

สภาวะที่เหมาะสมของการใช้เลคตินเป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของ กุ้งแชบ๊วยต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค

Optimizing Conditions for Using Lectin as a Marker for Banana Shrimp Response against Pathogenic Challenge

วิไลวรรณ แซ่โง้ว¹ ปิ่นนภา ลิ้มพานิช² วณิดา ฤทธิเดช² และ ประภาพร อุทารพันธุ์^{2*}

Wilaiwan Senghoi¹, Pinnapa Limpanich², Wanida Rittidach² and Prapaporn Utarabhand^{2*}

Received: 20 March 2019, Revised: 16 December 2019, Accepted: 12 March 2020

บทคัดย่อ

เลคตินเป็นโปรตีนจำพวกที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทะเลที่เลี้ยงในฟาร์ม ซึ่งจำแนกตามแหล่งที่มาของเซลล์ บุก งานวิจัยนี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เลคตินเป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของกุ้งแชบ๊วยต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค ได้วัดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (HA) ของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อก่อโรค และพัฒนาเทคนิค ELISA มีความไวสูงวัดปริมาณเลคตินได้น้อยสุด 12 ng เมื่อฉีดกุ้งด้วยเชื้อปริมาณต่างๆ พบว่า *Vibrio harveyi* 5×10^7 เซลล์ มีผลทำให้ HA และ specific HA ของเลคตินในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง เป็น 6.8 และ 10.5 เท่า ตามลำดับ แล้วมีค่าลดลง สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเลคตินที่หาด้วยวิธี ELISA โดยโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ทั้งหมดมีค่าลดลงจากการฉีดเชื้อ การฉีดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ในปริมาณที่เหมาะสมมีผลทำให้ระดับ HA และปริมาณเลคตินในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ไม่ได้หรือมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดการฉีดกุ้งด้วยน้ำเกลือ, inactive *V. harveyi* หรือเชื้อไม่ก่อโรค *Vibrio cholerae* การฉีดกุ้งด้วย WSSV 10^{-7} ของหัวเชื้อ ทำให้ค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมฟ์เพิ่มสูงสุดเป็น 3.8 เท่า ที่ 18 ชั่วโมง แล้วลดลง งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของเลคตินในฮีโมลิมฟ์สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคที่บุกรุก และบ่งบอกปริมาณเชื้อก่อโรคที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำกุ้ง คือ *V. harveyi* 5×10^7 เซลล์ หรือ WSSV 10^{-7} ของหัวเชื้อ

คำสำคัญ: เลคติน, กุ้งแชบ๊วย, จุลินทรีย์ก่อโรค, *Vibrio* spp., WSSV

¹ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

¹ School of Allied Health Sciences, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand.

² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

² Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): wilaiwan.se@wu.ac.th Tel: 08 9462 1325

ABSTRACT

Lectin is one of pattern recognition proteins which plays an important role in crustacean innate immunity. It is capable of recognizing specific carbohydrates on the cell surfaces of invading microorganisms. In this study, in order to optimize conditions for using lectin as a marker for Banana shrimp response against pathogenic challenge, changes in hemagglutinating activity (HA) of lectin in the hemolymph of shrimp injected with pathogens were investigated. ELISA was also developed to quantify lectin contents in the hemolymph with the sensitivity as low as 12 ng per assay. Among the challenge of shrimp with various amounts of pathogenic bacterium, the injection with *Vibrio harveyi* (5×10^7 cells) resulted in a significant increase in HA and specific HA of hemolymph lectin to the maximum level at 12 h post-injection of 6.8 and 10.5 folds, respectively and then decreased. It was agreed well with a change in levels of lectin contents determined by ELISA while total protein in the hemolymph was reduced from injection. The changes in hemolymph HA and lectin contents indicated the significant response of shrimp against pathogenic *V. harveyi* and toward the appropriate amount of the challenged bacterium since HAs were more or less the same in the hemolymph of shrimp during injection with saline, inactive *V. harveyi* or non-pathogenic *Vibrio cholerae*. When each shrimp was injected with white spot syndrome virus (WSSV) 10^7 of stock, HA of hemolymph lectin increased to the highest level (3.8 folds) at 18 h post-injection and then declined. Altogether, it is concluded that changes in lectin levels in the hemolymph could be used as a marker for shrimp response toward invading pathogens, indicating the appropriate amount for pathogenic challenge that was *V. harveyi* 5×10^7 cells or WSSV 10^7 of stock

Key words: Lectin, *Fenneropenaeus merguensis*, pathogen, *Vibrio* spp., WSSV

บทนำ

สัตว์ทะเลในกลุ่มครัสเตเชียนอย่างกุ้งเป็นที่ต้องการของตลาดโลก และเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีมูลค่าการส่งออกค่อนข้างสูง แต่อุปสรรคที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลคือการระบาดของโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย หรือไวรัส การวิจัยเพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งจึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการป้องกันและควบคุมโรค ปัญหาการเกิดโรคระบาดในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ทำให้กุ้งท้องถิ่นที่หาพ่อแม่พันธุ์ได้ง่ายกว่าและมีราคาถูกกว่าอย่างกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*) เป็น

ตัวเลือกที่น่าสนใจ กุ้งแชบ๊วยเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง อาศัยระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด (innate immunity) เพื่อป้องกันตนเอง ทั้งชนิดอาศัยเซลล์ฮีโมไซท์เป็น หลัก ในการ กำจัด สิ่ง บุก รุก แบบ phagocytosis, encapsulation หรือ nodule formation ในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียนยังมีโปรตีนหลากหลายชนิดที่ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์เจ้าบ้านจากการบุกรุกหนึ่งในนั้นคือเลคติน (lectin) ซึ่งมีบทบาทในการจดจำเซลล์แปลกปลอมและกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอื่นๆ ตามมา อาทิ กระบวนการยับยั้งหรือทำลายเซลล์แปลกปลอม (Wang and Wang, 2013) การจดจำสิ่งแปลกปลอมเป็นขั้นตอนเริ่มต้นใน

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โปรตีนที่ทำหน้าที่จดจำและจับกับโมเลกุลหรือโครงสร้างของสิ่งแปลกปลอมเรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs)

เลคตินเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่จับได้อย่างจำเพาะกับน้ำตาลบนผิวเซลล์ จึงเป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดต่างๆ เกาะกลุ่ม (hemagglutination) (Goldstein *et al.*, 1980) เลคตินแต่ละชนิดจับจำเพาะกับผิวเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกันไปตามชนิดของน้ำตาลบนผิวเซลล์นั้นๆ ดังนั้นการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาแอกทิวิตี (activity) ของเลคติน และใช้จำแนกชนิดของเลคตินที่มีความจำเพาะต่อชนิดของน้ำตาลต่างกัน เลคตินมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์และแบบอาศัยสารน้ำที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของคริสเตเรียนอย่างหลากหลาย อาทิ ชักนำให้เกิด phagocytosis หรือ encapsulation ต่อเซลล์บุกรุก (Ling and Yu, 2006; Kwankaew *et al.*, 2018) ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียและเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการกำจัดไวรัส (Runsang *et al.*, 2018) มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการทำงานของเซลล์อีโมไซท์ (Sierra *et al.*, 2005) และช่วยกำจัดแบคทีเรียในฮีมอลิมฟ์ผ่านการแสดงออกของ antimicrobial peptides (AMPs) (Wang *et al.*, 2014) เลคตินในสัตว์กลุ่มคริสเตเรียนมักพบในฮีมอลิมฟ์และส่วนใหญ่เป็นแบบ C ซึ่งต้องการ Ca^{2+} ในการเกิดปฏิกิริยา เลคตินในฮีมอลิมฟ์ที่ทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มได้พบหลากหลาย เช่น ในกุ้งกุลาดำ กุ้ง *Penaeus californiensis* กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* และในปู *Scylla serrata* (Ratanapo and Chulavattanol, 1992; Vargas-Albores *et al.*, 1993; Chattopadhyay *et al.*, 1996; Vazquez *et al.*, 1996) ในฮีมอลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยมีเลคตินที่

จำเพาะต่อน้ำตาล sialic acid ที่สามารถทำให้เชื้อก่อโรคอย่าง *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* เกาะกลุ่มได้ดีกว่า *Vibrio vulnificus* แต่ไม่เกาะกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคงู เช่น *Vibrio cholerae* การเกาะกลุ่มดังกล่าวถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาล sialic acid และ fetuin (Rittidach *et al.*, 2007; Utarabhand *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบปริมาณเลคตินในฮีมอลิมฟ์เพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งแชบ๊วยหรือกุ้งกุลาดำมีการติดเชื้อ (Ratanapo and Chula-vattanol, 1992; Utarabhand *et al.*, 2017a) จากการศึกษาเหล่านี้บ่งชี้ถึงบทบาทที่สำคัญของเลคตินในฮีมอลิมฟ์ในการป้องกันและยับยั้งแบคทีเรียที่บุกรุก เนื่องจากระดับของเลคตินที่เพิ่มขึ้นในฮีมอลิมฟ์เกิดจากการตอบสนองของกุ้งต่อการติดเชื้อ งานวิจัยนี้จึงต้องการใช้การเปลี่ยนแปลงของระดับเลคตินทั้งด้านแอกทิวิตีและปริมาณโปรตีนของเลคตินในฮีมอลิมฟ์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของกุ้งต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* และ white spot syndrome virus (WSSV) และใช้เป็น parameter ในการระบุปริมาณเชื้อก่อโรคที่เหมาะสมซึ่งทำให้เกิดการเหนี่ยวนำได้ดีที่สุด โดยวิเคราะห์แอกทิวิตีของเลคตินในฮีมอลิมฟ์ด้วยการทำ hemagglutination และวัดปริมาณโปรตีนของเลคตินโดยการพัฒนาเทคนิค ELISA ให้มีความไว (sensitivity) สูง ทั้งนี้เพื่อนำผลการวิจัยไปศึกษาปัจจัยอื่นๆ เช่นการใช้ปริมาณเชื้อก่อโรคที่เหมาะสมไปเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมฮีมอลิมฟ์ตัวอย่างจากกุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วยที่ใช้ในการศึกษามีขนาดลำตัวยาวประมาณ 10-14 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 20-30 กรัม และอยู่ในระยะคราบแข็ง (ไม่อยู่ในระยะลอกคราบ) จับจากทะเลอันดามัน นำมาเลี้ยงในถังพักใน

น้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt ให้ออกซิเจนตลอดเวลา และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C โดยให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 5 ครั้ง เป็นเวลา 5 วัน สังเกตพฤติกรรมว่ากุ้งแข็งแรงสมบูรณ์ดีไม่มีอาการติดเชื้อ ก่อนใช้ในการทดลอง (Runsang et al., 2018) จากนั้นจะเลือกจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้ง ปลอ่ยให้แข็งตัวที่ 4 °C นาน 1 คืน โฮโมจีไนซ์ (homogenize) แล้ว เซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที ที่ตะกอนที่เป็นกากเซลล์ และเก็บส่วนใสหรือโฮโมลิมฟ์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายและหาปริมาณของเลคติน

2. การทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย

ในการทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย ทำตามวิธีของ Utabhand et al. (2007) ดังนี้ จะเลือกกระต่ายผสมกับเฮพาริน (heparin) เพื่อกันเลือดแข็งตัว นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 5 นาที ล้างเม็ดเลือดแดงด้วย TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 - 0.85% NaCl) โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม 2 ครั้ง แวนลอสเม็ดเลือดแดงใน TBS ให้ได้ความเข้มข้น 2% แล้วนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงโดยผสมสารละลายเลคตินที่เจือจางแบบ 1:2 ตาม ลำดับ (1:2 serial dilution) 50 ไมโครลิตร กับ 2% สารแวนลอสเม็ดเลือดแดง 50 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลท ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนสารละลายเลคติน แอคติวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating activity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของการเจือจางสูงสุดของสารละลายเลคตินซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้อย่างสมบูรณ์ แสดงผลในรูปของหน่วย HA ต่อมิลลิกรัมโฮโมลิมฟ์ตัวอย่าง

(U/ml) ส่วน specific HA คำนวณได้จากค่า HA ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนของตัวอย่าง (U/mg)

3. การวัดปริมาณเลคตินด้วยวิธี ELISA

ในการหาปริมาณของโปรตีนเลคตินในโฮโมลิมฟ์ ด้วยวิธี ELISA ตามวิธีของ Utabhand et al. (2017a) ดังนี้ ทำการทดลองแต่ละหลุมโดยนำโฮโมลิมฟ์เจือจางด้วยบัฟเฟอร์เคลือบ (coating buffer, 50 mM Na₂CO₃, pH 9.6) ด้วยอัตราส่วนตั้งแต่ 1:50 ถึง 1:400 เติมนลงในเพลทขนาด 96 หลุม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ PBST (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.15 M NaCl - 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ล้างซ้ำ 3 ครั้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ PBST ที่มี 3% BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีต่อเลคตินบิริสุทธิ (1 ° Ab) (Utabhand et al., 2017a) ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ PBST อัตราส่วนระหว่าง 1:1,000 ถึง 1:5,000 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้างปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติมน 2 ° Ab ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับแอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (anti-rabbit IgG peroxidase conjugated) ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ PBST อัตราส่วนระหว่าง 1:12,500 ถึง 1:50,000 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เติมนสารละลาย 0.4 mg/ml o-phenylenediamine (OPD) ใน 50 mM sodium citrate phosphate, pH 5.0 ที่มี 0.01% H₂O₂ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A492) ด้วยเครื่อง ELISA

microplate reader จากค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่วัดได้ สามารถคำนวณหาปริมาณเลคตินใน ฮีโมลิมพ์ได้โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานเลคตินซึ่งทำในทำนองเดียวกัน แต่ใช้เลคตินบริสุทธิ์เคลือบผิวเพลทในปริมาณต่างๆ กัน

4. การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของฮีโมลิมพ์ตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ คูดฮีโมลิมพ์ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง โดยทำควบคู่กับ BSA (bovine serum albumin) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน เจือจาง BSA มาตรฐานให้มีปริมาณโปรตีนในช่วง 0 - 10 ไมโครกรัม ผสมกับสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 - 4.7% ethanol - 8.5% phosphoric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี นาน 1-2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595)

5. การเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรคปริมาณต่างๆ

5.1 การฉีดกึ่งแซบวัยด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi*

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองคือ *V. harveyi* นำไปเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar ที่มี 2% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °C ค้างคืน แล้วเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการนำไปเลี้ยงใน tryptic soy broth จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) โดยการเซนตริฟิวจ์ ล้างตะกอนและเตรียมแบคทีเรียในน้ำเกลือ ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.1 หน่วย เพื่อหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่สามารถกระตุ้นให้กุ้งติดเชื้อต่างๆ และมีเวลามากพอต่อการสังเกตการสังเคราะห์เลคติน จึงเริ่มจากการทดลองชุดที่ 1 แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม ทำการฉีดกึ่งกลุ่มที่ 1 ถึง 5 ด้วยเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่ม

ควบคุม ฉีดกึ่งด้วยน้ำเกลือ อย่างเดียว ปริมาตรเท่ากัน การทดลองชุดที่ 2 แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ทำการฉีดกึ่งกลุ่มที่ 1 ถึง 5 ด้วยเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 และ 5×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ และชุดที่ 3 แบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม ทำการฉีดกึ่งกลุ่มที่ 1 ถึง 4 ด้วยเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 และ 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ ทำการทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำ สังเกตอาการการติดเชื้อของกุ้งเป็นระยะๆ เมื่อกุ้งมีการติดเชื้อจะแสดงอาการอ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำไม่มีทิศทางและตัวอืด ดูดเลือดจากกุ้งแต่ละตัวที่เวลา 0, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง เวลาละ 3-5 ตัว แล้วนำไปเตรียมฮีโมลิมพ์ตามวิธีข้อ 1 จากนั้นนำฮีโมลิมพ์ไปวัดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระด่าย เปรียบเทียบกับกุ้งชุดควบคุม ทำการทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำ ส่วนตัวกุ้งนำไปทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธีตรวจสอบการเรืองแสงของเชื้อในที่มีตามวิธีของ Jiravanichpaisal and Miyazaki (1994) ข้อมูลที่ได้จะถูกระบุค่าสถิติด้วย One-way ANOVA โดยใช้ Duncan's multiple comparison test ที่มีค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

5.2 การฉีดกึ่งแซบวัยด้วยเชื้อ WSSV

หัวเชื้อไวรัส WSSV ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุขุมาศย์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ ซึ่งได้ผ่านการทดสอบแล้วว่าที่ความเข้มข้น 10^7 เท่าของหัวเชื้อทำให้กุ้งตาย 50% ภายใน 5 วัน โดยแบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม ฉีดกึ่งกลุ่มที่ 1 ถึง 5 ด้วย WSSV ปริมาณ 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 และ 10^9 เท่าของหัวเชื้อตามลำดับ ที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือ ปริมาตรเท่ากัน ทำการทดลองกลุ่มละ 2 ซ้ำ แล้วนำ

กึ่งไปเลี้ยงต่อตามปกติ คือดเลือดจากกึ่งแต่ละตัวที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เวลาละ 3-5 ตัว แล้วนำไปเตรียมฮีโมลิม์ฟตามวิธีข้อ 1 เพื่อหาแอกทิวิตีของเลคติน

6. การศึกษาเลคตินในกึ่งที่ได้รับเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ

ในการทดลองชุดนี้ใช้กึ่งแซบวัยขนาดกลางที่มีน้ำหนัก 17 ± 3 กรัม แบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม คือ 3 กลุ่มแรกฉีดกึ่งแต่ละตัวด้วยแบคทีเรียปริมาณ 5×10^7 เซลล์ ได้แก่ *V. harveyi*, *V. cholerae* และ inactive *V. harveyi* กลุ่มที่ 4 ฉีดด้วย WSSV ปริมาณ 10^{-7} ของหัวเชื้อต่อตัวกึ่ง และกลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดกึ่งด้วยน้ำเกลืออย่างเดียว ทำการทดลองกลุ่มละ 2 ตัว คือดเลือดจากกึ่งแต่ละตัวที่เวลา 0, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง (เวลาละ 3-5 ตัว) นำฮีโมลิม์ฟของกึ่งแต่ละตัวไปวิเคราะห์หา HA สำหรับ ฮีโมลิม์ฟของกึ่งกลุ่มที่ฉีดด้วย *V. harveyi* วิเคราะห์หา HA ปริมาณเลคตินด้วยวิธี ELISA และปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 4 ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ค่าสถิติด้วย One-way ANOVA โดยใช้ Duncan's multiple comparison test ที่ซึ่ง $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับการทำให้ *V. harveyi* inactive ทำโดยนำ *V. harveyi* แบบ active ที่เลี้ยงปกติ ปริมาณ 5×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วแขวนลอยตะกอนแบคทีเรียในน้ำเกลือที่มี 0.1% thimerosal บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ค้างคืน ล้างตะกอนแบคทีเรียหลังการเซนตริฟิวจ์ในน้ำเกลือ แล้วแขวนลอยกลับให้มีปริมาตรเท่ากับเริ่มต้น จากนั้นเจือจางและนำฉีดไปกึ่ง

