รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน (Western Blot Transfer System for Mini-Gel) ระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และ แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

คณะผู้วิจัย

1. นางศรีภาพรรณ ธาระนารถ (80%)
2. นางรชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ (20%)

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
57 หมู่ 1 ตำบลโขมง อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี 22170

สนับสนุนโดย

ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ คณะเทคโนโลยีทางทะเล
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

งบประมาณที่ได้รับ 50,000 บาท

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน (Western Blot Transfer System for Mini-Gel) ระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงจากบ่อดิน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลองคือ กุ้งไม่ถูกตัดตาได้รับอาหารเม็ดปกติหรือชุดควบคุม (N=12), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติ (N=12), กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 50, 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร (N=16, 16, 16 และ 8) ตามลำดับ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน เก็บตัวอย่างรังไข่ ตับ/ตับอ่อนและเลือด ในวันที่ 35 และ 60 วันของการเลี้ยง

จากการหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของวันที่ 35 พบว่า ในชุดการทดลองที่ 2 มีค่าสูงกว่าการทดลองอื่น (1.78±0.65%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนกุ้งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกชุดการทดลอง จากการวัดปริมาณโปรตีนในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่า ในเลือดมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (16.07–314.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับรังไข่ (0.25–8.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และตับ/ตับอ่อน (0.92–8.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน จากการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อน ด้วย 10% โพลีอะครีลาไมด์เจล (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีนที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จำนวน 20-40 แถบ

เมื่อศึกษาขนาดของโปรตีนไวเทลลินด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System โดยใช้แอนติ้บอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนไวเทลลินของกุ้งกุลาดำ พบว่า ตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงเป็นระยเวลา 35 วัน และ 60 วัน พบโปรตีนไวเทลลินจำนวน 13 และ 15 ขนาด ตามลำดับ โดยมีขนาดโปรตีนที่เหมือนกันคือ 200, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 38 และ 34 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่ได้จากการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้งจะปรากฏแถบโปรตีนที่มีความคมชัดมากกว่าแบบถังเปียก จากการเปรียบเทียบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน ที่ได้จาก 2 วิธี พบการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบโปรตีนที่ให้ผลตรงกันคิดเป็นร้อยละ 89.32 และ 94.44 ตามลำดับ การปรากฏของแถบโปรตีนที่ไม่ตรงกันคิดเป็นร้อยละ 10.68 และ 5.56 ตามลำดับ และ พบว่า ทั้ง 2 วิธี ให้ผลของการปรากฏแถบโปรตีนจำนวนเท่ากันคิดเป็นร้อยละ 50 การวิเคราะห์แบบกึ่งแห้งให้จำนวนแถบโปรตีนมากกว่าแบบถังเปียกคิดเป็นร้อยละ 46.67 ในขณะที่การวิเคราะห์แบบถังเปียกให้จำนวนแถบโปรตีนมากกว่าแบบกึ่งแห้งคิดเป็นร้อยละ 3.33

Abstract

This study were examined the efficiency of Western Blot Transfer System between Wet Tank Blotting Systems version of Mini Trans-Blot® Cell and Semi-dry version of Trans-Blot® Turbo ™ Transfer System. The vitellin protein levels examination in the female domesticated giant tiger shrimp (*Penaeus monodon)* brood stock were divided into 6 treatments; shrimp were fed with diets without hormone; N=12), eyestalk-ablation shrimp were fed with diets without hormone (N=12), shrimp were fed with diets enhanced with 17β-estradiol hormone at 10, 50, 100 and 500 mg/kg (N=16, 16, 16 and 8) respectively. The experiment have been performed for a period of 60 days and the samples were collected at day 35 and 60 for determinations of ovary, hepatopancreas and hemolymph.

The results showed that the average of GSI of eyestalk-ablation shrimp were fed with diets without hormone (1.78±0.65%) at day 35 was significantly higher than other groups (p<0.05). While, there was no significant different of the GSI in each experimental groups (p>0.05) at day 60. The protein levels in hemolymph were (16.07–314.55 mg/ml) higher than ovary (16.07–314.55 mg/ml) and hepatopancreas (0.92–8.79 mg/ml). Moreover, analysis total protein patterns by 10% polyacrylamide gel SDS-PAGE) in ovaries, hepatopancreas and hemolymph were found that the protein bands could be seen with 20 bands.

Studying the size of vitellin protein were analyzed by Western Blot method through using antibodies that specific to vitellin proteins of black tiger shrimp. The results at day 35 and 60 were found that the vitellin proteins sizes content were 13 and 15 respectively, which could be found the similarity of protein size were 200, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 38 and 34 kDa. In addition, the transferring proteins of the semi-dry appeared on performed obviously protein bands more than those of appeared by wet tanks. The comparison of protein vitellin levels in the giant tiger shrimp cultured for 35 and 60 days with both methods, the results showed that the appearance and non-appearance of protein bands similarity were 89.32% and 94.44% respectively whereas the appearance of different protein bands were 10.68% and 5.56% respectively. However, the both methods appearance of protein bands similarity were 50% while Semi-dry analysis was appeared more protein bands than wet tanks at 46.67% and the wet tank analysis was appeared more protein bands than semi-dry at 3.33%.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบัญ	iii
สารบัญภาพ	V
สารบัญตาราง	vi
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ชีววิทยาทั่วไปของกุ้งกุลาดำ	3
2.2 ฮอร์โมน 17β-Estradiol	6
2.3 กระบวนการไวเทลโลเจเนซีส	7
2.4 เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	7
2.5 เทคนิคเวสเทิร์นบลอท *(Western blot)*	8
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	12
3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง	12
3.2 การเตรียมอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ	12
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง	12
3.4 การวัดปริมาณโปรตีน	14
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ	14
3.6 การส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท	16
3.7 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท	18
3.8 วิธีวิเคราะห์ผลการทดลอง	18
4 ผลการวิจัย	19
4.1 การเก็บตัวอย่าง	19
4.2 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน	22
4.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)	22
4.4 การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่

4.5 การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท..... 34
4.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน ระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง ในการตรวจสอบระดับโปรตีน ไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ..... 45
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 53
5.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford..... 53
5.2 การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วย เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)..... 53
5.3 การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท..... 54
5.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน ระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้งในการตรวจสอบระดับโปรตีน ไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ..... 56
5.3 ข้อเสนอแนะ..... 57
บรรณานุกรม 58
ภาคผนวก 61

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะภายนอกของกุ้งกุลาดำ *P. monodon*.....	4
2-2 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ *P. monodon*.....	4
2-3 ระยะการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ.....	5
2-4 โครงสร้างของ 17β-Estradiol.....	6
2-5 การเข้าจับระหว่าง SDS กับโปรตีน.....	8
2-6 เครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell.....	9
2-7 เครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System.....	9
2-8 การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer)	10
2-9 การติดตามผล (detection) ของวิธีเวสเทิร์นบลอท	11
3-1 แผนผังการวางถังทดลองสำหรับเลี้ยงแม่พันธ์กุ้งกุลาดำ.....	13
3-2 ขั้นตอนการประกอบแผ่นเจลกับแผ่นเมมเบรนบน Gel holder cassette.....	16
3-3 การประกอบชุดเวสเทิร์นบลอท แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) เครื่อง Mini Trans – Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell.....	17
3-4 การประกอบชุดเวสเทิร์นบลอทแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) เครื่อง Mini Trans – Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) รุ่น Trans- Blot® Turbo™ Transfer System	18
4-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน.....	22
4-2 ผล SDS-PAGE ของรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน	30
4-3 ผล SDS-PAGE ของรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน	31
4-4 ผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของ แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน.....	36
4-5 ผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของ แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน.....	42

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3-1 ส่วนประกอบในการเตรียม 10% Separating gel และ 4% Stacking gel..... 15

4-1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาวของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำก่อนการทดลอง..... 19

4-2 ค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวความยาวน้ำหนักรังไข่ค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) และค่าดัชนีตับ/ตับอ่อน (%HSI) ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน..... 20

4-3 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ความยาว น้ำหนักรังไข่ ค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) และค่าดัชนีตับ/ตับอ่อน (%HSI) ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน..... 21

4-4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA)..... 22

4-5 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน..... 23

4-6 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน..... 24

4-7 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในตับ/ตับอ่อนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน..... 25

4-8 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในตับ/ตับอ่อนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน..... 26

4-9 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน..... 27

4-10 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน..... 28

4-11 สรุปแถบโปรตีนที่พบส่วนใหญ่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE..... 32

4-12 สรุปแถบโปรตีนที่พบส่วนใหญ่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE..... 33

4-13 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell..... 38

4-14 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System..... 39

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

4-15 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell..... 43

4-16 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System..... 44

4-17 เปรียบเทียบผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System..... 46

4-18 เปรียบเทียบผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System..... 47

4-19 เปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง 49

4-20 เปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในตับ/ตับอ่อน ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง..... 50

4-21 เปรียบเปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System..... 51

4-22 เปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังและแบบกึ่งแห้ง 52

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

5-1 สรุปข้อมูลเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท..... 55

5-2 ระยะเวลาและปริมาตรของสารที่ใช้ในการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง รุ่น Trans- Blot® Turbo™ Transfer System และแบบถังเปียก รุ่น Mini Trans-Blot® Cell..... 57

บทที่1
บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำเค็มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยมากเป็นอันดับแรกในบรรดาสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2538) ต่อมาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบปัญหาด้านการผลิตกุ้งที่มีคุณภาพ ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งคือการไม่เจริญพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในโรงเรือน (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556) ปัจจุบันเกษตรกรกระตุ้นการวางไข่ของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีการตัดก้านตา เนื่องจากบริเวณก้านตาของแม่พันธุ์กุ้งมีฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนารังไข่ หากตัดก้านตาออกจะส่งผลให้แม่พันธุ์ กุ้งพัฒนารังไข่ไปจนถึงระยะสมบูรณ์เพศและพร้อมที่จะผสมพันธุ์ตามเวลาที่ต้องการ แต่การตัดก้านตากุ้งส่งผลให้ฮอร์โมนต่างๆ ในตัวกุ้งทำงานผิดปกติ ลูกกุ้งที่ได้ไม่แข็งแรง แม่พันธุ์บอบช้ำ ที่สำคัญสิ้นเปลืองแม่พันธุ์ที่ราคาแพงและหาได้ยาก (กรมประมง, 2555) นอกจากนี้มีอีกแนวทางหนึ่งคือการใช้ฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออล (17β-estradiol) ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ โดย 17β-estradiol เป็นฮอร์โมนกลุ่ม สเตียรอยด์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส (vitellogenesis) มีโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนโพร เจสเทอโรน (Progesterone hormone) และ ฮอร์โมน 17 แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเตอโรน (17α-hydroxyproges terone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556) โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศในกุ้งกุลาดำที่แม่นยำ สามารถทำได้โดยการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในอวัยวะต่างๆ เช่น เลือด ตับ/ตับอ่อน และรังไข่ ซึ่งวิธีการตรวจสอบมีหลายวิธี เช่น การให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งเป็นการแยกสารโดยใช้ความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล การวัดปริมาณโปรตีนโดยตรงด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท (Western blot) เป็นต้น

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเลได้รับงบประมาณอุดหนุนครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ ปี 2559 ในการจัดหาเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน ทำให้ปัจจุบันทางศูนย์วิจัยฯ มีเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน จำนวน 2 เครื่อง ได้แก่ แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ซึ่งหากมีการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงจากบ่อดินด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนทั้ง 2 รุ่นนี้ จะทำให้ทราบถึงปริมาณโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ และจะเป็นการช่วยสนับสนุนแนวทางในการเลือกใช้เครื่องมือให้กับนักวิจัย นักวิทยาศาสตร์และบุคลากรที่ทำงานด้านโปรตีนต่อไป

1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน (Western Blot Transfer System for Mini-Gel) ระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

1.2 ขอบเขตของการวิจัย

ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงจากบ่อดิน โดยศึกษาและทดลองภายในโรงเพาะฟักระบบปิด ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี โดยเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์อายุประมาณ 20 เดือน ในถังพลาสติกขนาด 1 ตัน จำนวน 10 ถัง ในหนึ่งถังมีกุ้งเพศเมีย 8 ตัวและเพศผู้ 1 ตัว ใช้กุ้งทั้งหมด 90 ตัว เลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ตรวจสอบคุณภาพน้ำและปริมาณของอาหารตลอดระยะเวลาการทดลอง มีระยะเวลาในการให้แสงความสว่าง:ความมืด เท่ากับ 9:15 ชั่วโมง ใช้แสงจากหลอดไฟในการให้แสงสว่าง แบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมนหรือชุดควบคุม (T1), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน (T2), กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg (T3), กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg (T4), กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg (T5) และกุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg (T6) ให้อาหารวันละ 3 มื้อ เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยเก็บตัวอย่างรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดในวันที่ 35 วัน และ 60 วัน ของการทดลอง เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นตรวจสอบและเปรียบเทียบระดับของโปรตีนไวเทลลินด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System โดยเปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินของแต่ละชุดการทดลองคิดเป็นร้อยละของการปรากฏแถบโปรตีน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

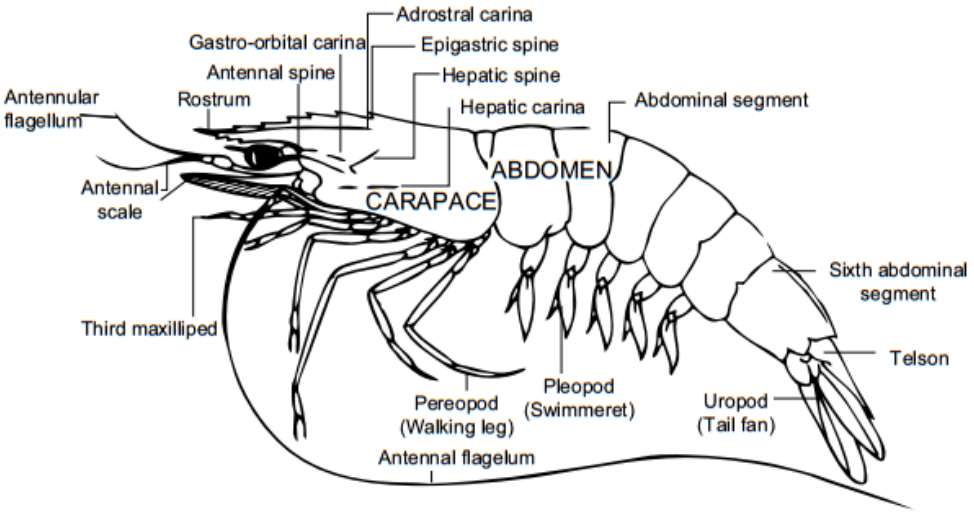
กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus, 1798) เป็นสัตว์ประจำถิ่นของประเทศไทย รวมทั้งในประเทศแถบอินโดแปซิฟิก มีรายงานผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั่วโลกเป็นจำนวน 676,000 ตัน ในปี ค.ศ. 2001 (FAO Fishery Statistic, 2009) ปัจจุบันเกษตรกรกระตุ้นการวางไข่ของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีการตัดก้านตา เนื่องจากบริเวณก้านตาของแม่พันธุ์กุ้งมีฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนารังไข่ หากตัดก้านตาออกจะส่งผลให้แม่พันธุ์กุ้งพัฒนารังไข่ไปจนถึงระยะสมบูรณ์เพศและพร้อมที่จะผสมพันธุ์ตามเวลาที่ต้องการได้ แต่การตัดก้านตากุ้งส่งผลให้ฮอร์โมนต่างๆ ในตัวกุ้งทำงานผิดปกติ ลูกกุ้งที่ได้ไม่แข็งแรง แม่พันธุ์บอบช้ำ ที่สำคัญสิ้นเปลืองแม่พันธุ์ที่ราคาแพงและหาได้ยาก (กรมประมง, 2555) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จึงมีการนำฮอร์โมนกลุ่มสเตียรอยด์มาใช้ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ ได้แก่ ฮอร์โมน 17β-estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส (vitellogenesis) ซึ่งมีความสำคัญในการแก้ปัญหาการใช้แม่พันธุ์สิ้นเปลือง

