



การศึกษาลักษณะและการแสดงออกของรูปแบบโปรตีนในปูทะเล (*Scylla serrata*) ที่มีอาการอกท้องแดงระยะแรก

ภัทราวดี ศรีมีเทียน^{1,2,#} และสุริยัน ธัญกิจจานุกิจ³

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: การศึกษาลักษณะของปูทะเล (*Scylla serrata*) ที่มีความผิดปกติในระยะแรกที่มีอาการอกท้องแดง จากฟาร์มปูทะเล ตำบลคลองโคกลน อำเภอมือง จังหวัดสมุทรสงคราม นำมาสังเกตลักษณะอาการเป็นเวลา 7 วัน พบว่าวันที่ 1, 2 และ 3 ปูมีลักษณะอาการคล้ายกับปูปกติ เช่น มีความต้องการอาหารสูงและมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 4, 5, 6 และ 7 พบว่าปูกินอาหารน้อยลงและการเคลื่อนที่ลดลง ซึ่งแตกต่างจากปูปกติ ส่วนลักษณะภายนอกพบว่า บริเวณอกท้องมีสีส้ม และรยางค์ขาามีสีส้มและมีจุดสีดำคล้ายกับสนิมเกาะขณะที่อวัยวะภายในพบว่า ตับและไม่คงรูป เหงือกมีสีส้ม พองบวม ปลายเหงือกมีสีดำนอกจากนี้ยังพบว่ากระดองแตกหักง่าย เปราะบางและกรอบ เมื่อนำปูดังกล่าวมาป้อนเป็นอาหารพบว่ามึนซึม ส่วนเลือดปูทะเลที่มีอาการอกท้องแดงในระยะแรก สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มลักษณะ ได้แก่ กลุ่มลักษณะแรกเลือดมีสีส้มอมฟ้า พบในปูทะเลที่มีอาการอกท้องแดง หลังจากสังเกตในวันที่ 1, 2 และ 3 วัน และกลุ่มลักษณะที่สองมีเลือดสีส้มชัดเจนพบในปูทะเลที่มีอาการอกท้องแดงหลังจากสังเกตในวันที่ 4, 5, 6 และ 7 วัน หลังจากนั้นนำเลือดไปทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) พบว่ากลุ่มลักษณะเลือดสีส้มชัดเจนมีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 137 kDa เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มลักษณะเลือดปูปกติและเลือดสีส้มอมฟ้า

คำสำคัญ: ปูทะเล อาการอกท้องแดง รูปแบบโปรตีน

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2559. 11(1): 23-33.

E-mail address: p.primeetian@hotmail.com

Characters and Protein Profile in the First Stage of Mud Crab (*Scylla serrata*) Infected by Red Sternum Syndrome

Pattarawadee Srimeetian^{1,2,#} and Suriyan Tunkijjanukij³

¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand, 73140; ²Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand; ³Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract: The first stage of mud crabs infected by red sternum symptom and normal mud crabs were collected from a farm in Samut Songkhram province, Thailand and their used to study in external-internal morphological characterization and their behavior. The symptoms of red sternum syndrome showed orange color of abdominal thorax, black spots on joints and very thin carapace. In internal organs were dark and soft as well as bitter meats. The behavior of mud crab were normal feeding and moving at 1st to 3rd day after infected by the syndrome. While 4th to 7th day after infected found that mud crabs were lose appetite and limited moving. The color blood of those crabs were classified into two groups; orange-blue (group I: 1st to 3rd day) and orange (group II: 4th to 7th day). To determine the protein expression of red sternum and normal mud crabs using Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) found that during 1st to 3rd day after red sternum syndrome infection demonstrated that the pattern of proteins were same as normal crab, while 4th to 7th day after infection showed that the additional protein was found compared to normal mud crab, approximately 137 kDa.

Keywords: Mud crab, Red sternum symptom, Protein profile

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(1): 23-33.

E-mail address: p.srimeetian@hotmail.com

บทนำ
ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของ
ประเทศไทยเนื่องจากมีรสชาติดีและมีคุณค่าทาง
โภชนาการสูง จึงเป็นที่นิยมบริโภคของทั้งชาวไทย

และต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น แคนาดา และ
ออสเตรเลีย เป็นต้น Department of Fisheries
(2015) รายงานการส่งออกปูของประเทศไทย
ประจำเดือนมกราคม-พฤษภาคม พ.ศ. 2557 มีมูลค่า