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

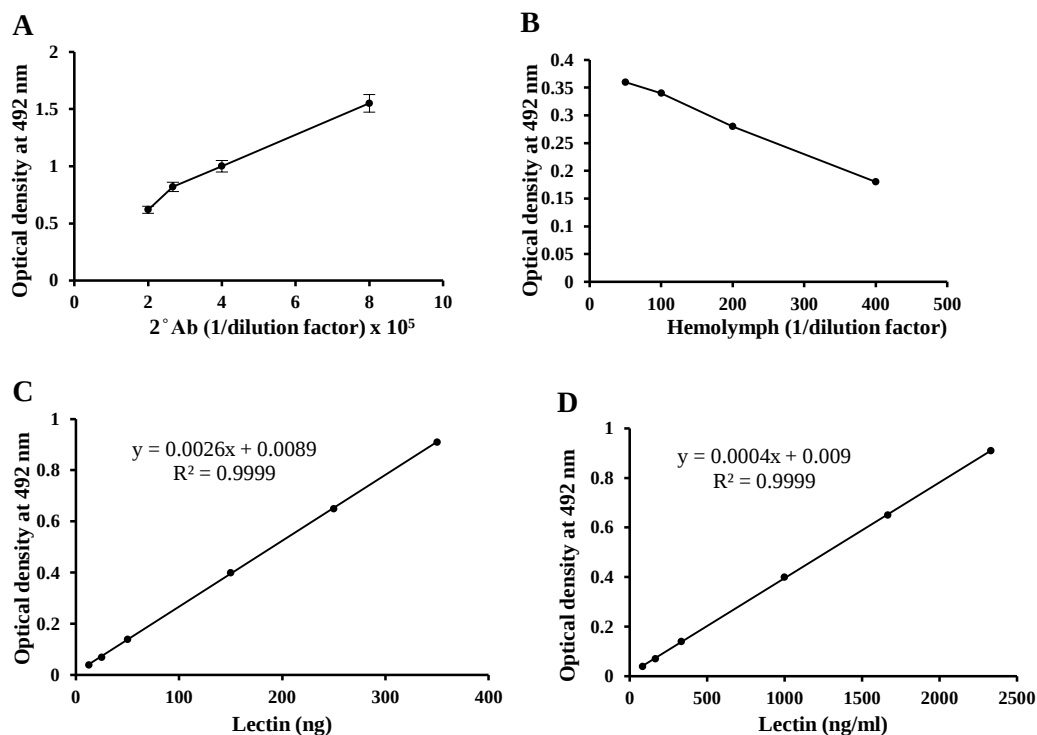
1. คุณลักษณะของเลคตินที่ศึกษาและการพัฒนาเทคนิคเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเลคติน

จากการศึกษาเลคตินในฮีโมลิม์ฟของกึ่งแซบวัยเบื้องต้น พบว่าสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเกาะกลุ่ม (hemagglutination) ได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงของคนหรือสัตว์ชนิดอื่นๆ (Utarabhand *et al.*, 2007) ในการวิจัยนี้จึงได้วัดแอกทิวิตีของเลคตินด้วยการวัดความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย (HA) ยังพบว่า HA ของเลคตินในฮีโมลิม์ฟของกึ่งแซบวัยเกิดได้ดีเมื่อมี Ca^{2+} แต่ไม่มีแอกทิวิตีเมื่อมี EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) หรือในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี Ca^{2+} บ่งชี้ว่าเลคตินที่ศึกษาเป็นเลคตินแบบ C ซึ่งเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องในกลไกการป้องกันตนเองของกึ่ง (Ratanapo and Chulavatnatol, 1992; Rittidach *et al.*, 2007)

งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาวิธี ELISA ให้มีความจำเพาะและมีความไวสูงเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในฮีโมลิม์ฟได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้นำเลคตินที่ทำบริสุทธิ์จากฮีโมลิม์ฟของกึ่งแซบวัย และใช้แอนติบอดีต่อเลคตินบริสุทธิ์ (Utarabhand *et al.*, 2017a) เป็น 1° Ab ในการพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อทดสอบหาปัจจัยที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ จากการทำโดยใช้ 1° Ab ที่เจือจางด้วยอัตราส่วนระหว่าง 1:1,000 ถึง 1:5,000 พบว่า 1° Ab ที่เจือจาง 1:3,000 ให้ค่า A492 ดีที่สุดคือไม่น้อยหรือมากเกินไป ส่วน 2° Ab ที่เจือจางด้วยอัตราส่วนระหว่าง 1:12,500 ถึง 1:50,000 พบว่า 2° Ab ที่เจือจาง 1:25,000 ให้ค่า A492 ดีที่สุด (ภาพที่ 1A) และปฏิกิริยาของเอนไซม์ เปอร้ออกซิเดสเกิดได้ดีที่สุดเมื่อใช้สับสเตรทเป็น 0.4 mg/ml OPD และ 0.01% H_2O_2 โดยเวลาของการเกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที เพื่อลดผลเบี่ยงเบนอันอาจเกิดจากการใช้ปริมาณตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม จึงได้วิเคราะห์โดยใช้ฮีโมลิม์ฟที่เจือจางด้วยอัตราส่วนตั้งแต่ 1:50 ถึง 1:400 พบว่าการเจือจางในช่วงดังกล่าวยังให้ผลแปร

ผันเป็นเส้นตรงตามปริมาณเลคติน (ภาพที่ 1B) แต่การเจือจางที่ 1:100 ให้ค่า A492 ต่ำกว่าค่าอื่นๆ จึงเลือกใช้ไอโมลิฟที่เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:100 ตลอดการทดลองทั้งหมด การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาจึงสรุปผลได้เป็นดังนี้ ใช้ไอโมลิฟที่เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:100 เคลือบเพลท ใช้ 1° Ab ที่เจือจาง 1:3,000 เท่า ใช้ 2° Ab ที่เจือจาง 1:25,000 เท่า วัดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรท 0.4 mg/ml OPD และ 0.01% H_2O_2 และเวลาของการเกิดปฏิกิริยา 30 นาที จากการทำกราฟมาตรฐานของเลคตินบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของเลคตินในไอโมลิฟของกึ่งแซบวัยพบว่ากราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงตามปริมาณของเลคตินบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 12 - 350 นาโนกรัม โดยมีค่า Correlation coefficient $R^2 = 0.9999$ (ภาพที่ 1C) เมื่อ

หาความไวของเทคนิคโดยใช้ตัวอย่างเป็นเลคตินบริสุทธิ์พบว่า วิธี ELISA ที่พัฒนานี้ สามารถวัดปริมาณเลคตินที่ความเข้มข้นน้อยสุด 80 ng/ml (หรือ 12 ng) และได้มากที่สุดถึง 2,330 ng/ml โดยมีค่า $R^2 = 0.9999$ (ภาพที่ 1D) ซึ่งมีความไวใกล้เคียงเคียงกับการใช้เทคนิคนี้ในการหาความเข้มข้นของเลคตินในซีรัมของกึ่งก้ามกราม (Agundis *et al.*, 2000) โดยสรุปงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค ELISA ที่มีความไวเพื่อใช้ในการหาปริมาณเลคตินในไอโมลิฟของกึ่งแซบวัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในทำนองเดียวกับการใช้ ELISA หาปริมาณเลคตินในกึ่งก้ามกราม (Agundis *et al.*, 2000) และในไอโมลิฟของกึ่ง *Fenneropenaeus indicus* (Jayasree *et al.*, 2000) ซึ่งทั้งค่า HA และปริมาณเลคตินที่เปลี่ยนแปลงในไอโมลิฟของกึ่งแซบวัยจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของการตอบสนองของกึ่ง ต่อ การ ติด เชื้อ อ ก อ โร ค ได้