ชีววิทยาและแหล่งอาศัยของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในตระกูล Penaeidae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์แตกต่างกันหลายชื่อตามนักวิทยาศาสตร์ที่ค้นพบ แต่ที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป คือ *Penaeus monodon* Frabricius และมีชื่อภาษาอังกฤษที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ใช้อยู่คือ Giant Tiger Prawn ส่วนแหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทะเลแถบอินโดแปซิกฟิกตะวันตก อัฟริกาตะวันออก อัฟริกาตะวันตกเฉียงใต้ และคาบสมุทรอินเดีย กุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นจะอาศัยตามปากแม่น้ำ และเมื่อเต็มวัยชอบอาศัยในทะเลที่มีพื้นที่มีโคลนปนทรายระดับความลึกไม่เกิน 110 เมตร กุ้งกุลาดำชอบฝังตัวในเวลากลางวันและหากินในเวลาคืน วางไข่ได้ตลอดทั้งปีแต่จะวางไข่ชุกชุมระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนธันวาคมในแถบน้ำกร่อย กินอาหารได้ทั้งพืชและมีความแข็งแรงทนทานและเลี้ยงง่าย (พรรณิภา หาญวิวัฒนกิจ, 2531)

ลักษณะทั่วไป

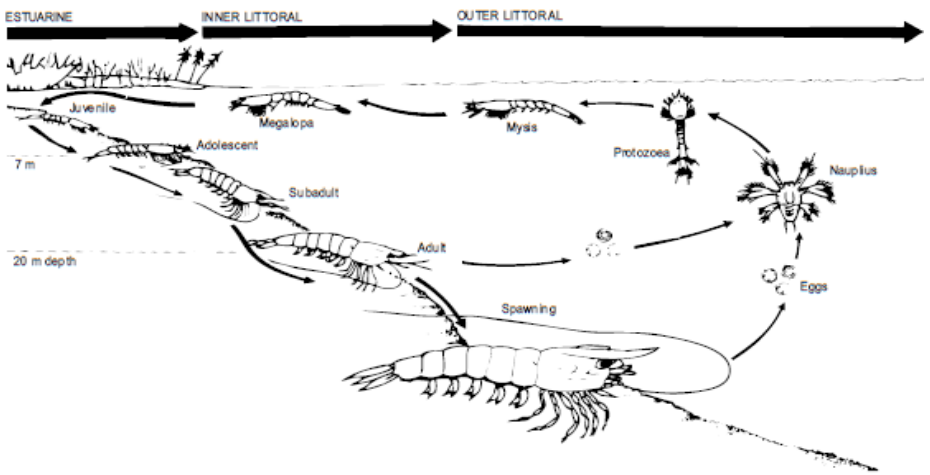
กุ้งกุลาดำมีลักษณะภายนอกเป็นเปลือกเกลี้ยงไม่มีขน มีหนวดสีดำไม่มีลาย ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายสีออกน้ำตาลเข้มพาดขวางที่หลังประมาณ 9 ลายข้างแถบสีขาว ด้านบนของกรีมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ สันกรียาวเกือบถึงคาราเปส มีสันตับ (Hepatic Crest) (ภาพที่ 2-1) ยาวตรงขนานไปกับลำตัว ขาเดินมีสีแดงปนดำ ขาว่ายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงินโคนขามีสีขาว ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มี exopod ขนาดความยาวประมาณ 18-25 เซนติเมตร



ภาพที่ 2-1 ลักษณะภายนอกของกุ้งกุลาดำ *P. monodon*
ที่มา: Motoh, 1981

วงจรชีวิต

หลังได้รับการปฏิสนธิไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะนอเพียส (Nauplius) ภายใน 12 ชั่วโมง ระยะนอเพียสมีขนาด 0.3-0.33 มิลลิเมตร ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนประมาณ 2 วันโดยไม่กินอาหาร ระยะนี้จะมีการลอกคราบ 6 ครั้ง สิ้นสุดระยะนอเพลียสจะมีขนาดประมาณ 0.6 มิลลิเมตร จากนั้นจะเจริญเข้าสู่ระยะซูเอีย (Zuea) มีขนาด 1-3.3 มิลลิเมตร ลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลา 3-4 วัน กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหารและเจริญเข้าสู่ระยะไมสีส (Mysis) มีขนาด 3.3-5 มิลลิเมตร กินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร ใช้เวลา 3-4 วันจึงเข้าสู่ระยะโพสลาวา (Postlarva) หรือที่นิยมเรียกว่า P1 ในระยะนี้จะเรียกตามจำนวนวันที่กุ้งเติบโต เช่น P10 คือเป็นกุ้งระยะโพสลาวาอายุ 10 วัน จนวันที่ 20 กุ้งจะมีขนาด 2-3 เซนติเมตร จากนั้นจะเข้าสู่ระยะจูเวนไนล์ (Juvenile) ในระยะนี้กุ้งจะมีลักษณะต่างๆ สมบูรณ์เหมือนตัวเต็มวัยแต่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้และใช้เวลา 10 เดือนถึงจะเป็นตัวเต็มวัย (adult หรือ broodstock) (ภาพที่ 2-2)



ภาพที่ 2-2 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ *P. monodon*
ที่มา: Motoh, 1981

การสืบพันธุ์

กุ้งกุลาดำมีอวัยวะเพศภายนอกมองเห็นได้ชัดเจนและสามารถใช้ลักษณะความแตกต่างของอวัยวะเพศในการจำแนกชนิดได้ อวัยวะเพศผู้เรียกว่าพีแตสม่า (petasma) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงแขนงอันในของขาว่ายน้ำคู่แรกทั้ง 2 ข้างเชื่อมติดกันเพื่อทำหน้าที่เป็นอวัยวะเพศผู้ ส่วนอวัยวะเพศเมียเรียกว่าทีไลคัม (thelycum) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงผนังด้านท้อง (sternal plate) ของรยางค์ส่วนอกปล้องที่ 7 และ 8 หรือตรงกับขาเดินคู่ที่ 4-5 พัฒนามาเป็นถุงสำหรับรับน้ำเชื้อ เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ (maturation) ซึ่งในวัยเจริญพันธุ์รังไข่หรืออวัยวะที่ใช้ในการผสมพันธุ์จะพัฒนาเต็มที่พร้อมที่จะผลิตไข่ (egg) หรือน้ำเชื้อ (sperm) และพร้อมที่จะผสมพันธุ์โดยใช้อวัยวะภายนอก การผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นภายหลังจากที่ตัวเมียลอกคราบใหม่ๆ ซึ่งแหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์ส่วนใหญ่จะได้มาจากการจับจากทะเลหรือบ่อเลี้ยง

ระยะการพัฒนารังไข่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

ระยะการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ แบ่งออกเป็น 5 ระยะ (Motoh, 1985) ดังนี้

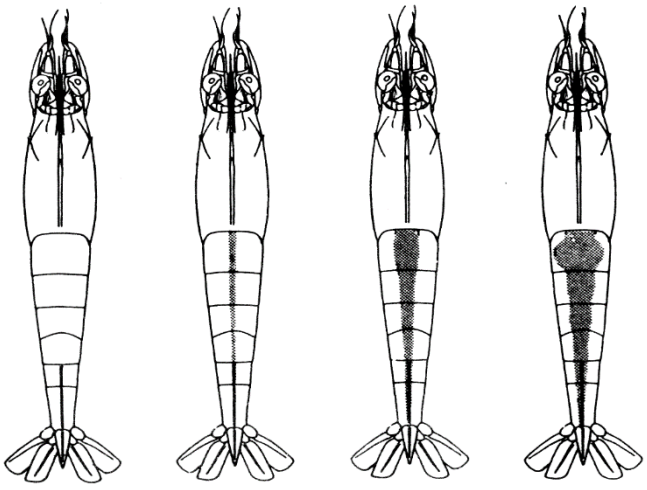
ระยะที่ 1 ระยะที่ไข่ยังไม่พัฒนา (Previtellogenic stage) รังไข่เป็นแถบใสยาวตั้งแต่หัวจรดหาง

ระยะที่ 2 ระยะที่ไข่กำลังพัฒนา (Early vitellogenic stage) แถบไข่หนาขึ้นเล็กน้อย และทึบแสง

ระยะที่ 3 ระยะไข่เกือบสุก (Late vitellogenic stage) แถบไข่หนาทึบโดยเฉพาะที่ปล้องที่ 1 จะแผ่เป็นปีกออกทั้ง 2 ข้างชัดเจน

ระยะที่ 4 ระยะการไข่สุก (Cortical rod stage) รังไข่ขยายออกเป็นลอนซ้อนๆ กันบริเวณหัวเป็นแถบยาวตลอดลำตัว โดยเฉพาะที่ปล้องแรกไข่จะขยายออกและแผ่ลึกต่ำลงถึงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 มองเห็นเป็นสีเขียวคล้ายสีมะกอก

ระยะที่ 5 ระยะการวางไข่ (Spawn) หลังจากมีการวางไข่ รังไข่จะมีลักษณะลีบ ดูภายนอกจะคล้ายกับรังไข่ระยะแรกเพียงแต่สีจะขุ่นเข้ม สามารถมองเห็นว่ากุ้งวางไข่หมดและฟักในคราวเดียวกัน ถ้าวางไข่ไม่หมดภายในครั้งเดียวนับว่าเป็นไข่ที่ไม่สมบูรณ์ (Primavera, 1988)

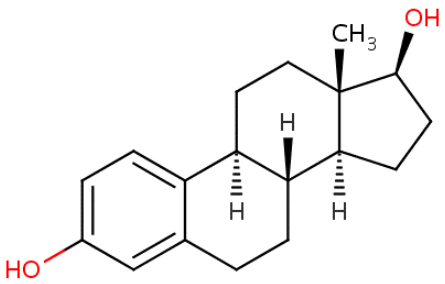


ระยะที่ 1และ5 ระยะที่ 2 ระยะที่ 3 ระยะที่ 4

ภาพที่ 2-3 ระยะการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ
ที่มา: Rolando, 1978

2.2 ฮอร์โมน 17β-Estradiol

ฮอร์โมน 17β-estradiol (E2) เป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ที่สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส (vitellogenesis) และการพัฒนารังไข่ในสัตว์ โดยฮอร์โมน 17β-estradiol เป็นสารที่พบในระยะต้นๆ ของการพัฒนารังไข่ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม decapod crustaceans (Ghosh and Ray, 1993) และยังมีโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนโพรเจสเตอโรนและฮอร์โมน 17-แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเตอโรนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไข่ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอีกด้วย (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556 อ้างอิงจาก Quackenbush, 1992) โดยมีสูตรโครงสร้าง คือ $C_{18}H_{24}O_2$ มีวงแหวน aromatic ที่มีหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 3 มีกลุ่ม methyl ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 3 มีกลุ่ม beta hydroxyl หรือ ketone ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 17 ของวงแหวน ดังภาพที่ 2-4 พบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้ตับ/ตับอ่อนสังเคราะห์ไข่แดง โดยยีน VTG mRNA ส่งผลให้รังไข่และฮีโมลิมฟ์สร้างไวเทลโลจินินและไวเทลลินทำให้ไข่เจริญพัฒนาขึ้น โดยทั่วไปฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลกับไข่ในระยะไข่อ่อน (early previtellogenic stage) มากกว่าระยะไข่สุก (full previtellogenic stages) ดังนั้น ถ้าหากกุ้งได้รับเอสโตรเจนจะทำให้การเจริญและการพัฒนาโอโอไซต์เร็วขึ้น ในกุ้งเอสโตรเจนเกิดจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน โดยสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับต่อมไร้ท่อ (Endocrine gland) จะผลิต Gonad stimulating hormone (GSH) และ Vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) จากนั้นจึงทำให้อวัยวะเป้าหมายคืออวัยวะสืบพันธุ์ และตับ/ตับอ่อนหลั่งสารออกมา (Herberman, 2000)



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของ 17β-Estradiol
ที่มา: https://www.caymanchem.com/product/10006315

ชมพูนุช โพธิ์อาสา (2558) ได้ศึกษาผลของอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol ต่อการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ *P. monodon* ที่เลี้ยงจากบ่อดิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินในการทดลองที่ 35 วัน พบว่า มีการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินที่ชุดที่ถูกตัดตา 1 ข้าง ที่ได้รับอาหารเม็ดปกติ และ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร ส่วนในการทดลองที่ 60 วัน พบว่า มีการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินในชุดควบคุมคือกุ้งไม่ถูกตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดปกติ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg และ 100 mg/kg ของอาหาร

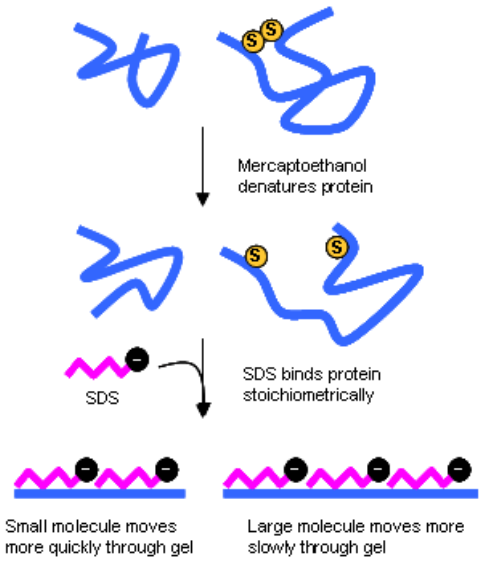
2.3 กระบวนการไวเทลโลเจเนซิส

กระบวนการไวเทลโลเจเนซีส (vitellogenesis) คือกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนไข่แดงแล้วเปลี่ยนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กเพื่อเข้าสู่เซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของการสืบพันธุ์ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เริ่มจากการผลิตโปรตีนตั้งต้น (ไวเทลโลจีนิน) ของโปรตีนไข่แดงในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจงแล้วผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็นโมเลกุลที่เล็กลงและมีการสะสมในภายหลังเพื่อใช้ในการพัฒนาเซลล์ไข่ในรูปของโปรตีนไวเทลลิน (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556) โดยโปรตีนไวเทลโลเจนิน (vitellogenin; VTG) ในกุ้งกุลาดำถือเป็นองค์ประกอบตั้งต้นในการสร้างโปรตีนไข่แดงหรือโปรตีนโยล์ค (yolk protein) และกระบวนการพัฒนาเซลล์ไข่ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในขั้นตอนการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ออกลูกเป็นไข่ (oviparous animals) (Tseng *et al*., 2001) โปรตีนไวเทลโลเจนินสังเคราะห์ขึ้นที่เนื้อเยื่อตับภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะลำเลียงผ่านกระแสเลือดไปสะสมที่เซลล์ไข่ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการพัฒนาของเอ็มบริโอ กระบวนการสร้างและสะสมโปรตีนโยล์คทำให้เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อสะสมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ (Wang and Lou, 2006) นอกจากนี้โปรตีนไวเทลโลจีนินยังมีส่วนเกี่ยวข้องในการนำแร่ธาตุ ไขมัน และสารอื่นๆ เข้าไปในเซลล์ไข่ที่กำลังมีการพัฒนาอีกด้วย กระบวนการไวเทลโลเจเนซีสของกุ้งกุลาดำแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ ช่วงก่อนสะสมโปรตีนไข่แดง ช่วงสะสมโปรตีนไข่แดงและช่วงผลิตคอร์ติคอลรอด อวัยวะที่มีรายงานว่าเป็นบริเวณที่มีการผลิตไวเทลโลเจนินในกุ้งพีเนียส คือ รังไข่ และตับ/ตับอ่อน (hepatopancreas) ในกุ้งหลายชนิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสอยู่ภายใต้การควบคุมแบบยับยั้ง (negative control) โดยฮอร์โมนที่ผลิตจากบริเวณก้านตา (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556)