402.76 ล้านบาท ความต้องการปูของตลาดส่งผลดี แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปู การเลี้ยงปูทะเลนั้นเกษตรกรจะนำปูเล็กจากธรรมชาติมาเลี้ยงจนได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการ ได้แก่ ปูเนื้อ ปูไข่และปูนิ่ม โดยฟาร์มส่วนใหญ่จะใช้กล่องในการเลี้ยงปูทะเล หนึ่งกล่องต่อปูหนึ่งตัวเพื่อป้องกันการต่อสู้กันเองของปูทะเลและสะดวกต่อการเก็บเกี่ยว ปัญหาที่สำคัญในการเลี้ยงปูทะเล เช่น การขาดแคลนพันธุ์ปู การลอกคราบไม่สมบูรณ์ และอาการผิดปกติที่บริเวณอกท้องของปูมีสีแดงนอกจากนี้ปูที่มีอาการผิดปกติดังกล่าวยังพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของเลือดอีกด้วย โดย Areekijseeree *et al.* (2010) ได้แบ่งความผิดปกติของปูทะเลที่มีอาการอกท้องแดงซึ่งจำแนกตามตามความรุนแรงโดยใช้ลักษณะของสีเลือดเป็นเกณฑ์ โดยแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะด้วยกันคือ ระยะแรกเลือดสีส้ม ระยะที่ 2 เลือดสีส้มขาว และระยะที่ 3 เลือดมีสีชาคล้ำขุ่นแตกต่างจากเลือดของปูปกติที่ใสไม่มีสีซึ่งเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนจะมีสีฟ้า โดยระยะที่ 2 และระยะที่ 3 ของปูที่มีอาการอกท้องแดงนั้นเป็นระยะที่มีความรุนแรง โดยปูจะมีลักษณะอาการคล้ายเป็นอัมพาตและตายภายในเวลา 24 ชั่วโมง (Intanakom, 2010) Plainpun (2014) รายงานว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ทำให้เลือดของปูทะเลชนิด *Scylla serrata* เปลี่ยนจากใสไม่มีเป็นสีส้มโดย เมื่ออาการอกท้องแดงเกิดขึ้นในปูทะเล ปูที่มีอาการดังกล่าวอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เช่น สารสี ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน โดยโปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งโปรตีนภายในเซลล์จะทำหน้าที่หลากหลายแตกต่างกันเช่น เอนไซม์ (enzyme) การขจัดสารพิษ (detoxification) ฮอร์โมน (hormone) และภูมิคุ้มกัน (immune

system) เป็นต้น โปรตีนแต่ละชนิดจะถูกผลิตและแสดงออกในสภาวะที่แตกต่างกันออกไป (Thammasirak, 2002) Salaenoi *et al.* (2006) รายงานว่าเลือดของปูทะเลชนิด *S. serrata* ที่มีอาการอกท้องแดง ระยะเลือดสีชาคล้ำขุ่นไม่พบการแสดงออกของโปรตีนฮีโมไซยานิน (haemocyanin) เมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) ความผิดปกติของปูทะเลที่แสดงอาการอกท้องแดงนี้ได้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปูทะเล Salaenoi *et al.* (2006) รายงานการระบาดของอาการอกท้องแดงพบ 10% ในฟาร์มปูทะเล โดยอาการผิดปกติของอกท้องแดงทำให้เกษตรกรสูญเสียค่าจ่ายใช้และสูญเสียรายได้เนื่องจากปูที่มีอาการอกท้องแดงนั้นจะไม่ลอกคราบเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต โดยส่วนมากเกษตรกรจะทราบว่าปูทะเลมีอาการดังกล่าวเมื่อเข้าสู่ระยะที่รุนแรงใกล้ตายแล้วซึ่งปัจจุบันข้อมูลและการศึกษาเกี่ยวกับอาการผิดปกติของอกท้องแดงในปูทะเลยังมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษา ลักษณะและอาการของปูทะเลที่มีอาการอกท้องแดงในระยะแรกเพื่อจักเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรนำไปสังเกตลักษณะอาการอกท้องแดงของปูทะเลในระยะเริ่มแรก ก่อนที่ปูทะเลจะเข้าสู่ระยะที่รุนแรงมากขึ้นสามารถช่วยลดความเสียหายจากอาการอกท้องแดง เช่น ลดการสูญเสียค่าจ่ายใช้และเวลาในการเลี้ยงปูทะเลที่มีอาการดังกล่าว นอกจากนี้ยังทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเลือดของปูทะเลที่มีอาการอกท้องแดง ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการศึกษาระดับชีวโมเลกุลของอาการดังกล่าวในปูทะเลต่อไป โดยงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยอาการ

ฉีดปกติออกท้องแดงในปูทะเลเพื่อหาทางป้องกันและรักษาในอนาคต

แล้วผ่าตัดเพื่อศึกษาอวัยวะภายในการวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างปูทะเลจำนวน 100 ตัว จากฟาร์มปูทะเล ตำบลคลองโคกน อำเภอมือง จังหวัดสมุทรสงคราม เดือนเมษายน พ.ศ. 2555 พบปูทะเลเพศผู้และเพศเมียจำนวน 5 ตัว ที่มีอาการออกท้องแดงในระยะแรกโดยสังเกตจากเลือดที่มีสีส้มและอาการผิดปกติบริเวณอกท้องของปูทะเล ซึ่งมีขนาดความกว้างของกระดอง 8.22 ± 0.26 เซนติเมตร ความยาว 5.70 ± 0.19 เซนติเมตร ความหนา 3.15 ± 0.10 เซนติเมตร และน้ำหนัก 367 ± 12.16 กรัม และทำการเก็บปูทะเลปกติเพศผู้และเพศเมียจำนวน 5 ตัว มีขนาดความกว้างของกระดอง 8.27 ± 0.24 เซนติเมตร ความยาว 5.73 ± 0.15 เซนติเมตร ความหนา 3.17 ± 0.08 เซนติเมตร และน้ำหนัก 369.40 ± 9.14 กรัม นำมาศึกษาลักษณะภายนอกเช่น สีของบริเวณอกท้อง จับปิ้ง และรยาศขา เป็นต้น หลังจากนั้นนำปูลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์ที่ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วนให้อากาศตลอดเวลา และให้เนื้อปลาสดขนาดประมาณ 2×1.5 เซนติเมตร เป็นอาหารวันละ 1 ครั้ง สังเกตลักษณะอาการเป็นเวลา 7 วัน โดยนำปูมาเจาะเลือดทุกๆ วัน ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 21 บริเวณโคนขาเดิน นำเลือดเก็บในหลอดพลาสติกที่มี 10% trisodium citrate (อัตราส่วนเท่ากับ 5:1) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE เมื่อครบ 7 วัน ทำการศึกษาลักษณะภายนอกอีกครั้ง หลังจากนั้นทำให้ปูสลบโดยการแช่น้ำเย็นจัดเป็นเวลา 3 นาที

การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูทะเล โดยใช้วิธี Bradford (Bradford, 1976) เปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (bovine serum albumin) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE

นำตัวอย่างเลือดความเข้มข้นของโปรตีน 5 ไมโครกรัม ผสมกับ 2X sample buffer (50% glycerol, 250 mM tris-HCl buffer pH 6.8, 10% SDS, 0.5% bromphenol blue, 0.5% mercaptoethanol) โดยใช้อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที เตรียม separating gel (12% acrylamide) และ stacking gel (6% acrylamide) โหลดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมเจลและโหลดโปรตีนมาตรฐาน 5 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที และกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 100 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย coomassie brilliant blue เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย destaining solution (methanol, acetic acid) 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที (Laemmli, 1970)

ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างปูทะเลปกติและปูทะเลใน ระยะแรกที่มีอาการรอกท้องแดง จากฟาร์มปูทะเล นำมาสังเกตลักษณะและอาการเป็นเวลา 7 วัน จาก การศึกษาสังเกตลักษณะอาการของปูปกติเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปูมีลักษณะดูร่ามมาก โดยแสดงอาการ ต่างๆ ดังนี้ ชูก้ามและกระโดดหนีบสิ่งที่เข้าไปกระตุ้น ได้อย่างรวดเร็วและทันทีทันใด มีการต่อสู้เพื่อป้องกัน ตัว เคลื่อนที่ได้อย่างคล่องแคล่วและว่องไว ปราด เปรี้ยว ปีนป่าย กินอาหารปลาสดหมดทุกวัน นอกจากนี้ยังพบว่าเลือดของปูปกติมีเลือดใสไม่มีสี เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนจะมีสีฟ้า (Figure 1A, B, C, D, E, F, G: a) เมื่อทำการศึกษาอาการของปูทะเล หลังจากที่มีอาการรอกท้องแดงในระยะแรกสังเกต ลักษณะอาการเป็นเวลา 7 วัน พบว่าวันที่ 1, 2 และ 3 ปูมีการกินอาหารและการเคลื่อนที่คล้ายคลึงกับปู ปกติ เช่น ความดูร่าม การตอบสนองต่อสิ่งที่เข้าไป กระตุ้นอย่างรวดเร็ว มีการปีนป่าย เคลื่อนที่ได้ คล่องแคล่ว กินอาหารหมด เมื่อสังเกตลักษณะของ เลือดพบว่าเลือดมีสีส้มอมฟ้า (Figure 1A, B, C: b) เมื่อทำการสังเกตในวันที่ 4, 5, 6 และ 7 พบว่าปูมี การกินอาหารน้อยลง การเคลื่อนที่ลดลง ไม่ปีนป่าย มีการยกชูก้ามขึ้นมาป้องกันตัวเอง เมื่อมีสิ่งกระตุ้น พยายามหลบซ่อนตัวและหลบเลี่ยงจากการต่อสู้ ไม่มี การกระโดดหนีบสิ่งที่เข้าไปกระตุ้น ลักษณะของ เลือดพบว่ามีสีส้มชัดเจน (Figure 1D, E, F, G: b)

การศึกษาลักษณะภายนอกก่อนและหลัง 7 วัน ของปูปกติพบว่ามีลักษณะเหมือนกัน คือทั่วทั้ง บริเวณอก ท้อง และจับปิ้ง มีสีขา (Figure 2A) ส่วน อวัยวะภายในทำการศึกษาหลังเลี้ยงได้ 7 วัน พบว่า ดับจะคงรูป เหงือกสดสีขาสะอาด และฉ่ำน้ำ (Figure 2B) ส่วนรยางค์ขาไม่มีสีเงิน (Figure 2C) และ