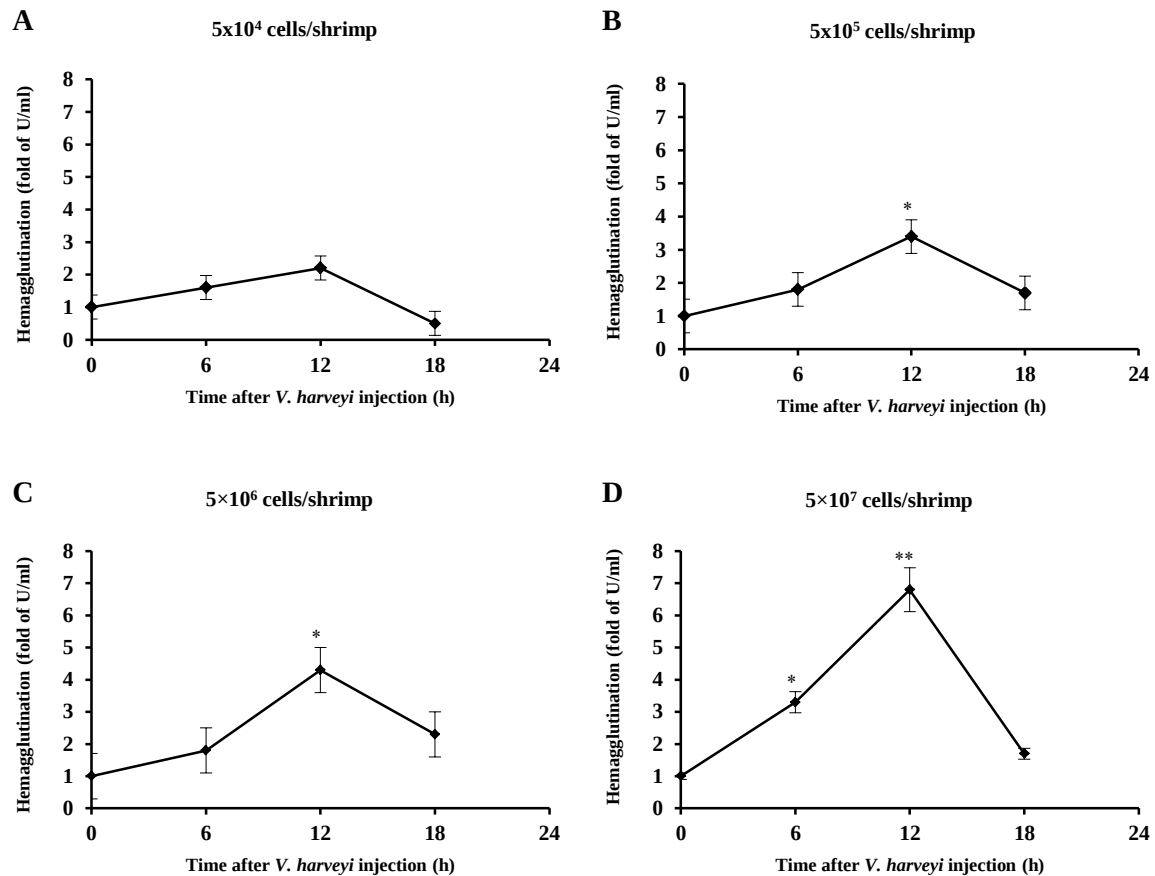


ภาพที่ 1 การพัฒนาเทคนิค ELISA (A) การเจือจางแอนติบอดีต่อ IgG ของกระด่ายที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (2° Ab) (B) การเจือจางตัวอย่างไอโมลิฟที่เหมาะสม (C) กราฟมาตรฐานของเลคตินบริสุทธิ์ และ (D) การหาความไวของการวิเคราะห์

2. แอคติวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ปริมาณต่างๆ

จากผลการวิจัยที่พบว่าเลคตินบริสุทธิ์และเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย สามารถเกาะกลุ่มเชื้อก่อโรคของกุ้งคือ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดีกว่า *V. vulnificus* แต่ไม่เกาะกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคงุ้ง เช่น *V. cholerae* (Rittidach *et al.*, 2007; Utarabhand *et al.*, 2007) เนื่องจากแบคทีเรียที่ก่อโรคอย่างมากในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ *V. harveyi* งานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ *V. harveyi* ในการศึกษาผลการเหนี่ยวนำให้กุ้งแชบ๊วยติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค แล้ววิเคราะห์การตอบสนองของกุ้งด้วยการวัดแอคติวิตีของเลคติน (HA) ในฮีโมลิมพ์ แต่การตอบสนองนั้นต้องมีนัยสำคัญทางสถิติ เพื่อที่ค่าการเปลี่ยนแปลงของ HA ในฮีโมลิมพ์จึงมีนัยสำคัญต่อการใช้เป็นตัวบ่งชี้การติดโรคได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้หาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการฉีดกระตุ้นกุ้งเพื่อก่อให้เกิดการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญตามเวลา และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ซึ่งพบว่าเมื่อฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณ 10^5 เซลล์/กุ้ง HA ของเลคตินมีค่าเพิ่มขึ้นที่เวลาต่างๆ ไม่มากนัก แต่มีค่าเพิ่มตามปริมาณเชื้อที่ฉีด จาก 10^6 - 10^9 เซลล์/กุ้ง ซึ่งพบว่าค่า HA เพิ่มขึ้นอย่างมาก การฉีดด้วยเชื้อปริมาณ 1×10^8 เซลล์/กุ้ง พบค่า HA มากสุด แต่กุ้งตายก่อน 12 ชั่วโมง ขณะที่การฉีดด้วยเชื้อ 1×10^9 เซลล์/กุ้ง ทำให้กุ้งตายภายในเวลา 1 ชั่วโมง (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ด้วยเหตุนี้จึงลองฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi*

ปริมาณในช่วง 1×10^8 - 5×10^8 เซลล์/กุ้ง พบว่าการฉีดเชื้อด้วยปริมาณ 5×10^8 เซลล์/กุ้ง จะทำให้กุ้งมีค่า HA เพิ่มขึ้นมากที่สุด แต่กุ้งตายเร็วเกินไป จึงเปลี่ยนปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ฉีดเป็น 5×10^4 - 5×10^7 เซลล์/กุ้ง พบว่า ค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเมื่อฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* 5×10^4 เซลล์ แต่เพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อฉีดด้วยเชื้อ 5×10^5 และ 5×10^6 เซลล์ และเพิ่มมากที่สุดเมื่อฉีดด้วย *V. harveyi* 5×10^7 เซลล์ต่อตัวกุ้ง และกุ้งแสดงรูปแบบการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียปริมาณต่างๆ ในทำนองเดียวกัน คือเมื่อหาค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมพ์ ณ เวลาต่างๆ เทียบกับค่า HA ที่ชั่วโมง 0 พบว่าค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมพ์เพิ่มขึ้นชั่วโมงที่ 6 แล้วเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 และลดลงในชั่วโมงที่ 18 (ภาพที่ 2A-D) ในขณะที่ค่า HA ของกุ้งชุดควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกัน ณ เวลาต่างๆ ในช่วง 0-18 ชั่วโมง หลังฉีดด้วยน้ำเกลือ (รูปที่ 3A) บ่งชี้ว่าวิธีการฉีดกุ้ง ไม่ได้ทำให้กุ้งเครียดและไม่มีผลต่อค่า HA ของเลคตินที่เปลี่ยนแปลง แต่การฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* เป็นการเหนี่ยวนำให้กุ้งตอบสนองต่อแบคทีเรียโดยมีแอคติวิตีของเลคติน (HA) เพิ่มขึ้นในฮีโมลิมพ์ จากการที่ฉีดกุ้งด้วยปริมาณ 5×10^7 เซลล์/กุ้ง ทำให้กุ้งตอบสนองโดยมีค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมพ์เพิ่มมากที่สุดและเป็นปริมาณที่กุ้งยังมีชีวิตตลอดการทดลอง ดังนั้นปริมาณ *V. harveyi* ที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้กุ้งแชบ๊วยเกิดโรคและตอบสนองได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นการฉีดกุ้งด้วยเชื้อแบคทีเรีย 5×10^7 เซลล์/กุ้ง