2.4 เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis หรือ SDS-PAGE เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลสามารถใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในตัวอย่าง หลักการของ SDS-PAGE คือ SDS เป็นสารพวกดีเทอร์เจน (detergent) ที่มีประจุลบไปเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนามากทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ นอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนเสียสภาพเปลี่ยนสภาพจากทรงกลม (globular) ไปอยู่ในสภาพที่เหยียดตรง โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัวในกรณีนี้ จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างในน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกในอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งหมายความว่าจะสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว นอกจากนี้ การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน สำหรับการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้น ของผสมโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 นาที ในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอและมีสารประเภทไทออล (thiol) เป็นองค์ประกอบ เช่น 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในโปรตีน ภายใต้ภาวะดังกล่าวนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะเกาะกับ SDS ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ (1.4 กรัมของ SDS ต่อ พอลิเพปไทด์ 1 กรัม) (ภาพที่ 2-5) จากนั้นนำของผสมโปรตีนแต่ละตัวอย่างใส่ลงในแต่ละช่องบนเจลแผ่นและนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งทั้งเจลและบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน

การแยกมี SDS เป็นองค์ประกอบอยู่ โปรตีนเทียบเคียงจะให้ผลในลักษณะเดียวกับเจลช่องอื่นๆ โดยโปรตีนจะเคลื่อนที่ไปตามน้ำหนักโมเลกุลของตัวเองภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้นเมื่อย้อมด้วยสี เช่น สีคูแมซีบลู (Coomassie Blue) หรือสีสารประกอบของเงิน (silver stain) การแยกด้วยวิธี SDS-PAGE นั้น SDS จะจับกับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ตลอดทั้งเจล (กล่าวคือ โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะมี SDS เกาะอยู่มาก) ทำให้โปรตีนทุกชนิดมีค่าความหนาแน่นของประจุต่อน้ำหนักโปรตีนเท่ากัน การแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้จึงอาศัยการแยกโดยขนาดเพียงอย่างเดียวไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้อง และเนื่องจากระยะทางที่เคลื่อนที่ไปของสายพอลิเพปไทด์บนเจลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพอลิเพปไทด์เท่านั้น การแยกโปรตีนที่เราสนใจบนเจลนี้ทำได้โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลระหว่างโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนเทียบเคียง (https://www.gibthai.com/service/note_detail/20)



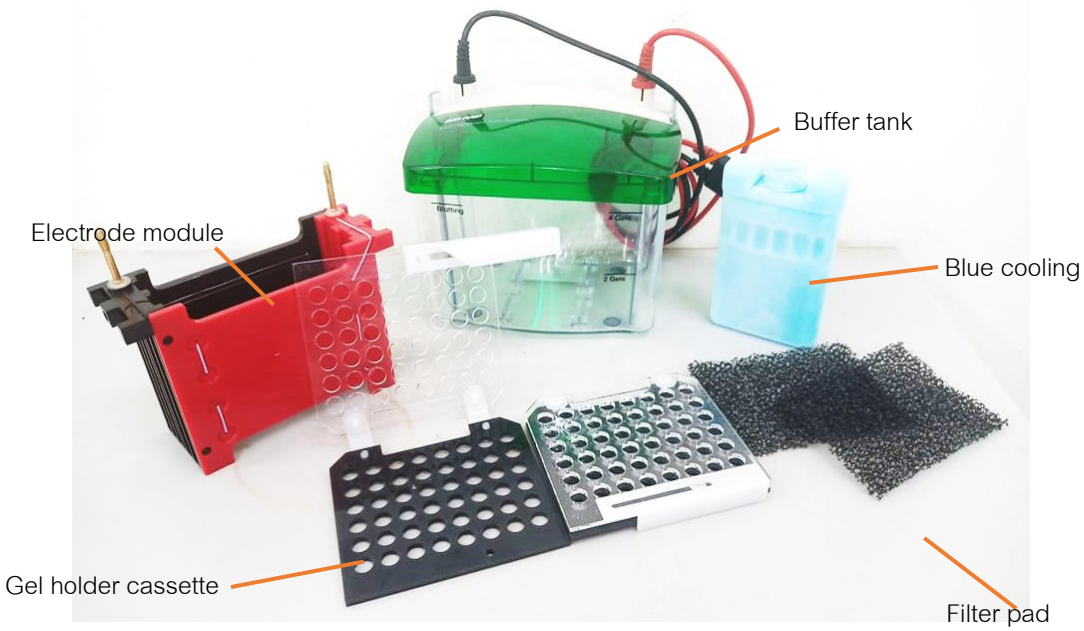
ภาพที่ 2-5 การเข้าจับระหว่าง SDS กับโปรตีน
ที่มา: https://www.gibthai.com/service/note_detail/20

2.5 เทคนิคเวสเทิร์นบลอท (Western blot)

เวสเทิร์นบลอท (Western blot) หรือ Immunoblot เป็นเทคนิคที่ใช้ติดตามโปรตีนที่สนใจในสารตัวอย่าง เช่น homogenate tissue หรือโปรตีนที่สกัดมา ซึ่งอาจเป็นสารสกัดโปรตีนจากเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือ โมเลกุลโปรตีนอื่นๆ ซึ่งอาศัยความสามารถในการเข้าจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยขั้นตอนแรกสารสกัดโปรตีนหรือโมเลกุลโปรตีนจะถูกทำให้เคลื่อนที่บนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลบนสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิค SDS-PSGE จากนั้นโปรตีนซึ่งถูกแยกบนโพลีอะคริลาไมด์เจลจะถูกถ่ายโอนลงบนพื้นผิวรองรับหรือเมมเบรน ซึ่งในปัจจุบันการถ่ายโอนโปรตีนลงบนพื้นผิวของแผ่นเมมเบรนสามารถทำได้ 3 ลักษณะ คือการถ่ายโอนโปรตีนแบบ Wet blot (immerse) (ภาพที่ 2-6) Semi-dry (ภาพที่ 2-7) และ Dry blot โดยประสิทธิภาพในการถ่ายโอนโปรตีน ระบบที่ใช้ในการถ่ายโอน รวมทั้งสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับถ่ายโอนโปรตีนจะมีความแตกต่างกัน

ภายหลังจากการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรนจะเป็นการเติมพื้นที่ว่างบนแผ่นเมมเบรนเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนอื่นๆ หรือแม้แต่แอนติบอดีกับแผ่นเมมเบรน โดยการปิดพื้นที่บริเวณ

นั้นด้วยโปรตีนชนิดอื่น ซึ่งโดยทั่วไปมักใช้ Bovine serum albomin (BSA) หรือโปรตีนไร้ไขมัน (non-fat dry milk) โปรตีนดังกล่าวจะทำหน้าที่ในการจับกับพื้นที่ว่างของเมมเบรนที่นอกเหนือจากบริเวณที่โปรตีนเข้าจับ จากนั้นโปรตีนบนแผ่นเมมเบรนจะถูกโพรบด้วยแอนติบอดีซึ่งอาจมีการเชื่อมต่อแอนติบอดีด้วยเอนไซม์หรือสารเรืองแสงเพื่อใช้ในการตรวจหาหรือติดตามโปรตีนที่สนใจ เมื่อเอนไซม์หรือสารเรืองแสงมีการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นใดๆ จะทำให้มีสีเกิดขึ้น (chromogenic detection) หรือมีการเรืองแสงเกิดขึ้น (chemiluminescence detection) ทำให้สามารถทราบตำแหน่งของโปรตีนที่สนใจได้ การทำเวสเทิร์นบลอทประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้



ภาพที่ 2-6 เครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell

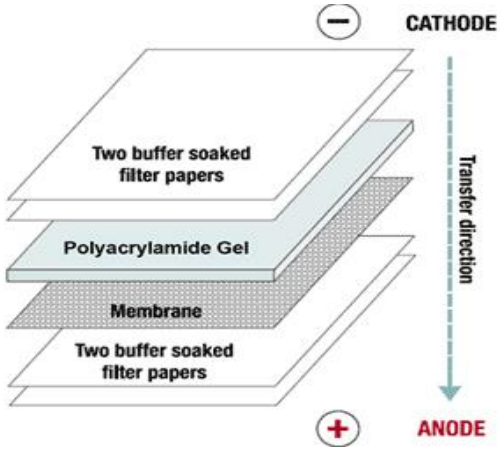
ภาพที่ 2-7 เครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

1. การเตรียมเนื้อเยื่อหรือโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการ (tissue/protein preparation) ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอทอาจได้มาจากเนื้อเยื่อของเซลล์ หรือทำการสกัดโปรตีนทั้งหมดออกมาจากเนื้อเยื่อ ซึ่งขั้นตอนการสกัดโปรตีนนั้นจะต้องมีการเติมสาร protease inhibitor ด้วยเป็นการป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์

2. การทำเจลอิเลคโตรฟอเรซีส (gel electrophoresis) เป็นการแยกโปรตีนตัวอย่างโดยอาจจะแยกตามค่า isoelectic point (*pI*) หรือแยกตามขนาดโปรตีน (molecular weight) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมทำกันมากเพราะเป็นวิธีที่ง่าย เจลที่ใช้แยกโปรตีนส่วนใหญ่ใช้เจลอะคริลาไมค์ (acrylamide) ซึ่งในการแยกโปรตีนทำได้ทั้งแบบ native gel หรือ denature gel หรือที่เรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

3. การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer) เป็นการย้ายโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซีสแล้วย้ายสู่เมมเบรนที่มีประจุบวก เช่น nitrocellulose หรือ polyvinylidene fluoride (PVDF) ในปัจจุบันวิธีการย้ายโปรตีนสามารถทำได้ 3 แบบคือ wet tank transfer เป็นการย้ายโดยอาศัย buffer tank ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้บัฟเฟอร์เยอะและใช้เวลานานพอสมควรในการย้ายโปรตีน วิธีที่สอง semi-dry transfer เป็นวิธีนิยมใช้กันมากในปัจจุบันเนื่องจากใช้บัฟเฟอร์ไม่เยอะ สามารถย้ายโปรตีนได้หลายแผ่นในเวลาเดียวกัน และสามารถย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนได้เกือบ 100% (ภาพที่ 2-8) วิธีสุดท้ายเป็นการย้ายแบบ dry bufferless transfer คือการย้ายโปรตีนโดยไม่ต้องใช้บัฟเฟอร์และใช้เวลาน้อยประมาณ 7 นาที ทำให้ลดกระบวนการเตรียมสารต่างๆ รวมถึงให้ประสิทธิภาพในการย้ายดีมาก

4. Blocking เป็นวิธีการป้องกันการเกิด non-specific ของโปรตีนอื่นๆ เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน หลังจากย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนแล้ว โปรตีนจะจับอยู่กับเมมเบรนแต่ยังมีพื้นที่ของแผ่นเมมเบรนอยู่ที่โปรตีนไม่ได้เข้าจับ ดังนั้นเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนตัวอื่นหรือแอนติบอดีกับแผ่นเมมเบรนจึงต้องทำการ blocking ด้วย bovine serum albumin (BSA) หรือ non-fat dry milk ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่นเมมเบรนยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว ดังนั้นการทำ blocking จึงมีความสำคัญเพราะจะช่วยลดการเกิด false positives ด้วย

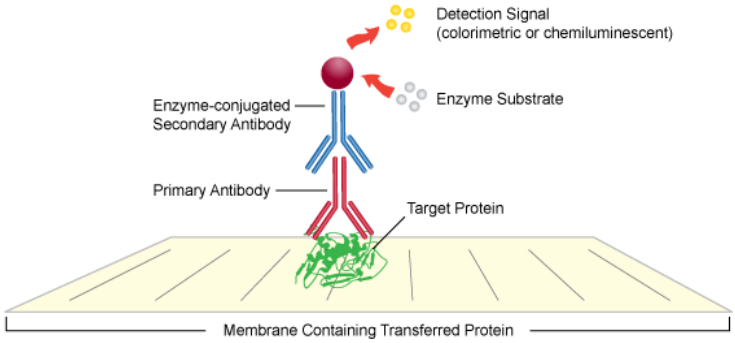


ภาพที่ 2-8 การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer)
ที่มา: https://www.gibthai.com/service/note_detail/18

5. การติดตามผล (detection) ในขั้นตอนการติดตามผลนั้นจะมีการโพรบเมมเบรนเพื่อหาโปรตีนที่สนใจด้วยแอนติบอดีซึ่งอาจมีการลิงค์ด้วยเอนไซม์ หรือ สารเรืองแสงอื่น และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีเกิดขึ้นหรือมีการเปล่งแสงออกมา ซึ่งแบ่งเป็น two step detection และ one-step detection เมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีเกิดขึ้นหรือมีการเปล่งแสงออกมา (ภาพที่ 2-9) รายละเอียดดังนี้

- Two-step detection เป็นการใช้แอนติบอดีเข้าไปจับโปรตีนที่มีความจำเพาะ เช่น ใช้ 1°Ab จับกับโปรตีนที่สนใจ บ่มเอาไว้เพื่อให้เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นทำการล้างเพื่อชะ non-specific binding ออกไป แล้วจึงใช้ 2°Ab ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สารรังสี หรือสารอื่นๆ ที่สามารถติดตามการเกิดสีหรือเรืองแสงได้ ซึ่ง 2°Ab จะเข้าจับกับ 1°Ab อย่างจำเพาะ

- One-step detection เป็นการใช้แอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์เรียบร้อยแล้วให้เข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายได้และสามารถทำให้เกิดสีได้ทันทีหลังจากเติมสารตั้งต้น โดยไม่ต้องผ่านการใช้ 2°Ab เข้าจับอีกที



ภาพที่ 2-9 การติดตามผล (detection) ของวิธีเวสเทิร์นบลอท
ที่มา : http://www.ispybio.com/search/protocols/Westernblot%20protocol36.htm

6. การวิเคราะห์ผล (Analysis) หลังจากทำการบ่มแผ่นเมมเบรนด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแล้วจะเป็นวิธีการติดตามว่าแอนติบอดีไปเกาะกับโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งใด ซึ่งการติดตามวิเคราะห์ผลขึ้นอยู่กับว่าแอนติบอดีที่ใช้ติดฉลากด้วยสารอะไร แบ่งได้เป็น

- Colorimetric detection เป็นการติดตามผลโดยดูการเกิดสีที่เกิดจากเอนไซม์ย่อยสารตั้งต้นแล้วเกิดขึ้นบนแผ่นเมมเบรน

- Chemiluminescent detection เป็นการติดตามผลโดยการใช้สารเรืองแสง ซึ่ง substrate ที่ใช้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นมา อาจต้องติดตามด้วย photo graphic filter หรือกล้อง CCD เพื่อจับภาพของเมมเบรน

- Radioactive detection การติดตามเป็นวิธีนี้ไม่ต้องใช้ substrate เพราะแอนติบอดีถูกติดฉลากด้วยสารรังสีซึ่งจะเกิดการเปล่งแสงออกมา ต้องติดตามผลด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์

