใกล้ขอบนอกทรงกลมมากขึ้น ความอิ่มตัวของสีก็มากขึ้น โดยครึ่งบนของทรงกลม สีจะสว่างขึ้นจนด้านบนสุดเป็นสีขาว ในขณะที่เดียวกัน ครึ่งทรงกลมด้านล่าง สีจะมีดลงเรื่อย ๆ จนเป็นสีดำ (Sappi etc, 2013)



รูปที่ 2.10 Color space ของ CIE 1976 $L^*a^*b^*$ ประกอบด้วย 3 ค่า ได้แก่ L^* หรือ lightness มีค่าอยู่ในช่วง 0-100 $+a^*$ คือค่าสีแดง $-a^*$ คือค่าสีเขียว $+b^*$ คือค่าสีเหลือง และ $-b^*$ คือค่าสีฟ้า

ที่มา: Konica minolta (2018)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

- กุ้งขาวแปซิฟิกที่ใช้ในการทดลองเป็นกุ้งขาวที่ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยกุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนมีน้ำหนักเฉลี่ย 3 ± 0.1 กรัม และกุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองเพื่อตรวจสอบการเกิดเมลานินในกุ้งที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีนมีน้ำหนักเฉลี่ย 21 ± 2 กรัม ทั้งนี้ เพื่อให้มีขนาดตัวเหมาะสมกับการใช้เครื่องวัดสี ก่อนเริ่มการทดลอง กุ้งจะได้รับการปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในระบบปฏิบัติการ โดยเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 20 ppt ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C และให้ออกซิเจนตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์	ตราสินค้า/ประเทศผู้ผลิต
- -20°C Refrigerator Freezer	Haier/China
- -80°C Freezer	SANYO/Japan
- -20°C Refrigerator	Mitsubishi Electric/Japan
- 96-well plate	Costar/USA
- chroma meter	Konica Minolta/Japan
- Gel documentation	Syngene/UK
- High-pressure steam sterilizer	Tomy/Japan
- High-speed refrigerated Micro centrifuge	Tomy/Japan
- Insulin syringes	Becton, Dickinson and

- Laboratory balance Sartorius/Germany
- Laboratory balance Sartorius/Germany
- Microplate BioTek/USA
- Microtubes (0.6, 1.5) Axygen Scientific/China
- PCR tubes Axygen Scientific/China
- Pipette tips Axygen Scientific/China
- Pipetman Classic USA
- Spectrophotometer Nanodrop/USA
- Thermal Cycler BIO-RAD/Germany
- vortex Biosan/Latvia

สารเคมี

สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

- Chloroform AnalaR NORMAPUR France
- Ethanol MERCK Germany
- Guanidine Thiocyanate & Phenol Molecular Research USA
Center
- Isopropanol MERCK Germany

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย semi-quantitative RT-PCR

- 100 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP Vivantis Malaysia
- 100 bp PlusGeneRuler™ Thermo Scientific USA

- Agarose	Vivanitis	Malaysia
- Boric acid	MERCK	Germany
- Ethidium bromide (Sigma)	Sigma-Aldrich	Germany
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA)	Ajax Finechem	Australia
- Oligodt (15) primer	Fermentas	USA
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane	USB	USA

สำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity)

- Bovine serum albumin (BSA)	Bio-Rad	USA
- 1x Bradford reagent	Bio-Rad	USA
- Dopamine hydrochloride	Sigma-Aldrich	Germany

สำหรับการวัดเมลานิน

- Sodium metabisulfite	KEMAUS	Australia
------------------------	--------	-----------

เอนไซม์และชุดอุปกรณ์ (kits)

สำหรับการการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA)

- NucleoSpin® Gel and PCR clean-up	Machery-Nagel	Germany
- pGEM®-T Easy Vector	Promega	USA
- T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems	Promega	USA

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย semi-quantitative RT-PCR

- Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit	Thermo Scientific	USA
- RQ1 RNase-Free DNase	Promega	USA

- Taq DNA polymerase

Thermo Scientific USA

ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินในกุ้งขาวแปซิฟิก

การค้นหาลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน ของฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย β (hemocyanin subunit β ; LvHcB) ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม BLASTN และ BLASTX จากนั้นนำลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genetyx และเพื่อให้เข้าใจโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีนหน่วยย่อยฮีโมไซยานินชนิดบีตาจึงทำการวิเคราะห์ตำแหน่งโปรตีนโดเมน (protein domain) ด้วยโปรแกรม Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) <http://smart.embl-heidelberg.de/> และใช้โปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB กับโปรตีนฮีโมไซยานิน และโปรตีนโพรทีนออกซิเดสหน่วยย่อยอื่น ๆ ของกุ้งขาวแปซิฟิก

3.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

3.2.1 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA)

การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อยีนฮีโมไซยานิน LvHcB จะใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction ; PCR) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะจำเพาะกับยีนฮีโมไซยานิน LvHcB และมีส่วนของ T7 promoter อยู่ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ โดยจับคู่กับไพรเมอร์อีกฝั่งที่ไม่มี T7 promoter เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอแม่แบบฝั่ง sense และ anti-sense จากนั้นนำดีเอ็นเอแม่แบบมาสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA ; ssRNA) ด้วยการสร้างอาร์เอ็นเอในหลอดทดลอง (*in vitro* transcription) โดยใช้ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems (Promega, USA) อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวทั้ง sense และ anti-sense จะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) ขั้นตอนต่อมา นำ ssRNA ทั้งสองฝั่ง (sense และ anti-sense) ในปริมาณที่เท่ากัน มาทำให้เกิดการจับแบบเข้าคู่กันของเบสคู่สม (annealing) โดยให้ความร้อน 70 °C นาน 10 นาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหนึ่งชั่วโมง เติมเอ็นไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (RQ1 RNase-Free DNase ;Promega, USA) และให้ความร้อน 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อสลายดีเอ็นเอแม่แบบ

หลังจากตกตะกอนด้วย sodium acetate (0.1 vol) และ isopropanol (1 vol) ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เข้มข้น 75% และละลาย อาร์เอ็นเอสายคู่ด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease-free water) ต่อมานำอาร์เอ็นเอสายคู่ มาวิเคราะห์ปริมาณ และวิเคราะห์คุณภาพด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) และเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล

3.2.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB

กึ่งที่ผ่านการปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในระบบปฏิบัติการมาแล้ว 7 วัน จะแบ่งออกเป็นสองกลุ่มการทดลองคือ กลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อยีนฮีโมไซยานิน LvHcB และกลุ่มควบคุมที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน green fluorescence protein (GFP) โดยฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เข้ากล้ามเนื้อของกึ่งปล้องที่สาม ซึ่งปริมาณ อาร์เอ็นเอสายคู่ที่ใช้มีสัดส่วน 5 ไมโครกรัม ต่อกึ่งน้ำหนัก 1 กรัม ทำการฉีดสองครั้ง ครั้งที่สองห่างจากครั้งแรก 24 ชั่วโมง และเลี้ยงกึ่งต่ออีก 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเริ่มเก็บตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อเยื่อตับ (hepatopancreas) และเก็บเม็ดเลือด (hemocyte) จากกึ่งกลุ่มการทดลองละ 3 ตัว เนื้อเยื่อทั้งหมดถูกแยกเก็บจากแต่ละตัวและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) และทำการเก็บน้ำเลือด (hemolymph) จากกึ่งกลุ่มการทดลองละ 3 ตัว เพื่อนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) หรือในการทดลองเพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ต่อการเกิดเมลานินซิส กึ่งจะไม่ถูกเก็บตัวอย่างแต่นำไปแช่เย็นเพื่อวัดเมลานินซิสด้วยเครื่องวัดสี (chroma meter) ต่อไป

3.2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

หลังจากฉีดกึ่งครั้งที่สองด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB (กลุ่มทดลอง) และยีน GFP (กลุ่มควบคุม) จึงเลี้ยงต่อจนครบ 48 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลือด และเนื้อเยื่อตับของกึ่งขาว กลุ่มการทดลองละ 3 ตัว เพื่อนำตัวอย่างมาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจสอบการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินซิสในกึ่งขาว ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ต่อไป การเก็บตัวอย่างกึ่งขาวเริ่มจากการใช้เข็มดูดน้ำเลือดของกึ่งขาวบริเวณเส้นเลือดด้านท้องขาเดินคู่สุดท้าย (ventral abdominal artery) จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ แล้วนำตัวอย่างทั้งสองส่วนมาแช่ในสารสกัดอาร์เอ็นเอ TRI Reagent® (Molecular

Research Center, USA) บนน้ำแข็งทันทีเพื่อคงสภาพอาร์เอ็นเอภายในเนื้อเยื่อตัวอย่าง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำมาสกัดอาร์เอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

การสกัดอาร์เอ็นเอเริ่มจากการบดตัวอย่างให้ละเอียดเพื่อทำให้เซลล์แตก และเติม TRI Reagent[®] (Molecular Research Center, USA) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างกับ TRI Reagent[®] ให้เข้ากันด้วยการวอร์เท็กซ์ (vortex) จากนั้นปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกเศษเนื้อเยื่อออกจากสารละลาย ปิดฝา สารละลายที่ไม่มีตะกอนแล้วแยกใส่ไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อแยกอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอ โปรตีน และสารอินทรีย์อื่น ๆ ผสมคลอโรฟอร์มกับสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันด้วยการวอร์เท็กซ์ วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C สารผสมที่ได้จะแยกชั้น ชั้นสีชมพูด้านล่าง คือ ชั้นสารอินทรีย์ (organic phase) และชั้นสารละลายใสด้านบน คือ ชั้นละลายน้ำ (aqueous phase) อาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ละลายอยู่ในส่วนนี้ จากนั้นเปิดชั้นใสด้านบน แยกใส่หลอดไมโครทิวบ์ เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อให้ อาร์เอ็นเอตกตะกอน บ่มที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ซึ่งตะกอนอาร์เอ็นเอ อยู่ด้านล่างของหลอด ปิดฝาสารละลายใส ทิ้งไปเหลือตะกอนสีขาวของอาร์เอ็นเอไว้ทั้งหมด เติมเอทานอลเข้มข้น 75 %v/v 1 มล. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ปิดฝา เอทานอลทิ้งและเปิดฝาเพื่อระเหยเอทานอลจนหมด ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease-free water) ตามปริมาณตะกอนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ นำไปวัดคุณภาพและปริมาณด้วยสเปกโตรโฟโตเมตรี จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเออีกครั้ง โดยก่อนสกัดเติมเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase I) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และบ่มให้เอนไซม์ทำงานที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อสลายดีเอ็นเอที่อาจตกค้างจากการสกัดรอบแรก การสกัดครั้งที่สองมีวิธีการเหมือนรอบแรก แต่ปรับลดปริมาณสารที่ใช้ คือ TRI Reagent[®] ปริมาตร 500 ไมโครลิตร คลอโรฟอร์มปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดคุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี

3.2.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (First strand cDNA) โดยใช้ Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, USA) และไพรเมอร์ oligo(dT)15 โดยใช้อาร์เอ็นเอจากชั้นก่อนหน้าในปริมาณที่เท่ากันในทุกตัวอย่าง เนื้อเยื่อตับใช้อาร์เอ็นเอ 1,500 นาโนกรัม และเม็ดเลือดใช้ 250 นาโนกรัม เนื่องจากปริมาณอาร์เอ็นเอในเม็ดเลือดที่มีอยู่น้อยตามธรรมชาติ เติมไพรเมอร์ oligo(dT)15 ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับ 1 ไมโครลิตร และตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากเม็ดเลือด 0.5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 12 ไมโครลิตร นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สายอาร์เอ็นเอคลายตัวเป็นเส้นตรงพร้อมสำหรับการดำเนินการขั้นถัดไป เมื่อครบ 5 นาที แช่น้ำแข็งทันทีอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นผสมสารตามตารางที่ 1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (reverse transcription)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5x reaction buffer	4
10 mM dNTP mix	2
RiboLock RNase inhibitor	1
RevertAid	1

จากนั้นนำเข้าเครื่อง T100™ Thermal Cycler และควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 42 °C เป็นเวลา 90 นาที และที่ 72 °C เป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนสุดท้ายที่ 12 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานิน ซึ่งประกอบด้วยยีนฮีโมไซยานิน LvHcL และ LvHcS และยีนโพรทีนอลออกซิเดส LvproPO1 LvproPO2 และ LvproPO3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวตามตารางที่ 3.2 และใช้ยีน Elongation factor 1 α (EF1- α) เป็นยีนควบคุม (internal control) ด้วยการทำ PCR analysis โดยผสมสารที่ใช้ในการทำ PCR ตามตารางที่ 3.3

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล โดยใช้อะกาโรสเข้มข้น 1.7 % w/v และตรวจวัดความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่ถูกย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide, EtBr) โดยใช้โปรแกรม Gel-Pro® Analyzer และคำนวณค่าการแสดงออกของยีนสัมพันธ์ (relative expression) ของยีนฮีโมไซยานิน (LvHcL และ LvHcS) และยีนโพรทีนอลออกซิเดส (LvproPO1 LvproPO2 และ LvproPO3) เทียบกับยีนควบคุม EF1- α

ค่าการแสดงออกของยีนสัมพันธ์ของแต่ละกลุ่มทดลองได้จากการนำค่าการแสดงออกของยีนสัมพันธ์ของทั้ง 3 ตัวในแต่ละกลุ่มทดลองมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การแสดงออกของยีนสัมพันธ์ใช้การคำนวณตามสมการด้านล่าง ดังนี้

$$\text{Relative expression} = \frac{\text{ความเข้มแถบของยีนที่ตรวจสอบ}}{\text{ความเข้มแถบของยีนEF1-}\alpha} \times 100$$



ตารางที่ 3.2 โพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน semiquantitative RT-PCR และ RNAi

ชื่อโพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	เทคนิคที่ใช้
LvHcBF	5'TCACTGCCGGCGACATGAAGGT3'	RT-PCR
LvHcBR	5'CGGAAGAAGGCCGCGTTGCCCT3'	RT-PCR
LvHcSrtF	5'CCGATTTGATGCTGAACGTCTG3'	RT-PCR
LvHcSrtR	5'AATTCGAGCAACATCGTCCACA3'	RT-PCR
LvHcL3rtF	5'AGTCCGAATTTTCGCTTGGCCTCAC3'	RT-PCR
LvHcL3rtR	5'AAGTCCGGAATCTGCGCCACCCAAG3'	RT-PCR
LvproPO1F	5'CATTCCGTCCGTCTGCCGA3'	RT-PCR
LvproPO1R	5'CAGGCGGGTAGATCAGGTGC3'	RT-PCR
LvproPO2F	5'TCTCAGCGTGAACCTGCCTTAC3'	RT-PCR
LvproPO2R	5'GATCCTGCTCGGTGTACGGTCT3'	RT-PCR
LvPO3rtF	5'GAGCAGGGAGTGGCTTACTG3'	RT-PCR
LvPO3Ri	5'CGGTGATGTGGGGAAAATAC3'	RT-PCR
LvHcBiF	5'CTCGACGTATATAAGGGCGCGGAGC3'	RNAi
LvHcBiR	5'CTTCTCGCGCAGCTGCCCTTGC3'	RNAi
T7LvHcBiF	5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGG CTCGACGTATATAAGGGCGCGGAGC3'	RNAi
T7LvHcBiR	5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGG CTTCTCGCGCAGCTGCCCTTGC3'	RNAi
GFP-F	5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA3'	RNAi
GFP-R	5'TTACTTGTACAGCTCGTCCA3'	RNAi
GFPT7-F	5'TAATACGACTCACTATAGGATGG TGAGCAAGGGCGAGGA3'	RNAi
GFPT7-R	5'TAATACGACTCACTATAGG TTACTTGTACAGCTCGTCCA3'	RNAi
EF1 α F	5'GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC3'	RT-PCR
EF1 α R	5'CGTTCGGTGATCATGTTCTTGATG3'	RT-PCR