ภาพที่ 2 แอคติวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งที่ฉีด *V. harveyi* ปริมาณต่างๆ

(Significant differences at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

3. แอคติวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สำหรับการฉีดกุ้งแต่ละตัวด้วย WSSV ปริมาณ 10^{-5} - 10^{-9} ของหัวเชื้อ พบว่า ณ ความเข้มข้นของ WSSV สูง ทำให้กุ้งตายเร็วเกินไป แต่ที่ความเข้มข้นของ WSSV ต่ำ ทำให้กุ้งตอบสนองไม่ชัดเจน เพราะการเพิ่มของค่า HA ของ เลคตินในฮีโมลิมพ์ไม่ มีนัยสำคัญ แต่ปริมาณ WSSV 10^{-7} ของหัวเชื้อเป็น ปริมาณที่เหมาะสมที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญได้ในเวลาการทดลองที่เหมาะสม กล่าวคือค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมพ์ เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เพิ่มขึ้นตามลำดับ จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 แล้วมีค่าลดลงที่ชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 3B) การใช้ WSSV 10^{-7} ของหัวเชื้อ สามารถ

เหนี่ยวนำให้กุ้งแซบวัยตอบสนองได้ดี ยืนยันได้ด้วยการวัดการแสดงออกของ mRNA ของเลคตินแบบ C 3 ชนิด ที่มีชื่อ FmLC3, FmLC5 และ FmLdlr ที่มีรูปแบบการแสดงออกของ mRNA ของเลคตินเหล่านี้ ในทำนองเดียวกับค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมพ์ที่เปลี่ยนแปลง คือการแสดงออกของ mRNA ของเลคตินแบบ C ทั้งสามชนิดเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เพิ่มขึ้นตามลำดับ จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 แล้วมีค่าลดลงที่ชั่วโมงที่ 24 (Runsaeng *et al.*, 2017; Senghoi *et al.*, 2017; Kwankaew *et al.*, 2018) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมพ์ที่เปลี่ยนแปลงเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในการติดตามการตอบสนองของกุ้งอย่างมีนัยสำคัญ และช่วยบ่งชี้ว่าปริมาณ WSSV ที่เหมาะสมในการ

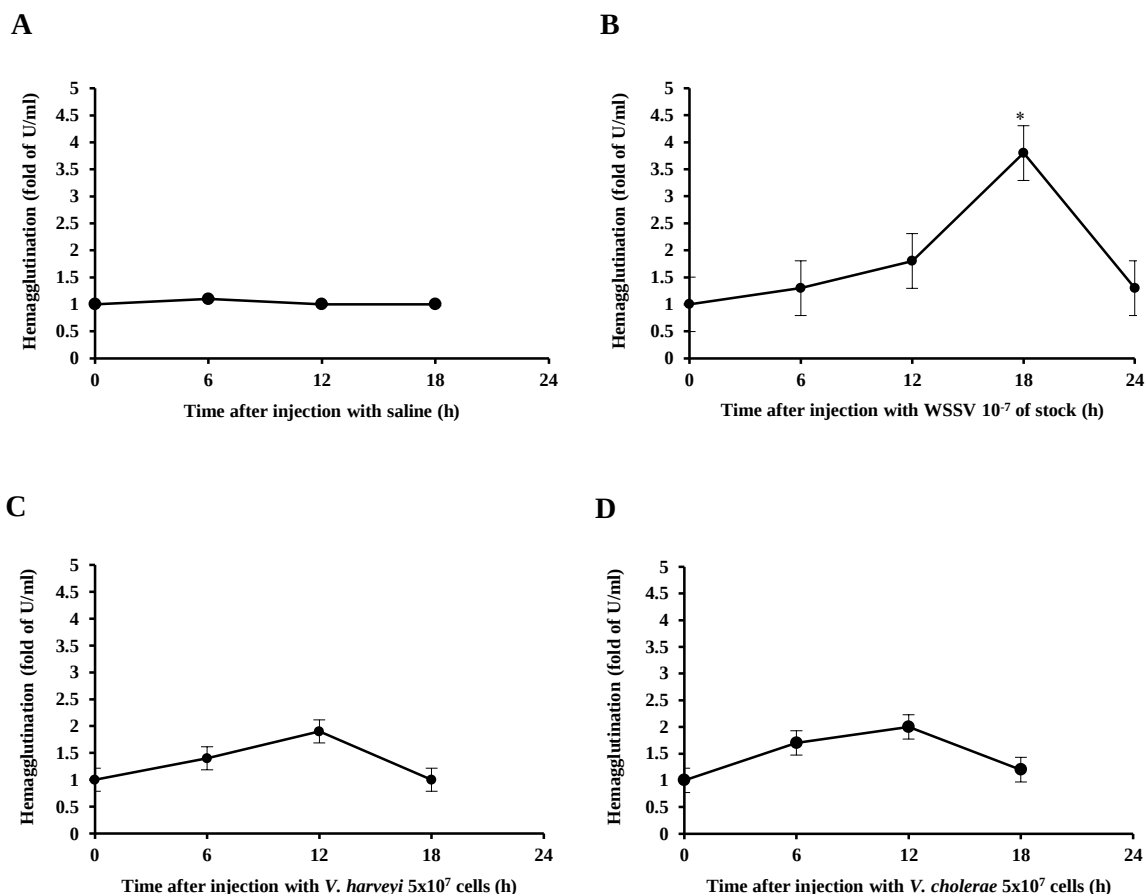
เหนียวน่าเป็น 10^{-7} ของหัวเชื้อ ซึ่งสามารถใช้ผลการวิจัยนี้ไปศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินได้ด้วย