- Fluorescent detection การวิเคราะห์และติดตามผลแบบนี้แอนติบอดีจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent) ซึ่งจะต้องมีการกระตุ้น (excitation) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมและมีการปล่อยแสง (emission) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน ดังนั้นจะต้องดูผลโดยการใช้กล้อง photosensor เช่น กล้อง CCD ที่มีฟิลเตอร์ ในช่วงความยาวคลื่นตรงกันกับสารเรืองแสงเหล่านั้นในการจับภาพ (www.invitrogen.com/western analysis)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์จากศูนย์เพิ่มจำนวนพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อายุประมาณ 20 เดือน แม่พันธุ์และพ่อพันธุ์กุ้งมีน้ำหนักเฉลี่ย 100 กรัมและ 90 กรัม ตามลำดับ เลี้ยงในถังพลาสติกทรงกลมสีดำขนาด 1 ตัน บรรจุน้ำความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 700 ลิตร จำนวน 10 ถัง โดยในแต่ละถังจะมีกุ้งกุลาดำเพศเมีย 8 ตัว และกุ้งกุลาดำเพศผู้ 1 ตัว เลี้ยงในโรงเรือนระบบปิด ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

3.2 การเตรียมอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมาบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.1 ไมครอน แล้วผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol ความเข้มข้นต่างกันจำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg และ 500 mg/kg ของอาหาร นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่องอัดเม็ด ปรับขนาดเม็ดอาหารให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ยาว 4 มิลลิเมตร นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วเข้าตู้อบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอาหารไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วคัดอาหารผ่านตะแกรง บรรจุใส่ถุงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

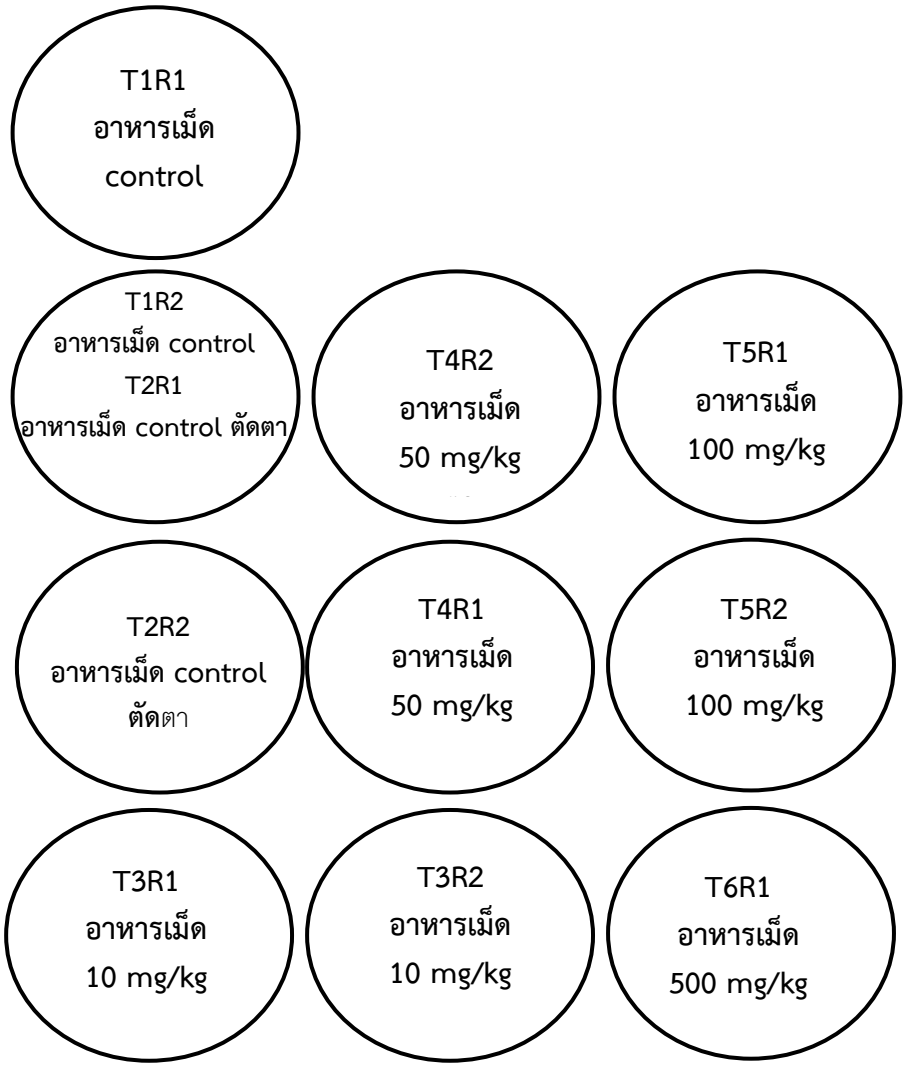
เลี้ยงแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 60 วัน แบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมนหรือชุดควบคุม (T1), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้าง ได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน (T2), กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg (T3), กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg (T4), กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg (T5) และกุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg (T6) โดยในแต่ละถังการทดลองมีแม่พันธุ์กุ้ง 8 ตัว และพ่อพันธุ์กุ้ง 1 ตัว ตรวจสอบคุณภาพน้ำทุกวันวันละ 2 ครั้งตลอดการทดลอง (7.00 น. และ 16.00 น.) ดูดตะกอนทุกสัปดาห์ มีการถ่ายน้ำและล้างถังกรองอย่างสม่ำเสมอ ดังแผนการทดลองในภาพที่ 3-1 ระหว่างการเลี้ยงมีระยะเวลาในการให้แสงสว่าง:ความมืด โดยใช้แสงจากหลอดไฟในการให้แสงสว่าง 9:15 ชั่วโมง ให้อาหารวันละ 3 มื้อ (7.00 น., 12.00 น. และ 16.00 น.) ปริมาณอาหารที่ได้รับขึ้นอยู่กับการกินอาหารของกุ้งกุลาดำในมื้อก่อน

การเก็บตัวอย่าง

นำแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน มาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว เก็บเลือดบริเวณแอ่งเลือดระหว่างขาเดินคู่ที่ 5 ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 23G ที่ภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปลดปลายเข็มออกใส่เลือดลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และผ่าเพื่อเก็บรังไข่ และตับ/ตับอ่อน นำรังไข่และตับ/ตับอ่อนมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเมีย (%GSI) และค่าดัชนีตับ/ตับอ่อน (%HSI) เก็บรังไข่ และตับ/ตับอ่อนที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียมตัวอย่างโดยสกัดโปรตีนด้วย TBS-PMSF

นำรังไข่ และตับ/ตับอ่อนไปบดใน TBS-PMSF ให้เซลล์แตก โดยใช้อัตราส่วนเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม:TBS-PMSF 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอาส่วนที่ใสซึ่งเป็นสารสกัดโปรตีนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3-1 แผนผังการวางถังทดลองสำหรับเลี้ยงแม่พันธ์กุ้งกุลาดำ

3.4 การวัดปริมาณโปรตีน

การสร้างกราฟสารสะลายโปรตีนมาตรฐาน

สร้างกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐานดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเจือจาง BSA (bovine serum albumin) ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.4, 0.06, 0.08, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน Microtiter plate หลุมละ 5 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Dry reagent (Bio-Rad, Bradford 1x Dry reagent) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตทิเตอร์ โดยใช้โปรแกรม spectro star nano ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยรายงานเป็นค่ามิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

เจือจางสารสกัดโปรตีนจากรังไข่ และตับ/ตับอ่อนด้วยน้ำกลั่นในอัตรส่วน 1:100 และเจือจางเลือดด้วยน้ำกลั่นในอัตรส่วน 1:600 จากนั้นปิเปตสารสกัดรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดที่ผ่านการเจือจางใส่ลงในไมโครเพลทที่มี Dry reagent (Bio-Rad, Bradford 1x Dry reagent) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร หลุมละ 5 ไมโครลิตร จำนวน 2 ซ้ำ ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตทิเตอร์ ด้วยโปรแกรม spectro star nano ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

การเตรียมตัวอย่างสารละลายโปรตีน

นำเลือด สารสกัดจากรังไข่ และตับ/ตับอ่อนมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดเจือจางปริมาตร 3 ไมโครลิตร ไปผสมกับ 2X Sample buffer (0.5 tris-HCl pH 7.4, Glycerol, 10% SDS, bromophenol blue และ ***β***-Merceptoethanol) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:2) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน 30 ไมโครกรัม หรือถ้าสารสกัดโปรตีนมีความเข้นข้นน้อยกว่า 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ให้คำนวนปริมาณสารสกัดที่ต้องการใช้ให้มีความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมไปผสมกับ 2X Sample buffer อัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตรรวมไม่ควรเกิน 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างของโปรตีนตัวอย่าง

การเตรียม 10% Separating gel และ 4% Stacking gel

ประกอบกระจกแผ่นเล็กและแผ่นใหญ่ที่มีความหนา 1.0 มิลลิเมตร เข้าด้วยกันเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจก จากนั้นล็อกกระจกทั้งสองแผ่นด้วย Casting frame วางลงบน Casting stand และตรวจสอบการรั่วของกระจกด้วยการปิเปตน้ำใส่ลงในช่องว่างของกระจก ถ้าไม่มีการรั่วซึมให้เตรียม 10% Separating gel โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1 จากนั้นปิเปตสารละลายใส่ลงในช่องระหว่างกระจก ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ และเพื่อทำให้ผิวหน้าชั้นแผ่นเจลมีความสม่ำเสมอให้ปิเปตน้ำใส่ลงช่องระหว่างกระจกให้พอดีกับด้านบนสุดของกระจกแผ่นเล็ก ตั้งทิ้งไว้ให้แผ่นเจลแข็งตัวเป็นเวลาประมาณ 45 -60 นาที เมื่อแผ่นเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างชั้นเจลและชั้นน้ำอย่างชัดเจน เทน้ำและซับน้ำออกให้หมด จากนั้นเตรียม 4% Stacking gel ส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1 และปิเปตลงในช่องว่างระหว่างเจลให้ถึงขอบบนของกระจก ใส่หวีลงในช่องกระจกเพื่อทำให้เกิดช่องว่างสำหรับโหลดสารละลายตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว

ตารางที่ 3-1 ส่วนประกอบในการเตรียม 10% Separating gel และ 4% Stacking gel

สารเคมี	10% Separating gel	4% Stacking gel
30% acrylamide (30%T/2.67%)	3.3 ml	2.0 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	1.25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
Distilled water	4.0 ml	1.68 ml
TEMED	15 µl	15 µl
10% Ammonium persulfate	100 µl	25 µl
ปริมาตรรวม	10 ml.	5 ml.

การทำอิเล็คโทรโฟริซิส (Polyacrylamide gel)

แยกปริมาณโปรตีนด้วย 10% polyacrylamide gel โดยประกอบเจลลงในเครื่องอิเล็คโทรโฟริซิส เติม Running buffer ตรงกลางระหว่างกระจกทั้ง 2 ข้าง ให้ท่วมเจลและเติมในถาดแชมเบอร์ (chamber) ให้ถึงขีดที่กำหนดไว้ จากนั้นค่อยๆ ดึงหวีออกจาก stacking gel โหลด Protein marker ลงในช่องหวีช่องแรกตามด้วยโปรตีนตัวอย่าง ปิดฝาแชมเบอร์และนำแชมเบอร์ลงในกล่องโฟมแล้วใส่น้ำแข็งลงในกล่องโฟมรอบๆ แชมเบอร์ โดยให้มีความสูงของน้ำแข็งเท่ากับบัพเฟอร์ ต่อสายไฟกับเครื่อง power supply ตั้งโปรแกรมโดยใช้ความต่างศักย์ 220 โวลต์ และกระแสไฟฟ้าที่ 20 มิลลิแอมแปร์/2 เจล ประมาณ 15 นาที เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่มาถึงส่วนของ Separating gel เปลี่ยนไปใช้กระแสไฟฟ้าที่ 40 มิลลิแอมแปร์/2เจล และความต่างศักย์ 250 โวลต์ เป็นเวลา 30-50 นาที จึงทำการหยุดกระแสไฟฟ้า ระหว่างการทดสอบให้สังเกตการเคลื่อนที่ของสี (dye) เพื่อไม่ให้โปรตีนที่สนใจเคลื่อนที่หลุดออกจากเจล นำแผนเจลออกโดยใช้ spacer เป็นตัวดันกระจกออก ตัดส่วน stacking gel ออก จากนั้นนำเจลออกจากกระจกด้วย spacer เช่นกัน ในระหว่างที่นำเจลออกจากกระจกให้เปิดน้ำก๊อกเบาๆ ให้น้ำไหลผ่านเจลตลอดเวลาเพื่อป้องกันเจลขาด จากนั้นนำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ ตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

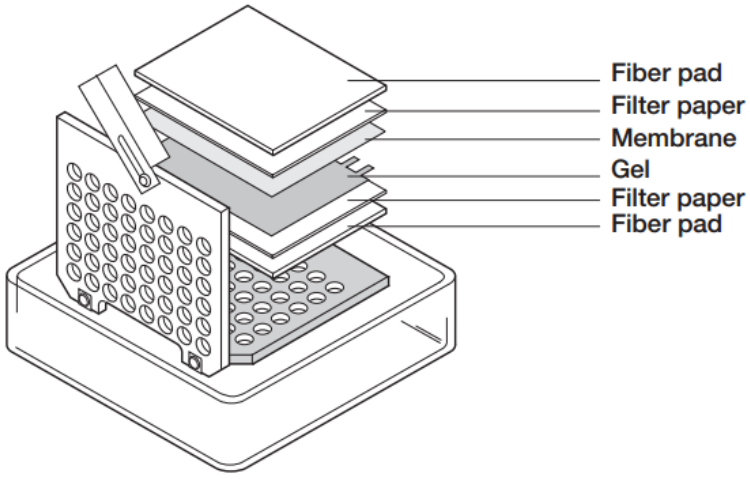
3.6 การส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

การเตรียมอุปกรณ์เพื่อใช้ในการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน

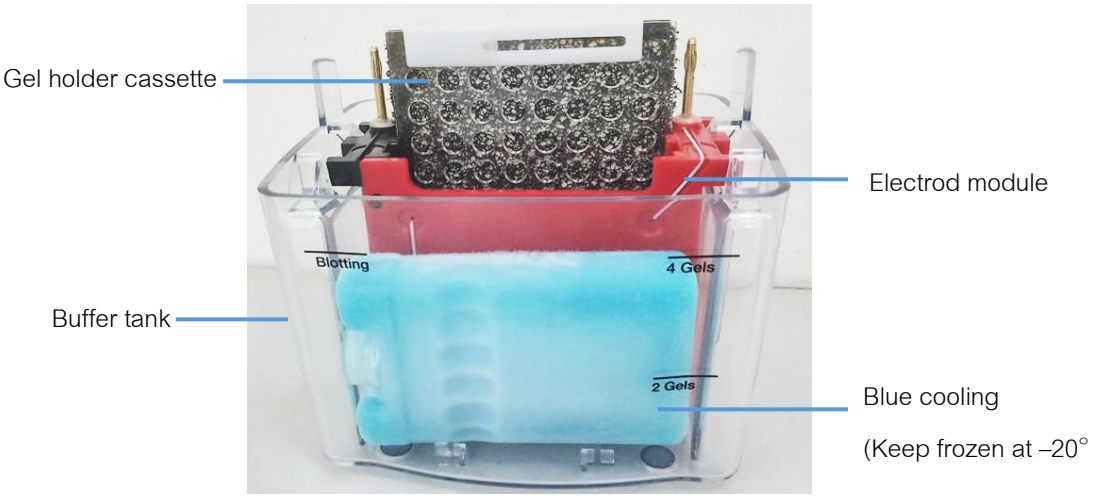
ตัดกระดาษเมมเบรน PVDF จำนวน 1 แผ่น/1เจล ให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นเจล SDS เล็กน้อย จากนั้นนำไปแช่ใน Methanol เป็นเวลา 2 นาที ระหว่างนั้นแช่ Tick paper (Wet tank 2 แผ่น และ Semi-dye 6 แผ่น) ใน 1x transfer buffer (20%Methanol) เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลาให้ย้าย PVDF มาแช่รวมกับ Tick paper เขย่าเล็กน้อย แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10-15 นาที นำเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ที่ยังไม่ผ่านการย้อมสีมาแช่ใน 1x transfer buffer (20%Methanol) 3 ครั้ง เป็นเวลา 2, 3 และ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นแช่ fiber pad (ฟองน้ำสีดำ) จำนวน 2 แผ่น/1เจล ใน 1x transfer buffer (20%Methanol) เป็นเวลา 15 นาที