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน

สารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำ	12.8
10x Taq buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5
25 mM MgCl_2	1.5
1 mM dNTP	2.5
Forward primer	2.5
Reverse primer	2.5
Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA)	0.2
cDNA	0.5

3.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน

เก็บตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแปซิฟิกตัวละ 100 ไมโครลิตร จากกุ้งทั้งสองกลุ่มทดลอง กลุ่มการทดลองละ 3 ตัว โดยเก็บหลังการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ครั้งที่สองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผสมน้ำเลือดให้เข้ากับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรที่แช่เย็นในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเพื่อรักษากิจกรรมของเอนไซม์และป้องกันการเกาะตัวเป็นโครงข่ายโปรตีนในน้ำเลือด นำตัวอย่างสารละลายน้ำเลือดมาวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยผสมตัวอย่างกับสารละลายเบรดฟอร์ด (Bradford reagent; Bio-Rad) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 595 นาโนเมตร (A595) (spectrophotometer; U-1800, Hitachi, Japan) การคำนวณความเข้มข้นโปรตีนจะเทียบค่า A595 ของตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า A595 กับปริมาณโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin ; BSA) การสร้างกราฟมาตรฐานใช้ BSA ที่ความเข้มข้น 0 1.25 2.5 5 และ 10 ไมโครกรัม และผสม BSA กับสารละลายเบรดฟอร์ด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า A595 และสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างด้วยสมการจากกราฟมาตรฐาน

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยใช้ปริมาณโปรตีน 500 ไมโครกรัม ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 คือ โปรตีนจากน้ำเลือดของกุ้งที่ฉีดด้วย อาร์เอ็นเอสายคู่ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB กลุ่มที่ 2 คือ โปรตีนจากน้ำเลือดของกุ้งที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP (กลุ่มควบคุม) และ กลุ่มที่ 3 คือ โปรตีนจากน้ำเลือดของกุ้งที่ฉีดด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ 10 mM Tris-HCl (กลุ่มควบคุม) และผสมสารในไมโครเพลท ตามลำดับ คือ สารละลาย บัฟเฟอร์ Tris-HCl ตามด้วยโปรตีนน้ำเลือด 500 ไมโครกรัม (N =3) และ โดพามีน (Dopamine) สับสเตอร์ท (3 mg/ml) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (A470) จากนั้นคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดส ตามสมการด้านล่าง ดังนี้

$$\text{Phenoloxidase activity} = \frac{A470 - \text{blank}}{\frac{0.5 \text{ mg protein}}{30 \text{ min}}} \times 100$$

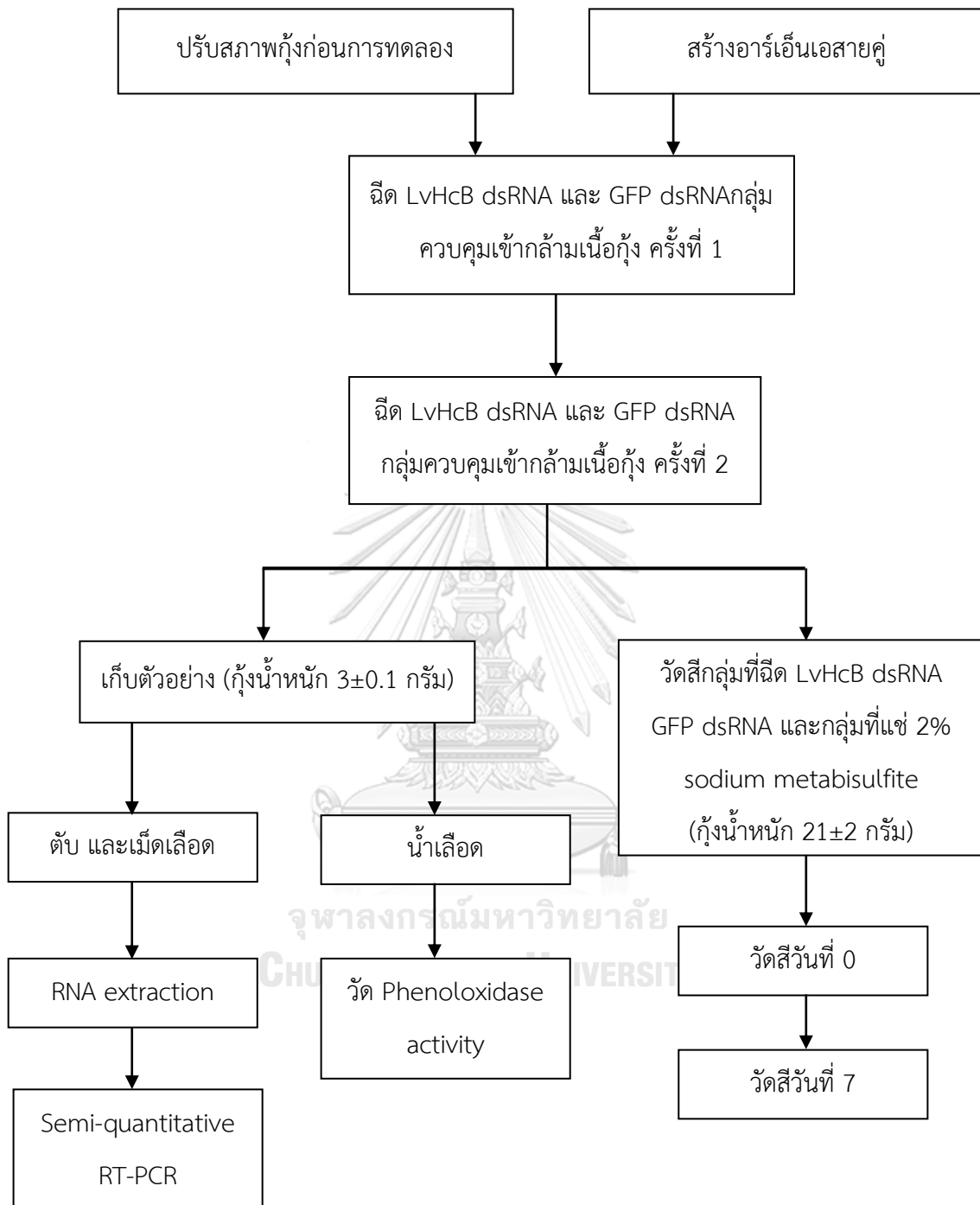
3.4 การตรวจสอบการเกิดเมลานโนซิส (melanosis) ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน

การตรวจสอบการเกิดเมลานโนซิสในกุ้งขาวแปซิฟิกการทดลองแบ่งเป็นสามกลุ่ม คือ (1) กลุ่ม กุ้งที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB (2) กลุ่มกุ้งควบคุมที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ ของ GFP และ (3) กลุ่มกุ้งควบคุมที่แช่โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) เข้มข้น 2 %w/v เป็นเวลา 5 นาที โดยแต่ละกลุ่มทดลองใช้กุ้งขาวกลุ่มละ 3 ตัว ก่อนการวัดสีเมลานโนซิส นำกุ้งขาวมาแช่น้ำแข็งเพื่อให้กุ้งสลบ 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดสี (วันที่ 0 หลังการแช่เย็น) ด้วย เครื่องโครมามิเตอร์ (Chroma meter ; Model CR-400, Minolta Co., Ltd., Tokyo, Japan) โดย เครื่องวัดสีมีบริเวณการวัดเป็นพื้นที่วงกลมขนาด 0.95 ตารางเซนติเมตรและมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร หลังจากวัดสีวันที่ 0 แล้วจึงนำกุ้งไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C จนครบ 7 วัน จากนั้นนำ กุ้งขาวออกมาวัดสีเมลานโนซิส ในวันที่ 7 หลังการแช่เย็น การวัดสีจะวัดสองบริเวณ คือ ส่วนหัวและ ส่วนตัวกุ้ง ส่วนละ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเป็นค่าสี L*, a*, b* วันที่ 0 หรือวันที่ 7 จากนั้นนำค่า สี L*, a*, b* ของกุ้งตัวเดียวกันจากทั้ง 2 วัน มาคำนวณหาค่าความแตกต่างสี (ΔE) ของกุ้งแต่ละตัว แล้วนำค่าความแตกต่างสีในแต่ละกลุ่มทดลองมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าความ ต่างสีคำนวณตามสมการด้านล่าง (Dattner และ Bohn, 2016) ดังนี้

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

L_0^* a_0^* และ b_0^* คือค่า L^* a^* และ b^* วัดวันที่ 0 หลังการแช่เย็น





รูปที่ 3.1 แผนผังสรุปขั้นตอนการวิจัย การทดลองเริ่มจากการปรับสภาพกึ่งให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในระบบการทดลองด้วยการเลี้ยงกึ่งขาวในน้ำที่มีความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วนและมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จะใช้ในการทดลอง เมื่อกึ่งได้รับการปรับสภาพแล้วจึงแบ่งกึ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ได้แก่ กลุ่ม

ที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อยีน *LvHcB* และกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มควบคุมที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ของโปรตีน GFP จากนั้นเริ่มฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ครั้งที่ 1 บริเวณกล้ามเนื้อ ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ใช้คือ 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกึ่ง 1 กรัม และฉีดซ้ำภายหลังอีก 24 ชั่วโมง เลี้ยงกึ่งต่ออีก 48 ชั่วโมงจึงเริ่มการทดลองชันลัดไป ในการทดลองเพื่อดูการแสดงออกของ ยีนฮีโมไซยานิน (*LvHcS* *LvHcL* *LvHcB*) และยีนโพรพีนอลออกซิเดส (*LvproPO1* *LvproPO2* *LvproPO3*) เนื้อเยื่อที่เก็บ ได้แก่ ตับและเม็ดเลือด โดยนำเนื้อเยื่อจากกึ่ง 3 ตัว ขนาด 3 ± 0.1 กรัม จากแต่ละกลุ่มทดลองมาสกัดอาร์เอ็นเอแล้วทำ reverse transcription เพื่อสร้าง cDNA สายแรกแล้วจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย polymerase chain reaction แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจสอบด้วย เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล ในการทดลองเพื่อหาความเกี่ยวข้องของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* ต่อการเกิดกิจกรรมโพรพีนอลออกซิเดส ตัวอย่างที่เก็บจากกึ่งคือน้ำเลือด โดยเก็บจากกึ่ง 3 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง และในการทดลองเพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องของยีน *LvHcB* ต่อการเกิดเมลานิน ชีสจะไม่มี การเก็บเนื้อเยื่อจากกึ่งแต่นำกึ่งไปแช่น้ำแข็งให้สลบแล้วนำไปวัดสีซึ่งนับเป็นวันที่ 0 หลังการแช่เย็น จากนั้นแช่เย็นกึ่งเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำกึ่งออกมาวัดสีอีกครั้ง จากนั้นจึงนับจึงคำนวณค่าความแตกต่างสี



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ฮีโมไซยานิน (Hemocyanin) เป็นโปรตีนมีหน้าที่หลัก คือ การลำเลียงออกซิเจน และมีรายงานถึงหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง สามารถตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียด้วยการทำให้เซลล์แบคทีเรียเกาะกลุ่มกัน (agglutination) และมีฤทธิ์ต่อต้านราและไวรัสได้ (Destoumieux-Garzón และคณะ, 2001; Lei และคณะ, 2008; Yan และคณะ, 2011) นอกจากนี้มีรายงานว่าฮีโมไซยานินมีกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ซึ่งถือว่าเป็นกลไกสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Amparyup และคณะ, 2013)

4.1 ลักษณะสมบัติของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB

เนื่องจากมีงานวิจัย พบว่าฮีโมไซยานินมีบทบาทต่อการเกิดเมลานোসิส (melanosis) หรือการเกิดจุดดำในกุ้งซึ่งส่งผลเสียต่ออุตสาหกรรมอาหารทะเล งานวิจัยนี้จึงได้ทำการค้นหายีนฮีโมไซยานินจากฐานข้อมูลจีโนมของกุ้งขาวแปซิฟิก (*L. vannamei*) จาก NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ผลจากการค้นหาพบว่ากุ้งขาวแปซิฟิกมียีนฮีโมไซยานินที่สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มหลัก ประกอบด้วย (1) ฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย L (hemocyanin subunit L; LvHcL) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยฮีโมไซยานินขนาดใหญ่ชนิดแกมมาและเป็นชนิดที่มีปริมาณมากที่สุด (2) ฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย S (hemocyanin subunit S; LvHcS) เป็นหน่วยย่อยฮีโมไซยานินขนาดเล็กชนิดแกมมา และ (3) ฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย B (hemocyanin subunit B; LvHcB) เป็นหน่วยย่อยฮีโมไซยานินชนิดบีตา

ในปี ค.ศ. 2016 มีการค้นพบยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ในกุ้งขาวแปซิฟิก *L. vannamei* ซึ่งถือว่าการพบยีนนี้ครั้งแรกในกุ้งตระกูล Penaeidae (Johnson และคณะ, 2016) และในปี 2019 มีการยืนยันว่ายีนฮีโมไซยานิน LvHcB มีการแสดงออกในระดับโปรตีนในกุ้งขาว *L. vannamei* ด้วยเช่นกัน (Wang และคณะ, 2019) ซึ่งนอกจากกุ้งขาวแล้วก็มีการพบยีนฮีโมไซยานิน LvHcB นี้ในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ด้วยเช่นกัน (Mendoza-Porrás และคณะ, 2020) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ในตระกูล Penaeidae ยังมีอยู่น้อยมาก ซึ่งงานวิจัยขั้นนี้ได้พยายามศึกษาหน้าที่ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ต่อความเกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system) และ การเกิดเมลานোসิส (Melanosis) ในกุ้งขาว *L. vannamei*

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB (Accession Number XM_027380856.1) พบว่ามี open reading frame (ORF คือบริเวณนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ Start codon ถึง Stop codon ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้) ยาว 2004 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำนวน 667 ตัว สามารถคำนวณน้ำหนักมวลโมเลกุลได้ 75 kDa และพบว่ามีจุดไอโซอิเล็กทริกอยู่ที่ 5.85 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) พบว่าโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB มีส่วนที่เป็นเพปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ที่มีกรดอะมิโน 17 ตัวอยู่ทางด้านต้นของสายเพปไทด์ (N-terminus) นอกจากนี้ ยังพบโปรตีนโดเมนอยู่ 3 โดเมนประกอบด้วย (1) Hemocyanin_N domain (2) Hemocyanin_M domain และ (3) Hemocyanin_C domain แสดงดังรูปที่ 4.1 (A)