เนื้อบริเวณโคนขาไม่มีสีขาวขุ่นปูปกติกระดองมีลักษณะ หยาบและแข็งมาก ด้านในของกระดองมีสีเทาอมเงิน (Figure 2D) ส่วนปูทะเลในระยะแรกที่มีอาการรอก ท้องแดง เมื่อนำมาศึกษาลักษณะและอาการ พบว่า ลักษณะภายนอกก่อนและหลัง 7 วัน มีลักษณะ เหมือนกันคือบริเวณอกท้องพบว่ามีสีส้ม โดยมีสีส้ม เด่นชัดที่บริเวณจับปิ้ง (Figure 3A) รยางค์ ขาไม่มีสีส้ม อมชมพู (Figure 3C) นอกจากนี้บริเวณบริเวณโคน รยางค์ขายังพบว่ามียูสติดำคล้ายกับสนิมเกาะและ เนื้อบริเวณโคนขาไม่มีสีส้ม ส่วนอวัยวะภายในของปู ทะเลหลังจากที่มีอาการรอกท้องแดงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าตับและไม่คงรูป หัวใจมีสีส้มคล้ำ เหงือกมีสีส้ม พอง หลวม และค่อนข้างแห้ง ส่วนตรงบริเวณปลาย เหงือกมีสีดำ (Figure 3B) เมื่อใช้กรรไกรตัดกระดอง พบว่ามีลักษณะแตกง่าย บางและกรอบ นอกจากนี้ยัง พบว่าลักษณะของเนื้อเยื่อใต้กระดองจะร้อนออกจาก กระดองโดยง่าย ไม่ติดกระดอง ส่วนด้านในของ กระดองมีสีส้ม (Figure 3D) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อ นำมาทำให้สุกและปรุงเป็นอาหารพบว่ามีรสขม

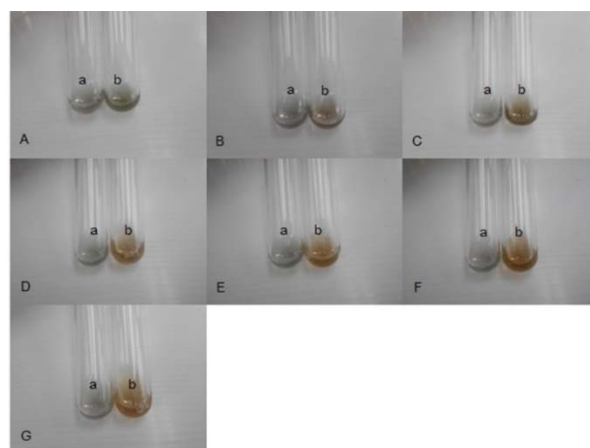


Figure 1 Blood color changing of mud crab during 7 days; day 1 (A), day 2 (B), day 3 (C), day 4 (D), day 5 (E), day 6 (F) and day 7 (G), (a) Normal mud crab and (b) the first stage of mud crab infected by red sternum syndrome



Figure 2 Appearance of the normal mud crab. The sternum was white and hard shell (A). The heart (h), hepatopancreas (hep), and gills (g) were normal (B). The legs were gray color (C). The carapace was gray color (D).

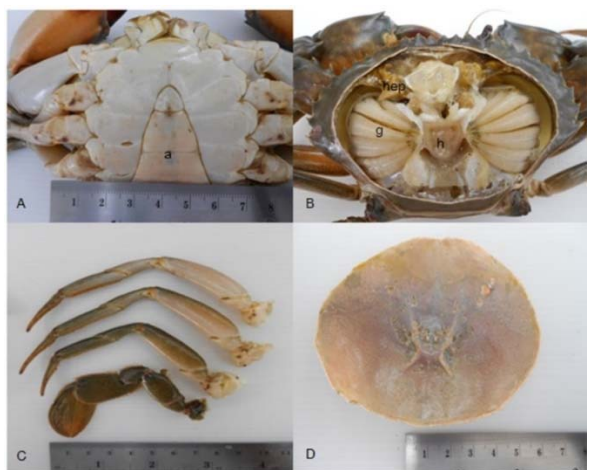


Figure 3 Appearance of the red sternum mud crab. The sternum was orange, especially orange abdomen (a) and easily broken shell (A). The heart (h) and gills (g) changed to orange. The hepatopancreas (hep) were soft and unshaped (B). The legs were orange color (C). The carapace was orange color (D).