การส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell

ประกอบแผ่นเจลกับแผ่นเมมเบรนบนตัวหนีบพลาสติก โดยวาง Filter pad 1 แผ่น ลงบนตัวหนีบพลาสติกด้านสีดำ ตามด้วย filter paper 1 แผ่น จากนั้นวางเจลที่ได้จากการทำ SDS บริเวณกึ่งกลางของ filter paper นำเมมเบรนด์มาวางประกบลงบนแผ่นเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ตามด้วย filter paper และ Filter pad อย่างละ 1 แผ่น ดังภาพที่ 3-2 พับตลับบรรจุแผ่นเจล (Gel holder cassette) พร้อมเลื่อนสลักให้แน่น ระวังอย่าให้แผ่นเจลและเมมเบรนขยับ สอดตลับบรรจุแผ่นเจลลงไปใน Electrode module โดยให้พลาสติกสีดำหันไปทาง Electrode module ด้านสีดำ นำ Electrode module ใส่ลงใน buffer tank จากนั้นใส่ Blue cooling ลงไปดังภาพที่ 3-3 และเติม 1x transfer buffer (20%Methanol) ให้ถึงขีดบอกปริมาตร ใส่แท่งแม่เหล็กและปรับความเร็วในการกวนเพื่อกระจายความเย็นอย่างทั่วถึง จากนั้นปิดฝาแล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ตั้งสภาวะการทำงานให้มีความต่างศักย์ 200 โวลต์ และกระแสไฟฟ้าที่ 350 มิลลิแอมแปร์/2เจล เป็นเวลา 60 นาที เมื่อสิ้นสุดการทำงานให้นำแผ่นเมมเบรนไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



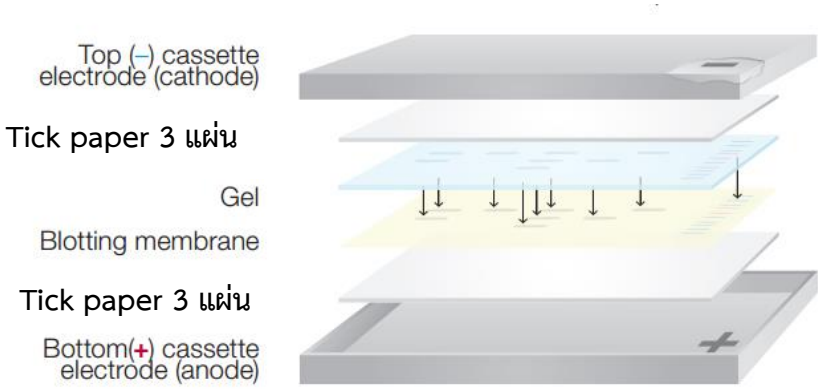
ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการประกอบแผ่นเจลกับแผ่นเมมเบรนบน Gel holder cassette
ที่มา: Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (2010)



ภาพที่ 3-3 การประกอบชุดเวสเทิร์นบลอทแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) เครื่อง Mini Trans – Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell

การส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans- Blot® Turbo™ Transfer System

ดึงถาดบรรจุเจล (Cassette base) ที่ต้องการใช้งานออกจากตัวเครื่องวางลงบนโต๊ะ แล้วเปิดถาดบรรจุเจลโดยหมุนตัวล็อกด้านบนทวนเข็มนาฬิการมาที่รูปกุญแจเปิด แล้วยกฝาปิดถาดออก จากนั้นประกอบเจลบนถาดโดยให้จัดวางอยู่ตรงกลางของแผ่นโลหะและระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ดังภาพที่ 3-4 ปิเปตสารละลาย 1x transfer buffer (20%Methanol) ที่ใช้แช่ tick paper เติมลงบริเวณด้านบนและด้านล่างของ tick paper ด้านละ 1 มิลลิลิตร ใช้ลูกกลิ้งรีดให้เรียบและอย่าให้มีฟองกากาศเอียงถาดแล้วดูดสารละลายส่วนเกินออก ปิดฝาถาดบรรจุเจล แล้วหมุนตัวล็อกตามเข็มนาฬิกาที่รูปกุญแจปิด จากนั้นนำถาดดังกล่าวไปใส่ในเครื่อง Trans-Blot® Turbo™ Blotting System ในช่องที่ต้องการ เชื่อมต่อไฟฟ้าเข้ากับเครื่องและเปิดเครื่องที่สวิตช์ด้านขวามือของเครื่อง กดปุ่มควบคุมตรงกลางใต้จอเครื่อง (LIST) กดเลือก Bio-Rad จากนั้นกดเลือก 1 MINI GEL หรือ 2 MINI GEL (เลือกตามจำนวนเจลที่ทำ) เลือกโปรแกรม STANDARD SD แล้วกดปุ่ม RUN กดเลือกช่องที่วางถาด (A:RUN หรือ B:RUN) เมื่อสิ้นสุดการทำงานให้นำถาดออกจากตัวเครื่อง หมุนตัวล็อกที่ฝาทวนเข็มนาฬิกาเพื่อปลดล็อกฝา นำแผ่นเมมเบรนไปทำการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-4 การประกอบชุดเวสเทิร์นบลอทแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) เครื่อง Mini Trans – Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System
ที่มา: Trans-blot turbo transfer system Instruction manual (2010)

3.7 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

หลังจากการ Blotting ทั้งสองวิธีแล้ว ให้ย้ายเมมเบรน PVDF ออกมายังภาชนะที่เตรียมไว้ เติม Blocking Buffer (TBST+Skimmilk) ให้ท่วมแผ่นเมมเบรน นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเท สารละลายทิ้ง จากนั้นเติม washing buffer (1XTBST) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายออกแล้วเติม Anti-rabbit VTG, 1°Ab ลงไป 15 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปบ่นที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นเท 1°Ab ออก แล้วเติม washing buffer (1X TBST) ให้ท่วมแผ่น PVDF และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที ทำ 3 ซ้ำ และเทออก จากนั้นเติม Goat Anti-Rabbit IgG-AP Conjugate, 2°Ab ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาให้เท 2°Ab ออก ตรวจสอบการปรากฏของแถบโปรตีนด้วยการเติม develop (Ap color Reagent A, Ap color Reagent B, 25x Ap color Development Buffer) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือจนกว่าจะปรากฏแถบสี ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ และบันทึกผล

3.8 วิธีวิเคราะห์ผลการทดลอง

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน (Western Blot Transfer System for Mini-Gel) ระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยเปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเมมเบรน โดยคิดเป็นร้อยละความเหมือนและความต่างของการปรากฏแถบโปรตีนของทั้ง 2 วิธี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่าง

จากการนำตัวอย่างแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำก่อนเริ่มการทดลองมาชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว และความยาวของแม่พันธุ์กุ้งก่อนการทดลองมีค่าสูงสุดในแม่พันธุ์กุ้งชุดการทดลองที่ 2 คือ 116.90±19.06 กรัม และ 22.76±1.14 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาวน้อยที่สุดในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ 3 คือ 94.59±19.66 กรัม และ 21.07±1.52 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำค่ามาเปรียบเทียบกัน พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำชุดการทดลองที่ 2 และชุดการทดลองที่ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ในขณะที่ค่าเฉลี่ยความยาว (กรี-หาง) ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำชุดการทดลองที่ 2 มีความแตกต่างจากชุดการทดลองที่ 3, 4 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 4-1)

เมื่อนำตัวอย่างแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากการทดลองเป็นระยะเวลา 35 วัน มาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ชั่งน้ำหนักของรังไข่ และตับ/ตับอ่อน พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของแม่พันธุ์กุ้งมีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 5 คือ 111.05±16.72 กรัม และมีค่าน้อยที่สุดที่ชุดการทดลองที่ 3 คือ 91.53±11.26 กรัม ซึ่งทั้ง 6 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ความยาวของแม่พันธุ์กุ้งมีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 2 คือ 22.08±1.81 เซนติเมตร และมีค่าน้อยที่สุดในชุดการทดลอง 3 คือ 20.48±0.85 เซนติเมตร ซึ่งความยาวของทั้ง 6 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดในชุดการทดลองที่ 2 คือ 1.78±0.65 กรัม มีค่าน้อยที่สุดที่ชุดการทดลองที่ 3 คือ 0.97±0.56 กรัม โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่ทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ค่าดัชนีตับ/ตับอ่อน (%HSI) มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดในชุดการทดลองที่ 2 คือ 3.58±1.08 กรัม และมีค่าน้อยที่สุดในชุดการทดลองที่ 1 คือ 2.41±1.63กรัม โดยค่าดัชนีตับ/ตับอ่อนทั้ง 6 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาวของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำก่อนการทดลอง

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย		
	น้ำหนักตัว (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	จำนวนตัวอย่าง (N)
1	105.21±11.65^{ab}	21.87±1.20^{ab}	12
2	116.90±19.06^{b}	22.76±1.14^{b}	12
3	94.59±19.66^{a}	21.07±1.52^{a}	16
4	105.10±22.25^{ab}	21.44±2.00^{a}	16
5	108.13±14.66^{ab}	21.88±1.02^{ab}	16
6	110.18±16.85^{ab}	21.48±1.59^{a}	8

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ความยาว น้ำหนักรังไข่ ค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) และค่าดัชนีตับ/ตับอ่อน (%HSI) ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย				จำนวนตัวอย่าง (N)
	น้ำหนักตัว (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	GSI (%)	HSI (%)	
1	100.81±13.26[a]	21.35±1.14[a]	1.08±0.35[ab]	2.41±1.63[a]	4
2	108.86±24.10[a]	22.08±1.81[a]	1.78±0.65[b]	3.58±1.08[a]	4
3	91.53±11.26[a]	20.48±0.85[a]	0.97±0.56[a]	2.82±0.72[a]	4
4	108.61±22.93[a]	21.78±1.28[a]	1.36±0.53[ab]	3.12±1.28[a]	4
5	111.05±16.72[a]	21.58±1.28[a]	1.12±0.24[ab]	3.33±0.69[a]	4
6	104.58±21.88[a]	20.67±1.36[a]	1.04±0.16[ab]	3.03±1.09[a]	3

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากการทดลองแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ 2 คือ กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน และชุดการทดลองที่ 6 คือ กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg มีการตายระหว่างการเลี้ยง ทำให้การเก็บตัวอย่างในวันที่ 60 เหลือตัวอย่างเพียง 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมนหรือชุดควบคุม (T1), กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg (T3), กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg (T4) และ กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg (T5) เมื่อนำตัวอย่างแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่เหลือมาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ชั่งน้ำหนักของรังไข่ และตับ/ตับอ่อน พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของแม่พันธุ์กุ้งมีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 5 คือ 99.60±16.83 กรัม มีค่าน้อยที่สุดในชุดการทดลองที่ 3 คือ 81.06±4.22 กรัม ซึ่งค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของการทดลองทั้ง 4 ชุด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ความยาวของแม่พันธุ์กุ้งมีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 5 คือ 21.53±1.34 เซนติเมตร และมีค่าน้อยสุดในชุดการทดลองที่ 3 คือ 19.40±1.01 เซนติเมตร ความยาวทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) มีค่าเฉลี่ยสูงสุดที่ชุดการทดลองที่ 5 คือ 1.37±0.70 กรัม มีค่าน้อยสุดที่ชุดการทดลองที่ 3 คือ 1.10±0.34 กรัม โดยทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ค่าดัชนีตับ/ตับอ่อน (%HSI) มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดในชุดการทดลองที่ 1คือ 3.93±0.75 กรัม และมีค่าน้อยที่สุดในชุดการทดลองที่ 5 คือ 2.92±1.08 กรัม โดยทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4-3 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ความยาว น้ำหนักรังไข่ ค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) และค่าดัชนีตับ/ตับอ่อน (%HSI) ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย				จำนวนตัวอย่าง (N)
	น้ำหนักตัว (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	GSI (%)	HSI (%)	
1	95.00±11.18[a]	20.63±1.00[a]	1.15±0.30[a]	3.93±0.75[a]	6
2	-	-	-	-	-
3	81.06±4.22[a]	19.40±1.01[a]	1.10±0.34[a]	3.13±1.21[a]	3
4	95.47±26.34[a]	20.85±2.18[a]	1.29±0.76[a]	3.48±0.81[a]	8
5	99.60±16.83[a]	21.53±1.34[a]	1.37±0.70[a]	2.92±1.08[a]	3
6	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

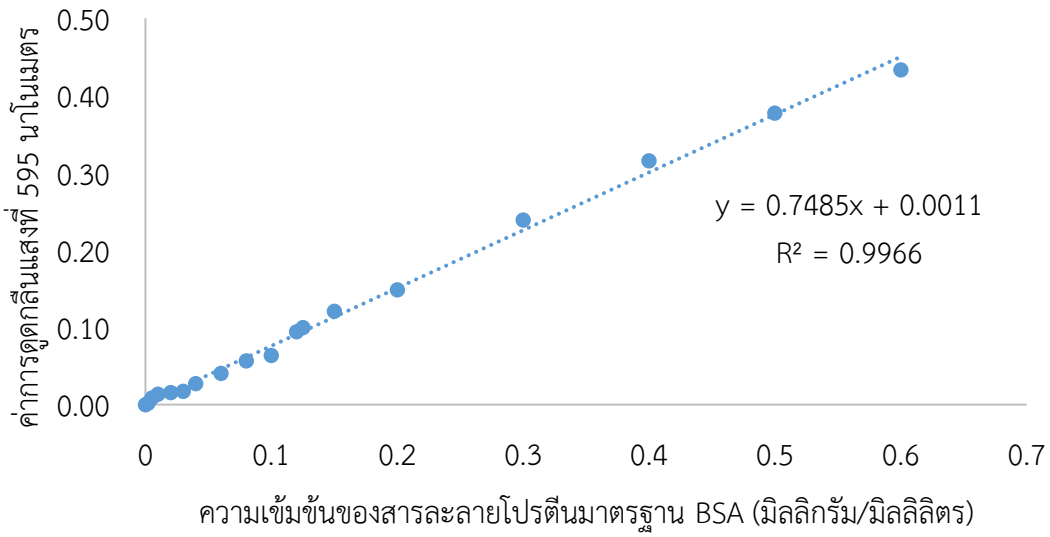
ตารางที่ 4-4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

ความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร)				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	OD
0	0.4025	0.3965	0.3963	0.3984	0.0000
0.002	0.3970	0.3991	0.4045	0.4002	0.0018
0.005	0.4075	0.4083	0.4051	0.4070	0.0086
0.010	0.4092	0.4118	0.4145	0.4118	0.0134
0.020	0.4121	0.4145	0.4150	0.4139	0.0155
0.030	0.4174	0.4124	0.4169	0.4156	0.0172
0.040	0.4306	0.4306	0.4156	0.4256	0.0272
0.060	0.4420	0.4360	0.4384	0.4388	0.0404
0.080	0.4453	0.4594	0.4603	0.4550	0.0566
0.100	0.4636	0.4591	0.4641	0.4623	0.0639
0.120	0.4927	0.4922	0.4928	0.4926	0.0942
0.125	0.4980	0.4975	0.4985	0.4980	0.0996
0.150	0.5088	0.5227	0.5264	0.5193	0.1209
0.200	0.5765	0.5359	0.5292	0.5472	0.1488
0.300	0.62077	0.6587	0.6323	0.6372	0.2388
0.400	0.7135	0.7143	0.7136	0.7138	0.3154
0.500	0.7789	0.7698	0.7779	0.7755	0.3771
0.600	0.8423	0.8348	0.8172	0.8314	0.4330

หมายเหตุ: ค่า OD คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ A_{595} นาโนเมตร ลบด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น (Blank)

4.2 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

เมื่อนำสารละลาย BSA เจือจางความเข้มข้น 0, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.4, 0.06, 0.08, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Bradford ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 4-4 เมื่อนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน ระหว่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA โดยรายงานเป็นค่ามิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

4.3 การศึกษาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

จากการวัดปริมาณโปรตีนของเลือด สารสกัดรังไข่ และสารสกัดตับ/ตับอ่อน ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำโดยการปิเปตสารละลายโปรตีนเจือจางของเลือดที่ความเข้มข้น 1:600 และ สารสกัดรังไข่และสารสกัดตับ/ตับอ่อน ที่ความเข้มข้น 1:100 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลทที่มี Dry reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูเกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA (ภาพที่ 4-1) พบว่า ปริมาณโปรตีนใน จากการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในรังไข่ของแม่กุ้งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.25–8.10 และ 2.25–7.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-5 และ 4-6) ปริมาณโปรตีนในตับ/ตับอ่อนของแม่พันธ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.92–8.79 และ 1.00–7.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-7 และ 4-8) และ ปริมาณโปรตีนในเลือดของแม่กุ้งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 16.07–281.48 และ 35.55-14.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4-9 และ 4-10)

ตารางที่ 4-5 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน

ชุดการทดลองที่	ตัวที่	ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร)	ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง 1:100 (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	1	0.0417	0.0542	5.42
	2	0.0164	0.0204	2.04
	3	0.0185	0.0232	2.32
	4	0.0104	0.0124	1.24
	ค่าเฉลี่ย			2.76±1.83
2	1	0.0315	0.0406	4.06
	2	0.0218	0.0277	2.77
	3	0.0100	0.0119	1.19
	4	0.0166	0.0206	2.06
	ค่าเฉลี่ย			2.52±1.21
3	1	0.0188	0.0236	2.36
	2	0.0236	0.0300	3.00
	3	0.0217	0.0275	2.75
	4	0.0030	0.0025	0.25
	ค่าเฉลี่ย			2.09±1.26
4	1	0.0332	0.0428	4.28
	2	0.0212	0.0269	2.69
	3	0.0294	0.0378	3.78
	4	0.0292	0.0375	3.75
	ค่าเฉลี่ย			3.62±0.67
5	1	0.0310	0.0399	3.99
	2	0.0039	0.0037	0.37
	3	0.0290	0.0373	3.73
	4	0.0618	0.0810	8.10
	ค่าเฉลี่ย			4.05±3.17
6	1	0.0216	0.0273	2.73
	2	0.0321	0.0414	4.14
	3	0.0348	0.0450	4.50
	ค่าเฉลี่ย			3.79±0.93

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร) คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดรังไข่จากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ A_{595} นาโนเมตร ลบด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น (Blank)

ตารางที่ 4-6 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลองที่	ตัวที่	ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร)	ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง 1:100 (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	1	0.0267	0.0341	3.41
	2	0.0180	0.0225	2.25
	3	0.0197	0.0248	2.48
	4	0.0205	0.0259	2.59
	5	0.0200	0.0253	2.53
	6	0.0394	0.0512	5.12
	ค่าเฉลี่ย			2.99±1.19
3	1	0.0265	0.0339	3.39
	2	0.0418	0.0544	5.44
	3	0.0338	0.0437	4.37
	ค่าเฉลี่ย			4.40±1.03
4	1	0.0564	0.0739	7.39
	2	0.0377	0.0489	4.89
	3	0.0426	0.0554	5.54
	4	0.0250	0.0319	3.19
	5	0.0585	0.0767	7.67
	6	0.0221	0.0281	2.81
	7	0.0222	0.0282	2.82
	8	0.0537	0.0703	7.03
	ค่าเฉลี่ย			5.17±2.07
5	1	0.0248	0.0316	3.16
	2	0.0357	0.0462	4.62
	3	0.0497	0.0649	6.49
	ค่าเฉลี่ย			4.76±1.67

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร) คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดรังไข่จากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ A_{595} นาโนเมตร ลบด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น (Blank)

ตารางที่ 4-7 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในตับ/ตับอ่อนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน

ชุดการทดลองที่	ตัวที่	ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร)	ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง 1:100 (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	1	0.0669	0.0879	8.79
	2	0.0297	0.0381	3.81
	3	0.0193	0.0243	2.43
	4	0.0247	0.0315	3.15
	ค่าเฉลี่ย			4.55±2.88
2	1	0.0184	0.0230	2.30
	2	0.0169	0.0211	2.11
	3	0.0188	0.0236	2.36
	4	0.0110	0.0133	1.33
	ค่าเฉลี่ย			2.03±0.48
3	1	0.0115	0.0138	1.38
	2	0.0273	0.0350	3.50
	3	0.0154	0.0190	1.90
	4	0.0240	0.0306	3.06
	ค่าเฉลี่ย			2.46±0.99
4	1	0.0209	0.0264	2.64
	2	0.0102	0.0122	1.22
	3	0.0228	0.0289	2.89
	4	0.0341	0.0441	4.41
	ค่าเฉลี่ย			2.79±1.31
5	1	0.0315	0.0405	4.05
	2	0.0516	0.0674	6.74
	3	0.0079	0.0092	0.92
	4	0.0153	0.0190	1.90
	ค่าเฉลี่ย			3.40±2.58
6	1	0.0256	0.0327	3.27
	2	0.0174	0.0217	2.17
	3	0.0156	0.0194	1.94
	ค่าเฉลี่ย			2.46±0.71

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร) คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตับ/ตับอ่อนจากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ A_{595} นาโนเมตร ลบด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น (Blank)

ตารางที่ 4-8 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในตับ/ตับอ่อนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลองที่	ตัวที่	ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร)	ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง 1:100 (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	1	0.0155	0.0192	1.92
	2	0.0247	0.0315	3.15
	3	0.0325	0.0419	4.19
	4	0.0383	0.0498	4.98
	5	0.0202	0.0255	2.55
	6	0.0265	0.0339	3.39
	ค่าเฉลี่ย			3.36±1.10
3	1	0.0543	0.0710	7.10
	2	0.0086	0.0100	1.00
	3	0.0097	0.0115	1.15
	ค่าเฉลี่ย			3.08±3.48
4	1	0.0352	0.0455	4.55
	2	0.0186	0.0234	2.34
	3	0.0318	0.0410	4.10
	4	0.0160	0.0199	1.99
	5	0.0241	0.0308	3.08
	6	0.0112	0.0135	1.35
	7	0.0172	0.0215	2.15
	8	0.0093	0.0110	1.10
	ค่าเฉลี่ย			2.58±1.24
5	1	0.0373	0.0484	4.84
	2	0.0326	0.0420	4.20
	3	0.0252	0.0321	3.21
	ค่าเฉลี่ย			4.08±0.82

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร) คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสกัดตับ/ตับอ่อนจากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ A_{595} นาโนเมตร ลบด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น (Blank)

ตารางที่ 4-9 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน

ชุดการทดลองที่	ตัวที่	ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร)	ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง 1:600 (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	1	0.1563	0.2073	124.41
	2	0.0752	0.0989	59.36
	3	0.0212	0.0268	16.07
	4	0.1336	0.1770	106.21
	ค่าเฉลี่ย			76.51±48.73
2	1	0.1503	0.1993	119.60
	2	0.1648	0.2186	131.18
	3	0.0590	0.0774	46.41
	4	0.0877	0.1156	69.38
	ค่าเฉลี่ย			91.64±40.36
3	1	0.0731	0.0961	57.68
	2	0.1607	0.2132	127.94
	3	0.2093	0.2781	166.85
	4	0.0830	0.1094	65.61
	ค่าเฉลี่ย			104.52±52.10
4	1	0.0496	0.0648	38.88
	2	0.2470	0.3285	197.07
	3	0.0453	0.0591	35.43
	4	0.1152	0.1524	91.42
	ค่าเฉลี่ย			90.70±75.40
5	1	0.2672	0.3555	213.31
	2	0.3523	0.4691	281.48
	3	0.1509	0.2001	120.08
	4	0.1146	0.1516	90.98
	ค่าเฉลี่ย			176.46±87.32
6	1	0.2239	0.2977	178.60
	2	0.0685	0.0901	54.07
	3	0.1764	0.2342	140.52
	ค่าเฉลี่ย			124.40±63.81

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร) คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเลือดแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ A_{595} นาโนเมตร ลบด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น (Blank)

ตารางที่ 4-10 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

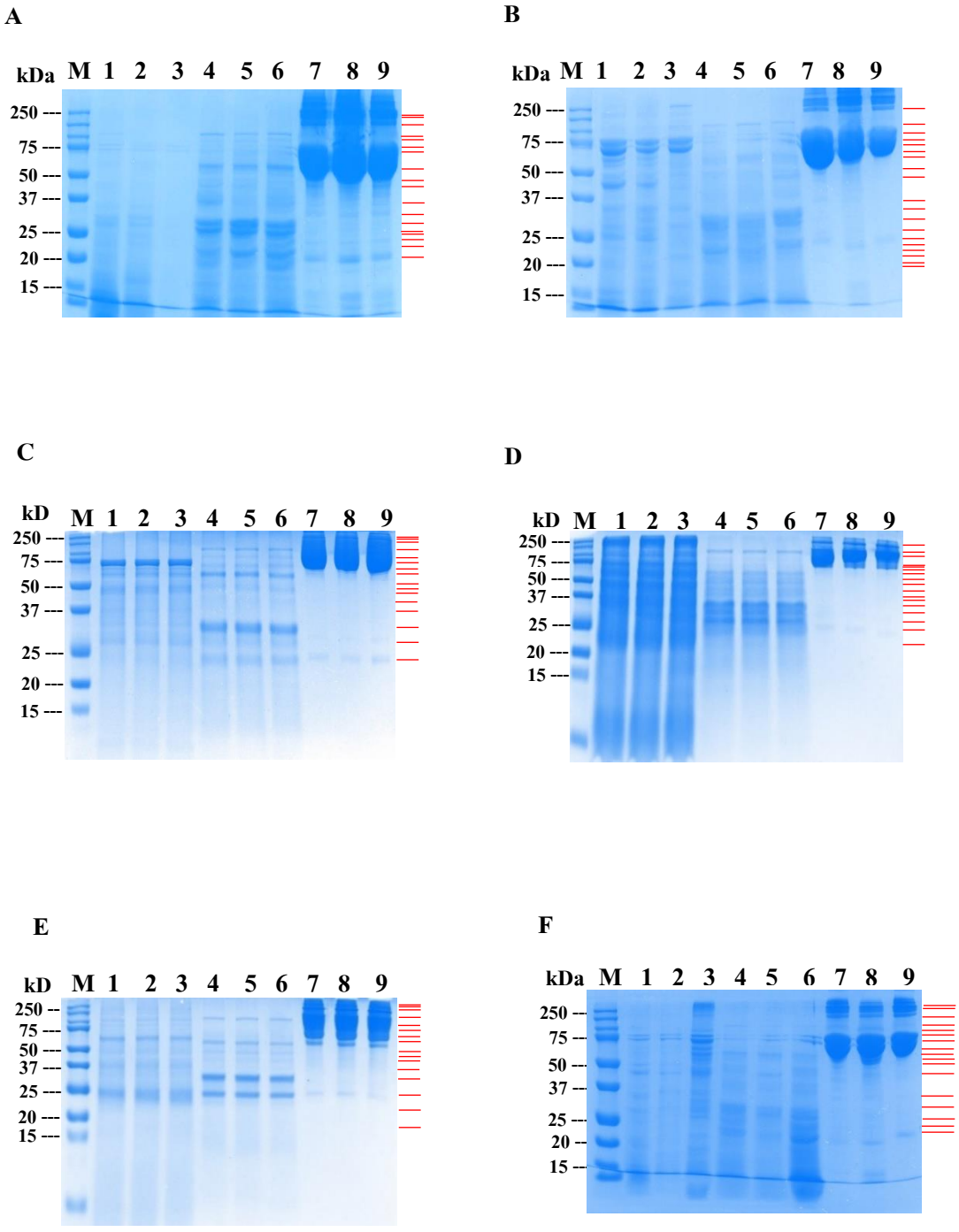
ชุดการทดลองที่	ตัวที่	ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร)	ปริมาณโปรตีนที่เจือจาง 1:600 (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	1	0.0538	0.0704	42.24
	2	0.1844	0.2449	146.93
	3	0.1410	0.1868	112.10
	4	0.2233	0.2969	178.12
	5	0.1560	0.2069	124.17
	6	0.2341	0.3113	186.77
	ค่าเฉลี่ย			131.72±52.65
3	1	0.1085	0.1434	86.05
	2	0.3935	0.5242	314.55
	3	0.2494	0.3317	199.04
	ค่าเฉลี่ย			199.88±114.25
4	1	0.0870	0.1147	68.82
	2	0.1717	0.2279	136.71
	3	0.2555	0.3398	203.89
	4	0.1910	0.2537	152.22
	5	0.2598	0.3456	207.37
	6	0.1608	0.2133	127.98
	7	0.0455	0.0593	35.55
	8	0.2351	0.3126	187.54
	ค่าเฉลี่ย			140.01±62.29
5	1	0.1835	0.2437	146.21
	2	0.2740	0.3646	218.76
	3	0.1352	0.1792	107.49
	ค่าเฉลี่ย			157.49±56.48

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสง 595 (นาโนเมตร) คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเลือดแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ A_{595} นาโนเมตร ลบด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น (Blank)