B

```

atgaaggtgctgttccctcgcgggtggcgctgctctccgcctcgggacctcgcggaggacaac
M K V L F L A V A L L S A S G L A E D N
ctcgcgcacaaagcagcagggcgatcaacaggcttctgtacaggggtgactgagcctctgctg
L A H K Q Q A I N R L L Y R V T E P L L
tcttccttcaccgacctgaaggagctggcgacgacgtgggacctcgcggggccacgtgggg
S S F T D L K E L A T T W D P R A H V G
cactgcaaggacggggggcgccgcctcggcgcctcatggcggagctggagcaaggggcag
H C K D G G A A V G R L M A E L E Q G Q
ctgcgcgagaagaggcagtggttctcgcgtgttcaacctcgcggcagagggaggagggcgtc
L R E K R Q W F S L F N P R Q R E E A L
atgctgatccacgtgctgctctcctgcaaggacttccacacgttcaagggaacgcgggcc
M L I H V L L S C K D F H T F K G N A A
ttcttcgcggagcgcgatgaacgagggcgagttcgtgtacgcgctctactgttccgtcagc
F F R E R M N E G E F V Y A L Y V S T
cactccaagatgacgcagggaggtcatcctgcctcgcctctacgaggtcacgccccactgt
H S K M T Q E V I L P P L Y E V T P H L
ttcaccactcggagggtcatccggaaggcgtacgagggccaagatgctgcagacgccccggc
F T N S E V I R K A Y E A K M L Q T P G
cgcttcaggatgacgttcaccggcacgctcaagaacagcagcagcgcgtggcgtacttc
R F R M T F T G T L K N S E Q R V A Y F
ggcgagacatcggcatgaactcgcaccacgtgcactggcacatggacttccccttctgg
G E D I G M N S H H V H W H M D F P F W
tgggacggcgagcacatcgaccgaaggcgagctgttcttctgggcgaccaccagctc
W D G E H I D R K G E L F F W A H H Q L
acggcgcgcttcgactccgagcgcctctccaaccacctgcccacgtcgcagcagctgcac
T A R F D S E R L S N H L P I V D E L H
tggggggcggccatcgacgagggcttctcgcggccacacgcttacaagtacggcgggcag
W G R P I D E G F A P H T V Y K Y G G E
ttcccagcggccccgacaacctcgtgttcgaggacgtggcgggcgctggcgcgctgctg
F P T R P D N L V F E D V A G V A R V R
gacctcgtggagatcgacgagcgcacatccgggactcgatcgcgcgcggttctcgtctacg
D L V E I D E R I R D S I A R G F V Y A
tccaacggcagcgcgatcagcctgaggaacgagcgcggcgcacatcctggcgacatc
S N G S A I S L R N E R G I D I L G D I
atcgagtcggtgtacagcgtgaacgagcagtagtactcgggctcgtgacacacagggcc
I E S S V Y S V N E Q Y Y G S L H N Q A
caccgctgctcggcgccccagtcggaccgctgggcaagttcaagatgcccggggcgctg

```

```

H R V L G A Q S D P L G K F K M P P G V
atgggagcacttcgagaccgcccacccgacccccgcttcttccgctccataatacatg
M E H F E T A T R D P A F F R L H K Y M
gataacatcttcaaggagcacaaggactccctgcccctactccaagaaggacctcgag
D N I F K E H K D S L P P Y S K K D L E
tacgacaacgtcctcgtcacctacgcgagggtgtccgagctcgtcaccttcttcgaggac
Y D N V L V T Y A E V S E L V T F F E D
ttcgagttcgacctgaccaacgcttcgacagcacggaggagctcgaggacgtgcccgctc
F E F D L T N A F D S T E E L E D V P V
accgcctacgtctcgcgctgaaccacaagcccttcaccttcgacatcttcgccaacggc
T A Y V S R L N H K P F T F D I F A N A
aagcgcgacgacgcggtgacggtccggatccacatctgcccgcgctacgacagcaacggc
K R D D A V T V R I H I C P R Y D S N G
atgcagatcccccttcgacaacaaccgctggagggtgcatcgagctcgacaagttctggagc
M Q I P F D N N R W R C I E L D K F W T
acagtgaaaggcggaagaaccacatcgtgcaagtcaccgagctcgtcggctccacatc
T V K A G E N H I V R K S T E S S V T I
cccgaccgcatcccgttcaagacgctgatgcagcaggcggacgaggccgctcgcgaacggc
P D R I P F K T L M Q Q A D E A V A N G
gtcgacctcccgcacgacatcgtcgcgctcggggctcgggcctccccagcgcctcctg
V D L P H D I A R A R G C G L P Q R L L
ctccccaaagggcagcagggacgggcatgcaagttctggctgttcggtggcctacgaccagcgc
L P K G T R T G M Q F W L F V G M T S G
gacgacggcgtgcacgacgacctgctggagaacacgcacggcaacacccacagcaactgc
D D G V H D D L L E N T H G N T H S N C
ggcatccacggcctcaagtaacccgacaagcggcggatgggcttccccttcgaccgacgc
G I H G L K Y P D K R P M G F P F D R R
atccccgacttcggaaacttcttctgctcggaacttcttctgctcgacctcgtgatccat
I P D F R N F I V G N F L S T I V M I H
cacaatgacactgaagagttgtga
H N D T E E L -

```

รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ของกุ้งขาวแปซิฟิก *L. vannamei*

- (A) โปรตีนฮีโมไซยานินประกอบด้วยสามโดเมน ได้แก่ โดเมน N โดเมน M และ โดเมน C วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Simple Modular Architecture Research Tool (SMART)
- (B) ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน LvHcB ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genetyx กรดอะมิโนแสดงด้วยตัวย่อบรรทัดล่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละโคดอน (codon) และ signal peptide ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genetyx เป็นกรดอะมิโน 17 ตัว แสดงด้วยตัวอักษรตัวหนา

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (sequence alignment) ของโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB กับลำดับกรดอะมิโนของยีนอื่น ๆ ในกุ้งขาวแปซิฟิกและกุ้งเครย์ฟิช (Crayfish) พบว่ามีความเหมือน (sequence similarity) กับโปรตีนในกลุ่มที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ (type III copper protein) ในกุ้งขาวแปซิฟิก โปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโน ดังนี้ โปรตีนฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย-L3 (LvHcL3; XP_027232124) มีความเหมือน 69% โปรตีนฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย-S (LvHcS; XP_027239062) มีความเหมือน 69% โปรตีนโพรฟีนอลออกซิเดส-1 (LvproPO1; ROT61249) มีความเหมือน 44% โปรตีนโพรฟีนอลออกซิเดส-2 (LvproPO2; ABQ45957) มีความเหมือน 45% และ โปรตีนโพรฟีนอลออกซิเดส-3 (LvproPO3) (XP_027235796) มีความเหมือน 41% และ ในกุ้งเครย์ฟิช *Pacifastacus leniusculus* ประกอบด้วยโปรตีนฮีโมไซยานิน

หน่วยย่อย 1 (*PleHc1*; AAM81357) ที่มีความเหมือนโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB 77% และโปรตีนฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย 2 (*PleHc2*; AAO47336) ที่ความเหมือน 72% นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์โครงสร้างระดับปฐมภูมิของโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB พบว่าโปรตีนโดเมนของโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB มีส่วนที่สามารถยึดจับกับอะตอมทองแดงและเป็นลักษณะสมบัติของโปรตีนในกลุ่มฮีโมไซยานิน ซึ่งทำให้สามารถจัดกลุ่มยีนฮีโมไซยานิน LvHcB เป็นฮีโมไซยานินของครัสเตเชียน

ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือน (รูปที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB มีความใกล้เคียงกับโปรตีนฮีโมไซยานิน *PleHc1* ของกุ้งเครย์ฟิช *P. leniusculus* มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Johnson และคณะ (2016) ที่ได้ระบุว่าโปรตีนฮีโมไซยานิน *PleHc1* ของเครย์ฟิช เป็นชนิดบีตา (β) ในขณะที่โปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcS และโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcL1 ของกุ้งขาวแปซิฟิกถูกจัดไว้ใกล้กับโปรตีนฮีโมไซยานิน *PleHc2* ของเครย์ฟิช ซึ่งจากงานวิจัยเดียวกัน Johnson และคณะได้อธิบายไว้ว่าโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcS และโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcL1 เป็นฮีโมไซยานินชนิดแกมมา (γ) และ *PleHc2* เป็นชนิดแอลฟา (α) โดยฮีโมไซยานินทั้งสองชนิดนี้ (แกมมา และแอลฟา) มีความใกล้เคียงกันในทางวิวัฒนาการมากกว่าชนิดบีตา

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) และฮีโมไซยานินมีตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา (active site) เหมือนกัน แต่โปรตีนทั้งสองชนิดมีหน้าที่ทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน กล่าวคือ ฮีโมไซยานินมีหน้าที่หลัก คือ การขนส่งออกซิเจน ในขณะที่ฟีนอลออกซิเดสมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) และออกซิเดชัน (oxidation) ของสารประกอบฟีนอลและควิโนน ซึ่งเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสนี้ถือว่าเป็นเอนไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยามเมลานิเซชัน (melanization) ที่เกี่ยวข้องกับ การเกิดจุดดำ (melanosis) ในกุ้ง ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน นอกจากการขนส่งออกซิเจนแล้ว ฮีโมไซยานินยังมีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Coates และ Nairn, 2013) เช่น ฮีโมไซยานินมีคุณสมบัติในการต่อต้านไวรัสและจุลินทรีย์ (Zhang และคณะ, 2004; Destoumieux-Garzón และคณะ, 2001; Lee และคณะ, 2003) และยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) และทำให้เซลล์แตก (hemolytic activity) (Zhang และคณะ, 2006; Zhang และคณะ, 2009) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันเชื้อโรค มีงานวิจัยหลายชิ้นได้รายงานว่าหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสด้วยเช่นกัน (García-Carreño และคณะ, 2008; Lee และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบัน ได้มีการค้นพบชนิดหน่วยย่อย

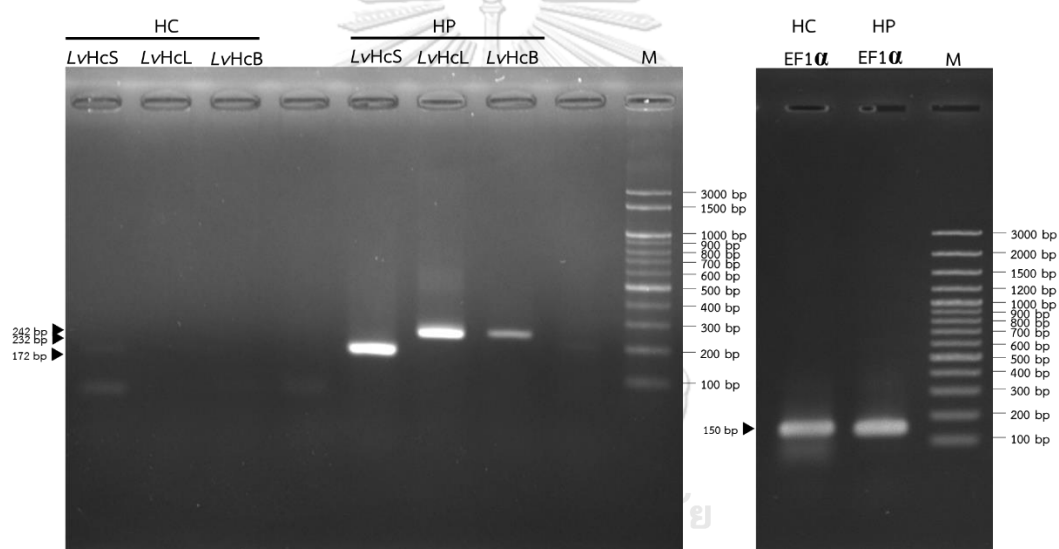
รูปที่ 4.2 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcB กับฮีโมไซยานินอื่น (LvHcL1 LvHcS PleHc1 และ PleHc2) และโพรทีนออกซิเดส (LvproPO1 LvproPO2 และ LvproPO3) ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Clustal บริเวณ signal peptide แสดงด้วยตัวอักษรหนาและขีดเส้นใต้ กรดอะมิโนที่เหมือนกันในทุกโปรตีนแสดงด้วยการแรเงาสีเทา กรดอะมิโนที่เหมือนกันในโปรตีนห้าชนิดขึ้นไปแสดงด้วยการแรเงาสีเทาเข้ม ตำแหน่งกรดอะมิโนที่จับกับโมเลกุลทองแดงสองบริเวณ คือ A และ B (copper-binding sites A and B) แสดงด้วยสี่เหลี่ยมผืนผ้า ตำแหน่งกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine) ที่มีการอนุรักษ์แสดงด้วย การแรเงาสีดำและตัวอักษรสีขาว ลำดับกรดอะมิโนใช้ข้อมูลจาก Genbank ได้แก่ LvHcB (XP_027236657.1) LvHcL1 (AHY86471.1) LvHcS (XP_027239062.1) LvproPO3 (ROT71233.1) LvproPO1 (ROT61249.1) LvproPO2 (ABQ45957.1) PleHc1 (AAM81357.1) PleHc2 (AAO47336.1)

4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อ (tissue distribution) ของกุ้ง

การตรวจสอบยืนยันการแสดงออกของยีนในกลุ่มฮีโมไซยานินที่ประกอบด้วยยีนของโปรตีนฮีโมไซยานิน LvHcL ฮีโมไซยานิน LvHcS และ ฮีโมไซยานิน LvHcB ในเนื้อเยื่อตับ (hepatopancreas) และในเม็ดเลือด (hemocyte) ของกุ้งขาวแปซิฟิก (รูปที่ 4.3) พบว่ายีนฮีโมไซยานิน LvHcL (พบแถบดีเอ็นเอมีขนาด 250 bp) ฮีโมไซยานิน LvHcS (พบแถบดีเอ็นเอมีขนาด 200 bp) และ ฮีโมไซยานิน LvHcB (พบแถบดีเอ็นเอมีขนาด 250 bp) มีการแสดงออกมากเฉพาะในเนื้อเยื่อตับของกุ้งขาวแปซิฟิก ซึ่งมีขนาดตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คำนวณได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีน ส่วนในเม็ดเลือดพบว่ามีแถบดีเอ็นเอจาง ๆ เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนฮีโมไซยานิน LvHcS อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนฮีโมไซยานิน LvHcL และ ฮีโมไซยานิน LvHcB ไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างเม็ดเลือด ซึ่งสรุปได้ว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนฮีโมไซยานิน LvHcB สามารถนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปได้

ในปี 2016 Johnson และคณะ ได้พบยีนฮีโมไซยานิน LvHcB มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอ ในกุ้งขาวแปซิฟิกจากการทำ RNA-seq (RNA-sequencing) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของกุ้งขาวแปซิฟิก ต่อมา Mendoza-Porras และคณะ (2020) ได้ตรวจพบยีนฮีโมไซยานิน PmHcB ในตับของกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ในปี 2020 ซึ่งการศึกษาฮีโมไซยานินชนิดปีตาในกุ้งตระกูล Penaeid ยังมีน้อยมากทำให้ข้อมูลการแสดงออกของยีนนี้ในเนื้อเยื่ออื่นนอกจากตับมีจำกัด ฮีโมไซยานินชนิดแกมมา ได้แก่ LvHcS และ LvHcL มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอในหลาย

เนื้อเยื่อ Lu และคณะ (2015) รายงานว่า ยีนฮีโมไซยานิน HcL มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อตับ ต่อม น้ำเหลือง (lymphoid) เม็ดเลือด (hemocytes) หัวใจ ลำไส้ และ เหงือก เป็นต้น โดยมีการแสดงออกที่ตับมากที่สุด ส่วนยีนฮีโมไซยานิน HcS ได้มีรายงานจาก Wang และคณะ (2007) พบว่ายีนฮีโมไซยานิน HcS มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อตับ กระเพาะ (stomach) ต่อม น้ำเหลือง เม็ดเลือด หัวใจ เหงือก ปมประสาท (neural ganglion) และ กล้ามเนื้อ (muscle) โดยเนื้อเยื่อตับเป็นส่วนที่มี การแสดงออกมากที่สุดต่างจากส่วนอื่นที่มีการแสดงออกเพียงเล็กน้อย เท่านั้น ซึ่งสามารถสรุปได้ว่ายีนฮีโมไซยานิน HcL ยีนฮีโมไซยานิน HcS และ ยีนฮีโมไซยานิน HcB มีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อตับ ซึ่งสอดคล้องกับผลวิจัยที่ศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงได้ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน HcB ในเนื้อเยื่อตับ



รูปที่ 4.3 การแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcS LvHcL และ LvHcB ในเม็ดเลือด (hemocytes; HC) และตับ (hepatopancreas; HP) ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcS LvHcL LvHcB ที่มีขนาด 172 bp 232 bp และ 242 bp ตามลำดับ และยีน EF1 α ที่มีขนาด 150 bp ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม

4.3 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายผ่านกระบวนการ RNA interference (RNAi)

กระบวนการ อาร์เอ็นเอ อินเทอร์เฟอเรนซ์ (RNA interference; RNAi) เป็นกลไกภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติของกุ้งขาวแปซิฟิก โดยกลไกนี้ได้มีการพัฒนาดัดแปลงมาใช้ในการศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ระดับอาร์เอ็นเอกันอย่างแพร่หลายในกุ้ง (Amparyup, Charoensapsri และ Tassanakajon, 2009) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค RNAi มาทำการศึกษาหน้าที่ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ซึ่งเป็นยีนที่ยังไม่เคยมีการศึกษาด้วยวิธีนี้มาก่อน ดังนั้น จึงต้องทดสอบความสามารถของเทคนิค RNAi ในการลดการแสดงออกของยีน ทั้งในด้านประสิทธิภาพและความแม่นยำของการลดการแสดงออกของยีน

เริ่มจากการสร้าง double strand RNA (dsRNA) ด้วย sense RNA และ antisense RNA ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ซึ่งได้จากการเพิ่มจำนวนยีนฮีโมไซยานิน LvHcB โดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ F คู่กับ R-T7 ที่ใช้ในการเตรียมเส้น sense RNA และใช้ไพรเมอร์ T7-F คู่กับ R ที่ใช้ในการเตรียม antisense RNA เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR products) ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) พบแถบดีเอ็นเอของทั้งสองเส้นมีขนาด 300 bp (329 bp) ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดคาดการณ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์

ในขั้นตอนต่อมาได้ทำการแยกบริสุทธิ์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเส้นดีเอ็นเอ sense DNA และ antisense DNA โดยการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล และทำการตัดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 300 bp มาแยกบริสุทธิ์ด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (Gel Extraction Kit) ผลจากการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำการแยกบริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดและมีความบริสุทธิ์ โดยไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปนเปื้อน

ขั้นตอนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ในหลอดทดลอง เริ่มจากการนำชิ้นดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ทั้งเส้นดีเอ็นเอ sense DNA และ antisense DNA มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อสังเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ T7 RNA Polymerase ที่เป็นส่วนประกอบในชุด T7 RiboMAX™ Express RNAi System โดยแยกหลอด เมื่อนำอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA ; ssRNA) มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล พบแถบอาร์เอ็นเอขนาด

300 bp ของทั้งเส้นดีเอ็นเอ sense DNA และ antisense DNA แสดงให้เห็นว่าประสบความสำเร็จในการสร้างอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

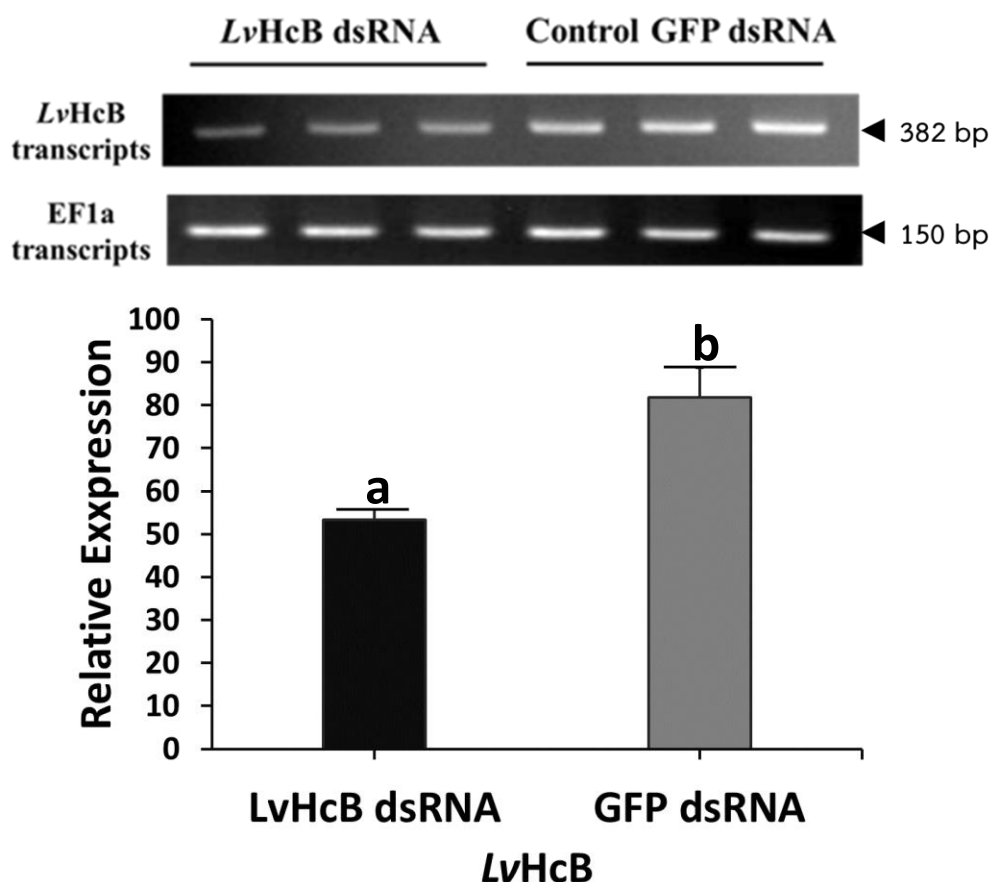
ขั้นตอนการเตรียมอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA; dsRNA) ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB เริ่มจากการนำอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) ของทั้งเส้น sense RNA และ antisense RNA มาทำการผสมกันเพื่อให้เกิดการจับกันเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลอง และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล จากผลการวิเคราะห์พบแถบอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาด 300 bp แสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ได้และสามารถนำไปศึกษาได้ในขั้นต่อไป

4.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน LvHcB ด้วย semi-quantitative RT-PCR

เนื่องจากมีรายงานวิจัยว่าโปรตีนฮีโมไซยานินมีกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) (Lee และคณะ, 2004; Garcia-Carreño และคณะ, 2008; Coates และ Nairn, 2013) การทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบความเกี่ยวข้องของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB กับระบบโพรงฟีนอลออกซิเดสในกุ้ง เริ่มจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ในกุ้งขาวโดยการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA ที่ความเข้มข้น dsRNA 5 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม เพื่อลดการแสดงออกของยีน LvHcB โดยกุ้งกลุ่มควบคุมได้ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ dsRNA ของยีน GFP ภายหลังการฉีด dsRNA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ (hepatopancreas) และ เม็ดเลือด (hemocyte) มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ และสร้าง cDNA ผลจากการตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วย semi-quantitative RT-PCR พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ในเนื้อเยื่อตับของกุ้งกลุ่มที่ฉีดยับยั้งด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA มีการแสดงออกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.4) โดยมีค่าลดลงประมาณ 34.8% จากผลแสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA ที่สร้างขึ้นมีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ในกุ้งได้และสามารถนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

จากงานวิจัยของ Amparyup และคณะ ในปี 2009 ได้รายงานความสำเร็จของการใช้เทคนิค RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนโพรงฟีนอลออกซิเดส PmpoPO1 และ โพรงฟีนอลออกซิเดส PmpoPO2 ในกุ้งกุลาดำ โดยใช้ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ที่ปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อ

1 กรัมของกุ้ง นอกจากนี้ในปี 2018 Chomwong และคณะ ได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของ ยีนโพรพีนอลออกซิเดส LvproPO1 และ โพรพีนอลออกซิเดส LvproPO2 ในกุ้งขาวแปซิฟิก พบว่า สามารถลดการแสดงออกของยีนได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพ โดยใช้ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ สายคู่ที่ปริมาณ 4 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมของกุ้ง ในปี 2014 Yang และคณะ ได้รายงานการใช้เทคนิค RNAi พบว่าสามารถลดการแสดงออกของยีนโพรพีนอลออกซิเดส proPO ในปูทะเล mud crab (*Scylla paramamosain*) ได้ประมาณ 39% โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ 2 ไมโครกรัมต่อ น้ำหนักปู 1 กรัม ผลจากการงานวิจัยชิ้นนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ถึงการใช้อาร์เอ็นเอ สายคู่ 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม อย่างไรก็ตามมีบางรายงานในปี 2007 Liu และคณะ ได้ใช้ เทคนิคเดียวกันนี้เพื่อลดการแสดงออกของยีนโพรพีนอลออกซิเดส proPO ในเครย์ฟิช *Pacifastacus leniusculus* ซึ่งสามารถลดการแสดงออกได้ประมาณ 57% โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่มากถึง 150 ไมโครกรัมต่อเครย์ฟิชหนัก 15 กรัม ต่อตัว หรือประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเครย์ฟิช 1 กรัม ซึ่งถือว่ามากกว่าปริมาณอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ถึงหนึ่งเท่า (งานวิจัยนี้ใช้ dsRNA 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถยับยั้งยีนเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.4 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *LvHcB* ในเนื้อเยื่อตับของกุ้งที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *LvHcB* แบบจำเพาะ โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR เพื่อตรวจสอบผลของการฉีด dsRNA ที่มีต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *LvHcB* แต่ละแถบสีขาวในภาพเจลแสดงถึง cDNA จากกุ้งแต่ละตัว ด้วยการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ ปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม โดยขนาดกุ้งที่ใช้คือ 3 ± 0.1 กรัม ทั้งนี้ยีนที่ใช้เป็นยีนควบคุม การแสดงออก คือ ยีน *EF1- α* ซึ่งจะใช้เพื่อบ่งบอกปริมาณ cDNA ที่เท่ากันในแต่ละตัวอย่าง กราฟแท่งแสดงถึงค่าเฉลี่ยของการแสดงออกสัมพัทธ์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ได้จากการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4.5 การตรวจสอบความจำเพาะของอาร์เอ็นเอสายคู่ *LvHcB* dsRNA ต่อการแสดงออกยีนในกลุ่ม type III copper protein ด้วย semi-quantitative RT-PCR

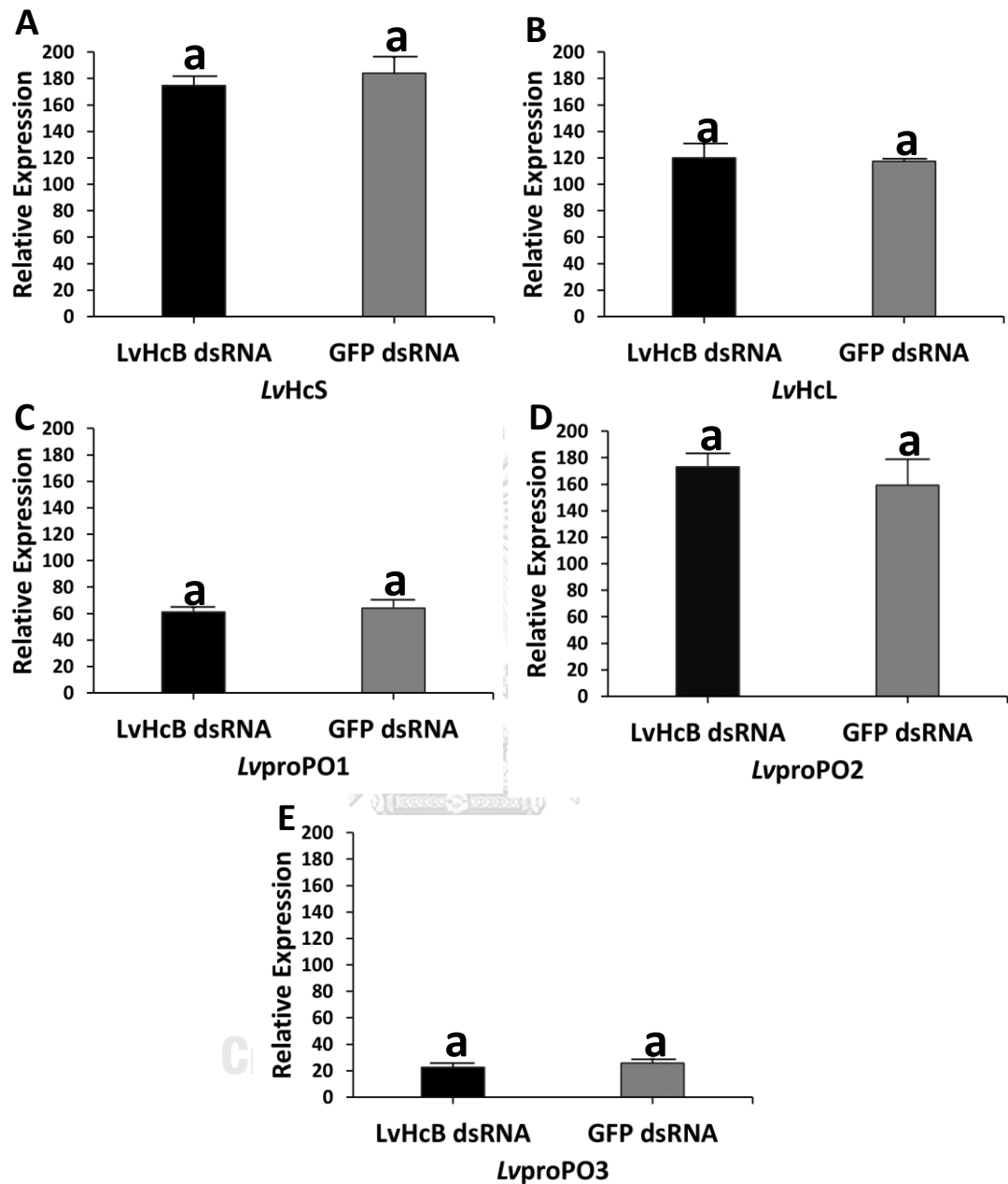
เพื่อทดสอบผลของอาร์เอ็นเอสายคู่ *LvHcB* dsRNA ต่อการแสดงออกของยีน type III copper protein ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินซิส ได้แก่ ยีนของโปรตีนฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย-L (*LvHcL*) ยีนของโปรตีนฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย-S (*LvHcS*) ยีนของโปรตีนโพรฟีนอลออกซิเดส-1