จากการศึกษาลักษณะของเลือดปูทะเลใน
ระยะแรกที่มีอาการรอกท้องแดง สามารถแบ่งเลือด

ของปูทะเลออกได้เป็น 2 กลุ่มลักษณะได้แก่ กลุ่ม
ลักษณะแรกเลือดที่มีสีส้มอมฟ้าซึ่งพบในวันที่ 1, 2
และ 3 หลังจากที่มีอาการรอกท้องแดง และ
กลุ่มลักษณะที่สองเลือดมีสีส้มอย่างชัดเจน ซึ่งพบใน
วันที่ 4, 5, 6 และ 7 วันหลังจากที่มีอาการรอก
ท้องแดง หลังจากนั้นนำเลือดทั้ง 2 กลุ่มลักษณะมา
ทำการศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE
บน 12% acrylamide gel ความเข้มข้นของโปรตีน
5 ไมโครกรัม โดยเทียบกับเลือดของปูปกติที่ปรากฏสี
ฟ้าเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน ผลการศึกษาพบว่ากลุ่ม
ลักษณะเลือดที่มีสีส้มอมฟ้า มีรูปแบบโปรตีนที่
เหมือนกันกับเลือดของปูปกติ ส่วนกลุ่มลักษณะที่มี
เลือดสีส้มอย่างชัดเจนมีรูปแบบโปรตีนที่แตกต่าง
ออกไป พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่น้ำหนัก
โมเลกุล (molecular weight) ประมาณ 137 กิโล
ดาลตัน (kDa) เพิ่มขึ้น โดยไม่พบการแสดงออกของ
โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวในเลือดปูปกติและ
เลือดสีส้มอมฟ้าของปูที่มีอาการรอกท้องแดงระยะแรก
(Figure 4)

สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษาพบว่าปูที่มีอาการรอกท้องแดงใน
ระยะแรกนั้น กระจกจะเปราะและบาง ซึ่งคล้ายกับ
โรค shell disease หรือ black spot ที่ทำให้ปูชนิด
Cancer pagurus เป็นจุดสีดำทั่วโครงร่าง มีสาเหตุ
มาจากการติดเชื้อกลุ่ม chitinolytic bacteria เช่น
Aeromonas sp. และ *Vibrio* sp. เป็นต้นโดย
แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase)
ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายไคติน (chitin) (Vogen
et al., 2002) โดยกระจกของปูนั้นมีไคตินเป็น
องค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งทำให้โครงร่างมีความแข็ง
(Merzendorfer and Zimoch, 2003) ดังนั้นเมื่อมี

การย่อยสลายไคตินจึงทำให้ไคตินในกระดองของปูลดลงกว่าปูปกติส่งผลให้กระดองของปูมีลักษณะผุกร่อนและแตกหักง่าย (Ayres and Edwards, 1982) นอกจากนี้ลักษณะจุดสีดำคล้ายสนิมเกาะที่รยางค์ขาของปูที่มีอาการรอกท้องแดงนั้นอาจเกิดจากการที่เม็ดเลือดเข้าไปล้อมรอบเพื่อทำลายเชื้อโรคซึ่งทำให้เกิดมีลักษณะที่เป็นจุดสีดำ (Noga *et al.*, 1994)

ส่วนลักษณะภายนอกของปูที่มีอาการรอกท้องแดงในระยะแรกนั้น พบว่าบริเวณรอกท้อง รยางค์ขาของปูทะเลที่มีอาการรอกท้องแดงพบว่ามีสีส้ม คล้ายกับโรค pink crab disease ซึ่งเป็นโรคที่มีเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีทำให้รอกและท้องของปูชนิด *C. pagurus* เปลี่ยนเป็นสีชมพู เมื่อนำปูที่มีอาการรอกท้องแดงมาทำให้สุกและปรุงเป็นอาหารพบว่ามึรสขม คล้ายกับโรค bitter crab disease (Meyers *et al.*, 1987) โดยโรคนี้ทำให้เนื้อปูชนิด *Chionoecetes bairdi* มึรสขมซึ่งมีสาเหตุมาจากปรสิต (dinoflagellate) สกุล *Hematodinium* ขณะที่ Taylor *et al.* (1996) รายงานว่าเมื่อ *Hematodinium* เข้าสู่กุ้งชนิด *Nephrops norvegicus* แล้วนั้น *Hematodinium* จะอาศัยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในร่างกายของกุ้งเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งจะทำให้โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในกุ้งมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าปูที่มีอาการรอกท้องแดง เมื่อนำมาประกอบอาหารแล้วมึรสขม อาจมีสาเหตุเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในเนื้อเยื่อนั่นเอง นอกจากนี้เลือดของปูที่มีอาการรอกท้องแดงคล้ายกับโรค milky blood disease โดยโรคนี้จะทำให้เลือดมีลักษณะคล้ายนม (milky hemolymph) ในกุ้งชนิด *Exopalaemon carinicauda* (Xu *et al.*, 2010) ซึ่งมีสาเหตุมาจาก *Hematodinium* และยังทำให้ปูชนิด

Paralithodes camtschaticus และปูชนิด *P. platypus* เปลี่ยนจากเลือดใสไม่มีสีเป็นเลือดที่มีลักษณะคล้ายครีม (cream colored) (Ryazanova, 2008) อีกด้วย

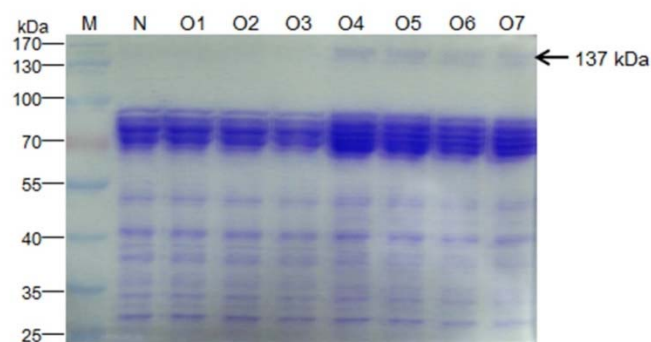


Figure 4 Lane M) molecular markers, Lane N) the blood of normal mud crab. The blood in the first stage of mud crab infected by red sternum syndrome Lane O1) day 1, Lane O2) day2, Lane O3) day3, Lane O4) day 4, Lane O5) day 5, Lane O6) day 6 and Lane O7) day 7