แต่เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุด 3.8 เท่า ที่ 18 ชั่วโมง หลังการฉีดด้วย WSSV 10^{-7} ของหัวเชื้อ (ภาพที่ 3B) ในขณะที่การฉีดด้วย *V. harveyi* 5×10^7 เซลล์/กึ่ง ทำให้ค่า HA ของเลคตินเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 6.8 เท่า ที่ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 2D) บ่งชี้ให้เห็นว่ากึ่งมีการตอบสนองต่อการเหนียวน่าด้วย WSSV ซ้ำกว่า และน้อยกว่าการเหนียวน่าด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* อาจเป็นเพราะ WSSV ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบบนผิวอนุภาคของไวรัส ในขณะที่เลคตินมีความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จึงนำไปสู่การกระตุ้นกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกันได้ดีและเร็วกว่า ดังเช่นการแสดงออกของ mRNA ของเลคตินแบบ C ที่มีความจำเพาะต่อ lipopolysaccharide ชื่อ FmLC4 ที่เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการเหนียวน่าด้วย *V. harveyi* 5×10^7 เซลล์/กึ่ง มากกว่าการเหนียวน่าด้วย WSSV 10^{-7} ของหัวเชื้อ รวมทั้งมีการแสดงออกตอบสนองต่อคาร์โบไฮเดรตบนผิวแบคทีเรียคือ lipopolysaccharide ด้วย (Utarabhand et al., 2017b) ในทำนองเดียวกับเลคตินแบบ C ของกึ่งกุลาคา (Luo et al., 2006) และของกึ่ง *P. californiensis* (Vargas-Albores et al., 1993)

จากการฉีดกึ่งแซบวัยด้วย *V. harveyi* แบบ active 5×10^7 เซลล์/กึ่ง (ภาพที่ 2D) กึ่งแสดงอาการติดเชื้อชัดเจนคือว่ายน้ำอย่างไร้ทิศทาง และค่อยๆ อ่อนแอลง จากนั้นจะนอนนิ่งๆ และอาจตายภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อวัดค่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมฟ์ที่ชั่วโมงต่างๆ พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่

ความเชื่อมั่น 95-99% ทั้งชั่วโมงที่ 6 และ 12 เป็น 3.3 และ 6.8 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่าก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) ซึ่งต่างจากการฉีดด้วย *V. harveyi* แบบ inactive ด้วยปริมาณเท่ากัน พบกึ่งแสดงอาการติดเชื้อไม่ชัดเจน อ่อนแอลงเล็กน้อย ว่ายน้ำน้อยลง และมี HA ของ เลคตินในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีค่า HA เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เป็น 1.4 และ 1.9 เท่า ณ ชั่วโมงที่ 6 และ 12 ตามลำดับ (ภาพที่ 3C) อาจเป็นเพราะเลคตินยังจดจำต่อคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ของเชื้อ *V. harveyi* แบบ inactive ได้ แอคติวิตีจึงเพิ่มขึ้นเพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่บุกรุก แต่เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียแบบ inactive ไม่มีการเพิ่มจำนวนหลังการฉีดเข้าตัวกึ่ง ดังนั้นจึงอาจมีจำนวนไม่มากพอที่จะกระตุ้นให้กึ่งตอบสนองได้มากนัก จึงพบแอคติวิตีของเลคตินมีค่าเพิ่มขึ้นน้อยกว่าการฉีด *V. harveyi* แบบ active

ในทำนองเดียวกัน เมื่อฉีดด้วยแบคทีเรียไม่ก่อโรคนั่นคือ *V. cholerae* ปริมาณ 5×10^7 เซลล์/กึ่ง พบว่าหลังจากฉีด กึ่งมีอาการอ่อนแอลงเล็กน้อย บางตัวมีอาการเป็นปกติ ณ ชั่วโมงที่ 6 และ 12 สาเหตุที่กึ่งอ่อนแอลงต่างๆ ที่ไม่มีการติดเชื้อจากแบคทีเรีย vibrio ชนิดนี้ อาจเป็นเพราะกึ่งถูกดูดเลือดทุก 6 ชั่วโมงทำให้อ่อนเพลียจากการเสียเลือด และพบว่า HA ของเลคตินในฮีโมลิมฟ์มีค่าเพิ่มขึ้นไม่มาก เมื่อเทียบกับกึ่งที่ฉีดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ active โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 1.7 และ 2.0 เท่า ณ ชั่วโมงที่ 6 และ 12 เมื่อเทียบกับค่าก่อนฉีด ดังแสดงผลในภาพที่ 3D ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเลคตินไม่มีความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตบนผิวของ *V. cholerae* ซึ่งสอดคล้องกับการที่เลคตินชนิดนี้ไม่ทำให้ *V. cholerae* เกิดการเกาะกลุ่มได้ (Utarabhand et al., 2007)



ภาพที่ 3 แอทวิตีของเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งที่ฉีดน้ำเกลือหรือจุลินทรีย์

(Significant differences at $*p < 0.05$)

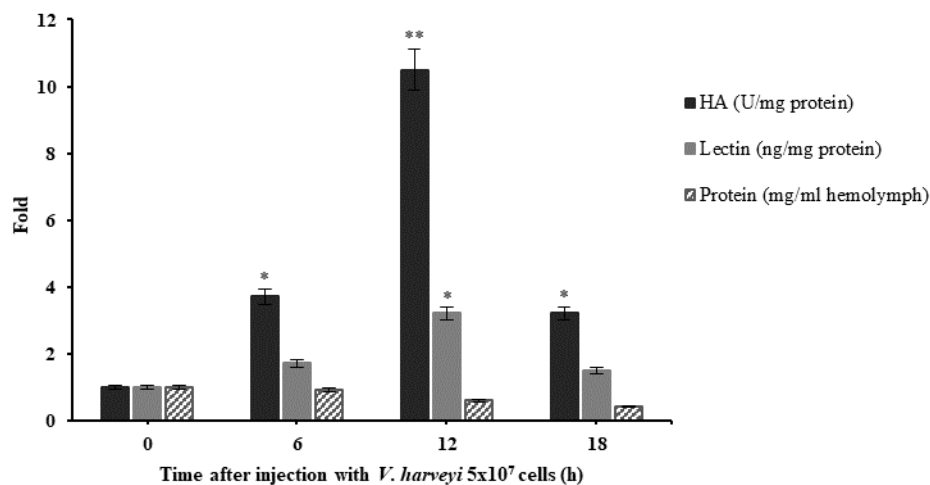
4. การตอบสนองของกุ้งที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยแบคทีเรียก่อโรค

จากการฉีดกุ้งขนาดกลางด้วย *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^7 เซลล์/กุ้ง แล้วนำฮีโมลิมพ์ที่เวลาต่างๆ ไปวัดค่า HA ของเลคติน และวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford พบว่าปริมาณโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแซบวัยที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ลดลงตามระยะเวลาหลังการฉีดเชื้อ (ภาพที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Luo (1996) ที่พบปริมาณโปรตีนลดลงในฮีโมลิมพ์ของกุ้งขาวจีนที่ฉีดเชื้อแบคทีเรียเช่นกัน ดังนั้นเมื่อคำนวณหาค่า specific HA (U/mg protein) เทียบกับค่าที่ชั่วโมง 0 ก่อนการฉีดกุ้ง พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 3.7 และ 10.5 เท่า (อย่าง