(LvproPO1) ยีนของโปรตีนโพรพีนอลออกซิเดส-2 และ ยีนของโปรตีนโพรพีนอลออกซิเดส-3 (LvproPO3)

ผลจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน LvHcL LvHcS และ LvproPO3 ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อตับ (hepatopancreas) ของกุ้ง ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแต่ละยีน และใช้ยีน elongation factor 1-alpha (EF1 α) ซึ่งเป็นยีน housekeeping gene หรือยีนที่มีการแสดงออกปกติในทุกสภาวะ ใช้เป็นยีนควบคุมเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในการทดลอง ผลการทดลองพบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcS (รูปที่ 4.5A) LvHcL (รูปที่ 4.5B) และยีนโพรพีนอลออกซิเดส LvproPO3 (รูปที่ 4.5E) ในเนื้อเยื่อตับของกุ้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือด (hemocyte) ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA พบว่าไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนโพรพีนอลออกซิเดส LvproPO1 (รูปที่ 4.5C) และ LvproPO2 (รูปที่ 4.5D) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA สามารถนำไปใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน LvHcB ต่อความเกี่ยวข้องกับระบบโพรพีนอลออกซิเดส และการเกิดเมลานินซิสในกุ้งได้

ในปี 2015 Jearaphunt และคณะ ได้ศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน serine proteinase homologues (SPHs) ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลายในระบบภูมิคุ้มกัน Jearaphunt และคณะ ได้ทำการทดลองลดการแสดงออกของยีน PmMasSPH1 และ PmMasSPH2 ด้วยเทคนิค RNAi พบว่าการลดการแสดงออกของยีน PmMasSPH1 มีผลทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรพีนอลออกซิเดส ได้แก่ ยีน PmPPAE2 (proPO-activating enzyme) ซึ่งเป็น serine proteinase ในระบบโพรพีนอลออกซิเดส และยีนของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ได้แก่ ยีน PenmonPEN3 PenmonPEN5 crustinPm1 และ Crus-likePm มีการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอลดลง งานวิจัยนี้ยังพบว่าโปรตีน PmMasSPH1 มีการทำอันตรกิริยากับโปรตีน PmPPAE2 และนอกจากนี้ทั้งสองยีน PmMasSPH1 และ PmMasSPH2 สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์โพรพีนอลออกซิเดส (PO activity) ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย peptidoglycan ของแบคทีเรียแกรมบวก จึงสรุปได้ว่า ยีน PmMasSPH ทั้งสองยีนมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของระบบโพรพีนอลออกซิเดส ในกุ้ง ในปีถัดมา Sangsuriya และคณะ (2016) ได้ศึกษา ยีน serine proteinase inhibitors ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เรียกว่า PmPacifastin-like ด้วย

การใช้ RNAi ลดการแสดงออกของยีน ซึ่ง Sangsuriya และคณะ พบว่าการลดการแสดงออกของยีน *PmPacifastin-like* ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) เพิ่มขึ้น และมีผลให้การแสดงออกของยีน *PmPPAE2* (proPO-activating enzyme) ลดลง และนอกจากนี้การลดการแสดงออกของยีนโปรฟีนอลออกซิเดส *PmproPO1* และ *PmproPO2* มีผลให้ยีน *PmPacifastin-like* ลดการแสดงออกด้วยเช่นกัน แสดงว่า *PmPacifastin-like* มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเชิงลบของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส การใช้ RNAi เป็นวิธีที่แพร่หลายในการศึกษาหน้าที่ของยีนในด้านภูมิคุ้มกันของครัสเตเชียน ซึ่ง Saponpong และคณะ (2018) ได้ใช้ RNAi ศึกษาการทำงานของยีน DEAD-box polypeptide 41 ในกิ้งกูดดำ (*P. monodon*) หรือเรียกว่า *PmDDX41* ซึ่งเป็นยีนของ DNA receptor บริเวณ cytosol ของเซลล์ การลดการแสดงออกของ *PmDDX41* นอกจากทำให้กุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตีเอ็นเอ WSSV (white spot syndrome virus) ตายอย่างรวดเร็วแล้ว ยังทำให้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันลดลงอีกด้วย ซึ่งยีนที่มีการแสดงออกลดลง ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction pathway ดังนี้ *PmIKK β* *PmIKK ϵ* *PmRelish* *PmCactus* *PmDorsal* และยีนที่เกี่ยวข้องกับเพปไทด์ต้านจุลชีพ ดังนี้ *PmPEN3* *PmPEN5* และ *ALFPm6* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *PmDDX41* มีหน้าที่ในการทำงานต่อต้านไวรัส และเป็นส่วนหนึ่งของ DNA-sensing pathway ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของยีนภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ทั้งนี้ การใช้ RNAi เป็นวิธีที่มีความแม่นยำจึงเป็นวิธีที่งานวิจัยมากมายเลือกใช้เพื่อศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนเป้าหมายรวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกัน



รูปที่ 4.5 ระดับการแสดงออกของยีน (A) *LvHcS* (B) *LvHcL* (C) *LvproPO1* (D) *LvproPO2* และ (E) *LvproPO3* ในเนื้อเยื่อต้นและเมล็ดเลือดของกุ่มที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *LvHcB* แบบจำเพาะด้วยการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ่ม 1 กรัม โดยขนาดกุ่มที่ใช้คือ 3 ± 0.1 กรัม นำตัวอย่างต้นและเมล็ดเลือดมาสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน (ตารางที่ 3.2) ยีนที่ใช้เป็นยีนควบคุมการแสดงออก คือ ยีน *EF1- α* ซึ่งใช้เพื่อบ่งบอกปริมาณ cDNA ที่เท่ากันในแต่ละตัวอย่าง กราฟแท่งแสดงถึงค่าเฉลี่ยของ

การแสดงผลค่าสัมพัทธ์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ได้จากการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

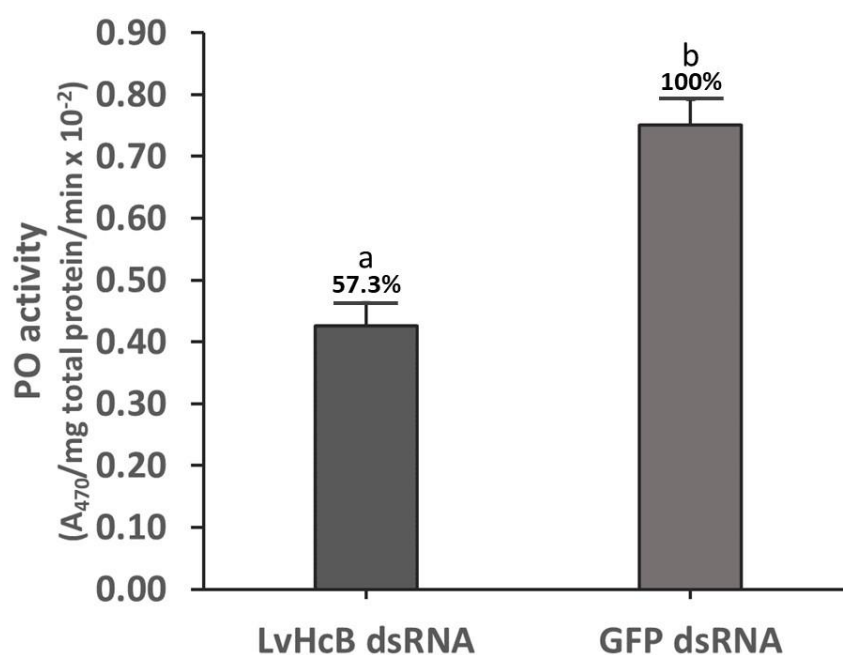
4.6 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB

เพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ต่อระบบโพรฟีนอลออกซิเดส โดยทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ในเลือดของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ด้วยการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA จากนั้นจึงเก็บเลือดกุ้งและเตรียมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในสารละลายบัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0) และทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบบรูดฟอร์ด (Bradford's method) โดยใช้โดพามีน (dopamine) ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีความจำเพาะต่อการตรวจปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

ผลจากการทดลองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มของกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ซึ่งถูกฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA (ตารางที่ 4.1) โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสต่ำกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอ สายคู่ GFP dsRNA ถึง 42.7% (รูปที่ 4.6) ผลจากการทดลองสรุปได้ว่ายีนฮีโมไซยานิน LvHcB เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดสของกุ้ง

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้ศึกษาหน้าที่ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือดของกุ้งขาวแปซิฟิกด้วยการใช้เทคนิค RNAi ซึ่งผลการทดลองนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีนฮีโมไซยานิน LvHcB เกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับผลจากงานวิจัยอื่นที่พบว่า ยีนฮีโมซานิน-2 (GenBank AY193781) ของเครย์ฟิช *Pacifastacus leniusculus* เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) จะทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ (Lee และคณะ, 2004) และในปี 2018 มีงานวิจัยที่พบอีกว่า ยีนฮีโมไซยานิน-1 (GenBank KT725202) ของเครย์ฟิช red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) ก็มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสด้วยเช่นกัน (Qin และคณะ, 2018) โดยลำดับกรดอะมิโนของยีนนี้มี ความเหมือนกับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน HcB ของกุ้งขาวอยู่ 67.72% และยังจัดอยู่ในกลุ่มหน่วยย่อยฮีโมไซยานินชนิดบีตา (Zeng, 2016) เหมือนกัน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีนฮีโมไซยานิน HcB ของกุ้งขาวแปซิฟิกกับกรดอะมิโนของ *P. leniusculus* พบว่ามีความคล้ายกับยีนฮีโมไซยานิน-1 (77%) มากกว่ายีนฮีโมไซยานิน-2 (72%) ของเครย์ฟิช

ซึ่งฮีโมไซยานิน-1 สามารถถูกกระตุ้นให้มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย (Lee, Lee และ Söderhäll, 2003) ในขณะที่ฮีโมไซยานิน-2 สามารถถูกกระตุ้นให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ (Lee, Lee และ Söderhäll, 2004) อย่างไรก็ตามฮีโมไซยานินทั้งสองยีนของเครย์ฟิชต่างมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน คือ ต้านเชื้อแบคทีเรียและมีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีนฮีโมไซยานิน HcB มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดของกุ้งขาวแปซิฟิก



รูปที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดของกุ้งกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย LvHcB dsRNA และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย GFP dsRNA กุ้งทั้งสองกลุ่มได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอ 2 ครั้ง แต่ละครึ่งใช้ dsRNA 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม ขนาดกุ้งที่ใช้คือ 3 ± 0.1 กรัม เก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งขาวด้วยการใช้เข็มดูดเลือดออกมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Tris-HCl buffer pH 8.0 ผสมเลือดที่มีโปรตีน 500 ไมโครกรัม กับโดปามีนที่เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยา จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร การทดลองทำซ้ำสามครั้ง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.1 ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (PO activity) จากฮีโมลิมป์ของกุ้งขาวแปซิฟิกที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *LvHcB* ด้วยการฉีด *LvHcB* dsRNA เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีด GFP dsRNA กุ้งทั้งสองกลุ่มได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอ 2 ครั้ง ใช้ dsRNA 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม ขนาดกุ้งที่ใช้คือ 3 ± 0.1 กรัม เก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งขาวด้วยการใช้เข็มดูดเลือดออกมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Tris-HCl buffer pH 8.0 ผสมเลือดที่มีโปรตีน 500 ไมโครกรัม กับโดปามีนที่เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยา จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร การทดลองทำซ้ำสามครั้ง ตารางแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การยับยั้งการแสดงออก	PO activity ($\Delta A_{470}/\text{mg total protein}/\text{min}$)
<i>LvHcB</i> dsRNA	0.43 ± 0.037
GFP dsRNA	0.76 ± 0.041

4.7 การตรวจสอบการเกิดเมลานินในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB*

ในการทดลองเพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* ต่อการเกิดเมลานินของกุ้งขาวแปซิฟิก ได้ทำการตรวจวัดการเกิดเมลานิน (melanosis) โดยการวัดสีเปลือกกุ้งด้วยเครื่องโครมามิเตอร์ (Chroma meter) โดยเริ่มจากแบ่งกุ้งออกเป็น 3 กลุ่ม กุ้งกลุ่มที่ 1 คือกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* ด้วยการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ *LvHcB* dsRNA กุ้งกลุ่มที่ 2 คือกุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA และกุ้งกลุ่มที่ 3 คือกุ้งกลุ่มควบคุมที่แช่ด้วยสารละลาย 2% โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite; SMS) หลังจากนั้นเก็บรักษากุ้งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดสีเปลือกกุ้งทั้งบริเวณส่วนหัวและส่วนตัวกุ้งด้วยเครื่องโครมามิเตอร์ ทำการคำนวณหาค่าความต่างสี (ΔE) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (กุ้งกลุ่มที่ 2) คือ กลุ่มที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (กุ้งกลุ่มที่ 3) คือ กุ้งที่แช่ด้วย 2% โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ โดยในการทดลองนี้ ค่า ΔE แสดงถึงระดับความแตกต่างของสีในวันที่ 0 และวันที่ 7 หลังการแช่เย็น และเนื่องจากเมลานินมีสีเข้ม การเพิ่มขึ้นของค่า ΔE จึงบ่งบอกถึงความเข้มหรือค่าที่มากขึ้นของสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 4.2 ค่าความแตกต่างสีบริเวณหัวกุ้งและตัวกุ้งของแต่ละกลุ่มการทดลองหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน SMS กุ้งกลุ่มที่ฉีด LvHcB dsRNA และ GFP dsRNA ได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอ 2 ครั้ง ใช้ dsRNA 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม ขนาดกุ้งที่ใช้คือ 21 ± 2 กรัม โดยการฉีดครั้งที่สองห่างจากครั้งแรก 24 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงต่อจนครบ 48 ชั่วโมง กุ้งกลุ่มควบคุมที่แช่ sodium metabisulfite (SMS) เข้มข้น 2%w/v กุ้งจะถูกทำให้สลบด้วยการแช่เย็นแล้วจึงนำกุ้งมาแช่ในสารละลาย SMS (4 °C) นาน 5 นาที จากนั้นจึงวัดสีกุ้งทั้งสามกลุ่มและนับเป็นวันที่ 0 หลังการแช่เย็น จากนั้นเก็บรักษากุ้งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดสีอีกครั้งแล้วนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความแตกต่างสี การทดลองทำซ้ำสามครั้ง และค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การยับยั้งการแสดงออก	ค่าความแตกต่างสี (ΔE)	
	หัว	ตัว
การฉีด LvHcB dsRNA	15.40 ± 0.45	5.21 ± 0.93
การฉีด GFP dsRNA	8.45 ± 1.65	5.87 ± 0.60
การแช่ 2% sodium metabisulfite	5.34 ± 0.26	4.12 ± 0.13