จากผลการศึกษาพบว่าเลือดของปูที่มีอาการรอกท้องแดงในระยะแรกนั้น สามารถแบ่งตามลักษณะของสีเลือดออกได้เป็น 2 กลุ่มลักษณะ ได้แก่ กลุ่มลักษณะเลือดที่มีสีส้มอมฟ้าและกลุ่มลักษณะที่มีเลือดสีส้มอย่างชัดเจน ส่วนพฤติกรรมพบว่าปูที่มีอาการรอกท้องแดงระยะแรกกลุ่มเลือดสีส้มอมฟ้ามีพฤติกรรมคล้ายคลึงใกล้เคียงกับปูปกติ ส่วนกลุ่มลักษณะที่มีเลือดสีส้มอย่างชัดเจนพบว่ามีพฤติกรรมที่แตกต่างจากปูปกติ Srimarksuk (2012) รายงานว่าลักษณะการแสดงออกของพฤติกรรมจะสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการป่วยในกุ้งชนิด *Litopenaeus vannamei* ส่วน Costa-Ramos and Rowley (2004) พบว่าปูชนิด *C. pagurus* เมื่อได้รับเชื้อ *Pseudoalteromonas atlantica* ปูจะเริ่มกิน

อาหารลดลง การเคลื่อนที่ลดลง ในเวลาต่อมาจะไม่กินอาหาร ไม่สามารถเคลื่อนที่หรือเคลื่อนไหวได้และตายลงในที่สุด จากผลการทดลองพบว่าปูที่มีอาการออกท้องแดงระยะแรกกลุ่มลักษณะเลือดที่มีสีส้มอมฟ้าเกิดขึ้นในช่วงวันที่ 1-3 (ปูวันที่ 1-3 มีพฤติกรรมเหมือนกัน) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปูยังไม่แสดงอาการป่วย โดยสังเกตจากลักษณะพฤติกรรมที่คล้ายกับปูปกติ แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 4-7 (ปูวันที่ 4-7 มีพฤติกรรมเหมือนกัน) พบว่าปูมีพฤติกรรมกินอาหารและการเคลื่อนที่ลดลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปูเริ่มที่จะแสดงอาการป่วยเกิดขึ้น Nonwachai (2010) รายงานว่ากุ้งชนิด *L. vannamei* หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จะมีพฤติกรรมอาการเช่นเดียวกับกุ้งปกติ แต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว กุ้งจะเริ่มแสดงลักษณะอาการป่วย โดยพฤติกรรมอาการของกุ้งป่วยคือจะไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่างๆ ไม่ว่ายน้ำและตายในที่สุด นอกจากนี้ในกุ้งป่วยดังกล่าวยังพบว่าการสร้างเมลานิน (melanin) แทรกที่กล้ามเนื้อแต่ไม่พบเมลานินในกุ้งปกติ ซึ่งเมลานินดังกล่าวเกิดขึ้นหลังจากทำการเหนี่ยวนำเชื้อแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมลานินเป็นสารสีดำที่มีช่วยในการยับยั้งและป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา (Söderhäll and Cerenius 1998) Somboonwivat *et al.* (2010) ยังพบว่ากุ้งชนิด *Penaeus monodon* หลังทำการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *V. harveyi* กุ้งจะเริ่มแสดงอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป นอกจากนี้กุ้งที่มีอาการป่วยในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ยังพบว่าการผลิตรูปแบบโปรตีนที่เหมือนกันอีกด้วย ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าหลังจากที่ปูมีอาการออกท้องแดง ปูจะเริ่มที่จะแสดงลักษณะอาการป่วยในวันที่ 4-7 ซึ่งวันที่ 4-7 ปูดังกล่าวมีพฤติกรรมเหมือนกันและมีเลือดที่มี