มีนัยสำคัญที่ 99%) ที่ชั่วโมง 6 และ 12 หลังการฉีดตามลำดับ (ภาพที่ 4) เพื่อทดสอบว่าการที่กุ้งมีค่า HA ของเลคตินเพิ่มขึ้นเกิดจากการที่กุ้งมีการหลั่งโปรตีนเลคตินออกมาในฮีโมลิมพ์มากขึ้นด้วยหรือไม่ จึงวัดปริมาณเลคตินในฮีโมลิมพ์ของกุ้งตัวอย่างชุดเดียวกันโดยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับค่า HA พบว่าปริมาณเลคตินจำเพาะ (นาโนกรัมเลคตินต่อมิลลิกรัมโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมพ์) เมื่อเทียบกับค่าก่อนการฉีดกุ้งเพิ่มขึ้นเป็น 1.7 และ 3.2 เท่า ที่ชั่วโมง 6 และ 12 หลังการฉีด ตามลำดับ และลดลงเป็น 1.5 เท่า ที่ชั่วโมง 18 (ภาพที่ 4) จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* 5×10^7 เซลล์/กุ้ง กระตุ้นให้กุ้งแซบวัยมีระดับปริมาณโปรตีนเลคติน

ในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้น 3.2 เท่า อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่ชั่วโมง 12 หลังการฉีด ในขณะที่มีค่า specific HA เพิ่มขึ้นเป็น 10.5 เท่า อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% แสดงให้เห็นว่ากุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองตอบสนองต่อการติดเชื้ออาจจะเป็น 2 ทาง กล่าวคือกระตุ้นเลคตินที่มีอยู่ในฮีโมลิมฟ์ให้ทำงานได้ดีขึ้น (มีค่า HA เพิ่มขึ้น) และถ้าการติดเชื้อค่อนข้างรุนแรงก็อาจมีผลกระตุ้นให้กุ้งสังเคราะห์หรือหลังเลคตินฮีโมลิมฟ์มากขึ้นเพื่อช่วย

ในการกำจัดเชื้อก่อโรค ดังจะเห็นได้จากการปริมาณเลคตินที่เพิ่มขึ้นซึ่งวัดโดยวิธี ELISA ในขณะที่ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ลดลงจากการติดเชื้อ ซึ่งจะสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนเลคตินแบบ C ที่เพิ่มมากที่สุดที่ชั่วโมง 12 หลังการฉีดด้วย *V. harveyi* 5×10^7 เซลล์/กุ้ง ดังที่ได้รายงานไปแล้ว (Runsaeng *et al.*, 2017; Senghoi *et al.*, 2017; Utarabhand *et al.*, 2017b; Kwankaew *et al.*, 2018)



ภาพที่ 4 ปริมาณและแอกทिवิตีของเลคตินและปริมาณโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีด *V. harveyi* 5×10^7 เซลล์/กุ้ง
(Significant differences at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

สรุป

เนื่องจากเลคตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคที่บุกรุก งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค ELISA ให้มีความไวเพื่อใช้หาปริมาณเลคตินได้อย่างมีประสิทธิภาพ และใช้การเปลี่ยนแปลงระดับของเลคตินในฮีโมลิมฟ์เป็นตัวติดตามการตอบสนองของกุ้งต่อการติดเชื้อก่อโรค ซึ่งในการเหนี่ยวนำกุ้งแพด้วยวิธีการฉีดเชื้อ *V. harveyi*

ปริมาณ 5×10^7 เซลล์/กุ้ง พบว่าแอกทिवิตีและปริมาณของเลคตินมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในฮีโมลิมฟ์ บ่งชี้ว่าสามารถใช้การเปลี่ยนแปลงระดับของเลคตินแบบ C ในฮีโมลิมฟ์ เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีต่อการตอบสนองของกุ้งต่อเชื้อก่อโรค และเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณเชื้อก่อโรคที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้กุ้งตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า เชื้อก่อโรค *V. harveyi* ปริมาณ 5×10^7 เซลล์/กุ้ง หรือ WSSV ปริมาณ 10^{-7} ของหัวเชื้อ/กุ้ง เป็นปริมาณที่เหมาะสม

ต่อการเหนี่ยวนำให้กุ้งตอบสนองได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถนำข้อมูลวิจัยนี้ไปใช้ในการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคของกุ้งได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ขอขอบคุณศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุภมาตย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนสถานที่เลี้ยงกุ้งตัวอย่างและอนุเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคกุ้ง

เอกสารอ้างอิง

- Agundis, C., Pereyra, A., Zenteno, R., Brassart, C., Sierra, C., Vazquez, L. and Zenteno, E. 2000. Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA. **Comparative Biochemistry and Physiology** 127B: 165-172.
- 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.
- Chattopadhyay, T., Guha, A.K. and Chatterjee, B.P. 1996. Novel antimicrobial activity of scyllin, a haemolymph lectin of the edible crab *Scylla serrata*. **Biomedical Letters** 53: 29-40.
- Goldstein, I.J., Huges, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. What should be called a lectin. **Nature** 285: 66.
- Jayasree, S., Selvam, G.S. and Thomas, S. 2000. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for agglutinin, and antibacterial protein of the shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Journal of Crustacean Biology** 20: 621-627.
- Jiravanichpaisal, P. and Miyazaki, T. 1994. Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Journal of Aquatic Animal Health** 6: 27-35.
- Kwankaew, P., Praparatana, R., Runsaeng, P. and Utarabhand, P. 2018. An alternative function of C-type lectin comprising low-density lipoprotein receptor domain from *Fenneropenaeus merguensis* to act as a binding receptor for viral protein and vitellogenin. **Fish & Shellfish Immunology** 74: 295-308.
- Ling, E. and Yu, X. 2006. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental and Comparative Immunology** 30: 289-299.
- Luo, R. 1996. Study on the contents of serum protein and glucose in the hemolymph of the shrimp *Penaeus chinensis*. **Journal of Oceanology and Limnology** 27(5): 476-480.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X. and Xu, X. 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-

- binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology** 30: 607-617.
- Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1992. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). **Comparative Biochemistry and Physiology** 102: 855-859.
- Rittidach, W., Pajit, N. and Utarabhand, P. 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta** 1770: 106-114.
- Runsaeng, P., Puengyam, P. and Utarabhand, P. 2017. A mannose-specific C-type lectin from *Fenneropenaeus merguensis* exhibited antimicrobial activity to mediate shrimp innate immunity. **Molecular Immunology** 92: 87-98.