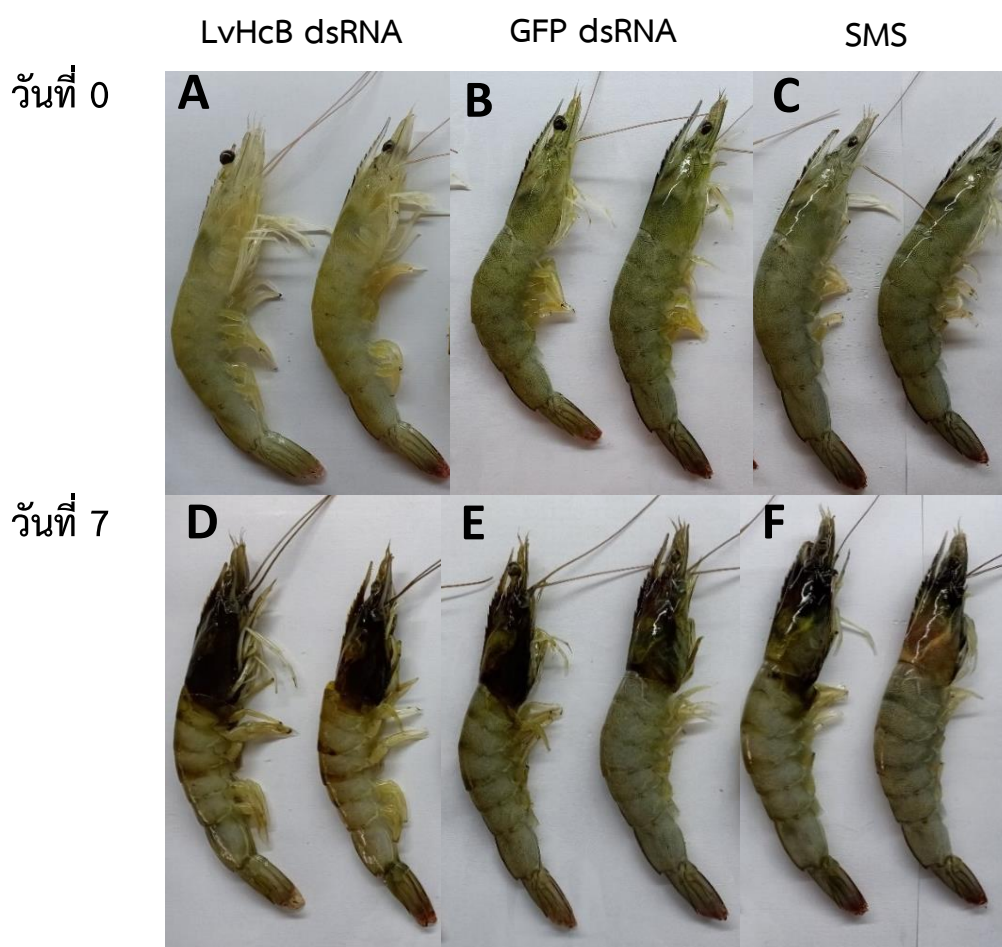
ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อวิเคราะห์ค่าสีบริเวณส่วนหัว และลำตัวกุ้งในกุ้งกลุ่มทดลองที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA (กุ้งกลุ่มที่ 1) มีค่าความต่างสีที่ส่วนหัวและตัวเท่ากับ 15.40 และ 5.21 ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA (กุ้งกลุ่มที่ 2) มีค่าความต่างสีที่ส่วนหัวและตัวเท่ากับ 8.45 และ 5.87 ตามลำดับ และกุ้งกลุ่มควบคุมที่แช่ด้วยสารละลาย 2% โซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (กุ้งกลุ่มที่ 3) มีค่าความต่างสีที่ส่วนหัวและตัวเท่ากับ 5.34 และ 4.12 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ดังปรากฏในรูปถ่ายหลังแช่เย็นกุ้งในวันที่ 7 (รูปที่ 4.7) จากผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้ บริเวณส่วนหัวของกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่า (15.40) ค่าของกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (8.45 และ 5.34) (รูปที่ 4.8) สรุปได้ว่ายีนฮีโมไซยานิน LvHcB ไม่มีผลต่อการเกิดเมลานินในกุ้งขาวแปซิฟิก

อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่าค่าความต่างสีเมลานินในส่วนหัวของกุ้งในวันที่ 7 ของกลุ่มที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA (8.54) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA (5.87) สาเหตุการเพิ่มขึ้นของเมลานิน อาจเกิดจากมีการเพิ่มการกระตุ้นการทำงานของกิจกรรมฟีนอลออกซิเดสในหัวกุ้ง ผ่านการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสของจุลินทรีย์ที่

มีมากขึ้นเนื่องจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB ทำให้กุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ลดลง (ฟินอลออกซิเดสลดลง) ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียมีมากขึ้น ทั้งนี้ งานวิจัยนี้ยังต้องการการทดลองเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของเมลานินและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อของกุ้งขาว แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีงานวิจัยที่รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างฟินอลออกซิเดสที่ลดลงกับการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรีย โดยในปี 2009 Fagutao และคณะ ได้ลดการแสดงออกของยีนโพรฟินอลออกซิเดส proPO ในกุ้งครุมา (*Marsupenaeus japonicus*) ด้วยเทคนิค RNAi interference และพบว่ากุ้งครุมาที่มีกิจกรรมฟินอลออกซิเดสลดลงมากถึง 80% ประกอบกับมีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในวันที่ 3 และ 7 หลังการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ proPO dsRNA แม้ว่าไม่มีการใส่เชื้อใด ๆ เพิ่มในการทดลองนี้เลย จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นของกุ้งครุมา พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในจิ้นส (genus) *Vibrio* (80%) และแบคทีเรียตระกูล (family) *Enterobacteriaceae* นอกจากนี้ งานวิจัยของ Liu และคณะ (2007) ได้พบว่าเครย์ฟิช *P. leniusculus* ที่ได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ proPO dsRNA มีกิจกรรมฟินอลออกซิเดส ลดลง 33% จากนั้นได้ฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (4×10^6 CFU/ml) ซึ่งเป็นผลให้มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นถึง 2.3 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA ร่วมกับเชื้อ การเพิ่มขึ้นของเชื้อใช้เวลาเพียง 3 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการลดลงของกิจกรรมฟินอลออกซิเดส มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว ดังนั้น การลดลงของกิจกรรมฟินอลออกซิเดสในกุ้งขาวที่ฉีดด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ LvHcB dsRNA ถึงแม้จะไม่มีผลต่อ การเกิดเมลานินแต่อาจทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียของกุ้งขาวแปซิฟิกเพิ่มขึ้นได้เมื่อเทียบกับกลุ่มอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อแบคทีเรียนี้อาจมีผลต่อไปจนถึงช่วงหลังการตายของกุ้ง (Kaspar และ Tamplin, 1993; Leroi และ Joffraud, 2011) ซึ่งผลจากการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียอาจทำให้มีเอนไซม์โปรตีเอสในปริมาณสูงและนำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของโพรฟินอลออกซิเดสและฮีโมไซยานินที่ทำหน้าที่ในการสร้างเมลานินให้มีการกระตุ้นการเกิดเมลานินในกุ้งขาวได้

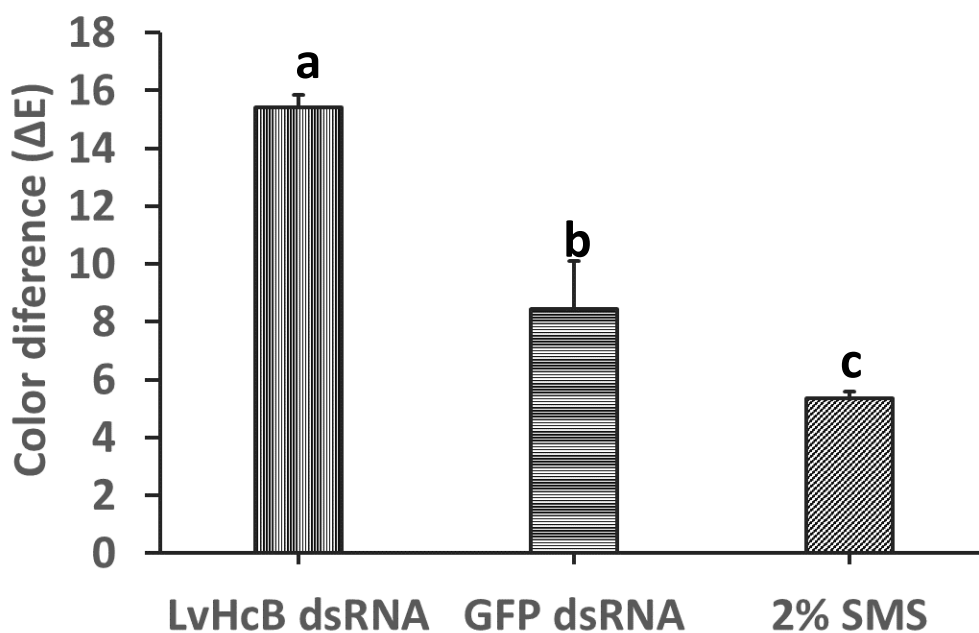
ถึงแม้มีรายงานการศึกษาความเกี่ยวข้องของยีนฮีโมไซยานิน (García-Carreño และคณะ, 2008; Coates และ Nairn, 2013) และโพรฟินอลออกซิเดส (Gimenez และคณะ 2010; Zamorano และคณะ, 2009; Ali และคณะ, 1994) ต่อการเกิดเมลานินในกุ้งหลายชนิด (Martínez-Alvarez และคณะ, 2008; Perdomo-Morales และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีรายงานยืนยันที่แน่ชัดว่ายีนฮีโมไซยานิน และยีนโพรฟินอลออกซิเดสเป็นยีนที่สำคัญต่อการควบคุมการเกิดเมลานินในกุ้ง นอกจากนั้นทั้งสองโปรตีนประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย เช่น

ยีนฮีโมไซยานิน หน่วยย่อย L หน่วยย่อย S หน่วยย่อย B และโพรพีนอลออกซิเดส (proPO1, proPO2 และ proPO3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกการเกิดเมลานินเป็นกลไกที่ซับซ้อน อาจจะมีการทำงานของโปรตีนหลายชนิดในการควบคุมการเกิดกลไกนี้ อย่างไรก็ตามหน้าที่ของฮีโมไซยานิน LvHcB ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานิน แต่มีความเกี่ยวข้องับระบบโพรพีนอลออกซิเดสซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญในการต้านโรคของกุ้งขาวแปซิฟิก

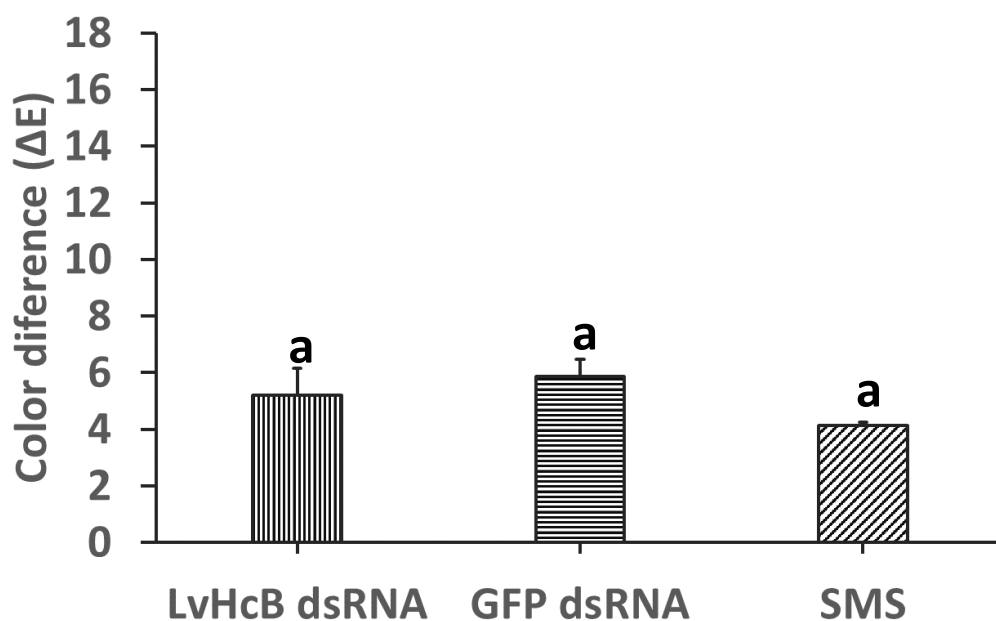


รูปที่ 4.7 การเกิดเมลานินของกุ้งขาวแปซิฟิกวันที่ 0 (A-C) และวันที่ 7 (D-F) หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C A และ D คือกลุ่มการทดลองที่ได้รับ LvHcB dsRNA รูป B และ E ได้รับ GFP dsRNA และ รูป C และ F คือกลุ่มที่ถูกแช่ใน 2% SMS กุ้งกลุ่มที่ฉีด LvHcB dsRNA และ GFP dsRNA ได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอ 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ dsRNA 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม ขนาดกุ้งที่ใช้คือ 21 ± 2 กรัม กุ้งกลุ่มควบคุมที่แช่ sodium metabisulfite (SMS) เข้มข้น 2%w/v กุ้งจะถูกทำให้สลบด้วยการแช่เย็นแล้วจึงนำกุ้งมาแช่ในสารละลาย SMS (4 °C) นาน 5 นาที จากนั้นจึงวัดสีกุ้งทั้งสามกลุ่มและนับเป็นวันที่ 0

หลังการแช่เย็น จากนั้นเก็บรักษากุ้งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดสีอีกครั้ง แล้วนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความแตกต่างสี การทดลองทำซ้ำสามครั้ง และกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.8 ค่าความต่างสี (ΔE) บริเวณหัว (cephalothorax) ของกุ้งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน กุ้งกลุ่มที่ฉีด LvHcB dsRNA และ GFP dsRNA ได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอ 2 ครั้ง แต่แต่ละครั้งใช้ dsRNA 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม ขนาดกุ้งที่ใช้คือ 21 ± 2 กุ้ง กลุ่มควบคุมที่แช่ sodium metabisulfite (SMS) เข้มข้น 2%w/v กุ้งจะถูกทำให้สลบด้วยการแช่เย็นแล้วจึงนำกุ้งมาแช่ในสารละลาย SMS (4 °C) นาน 5 นาที จากนั้นจึงวัดสีกุ้งทั้งสามกลุ่มและนับเป็นวันที่ 0 หลังการแช่เย็น จากนั้นเก็บรักษากุ้งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดสีอีกครั้งแล้วนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความแตกต่างสี การทดลองทำซ้ำสามครั้ง และกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.9 ค่าความต่างสี (ΔE) บริเวณตัว (abdomen) ของกิ้งหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน กิ่งกลุ่มที่ฉีด LvHcB dsRNA และ GFP dsRNA ได้รับการฉีดอาร์เอ็นเอ 2 ครั้ง กิ่งกลุ่มควบคุมที่แช่ sodium metabisulfite (SMS) เข้มข้น 2%w/v กิ่งจะถูกทำให้สลบด้วยการแช่เย็นแล้วจึงนำกิ่งมาแช่ในสารละลาย SMS (4 °C) นาน 5 นาที จากนั้นจึงวัดสีกิ่งทั้งสามกลุ่มและนับวันที่ 0 หลังการแช่เย็น จากนั้นเก็บรักษากิ่งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดสีอีกครั้งแล้วนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความแตกต่างสี การทดลองทำซ้ำสามครั้ง และกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* ในกุ้งขาวแปซิฟิก (*L. vannamei*) ต่อความเกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินซิส ด้วยการใช้อาร์เอ็นเอ อินเทอร์เฟอเรนซ์ (RNA interference) เพื่อลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย จากผลการทดลอง พบว่าการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ *LvHcB* dsRNA เข้ากล้ามเนื้อกุ้งสามารถลดปริมาณทรานสคริปต์ของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* ได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพโดยไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ (type III copper protein) ประกอบด้วยยีนฮีโมไซยานิน *LvHcL* และ *LvHcS* และยีนโพรฟีนอลออกซิเดส *LvproPO1* *LvproPO2* และ *LvproPO3* และพบว่าการลดการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* นี้ มีผลทำให้กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเลือดของกุ้งขาวลดลง แสดงว่ายีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และภูมิคุ้มกันของกุ้ง อย่างไรก็ตาม การฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ *LvHcB* dsRNA ไม่มีผลทำให้ค่าสีการเกิดเมลานินซิสลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ GFP dsRNA แสดงว่ายีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* ไม่มีผลต่อการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาวแปซิฟิก ดังนั้น จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า RNAi สามารถลดการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* ได้อย่างมีประสิทธิภาพและแม่นยำ และยีนฮีโมไซยานิน *LvHcB* มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินซิสแต่ไม่มีผลต่อการเกิดเมลานินซิส

5.2 ข้อเสนอแนะ

การฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ *LvHcB* dsRNA ในการศึกษาครั้งนี้ มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อการศึกษาหน้าที่ของยีนในกุ้ง ดังนั้น เทคนิคอาร์เอ็นเออินเทอร์เฟอเรนซ์ (RNAi) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนอื่น ๆ เช่น ยีนฮีโมไซยานิน *LvHcL* และ *LvHcS* ต่อความเกี่ยวข้องกับการเกิดเมลานินซิสในกุ้งได้ในอนาคต

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาษาไทย

กระทรวงสาธารณสุข. 1984. วัตถุประสงค์อาหาร. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 84) พ.ศ. 2527.