ลักษณะสีส้มอย่างชัดเจนเหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตั้งแต่วันที่ 4-7 มีความรุนแรงของอาการออกท้องแดงในปูทะเลเท่าเดิม โดยเลือดของปูที่มีอาการออกท้องแดงวันที่ 4-7 มีการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 137 kDa เพิ่มขึ้นเหมือนกัน เมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค SDS PAGE ซึ่งไม่พบขนาดโปรตีนดังกล่าวในกลุ่มเลือดที่มีสีส้มอมฟ้า (วันที่ 1-3) และปูปกติ Plainpun (2014) รายงานว่าเลือดของปูชนิด *S. serrata* ที่มีอาการออกท้องแดงระยะเลือดสีขานม (ระยะที่สอง) พบการแสดงออกของโปรตีนขนาดประมาณ 70 และ 53 kDa แต่ไม่พบการแสดงออกของขนาดโปรตีนดังกล่าวในปูปกติ ส่วน Qiao *et al.* (2011) พบโปรตีนขนาดประมาณ 188 kDa ซึ่งเป็นโปรตีน hemolymph clottable protein ในเลือดของกุ้งชนิด *L. vannamei* ที่ทำการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *V. parahemolyticus* แต่ไม่พบโปรตีนดังกล่าวในปูปกติ hemolymph clottable protein เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยโปรตีนดังกล่าวทำหน้าที่ในกระบวนการการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจะช่วยในการป้องกันการสูญเสียเลือดของร่างกาย (Martin *et al.*, 1991) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่พบในเลือดของปูที่มีอาการออกท้องแดงระยะแรกแต่ไม่พบในปูปกติ อาจเป็นโปรตีนที่ถูกผลิตออกมาเพื่อทำหน้าที่ในการตอบสนองต่ออาการออกท้องแดงในปูทะเล Liu *et al.* (2011) ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่การตอบสนองต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) ของปูชนิด *S. serrata* พบโปรตีน catalase, cryptocyanin และ heat shock protein 90-2 ที่ถูกแสดงออกมาเพื่อทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสดังกล่าว ส่วน Somboonwivat *et al.* (2010) รายงานว่ากุ้งชนิด *P. monodon* เมื่อทำการ

เหนียวน่าด้วยเชื้อ *V. harveyi* จะมีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างจากกุ้งที่ไม่ได้เหนียวน่าเชื่อดังกล่าว

จากการศึกษารูปแบบโปรตีนในปูที่มีอาการรอกท้องแดงระยะแรกด้วย SDS PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกน้ำหนักรโมเลกุลของโปรตีน ผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงปูที่มีอาการรอกท้องแดงระยะแรก กลุ่มที่มีเลือดลักษณะสีส้มชัดเจนเท่านั้นที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างจากปกติ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่อาจจะนำกลุ่มลักษณะเลือดสีส้มชัดเจนไปศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคอื่นที่สามารถทำการแยกได้ทั้งน้ำหนักรโมเลกุลและค่า Isoelectric point (pI) ของโปรตีน ซึ่ง pI เป็นค่าที่เฉพาะของโปรตีนหนึ่งๆ หรืออาจกล่าวได้ว่าโปรตีนแต่ละชนิดจะมีค่า pI ที่แตกต่างกัน (Klose, 1975) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมให้ทราบถึงชนิดของโปรตีนที่แสดงออกในปูทะเลกลุ่มลักษณะเลือดที่มีสีส้ม แต่ไม่แสดงออกในกลุ่มลักษณะเลือดส้มอมฟ้าและเลือดปูทะเลปกติต่อไป

จากผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะช่วยให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้สังเกตอาการระยะแรกของปูที่มีอาการรอกท้องแดง โดยสังเกตได้จากลักษณะภายนอก และอาการต่างๆ ของปูทะเล นอกจากนี้อาจมีการตรวจสอบลักษณะของสีเลือดเพิ่มเติม (อาจโดยการตัดที่ปลายขาเพียงเล็กน้อยของปูทะเล) เพื่อที่เกษตรกรจะได้ทำการแยกคัดทิ้งปูที่มีอาการดังกล่าวก่อนที่จะนำลงเลี้ยงในบ่อหรือในกล่องและยังสามารถนำไปสังเกตในช่วงระหว่างการเลี้ยงปูทะเลได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งจะทำให้เกษตรกรลดการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงปูทะเลที่มีอาการรอกท้องแดง เนื่องจากปูที่มีอาการนี้จะไม่ลอกคราบและเมื่อเข้าสู่ระยะที่รุนแรงปูที่มีอาการดังกล่าวจะตายในที่สุด

นอกจากนี้การศึกษารูปแบบการแสดงออกของรูปแบบโปรตีนยังเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวินิจฉัยปูทะเลที่มีอาการรอกท้องแดงทางด้านชีวโมเลกุลต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเพณีทุนบัณฑิตศึกษา สัญญาเลขที่ กบง./2557-06.03 ทุนพัฒนาอาจารย์และบุคลากรสำหรับสถาบันอุดมศึกษาในเขตพัฒนาเฉพาะกิจจังหวัดชายแดนภาคใต้สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ สัญญาเลขที่ 21/2554

เอกสารอ้างอิง

- Areekijseeree, M., Chuen-I, T. and Panyarachun, B. 2010. Characterization of red sternum syndrome in mud crab farms from Thailand. *Biologia (Section Zoology)*. 65(1): 150-156.
- Ayres, P. and Edwards, E. 1982. Notes on the distribution of "black spot" shell disease in crustacean fisheries. *J. Chem. Ecol.* 1: 125-130.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Costa-Ramos, C. and Rowley, A. F. 2004. Effect of Extracellular Products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the Edible Crab *Cancer pagurus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2): 729-735.
- Department of Fisheries. 2015. <http://www.fisheries.go.th/>. 12 December 2015.
- Intanakom, J. 2010. Study on morphological, bacterial identification and histology in mud crab (*Scylla* sp.) with red thoracic-abdominal syndrome. The thesis of Kasetsart University. Bangkok. 93 p. (in Thai)
- Klose, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 26(3): 231-243.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Liu, W., Qian, D. and Yan, X. 2011. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hemolymph of *Scylla serrata* response to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture.* 314: 53-57.
- Martin, G.G., Hose, J.E., Omori, S., Chong, C., Hoodbhoy, T. and McKrell, N. 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapods crustaceans. *Comp Biochem Physiol.* 100(B): 517-522.
- Merzendorfer, H. and Zimoch, L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206: 4393-4412.
- Meyers, T.R., Koeneman, T.M., Botelho, C. and Short, S. 1987. Bitter crab disease: a fetal dinoflagellate infection and marketing problem for Alaska tanner crabs *Chionoecetes bairdi*. *Dis. Aquat. Organ.* 3: 195-216.
- Noga, E.J., Engel, D.P., Arroll, T.W., McKenna S. and Davidian, M. 1994. Low serum antibacterial activity coincides with increased prevalence of shell disease in blue crabs *Callinectes sapidus*. *Dis. Aquat. Organ.* 19: 121-128.
- Nonwachai, T. 2010. Growth, survival and non-specific immune characteristics of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with supplement *Sehizochytrium* sp. and ARA containing diets, and challenged with *Vibrio harveyi*. The thesis of Kasetsart University. Bangkok. 113 p. (in Thai)
- Plainpun, N. 2014. Induction of red thoracic – abdominal syndrome with bacteria isolated from mud crab (*Scylla* sp.). The

- thesis of Kasetsart University. Bangkok. 121 p. (in Thai)
- Qiao, J., Du, Z., Zhang Y., Du H., Guo L., Zhong M., Cao J. and Wang X. 2011. Proteomic identification of the related immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs. *Fish & Shellfish Immunol.* 31: 736-745.
- Ryazanova, T.V. 2008. Bitter crab syndrome in two species of king crabs from the Sea of Okhotsk. *Russ. J. Mar. Biol.* 34: 411-414.
- Salaenoi, J., Sangcharoen, A., Thongpan, A. and Mingmuang, M. 2006. Morphology and haemolymph composition changes in red sternum mud crab (*Scylla serrata*). *KasetsartJ. (Nat. Sci.)* 40: 158-166.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol.* 10: 23-28.
- Somboonwiwat, K., Chikeeratisak, V., Wang, H.C., Lo F.C. and Tassanaka, A. 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. *Proteome Sci.* 8: 1-11.
- Srimarksuk A. 2012. Growth, survival, non-specific immune characteristics and resistance to *Vibrio harveyi* of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with yeast cell debris. The thesis of Kasetsart University. Bangkok. 114 p.
- Stentiford, G.D., Green, M., Bateman, K., Small, H.J., Neil, D.M. and Feist, S.W. 2002. Infection by a hematodinium-like parasitic dinoflagellate causes pink crab disease (PCD) in the edible crab *Cancer pagurus*. *J. Invertebr. Pathol.* 79: 179-191.
- Taylor, A.C., Field, R.H. and Parslow-Williams, P.J. 1996. The effects of *Hematodinium* sp. infection on aspects of the respiratory physiology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 207: 217-228.
- Thammasirirak, S. 2002. Proteomics. *KKU Sci. J.* 30(3): 160-168. (in Thai)
- Vogan, L. C., Costa-Ramos, C. and Rowley, A. F. 2002. Shell disease syndrome in the edible crab, *Cancer pagurus* – isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. *Microbiology.* 148:743-754.
- Xu,W., Xie, J.,Shi H. and Li, C. 2010. Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China. *Aquaculture.* 300: 25-31.





โรงพยาบาลเพื่อการสอนด้านสัตว์ใหญ่

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

The Large Animal Teaching Hospital
Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology

“มุ่งมั่นบริการวิชาการ สนับสนุนการเรียนการสอนและงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง”

ภารกิจ...

- บริการให้คำปรึกษาด้านสุขภาพสัตว์และการเลี้ยงดูสัตว์แก่เกษตรกร
- บริการตรวจวินิจฉัยโรคและรักษาสัตว์ป่วยทั้งในและนอกสถานที่โดยมีอุปกรณ์เครื่องมือที่ทันสมัย เช่น เครื่องเอกซเรย์ เครื่องอัลตราซาวนด์
- บริการย้ายฝากตัวอ่อนในโค
- บริการให้คำปรึกษาแก้ปัญหาการผสมติดยากในสัตว์
- บริการให้คำปรึกษาด้านการจัดตั้งศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง
- สนับสนุนการทำงานวิจัยและการค้นคว้าเพื่อพัฒนาด้านวิชาการของคณาจารย์
- สนับสนุนการเรียนการสอนของนักศึกษาโดยมุ่งเน้นให้นักศึกษาเรียนรู้ได้จากประสบการณ์จริงภายใต้การดูแลของสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาล และคณาจารย์ที่มีความรู้ความสามารถเฉพาะด้านอย่างใกล้ชิด

คณะสัตวแพทยศาสตร์

“เราภูมิใจที่ได้ให้บริการ”