กระทรวงสาธารณสุข. 2018. คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 389 พ.ศ. 2561 เรื่อง วัตถุประสงค์อาหาร (ฉบับที่ 5).

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2015. สถิติผลผลิต การเลี้ยงกุ้งทะเลประจำปี 2556. Vol. 4.

กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2020. สถิติ ผลผลิตการเลี้ยงกุ้งทะเลประจำปี 2561.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). n.d. การเลี้ยงกุ้งของไทย. คลังข้อมูล สารสนเทศระดับภูมิภาค (ภาคใต้). <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/shrimp/history/01-03.php>.

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2013. เลี้ยงกุ้งทะเลในระบบปิด. จันทบุรี.

ภาษาอังกฤษ

Adachi, K., Endo, H., Watanabe, T., Nishioka, T. and Hirata, T. 2005. Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: Enzymatic properties and immunolocalization. *Pigment Cell Research*, 18: 136–143.

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. and Mukherjee, S. K. 2003. RNA Interference: Biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 67: 657–685.

Ai, H., Huang, Y., Li, S., Weng, S., Yu, X. and He, J. 2008. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 25:

28–39.

- Ai, H., Liao, J., Huang, X., Yin, Z., Weng, S., Zhao, Z., Li, S., Yu, X. and He, J. 2009. A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 33: 59–68.
- Ali, M. T., Gleeson, R. A., Wei, C. I. and Marshall, M. R. 1994. Activation mechanisms of pro-phenoloxidase on melanosis development in florida spiny lobster (*Panulirus argus*) cuticle. *Journal of Food Science*, 59: 1024–1030.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W. and Tassanakajon, A. 2009. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33: 247–256.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W. and Tassanakajon, A. 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, 34: 990–1001.
- Andersen, S. O., Peter, M. G. and Roepstorff, P. 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113: 689–705.
- Andersen, S. O. 2010. Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 166–178.
- Andrade, L. T., Araújo, N. G., Ventura, A. P. M., Lira, A. L., Magnani, M. and Cavaleiro, J. M. O. 2015. Standardization of sodium metabisulfite solution concentrations and immersion time for farmed shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Ciência Rural*, 45: 499–504.
- Ashida, M. and Brey, P. T. 1995. Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 10698–10702.

- Atkinson, D. A., Sim, T. and Grant, J. 1994. Sodium metabisulfite and SO₂ release: An underrecognized hazard among shrimp fishermen. *Annals of Allergy*, 71: 563–566.
- Bailey-Brock, J. H. and Moss, S. M. 1992. Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. In A. W. Fast and L. J. Lester (ed.), Marine Shrimp Culture: Principle and Practices. Elsevier B.V. pp. 9–27.
- Bartolo, I. and Birk, E. O. 1998. Some factors affecting norway lobster (*Nephrops norvegicus*) cuticle polyphenol oxidase activity and blackspot development. *International Journal of Food Science & Technology*, 33: 329–336.
- Bono, G., Badalucco, C., Corrao, A., Cusumano, S., Mammina, L. and Palmegiano, G. B. 2010. Effect of temporal variation, gender and size on cuticle polyphenol oxidase activity in deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry*, 123: 489–493.
- Boone, L. 1931. Anomuran, macruran crustacea from Panama and canal zone. Bulletin American Museum of Natural History. New York: The American Museum of Natural History.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. 2004. Introductions and Movement of Penaeus Vannamei and Penaeus Stylirostris in Asia and the Pacific. 10th ed. Bangkok: RAP Publication.
- Burmester, T. 2002. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 172: 95–107.
- Carmen, G. M., Óscar, M., Argimiro, L. and Pilar, M. 2005. Melanosis Inhibition and SO₂

- residual levels in shrimps (*Parapenaeus longirostris*) after different sulfite-based treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1143–1148.
- Cerenius, L., Lee, B. L. and Söderhäll, K. 2008. The proPO-system: Pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29: 263–271.
- Cerenius, L, and Soderhall K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198 : 116–126.
- Chomwong, S., Charoensapsri, W., Amparyup, P. and Tassanakajon, A. 2018. Two host gut-derived lactic acid bacteria activate the proPO system and increase resistance to an AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 89: 54–65.
- Coates, C. J. and Nairn, J. 2013. Hemocyanin-derived phenoloxidase activity: A contributing factor to hyperpigmentation in *Nephrops norvegicus*. *Food Chemistry*, 140: 361–369.
- Cobb, B. F. 1977. Biochemistry and physiology of shrimp: Effect on use as food in Proceedings of the Conference on the Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. Tropical Products Institute London. pp. 405–411.
- Corteel, M., Nauwynck, H. J., Sorgeloos, P. and Alday-Sanz, V. 2013. White spot syndrome virus infection in *P. vannamei* and *M. rosenbergii*: Experimental studies on susceptibility to infection and disease. Ghent University, Belgium.
- Dall, W., Hill, J., Rothlisberg, P. C. and Sharples, D. 1990. The biology of penaeidae. Advances of Marine Biology. New York, USA: Academic Press. pp. 489.
- Dattner, M. and Bohn, D. 2016. Characterization of print quality in terms of colorimetric aspects. In J. Izdebska and S. Thomas (ed.), Printing on Polymers. William Andrew Publishing. pp. 329–345.
- Decker, H., Hellmann, N., Jaenicke, E., Lieb, B., Meissner, U. and Markl, J. 2007. Minireview: Recent progress in hemocyanin research. *Integrative and*

Comparative Biology, 47: 631–644.

Decker, H. and Jaenicke, E. 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 673–687.

Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P. and Bachère, E. 2001. Crustacean immunity: Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 47070–47077.

Fagutao, F. F., Koyama, T., Kaizu, A., Saito-Taki, T., Kondo, H., Aoki, T., and Hirono, I. 2009. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *The FEBS Journal*, 276: 5298–5306.

FAO. 2006. Cultured aquatic species information programme. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en#tcNA015E.

FAO. 2020. Global production statistics 1950-2018. *FAO Aquaculture, Capture and Global Production Databases*. Rome.

Feinberg, E. H., and Hunter, C. P. 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301: 1545–1548.

Ferrer, O. J., Koburger, J. A., Otwell, W. S., Gleeson, R. A., Simpson, B. K. and Marshall, M. R. 1989. Phenoloxidase from the cuticle of florida spiny lobster (*Panulirus argus*): mode of activation and characterization. *Journal of Food Science*, 54: 63–67.

García-Carreño, F. L., Cota, K., and Navarrete del Toro, M. A. 2008. Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: Conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6454–6459.

- García-Molina, F., Peñalver, M. J., Fenoll, L. G., Rodríguez-López, J. N., Varón, R., García-Cánovas, F. and Tudela, J. 2005. Kinetic study of monophenol and o-diphenol binding to oxytyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32: 185–192.
- Gimenez, B., Alvarez, O. M., Montero, P. and Gomez-Guillen, M. 2010. Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *LWT - Food Science and Technology*, 43.
- Gokoglu, N. and Yerlikaya, P. 2008. Inhibition effects of grape seed extracts on melanosis formation in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *International Journal of Food Science & Technology*, 43: 1004–8.
- Gonçalves, A. A. and Oliveira, A. R. M. 2016. Melanosis in crustaceans: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 65: 791–99.
- Green, J. and Gordon, I. 2018. Crustacean. *Encyclopædia Britannica*. Encyclopædia Britannica, inc.
- Haard, N. F. and Simpson, B. K. 2000. Seafood Enzymes : Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality. Marcel Dekker, Inc.
- Hajek, A. E. and St. Leger. R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39: 293–322.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in drosophila cells. *Nature*, 404: 293–296.
- Jaenicke, E. and Decker, H. 2003. Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochemical Journal*, 371: 515–523.
- Jearaphunt, M., Amparyup, P., Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Senapin, S. and Tassanakajon, A. 2015. Shrimp serine proteinase homologues *PmMasSPH-1* and -

2 play a role in the activation of the prophenoloxidase system. *PLoS ONE*, 10: 1–20.

Johnson, J. G., Burnett, L. E. and Burnett, K. G. 2016. Uncovering hemocyanin subunit heterogeneity in penaeid shrimp using RNA-Seq. *Integrative and Comparative Biology*, 56: 1080–1091.

Johnson, J. G., Paul, M. R., Kniffin, C. D., Anderson, P. E., Burnett, L. E. and Burnett, K. G. 2015. High CO₂ alters the hypoxia response of the pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) transcriptome including known and novel hemocyanin isoforms. *Physiological Genomics*, 47: 548–558.

Kaspar, C. W., and Tamplin, M. L. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2425–2429.

Koburger, J. A., Miller, M. and Otwell, W. S. 1985. Thawed lobster tails: Some quality changes in Proceeding of the Tenth Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas. Texas A&M Sea Grant, College Station.

Konica minolta. 2018. What is CIE 1976 lab color space? - Konica Minolta color, light, and display measuring instruments. <https://sensing.konicaminolta.asia/what-is-cie-1976-lab-color-space/>.

Krishnan, P., Gireesh-Babu, P., Rajendran, K. V. and Chaudhari, A. 2009. RNA Interference-based therapeutics for shrimp viral diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86: 263–272.

Kumar, S., Christophides, G. K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y. S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F. C. and Barillas-Mury, C. 2003. The role of reactive oxygen species on plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae* in Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (SUPPL. 2). 14139–14144.

- Lee, S. Y., Lee, B. L. and Söderhäll, K. 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 7927–7933.
- Lee, S. Y., Lee, B. L. and Söderhäll, K. 2004. Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322: 490–496.
- Leger, R. J. S., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52: 459–470.
- Lei, K., Li, F., Zhang, M., Yang, H., Luo, T. and Xu, X. 2008. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 808–813.
- Leroi, F. and Joffraud, J. J. 2011. Microbial degradation of seafood. *Aquaculture Microbiology and Biotechnology*, 2: 47–72.
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B. and Mezzetti, B. 2017. New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1418. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Bok, L. L., Söderhäll, I. and Söderhäll, K. 2007. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 33593–33598. CHULALONGKORN UNIVERSITY
- Louisiana Fisheries Forward. 2018. Avoiding Sulfite Abuse. Louisiana.
- Lu, X., Lu, H., Guo, L., Zhang, Z., Zhao, X., Zhong, M., Li, S. and Zhang, Y. 2015. Cloning and characterization of a novel hemocyanin variant LvHMCV4 from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 46: 398–405.
- Markl, J. and Decker, H. 1992. Molecular structure of the arthropod hemocyanins BT -

- blood and tissue oxygen carriers. In C. P. Mangum (ed.), Advances in Comparative and Environmental Physiology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp. 325–376.
- Marshall, M. and Otwell, W. S. 1986. Influence of washing and cooking on sulfite residuals on treated shrimp. Studies on the Use of Sulfites to Control Shrimp Melanosis (Blackspot). pp. 11–18.
- Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, C. and Montero, P. 2008. Presence of hemocyanin with diphenoloxidase activity in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) postmortem. *Food Chemistry*, 107: 1450–1460.
- Martínez-Alvarez, O., Montero, P. and Gómez-Guillén, M. C. 2005. Controlled atmosphere as coadjuvant to chilled storage for prevention of melanosis in shrimps (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology*, 220: 125–130.
- Martínez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. and Tuschl, T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110: 563–574.
- Martínez-Alvarez, O., López-Caballero, M. E., Montero, P. and Gómez-Guillén, M. C. 2007. Spraying of 4-hexylresorcinol based formulations to prevent enzymatic browning in norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) during chilled storage. *Food Chemistry*, 100: 147–155.
- Maruekawong, K., Tirasophon, W., Panyim, S. and Attasart, P. 2018. Involvement of LvSID-1 in dsRNA uptake in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 482: 65–72.
- Masuda, T., Otomo, R., Kuyama, H., Momoji, K., Tonomoto, M., Sakai, S., Nishimura, O., Sugawara, T. and Hirata, T. 2012. A novel type of prophenoloxidase from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* contributes to the melanization of plasma in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 61–68.
- Mendoza-Porras, O., Kamath, S., Harris, J. O., Colgrave, M. L., Huerlimann, R., Lopata, A.

- L. and Wade, N. M. 2020. Resolving hemocyanin isoform complexity in haemolymph of black tiger shrimp *Penaeus monodon* - implications in aquaculture, medicine and food safety. *Journal of Proteomics*, 218.
- Montero, P., Ávalos, A. and Pérez-Mateos, M. 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: Additives and high-pressure treatment. *Food Chemistry*, 75: 317–324.
- Moret, Y. and Moreau, J. 2012. The immune role of the arthropod exoskeleton. *Isj*, 9: 200–206.
- Nappi, A. J. and Christensen, B. M. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 443–459.
- Nirmal, N. P. and Benjakul, S. 2012. Biochemical properties of polyphenoloxidase from the cephalothorax of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *International Aquatic Research*, 4: 1–13.
- Nirmal, N. P., Benjakul, S., Ahmad, M., Arfat, Y. A. and Panichayupakaranant, P. 2015. Undesirable enzymatic browning in crustaceans: Causative effects and its inhibition by phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 1992–2003.
- Ogawa, M., Kurotsu, T., Ochiai, I. and Kozima, T. T. 1983. Mechanism of black discoloration in spiny lobster tails stored in ice. *Bulletin of the Japanese Society Of Scientific Fisheries*, 49: 1065–1075.
- Ogawa, M., Perdigao, N. B., Asntiago, M. E. and Kozima, T. T. 1984. On physiological aspects of black spot appearance in shrimp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50: 1763–1769.
- Otwell, W. S. and Marshall, M. 1986. Screening alternatives to sulfiting agents to control shrimp melanosis. Studies on the Use of Sulfites to Control Shrimp

Melanosis (Blackspot). Florida Sea Grant College. pp. 1–10.

Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Perera, E., Pardo-Ruiz, Z. and Jimenez, E. A. 2008. Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 652–658.

Pérez Farfante, I. and Kensley, B. F. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Paris, France: Memories du Museum National D'Historie Naturelle.

Plaistow, S. J., Outreman, Y., Moret, Y. and Rigaud, T. 2003. Variation in the risk of being wounded: An overlooked factor in studies of invertebrate immune function?. *Ecology Letters*, 6: 489–494.

Qin, Z., Babu, V. S., Wan, Q., Muhammad, A., Li, J., Lan, J. and Lin, L. 2018. Antibacterial activity of hemocyanin from red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 75: 391–399.

Rocheleau, C. E. 2012. RNA interference: Systemic RNAi Sides with endosomes. *Current Biology*, 22: 873–875.

Rodríguez-López, J. N., Tudela, J., Varón, R., García-Carmona, F. and García-Cánovas, F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 3801–3810.

Rotllant, G., Arnau, F., García, J. A., García, N., Rodríguez, M. and Sardà, F. 2002. Effect of metabisulphite treatments and freezing on melanosis inhibition in rose shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Food Science and Technology International*, 8: 243–247.

Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Chomwong, S., Senapin, S., Tassanakajon, A. and Amparyup, P. 2016. A shrimp pacifastin light chain-like inhibitor: Molecular identification and role in the control of the prophenoloxidase system. *Developmental and Comparative Immunology*, 54: 32–45.

- Sappi etc. 2013. Defining and communicating Color : The CIELAB system. Sappi Fine Paper North America.
- Scherbaum, S., Ertas, B., Gebauer, W. and Burmester, T. 2010. Characterization of hemocyanin from the peacock mantis shrimp *Odontodactylus scyllarus* (Malacostraca:Hoplocarida). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180: 1235–1245.
- Sellos, D., Lemoine, S. and Wormhoudt, A. V. 1997. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Letters*, 407: 153–158.
- Simpson, B. K., Marshall, M. R. and Otwell, W. S. 1987. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): Purification and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 918–921.
- Solano, F. 2014. Melanins: Skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 2014: 1–28.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M. and Machonkin, T. E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96: 2563–2606.
- Soponpong, S., Amparyup, P. and Tassanakajon, A. 2018. A cytosolic sensor, PmDDX41, mediates antiviral immune response in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 81: 291–302.
- Sugumaran, M. 1998. Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. In P. D. Evans (ed.), *Advances in Insect Physiology*. Academic Press. 27: 229–334.
- Summers, N. M. 1967. Cuticle sclerotization and blood phenol oxidase in the fiddler crab, *Uca pugnax*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 23: 129–138.
- Tabara, H., Grishok, A. and Mello, C. C. 1998. RNAi in *C. elegans*: Soaking in the genome sequence. *Science*, 282: 430-431.

- Terwilliger, N. B. 1999. Hemolymph proteins and molting in crustaceans and insects. *American Zoologist*, 39: 589–599.
- Terwilliger, N. B., Ryan, M. and Phillips, M. R. 2006. Crustacean hemocyanin gene family and microarray studies of expression change during eco-physiological stress. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 991–999.
- Thorp, J. H. and Rogers, D. C. 2011. Aquatic sow bugs, scuds, and opossum shrimp: subphylum Crustacea, class Malacostraca, superorder Peracarida. In J. H. Thorp and D. C. Rogers (ed.), Field Guide to Freshwater Invertebrates of North America. Boston: Academic Press. pp. 147–156.
- Timmons, L., Court, D. L. and Fire, A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263: 103–112.
- Vally, H. and Misso, N. L. A. 2012. Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 5: 16–23.
- Voorhoeve, P. M. and Agami, R. 2003. Knockdown stands up. *Trends in Biotechnology*, 21: 2–4.
- Wang, J., Janech, M. G. and Burnett, K. G. 2019. Protein-level evidence of novel β -type hemocyanin and heterogeneous subunit usage in the pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in Marine Science*, 6: 1–14.
- Wang, Y. C., Chang, P. S. and Chen, H. Y. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 1161–1177.
- Wyban, J. and Sweeney, J. N. 1991. *Intensive Shrimp Production Technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual*. The Institute.
- Yan, F., Zhang, Y., Jiang, R., Zhong, M., Hu, Z., Du, H., Lun, J., Chen, J. and Li, Y. 2011.

- Identification and agglutination properties of hemocyanin from the mud crab (*Scylla serrata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 354–360.
- Yang, Y., Bao, C., Liu, A., Ye, H., Huang, H. and Li, S. 2014. Immune responses of prophenoloxidase in the mud crab *Scylla paramamosain* against *Vibrio alginolyticus* infection: In vivo and in vitro gene silencing evidence. *Fish and Shellfish Immunology*, 39: 237–244.
- Zamorano, J., Martínez-Álvarez, O., Montero, P. and Gómez-Guillén, M. C. 2009. Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry*, 112: 104–111.
- Zeng, Y. 2016. The cDNA sequence of two hemocyanin subunits from red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their responses to white spot syndrome virus infection. *Journal of Aquatic Animal Health*, 28: 39–45.
- Zhang, X., Huang, C. and Qin, Q. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Research*. 61: 93–99.
- Zhang, Y., Wang, S., Xu, A., Chen, J., Lin, B. and Peng, X. 2006. Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutination characterization. *Journal of Proteome Research*, 5: 815–821.
- Zhang, Y., Yan, F., Hu, Z., Zhao, X., Min, S., Du, Z., Zhao, S., Ye, X. and Li, Y. 2009. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 27: 330–335.

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- Spectrophotometer
- Cuvette
- p1000 micropipette
- p1000 tips

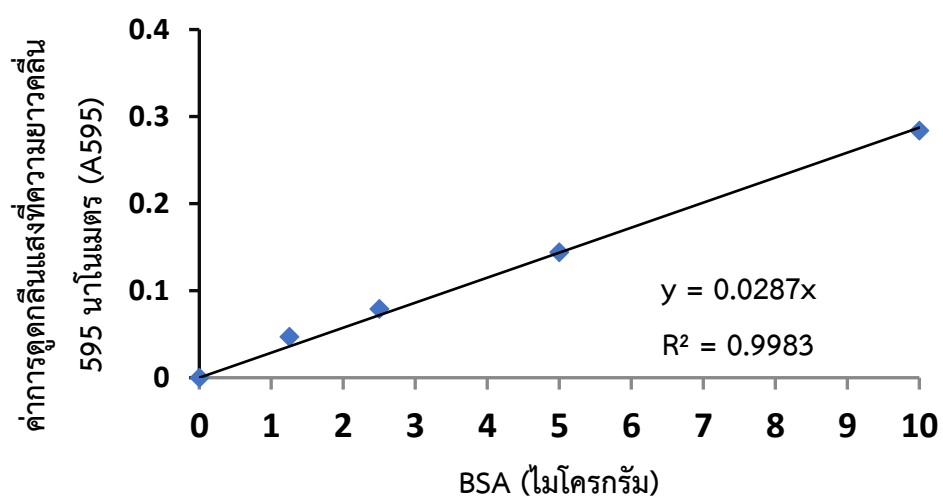
สารเคมี

- 1x Bradford reagent
- Bovine serum albumin 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- Tris-HCl buffer pH 8.0

วิธีการวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่าง

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ใช้โปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin น้ำหนัก 0 1.25 2.5 5 และ 10 กรัม ด้วย การปิเปต Bovine serum albumin เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0 0.625 1.25 2.5 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ เพื่อผสมกับ Bradford reagent 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ต่อมานำค่า A595 และน้ำหนัก BSA ทั้งห้าค่ามาสร้างกราฟ จึงได้เป็นกราฟเส้นตรงที่มีสมการ $y = 0.0287x$ และมีค่า $R^2 = 0.9983$



รูปที่ ก 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน BSA ที่มีน้ำหนัก 0 1.25 2.5 5 และ 10 กรัม (แสดงด้วยจุดสีฟ้าทั้งห้าจุด) กับ Bradford reagent 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (A595) ด้วยเครื่อง spectrophotometer กราฟมาตรฐานมีสมการ $y = 0.0287x$ และค่า $R^2 = 0.9983$

ภาคผนวก ข

ลำดับกรดนิวคลีอิกที่สมบูรณ์ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB

GCCGACGGCACAAGCGGCGCTGCCTGCGCCCCCGAGGCCTGAGGCTCAGAGGGACCT
 CCGAAAGCTCGCCGTTTGAAGCGAAGGAAAAGCCTGGTCTTATCGCGTGTTGCCAAG
 TGCCGCCGGAGGCCATTGAGGCGAGTTCTGTCCTTGCACAGGCTGCAGCGGCGCCCC
 CTCGACGTATAAAGGGCGCGGAGCCCAGCGCTCGCCTTCACTGCCGGCGACATGAAG
 GTGCTGTTCCCTCGCGGTGGCGCTGCTCTCCGCCTCGGGCCTCGCCGAGGACAACCTCGC
 GCACAAGCAGCAGGCGATCAACAGGCTTCTGTACAGGGTGACTGAGCCTCTGCTGTCT
 TCCTTACCGACCTGAAGGAGCTGGCGACGACGTGGGACCCGCGGGCCCACGTGGGGC
 ACTGCAAGGACGGGGCGCCCGCTCGGCCGCTCATGGCCGAGCTGGAGCAAGGGCA
 GCTGCGCGAGAAGAGGCAGTGGTTCTCGCTGTTCAACCCGCGCCAGAGGGAGGAGGCGCTCA
 TGCTGATCCACGTGCTGCTCTCCTGCAAGGACTTCCACACGTTCAAGGGCAACGCGGCCTTCTT
 CCGCGAGCGCATGAACGAGGGCGAGTTCGTGTACGCGCTTACGTGTCCGTCACGCACTCCAA
 GATGACGCAGGAGGTCATCCTGCCTCCGCTCTACGAGGTCACGCCCCACTTGTTACCAACTCG
 GAGGTCATCCGGAAGGCGTACGAGGCCAAGATGCTGCAGACGCCCGGCCGCTTCAGGATGACG
 TTCACCGGCACGCTCAAGAACAGCGAGCAGCGCGTGGCGTACTTCGGCGAGGACATCGGCATG
 AACTCGCACACGTCGACTGGCACATGGACTTCCCCTTCTGGTGGGACGGCGAGCACATCGACC
 GCAAGGGCGAGCTGTTCTTCTGGGCGCACCACCAGCTCACGGCGCGCTTCGACTCCGAGCGCC
 TCTCCAACCACCTGCCCATCGTCGACGAGCTGCACTGGGGGCGCCCCATCGACGAGGGCTTCG
 CGCCCCACACCGTCTACAAGTACGGCGGCGAGTTCGACGCGGCCCGACAACCTCGTGTTCCG
 AGGACGTGGCGGGCGTGGCGCGCTGCGGGACCTCGTGAGATCGACGAGCGCATCCGGGACT
 CGATCGCGCGGGCTTCGTCTACGCCTCCAACGGCAGCGCGATCAGCCTGAGGAACGAGCGCG
 GCATCGACATCCTGGGCGACATCATCGAGTCGTGCGGTGTACAGCGTGAACGAGCAGTACTACGG
 GTCGCTGCACAACCAGGCCACCAGCGTGCTCGGGCGCCAGTCCGACCCGCTGGGCAAGTTCAA
 GATGCCGCCGGGCGTGATGGAGCACTTCGAGACCGCCACCCGCGACCCCGCCTTCTTCCGCCT
 CCATAAATACATGGATAACATCTTCAAGGAGCACAAGGACTCCCTGCCGCCCTACTCCAAGAAG
 GACCTCGAGTACGACAACGTCCTCGTCACCTACGCGGAGGTGTCCGAGCTCGTCACCTTCTTCG
 AGGACTTCGAGTTCGACCTGACCAACGCCTTCGACAGCACGGAGGAGCTCGAGGACGTGCCCCG

TCACCGCCTACGTCTCGCGCCTGAACCACAAGCCCTTCACCTTCGACATCTTCGCCAACGCCAA
 GCGCGACGACGCGGTGACGGTCCGGATCCACATCTGCCCGCGCTACGACAGCAACGGCATGCA
 GATCCCCTTCGACAACAACCGCTGGAGGTGCATCGAGCTCGACAAGTTCTGGACGACAGTGAAG
 GCGGGCGAGAACCACATCGTGCGCAAGTCCACCGAGTCGTGCGGTACCATCCCCGACCGCATC
 CCGTTCAAGACGCTGATGCAGCAGGCGGACGAGGCCGTGCGGAACGGCGTGCACCTCCCCGCAC
 GACATCGCTCGCGCTCGGGGCTGCGGCCTCCCCAGCGCCTCCTGCTCCCCAAGGGCACGAGG
 ACGGGCATGCAGTTCTGGCTGTTCTGTTGGCATGACCAGCGGCGACGACGGCGTGCACGACGAC
 CTGCTGGAGAACACGCACGGCAACACCCACAGCAACTGCGGCATCCACGGCCTCAAGTACCCC
 GACAAGCGGCCGATGGGCTTCCCCTTCGACCGACGCATCCCCGACTTCCGGAACTTCATTGTCTG
 GAACTTCTTGTGCGACCATCGTCATGATCCATCACAATGACACTGAAGAGTTGIGATTTACGTC
 AAAGACAGTGATTTTTTTTTTCAAAGCTAGTGAACATGTTTTTTTTTTTTTTCTTGAAAGAAAG
 TGAAGACTTTTGTGTTTTCTTTTCAAAAATCGTGAAAATTAATGTTTGTTCGAAAGATATAAAG
 CTATGGGAGGCGACCGGAGTGTGAACAGCAGAAAGTCCACGATTAATAAAAAAAAAAATGTCTGT
 GTTAAGATGTTTCCATTGGAGGTGAAAAGGGGTCTTATAGATCTGCCGATGACTATTATAGCCT
 ATCATTATCCATAATTTTGTAGAAAAGAAATAAATATATTCCTAAAATCTACATACTGAA
 ATGAACTCCTTATACCTCAAAAATCAAAGACTGAAAATCAATGATCACAAAAACCTCTGTCAATT
 CCAATGAAATAAGTAGTTCCAAAATTAATAATCCACTGATACTTTTCATCATAAAAAGGTAAATC
 AA

รูปที่ ข 1 แสดงลำดับกรดนิวคลีอิกที่สมบูรณ์ของยีนฮีโมไซยานิน LvHcB (XM_027380856.1) 2693 คู่เบส โดยส่วนที่มีลำดับกรดนิวคลีอิกของอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน LvHcB คือบริเวณที่ทำตัวหนา และตำแหน่ง start codon คือ บริเวณกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้เส้นเดียว ส่วน stop codon คือ บริเวณกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้สองเส้น

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Janwarang Ruangpat
วัน เดือน ปี เกิด	9 June 1994
สถานที่เกิด	Bangkok
วุฒิการศึกษา	Faculty of Science, Mahidol University
ที่อยู่ปัจจุบัน	41/145 soi Inthamara29 yaek1, Samsen Nai, Phaya-Thai, Bangkok 10400
ผลงานตีพิมพ์	Ruangpat, J., Charoensapsri, W., Imjongjirak, C. and Amparyup, P. 2020. Involvement of Hemocyanin in prophenoloxidase activating system in pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> in Proceedings of the 50th National Graduate Research Conference. Bangkok, Thailand.