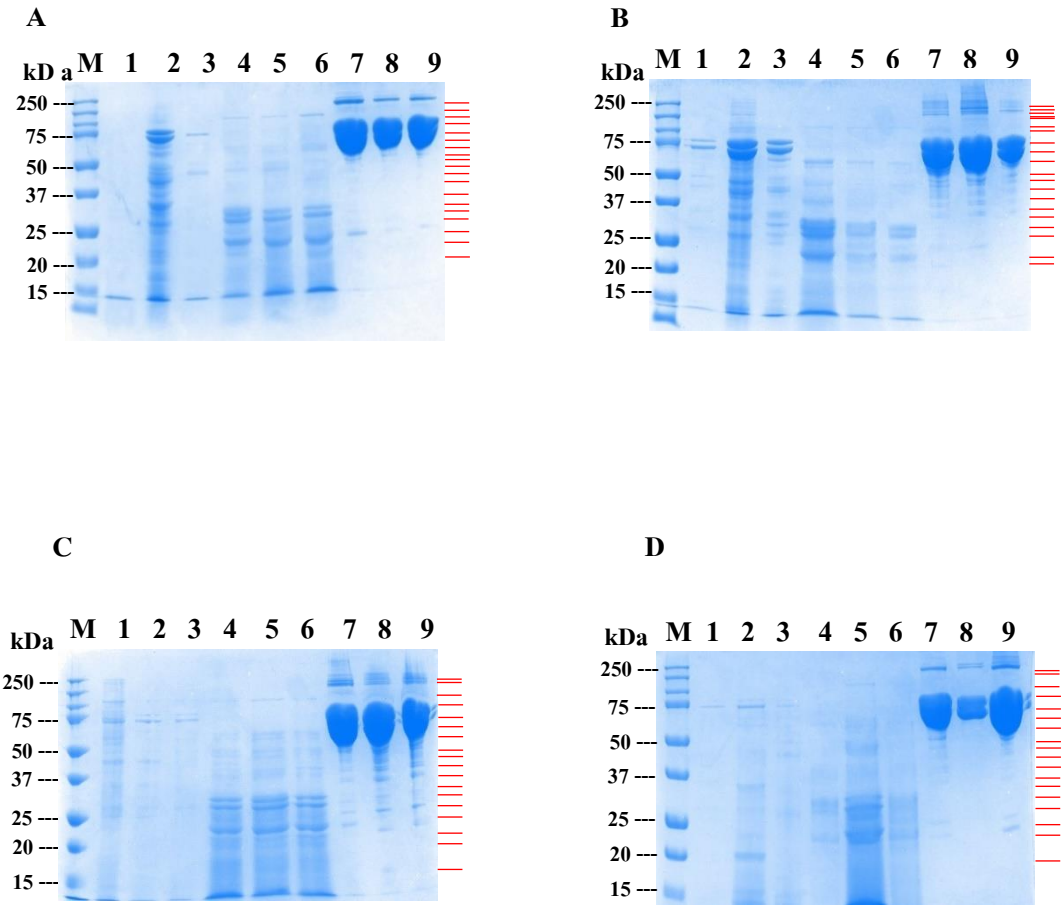
4.4 การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

แยกรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อน ด้วย 10% Polyacrylamide gel ความต่างศักย์ 220 โวลต์/2เจล เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ย้อมสีด้วย Coomassie blue R-250 ประมาณ 15 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วย Destaining Solution จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จากการศึกษาพบการปรากฏของแถบโปรตีนในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อน ให้ผลดังนี้

จากการเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อน ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน พบว่า มีแถบโปรตีนที่ปรากฏประมาณ 20 ถึง 40 แถบ โดยเลือกแถบโปรตีนในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อนที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจำนวน 20 แถบ ได้แก่ 240, 220, 200, 168, 157, 130, 104, 83, 74, 63, 58, 53, 50, 45, 38, 34, 28, 26, 23 และ 20 กิโลดาลตัน เมื่อแยกรูปแบบโปรตีนในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อน ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่ปรากฏในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อนของทุกการทดลองมีจำนวน 5 แถบที่เหมือนกัน ได้แก่ 104, 74, 58, 28 และ 23 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะในรังไข่จำนวน 2 แถบ ได้แก่ 157 และ 130 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะในตับ/ตับอ่อน จำนวน 2 แถบ ได้แก่ 53 และ 45 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะในเลือดจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 240 และ 34 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนขนาด 240, 220, 200 และ 168 กิโลดาลตัน ไม่ปรากฏในตับ/ตับอ่อนของทุกการทดลอง และในทุกอวัยวะของชุดควบคุมไม่มีการปรากฏแถบโปรตีนที่ 200 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 4-6 ซึ่งสามารถสรุปผลการเกิดแถบโปรตีนได้ดังตารางที่ 4-19 และเมื่อแยกรูปแบบโปรตีนในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่ปรากฏในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อนของทุกการทดลองมีจำนวน 9 แถบที่เหมือนกัน ได้แก่ 104, 58, 50, 45, 38, 34, 28, 26 และ 23 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะในรังไข่จำนวน 3 แถบ ได้แก่ 83, 63 และ 20 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนที่ปรากฏเฉพาะในเลือดจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 168 และ 157 กิโลดาลตัน ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 240, 200, 168 และ 83 กิโลดาลตัน ไม่ปรากฏในตับ/ตับอ่อนของทุกการทดลอง แถบโปรตีนขนาด 83 กิโลดาลตัน ปรากฏเฉพาะในรังไข่และเลือดเท่านั้น และ ในทุกอวัยวะของชุดควบคุมไม่มีการปรากฏของแถบโปรตีนขนาด 240, 200 และ 53 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 4-7 ซึ่งสามารถสรุปผลการเกิดแถบโปรตีนได้ดังตารางที่ 4-20



ภาพที่ 4-2 ผล SDS-PAGE ของรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน A=ชุดการทดลองที่ 1, B=ชุดการทดลองที่ 2, C=ชุดการทดลองที่ 3, D=ชุดการทดลองที่ 4, E=ชุดการทดลองที่ 5 และ F=ชุดการทดลองที่ 6
โดยที่ M = โปรตีนมาตรฐาน โดยช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด



ภาพที่ 4-3 ผล SDS-PAGE ของรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน A=ชุดการทดลองที่ 1, B=ชุดการทดลองที่ 3, C=ชุดการทดลองที่ 4 และ D=ชุดการทดลองที่ 5 โดยที่ M= โปรตีนมาตรฐาน โดยช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด

ตารางที่ 4-11 สรุปแถบโปรตีนที่พบส่วนใหญ่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

kDa/ตัวอย่าง	ชุดการทดลองที่ 1			ชุดการทดลองที่ 2			ชุดการทดลองที่ 3			ชุดการทดลองที่ 4			ชุดการทดลองที่ 5			ชุดการทดลองที่ 6		
	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
~240	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
~220	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
~200	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
~168	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
~157	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
~130	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~104	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~83	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
~74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~63	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
~58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~53	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
~50	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
~45	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
~38	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
~34	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
~28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~26	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
~23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~20	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ: OV = รังไข่ HP = ตับ/ตับอ่อน HL = เลือด

ตารางที่ 4-12 สรุปแถบโปรตีนที่พบส่วนใหญ่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

	ชุดการทดลองที่ 1			ชุดการทดลองที่ 3			ชุดการทดลองที่ 4			ชุดการทดลองที่ 5		
kDa/ตัวอย่าง	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
~240	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
~220	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
~200	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
~168	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
~157	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
~130	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
~104	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~83	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
~74	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
~63	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
~58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~53	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
~50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~28	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
~26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~20	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-

หมายเหตุ: OV = รังไข่ HP = ตับ/ตับอ่อน HL = เลือด

4.5 การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

จากการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และ แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ได้ผลการศึกษาดังนี้

การตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก

จากการการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือด ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell พบการปรากฏของโปรตีนไวเทลลิน จำนวน 13 ขนาด ได้แก่ 200, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 28 และ 26 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-13) รายละเอียดดังนี้

โปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

โปรตีนขนาด 157 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของการทดลองชุดตัดตา ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 500 mg/kg ของอาหาร พบในตับ/ตับอ่อนของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร และ พบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของการทดลองชุดตัดตา ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 74 และ 104 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของทุกชุดการทดลอง และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 58 และ 50 กิโลดาลตัน ไม่พบในชุดควบคุม ชุดตัดตา และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 45 กิโลดาลตัน พบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 38 กิโลดาลตัน พบในรังไข่เฉพาะในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

โปรตีนขนาด 34 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

โปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดควบคุมและชุดที่ตัดตาเท่านั้น

โปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 500 mg/kg ของอาหาร

การตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง

จากการการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System พบการปรากฏของโปรตีนไวเทลลินจำนวน 13 ขนาด ได้แก่ 200, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 28 และ 26 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-14) เช่นเดียวกับที่พบในการการทดลองแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® รายละเอียดดังนี้

โปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในเลือดของชุดการทดลองที่ตัดตา และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 157 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดตัดตา ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร พบในตับ/ตับอ่อนและเลือดของชุดตัดตา ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของการทดลองชุดตัดตา ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 104 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของทุกชุดการทดลอง และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ตัดตา ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของทุกชุดการทดลอง และพบในเลือดของชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ตัดตา ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร พบในตับ/ตับอ่อนเฉพาะชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร พบในเลือดของชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 58 กิโลดาลตัน ไม่พบในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

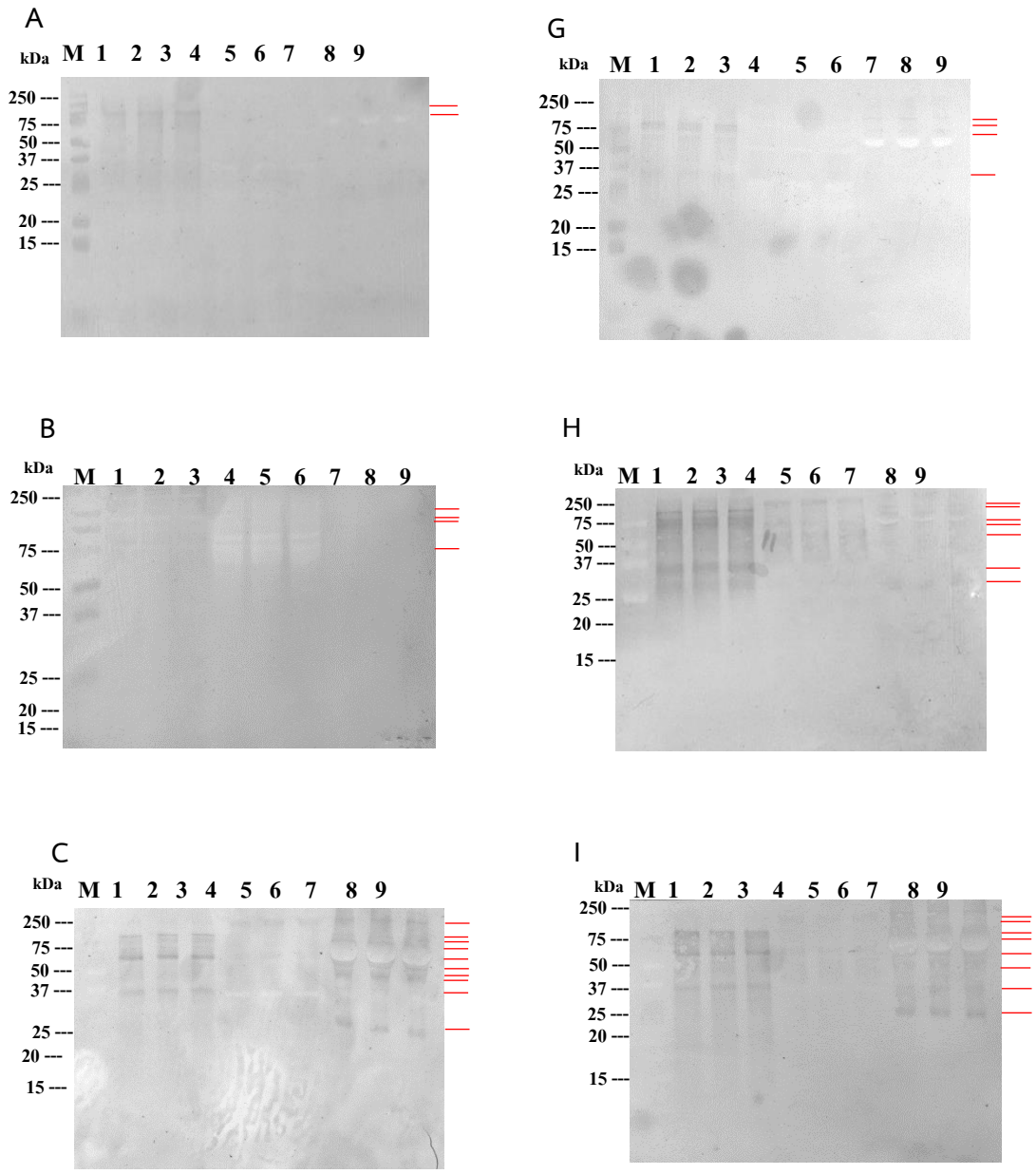
โปรตีนขนาด 50 และ 45 กิโลดาลตัน ไม่พบในชุดควบคุม ชุดตัดตา และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 38 กิโลดาลตัน พบในรังไข่เฉพาะในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

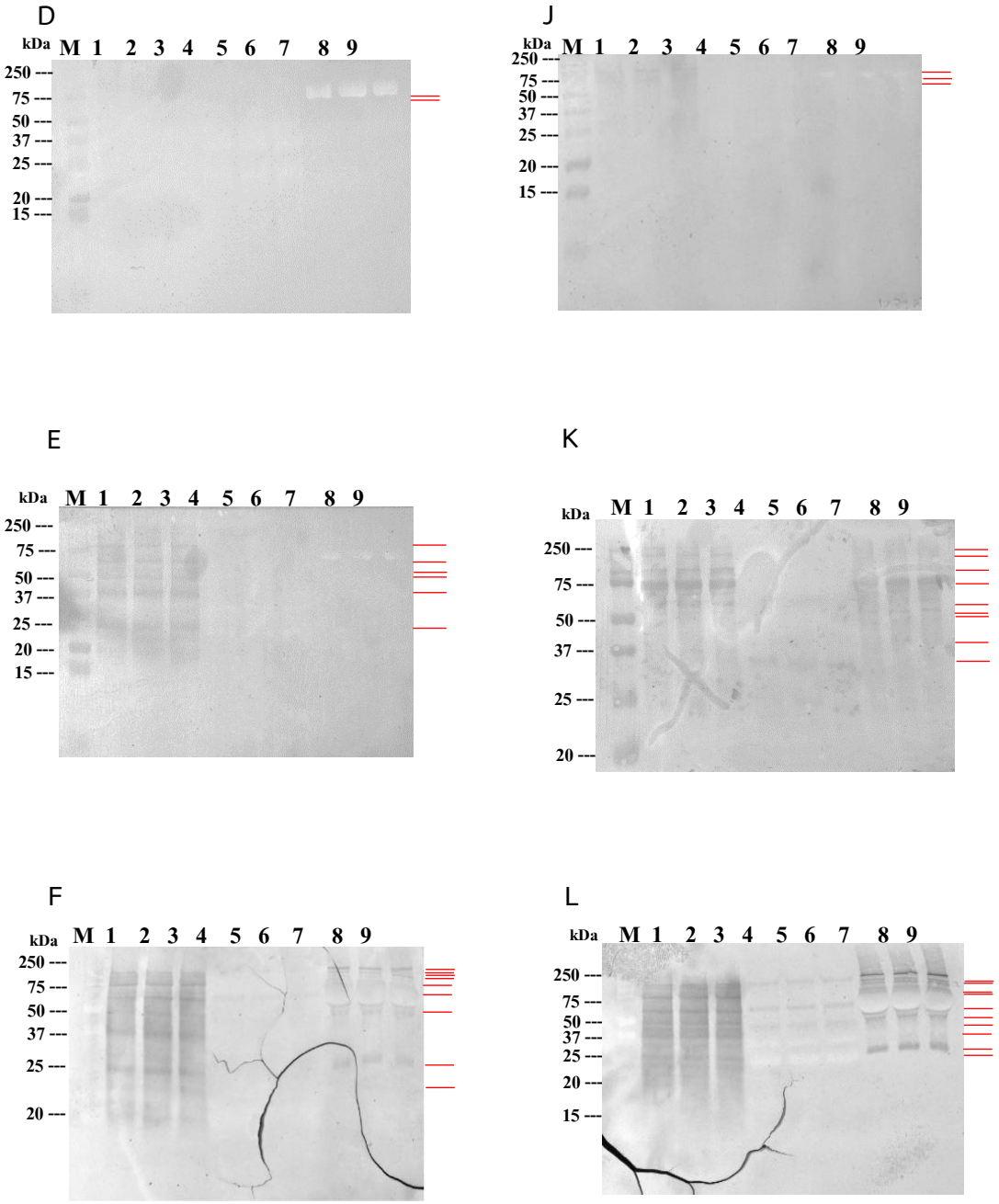
โปรตีนขนาด 34 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดตัดตาและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร พบในตับ/ตับอ่อนของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในรังไข่ของชุดควบคุมและชุดที่ตัดตาเท่านั้น

โปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน ไม่พบในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร



ภาพที่ 4-4 ผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน A และ G = ชุดการทดลองที่ 1, B และ H = ชุดการทดลองที่ 2, D และ I = ชุดการทดลองที่ 3 โดยที่ A – C = วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก D - F = วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง
M = โปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด



ภาพที่ 4-4 (ต่อ) ผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน D และ J = ชุดการทดลองที่ 4, E และ K = ชุดการทดลองที่ 5, F และ L = ชุดการทดลองที่ 6 โดยที่ A – C = วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก D - F = วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง
M = โปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด

ตารางที่ 4-13 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell

	ชุดการทดลองที่ 1			ชุดการทดลองที่ 2			ชุดการทดลองที่ 3			ชุดการทดลองที่ 4			ชุดการทดลองที่ 5			ชุดการทดลองที่ 6		
kDa/ตัวอย่าง	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
~200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
~157	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
~130	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
~104	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
~74	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
~63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
~58	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
~50	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
~45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
~34	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~28	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~26	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+

หมายเหตุ: OV = รังไข่ HP = ตับ/ตับอ่อน HL = เลือด

ตารางที่ 4-14 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

	ชุดการทดลองที่ 1			ชุดการทดลองที่ 2			ชุดการทดลองที่ 3			ชุดการทดลองที่ 4			ชุดการทดลองที่ 5			ชุดการทดลองที่ 6		
kDa/ตัวอย่าง	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
~200	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
~157	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
~130	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
~104	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
~74	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
~63	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
~58	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
~50	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
~45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
~38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
~34	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
~28	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~26	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+

หมายเหตุ: OV = รังไข่ HP = ตับ/ตับอ่อน HL = เลือด

การตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก

จากการการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell พบการปรากฏของโปรตีนไวเทลลิน จำนวน 15 ขนาด ได้แก่ 240, 200, 168, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 26 และ 23 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-15) รายละเอียดดังนี้

โปรตีนขนาด 240 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 168 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

โปรตีนขนาด 157 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 50 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน พบในรังไข่เฉพาะในชุดควบคุม พบในตับ/ตับอ่อน และเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 104 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของทุกชุดการทดลอง พบในตับ/ตับอ่อนเฉพาะในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร และ พบในเลือดของชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน พบในรังไข่และเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 58 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

โปรตีนขนาด 50 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 100 mg/kg ของอาหาร ตัน

โปรตีนขนาด 45 กิโลดาลตัน พบในเลือดของชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 38 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 34 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในเลือดของชุดควบคุมเท่านั้น

โปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน พบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

โปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตัน พบในเลือดของชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

การตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ระยะเวลา 60 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง

จากการการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System พบการปรากฏของโปรตีนไวเทลลินจำนวน 15 ขนาด ได้แก่ 240, 200, 168, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 26 และ 23 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-16) เช่นเดียวกับที่พบในการทดลองแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® รายละเอียดดังนี้

โปรตีนขนาด 240 กิโลดาลตัน พบในรังไข่และเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 168 กิโลดาลตัน พบในเลือดเฉพาะของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร เท่านั้น

โปรตีนขนาด 157 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของทุกชุดการทดลอง และพบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดควบคุม และในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 104 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของทุกชุดการทดลอง และพบในเลือดของควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน พบในรังไข่และเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 58 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 50 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 100 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดควบคุม

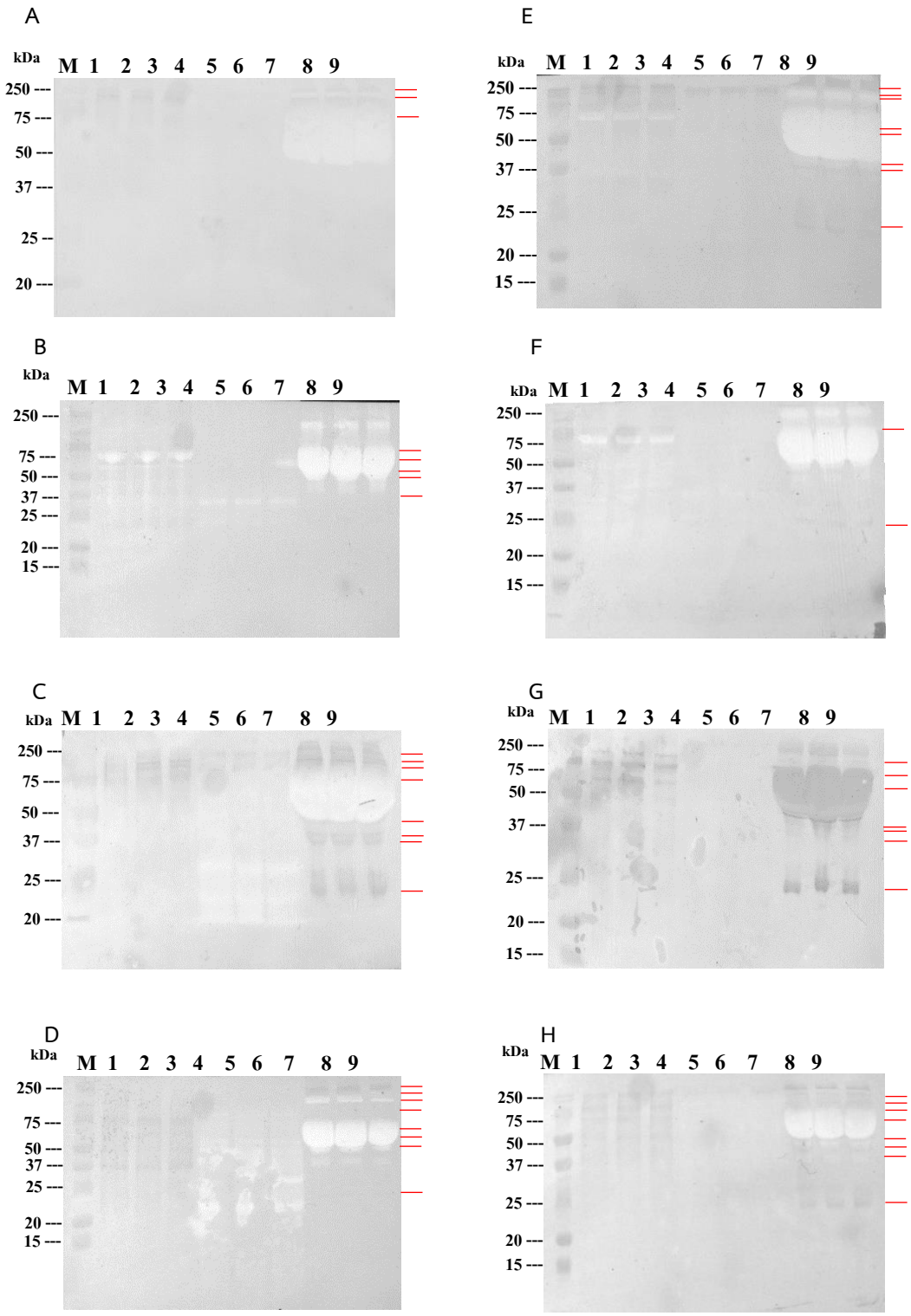
โปรตีนขนาด 45 กิโลดาลตัน พบในเลือดของชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 38 กิโลดาลตัน พบในรังไข่ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร และพบในเลือดของชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 34 กิโลดาลตัน พบในเลือดของชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 26 กิโลดาลตัน พบในตับ/ตับอ่อนของชุดการทดลองที่ได้รับอาหาร 50 mg/kg ของอาหาร และ พบในเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร

โปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตัน พบในเลือดของชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 50 และ 100 mg/kg ของอาหาร



ภาพที่ 4-5 ผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน A และ E = ชุดการทดลองที่ 1, B และ F = ชุดการทดลองที่ 3, C และ G = ชุดการทดลองที่ 4, D และ H = ชุดการทดลองที่ 5 โดยที่ A – D = วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก E - H = วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง M = โปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด

ตารางที่ 4-15 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell

kDa/ตัวอย่าง	ชุดการทดลองที่ 1			ชุดการทดลองที่ 3			ชุดการทดลองที่ 4			ชุดการทดลองที่ 5		
	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
~240	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
~200	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
~168	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
~157	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
~130	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
~104	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
~74	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
~63	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
~58	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
~50	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
~45	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
~38	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
~34	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~26	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
~23	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

หมายเหตุ: OV = รังไข่ HP = ตับ/ตับอ่อน HL = เลือด

ตารางที่ 4-16 สรุปผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

kDa/ตัวอย่าง	ชุดการทดลองที่ 1			ชุดการทดลองที่ 3			ชุดการทดลองที่ 4			ชุดการทดลองที่ 5		
	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
~240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
~200	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
~168	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
~157	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
~130	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
~104	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
~74	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
~63	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
~58	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
~50	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
~45	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
~38	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
~34	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
~26	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
~23	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

หมายเหตุ: OV = รังไข่ HP = ตับ/ตับอ่อน HL = เลือด

4.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน (Western Blot Transfer System for Mini-Gel) ระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และ แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน พบว่า การส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans Blot® Turbo™ Transfer System แถบโปรตีนที่ปรากฏมีความคมชัดมากกว่าการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell ดังภาพที่ 4-4 และ 4-5 และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏได้ผลดังตารางที่ 4-17 และตารางที่ 4-18

จากการเปรียบเทียบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง พบการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบโปรตีนทุกชุดการทดลองที่ให้ผลตรงกันคิดเป็นร้อยละ 89.32 และการปรากฏของแถบโปรตีนที่ไม่ตรงกันคิดเป็นร้อยละ 10.68 เมื่อแยกเปรียบเทียบเฉพาะในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของทุกชุดการทดลอง พบว่า การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบโปรตีนที่ได้รับผลตรงกันคิดเป็นร้อยละ 92.31, 92.31 และ 83.33 ตามลำดับ และการปรากฏของแถบโปรตีนที่ไม่ตรงกันคิดเป็นร้อยละ 7.69, 8.97 และ 16.67 ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง พบการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบโปรตีนของทุกชุดการทดลองที่ได้รับผลตรงกันคิดเป็นร้อยละ 94.44 และการปรากฏของแถบโปรตีนที่ไม่ตรงกันคิดเป็นร้อยละ 5.56 เมื่อแยกเปรียบเทียบเฉพาะในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือด ของทุกชุดการทดลอง พบว่า การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบโปรตีนที่ได้รับผลตรงกันคิดเป็นร้อยละ 98.33, 96.67 และ 88.33 ตามลำดับ และการปรากฏของแถบโปรตีนที่ไม่ตรงกันคิดเป็นร้อยละ 1.67, 3.33 และ 11.67 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-17 เปรียบเทียบผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

kDa/ตัวอย่าง	ชุดการทดลองที่ 1						ชุดการทดลองที่ 2						ชุดการทดลองที่ 3						ชุดการทดลองที่ 4						ชุดการทดลองที่ 5						ชุดการ ทดลองที่ 6					
	OV		HP		HL		OV		HP		HL		OV		HP		HL		OV		HP		HL		OV		HP		HL		OV		HP		HL	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
~200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
~157	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
~130	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
~104	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
~74	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
~63	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
~58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
~50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
~45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
~38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
~34	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
~28	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
จำนวนแถบโปรตีนที่ขึ้นตรงกัน	13		13		10		12		11		9		13		12		12		12		13		13		11		12		8		11		11		13	
จำนวนแถบโปรตีนที่ขึ้นต่างกัน	0		0		3		1		2		4		0		1		1		1		0		0		2		1		5		2		2		0	

หมายเหตุ W = วิเคราะห์แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell S = วิเคราะห์แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

ตารางที่ 4-18 เปรียบเทียบผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

kDa/ตัวอย่าง	ชุดการทดลองที่ 1						ชุดการทดลองที่ 3						ชุดการทดลองที่ 4						ชุดการทดลองที่ 5					
	OV		HP		HL		OV		HP		HL		OV		HP		HL		OV		HP		HL	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
~240	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
~200	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
~168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
~157	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
~130	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
~104	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
~74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
~63	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
~58	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~50	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
~45	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
~38	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
~34	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
~26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
~23	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
จำนวนแถบโปรตีนที่ขึ้นตรงกัน	15		15		14		15		15		13		15		13		15		14		15		11	
จำนวนแถบโปรตีนที่ขึ้นต่างกัน	0		0		1		0		0		2		0		2		0		1		0		4	

หมายเหตุ W = วิเคราะห์แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell

S = วิเคราะห์แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

เมื่อแยกเปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินเฉพาะในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน ให้ผลดังนี้ ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่า รังไข่ของชุดการทดลองที่ตัดตา ชุดที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 500 mg/kg ของอาหาร การวิเคราะห์แบบกึ่งแห้งจะให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบถังเปียก ส่วนการทดลองชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 100 mg/kg ของอาหาร พบว่า แถบโปรตีนที่ปรากฏมีจำนวนเท่ากันในการวิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง (ตารางที่ 4-28) ในตับ/ตับอ่อน พบว่า การทดลองชุดที่ตัดตา ชุดที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10, 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร การวิเคราะห์แบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบถังเปียก และชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร การวิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนเท่ากัน (ตารางที่ 4-29) และ ในเลือด พบว่า ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ตัดตา ชุดที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 100 mg/kg ของอาหาร การวิเคราะห์แบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบถังเปียก ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 และ 500 mg/kg ของอาหาร พบว่า แถบโปรตีนที่ปรากฏมีจำนวนเท่ากันในการวิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง (ตารางที่ 4-30)

ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า ในรังไข่ของทุกชุดการทดลองการวิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนจำนวนเท่ากัน (ตารางที่ 4-31) ในตับ/ตับอ่อน พบว่า ชุดควบคุม ชุดที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 100 mg/kg ของอาหาร การวิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนจำนวนเท่ากัน ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร พบว่า การวิเคราะห์แบบถังเปียกให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบกึ่งแห้ง (ตารางที่ 4-31) และ ในเลือด พบว่า ในชุดควบคุม ชุดที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 100 mg/kg ของอาหาร การวิเคราะห์แบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบถังเปียก ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร พบว่า การวิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนจำนวนเท่ากัน (ตารางที่ 4-31)

เมื่อนำผลการเปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินของทุกชุดการทดลองที่วิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง พบว่า ทั้ง 2 วิธี ให้ผลของการปรากฏแถบโปรตีนจำนวนเท่ากัน คิดเป็นร้อยละ 50 ผลการวิเคราะห์แบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบถังเปียก คิดเป็นร้อยละ 46.67 และผลการวิเคราะห์แบบถังเปียกให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบกึ่งแห้งคิดเป็นร้อยละ 3.33

ตารางที่ 4-19 เปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง

	ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 2		ชุดการทดลองที่ 3		ชุดการทดลองที่ 4		ชุดการทดลองที่ 5		ชุดการทดลองที่ 6	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
~200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~157	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
~130	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
~104	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
~74	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
~63	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
~58	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
~50	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
~45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
~38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
~34	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
~28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
~26	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
จำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏ	3	3	5	6	7	7	1	2	6	6	8	10

หมายเหตุ W = วิเคราะห์แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell
S = วิเคราะห์แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

ตารางที่ 4-20 เปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในตับ/ตับอ่อน ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง

	ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 2		ชุดการทดลองที่ 3		ชุดการทดลองที่ 4		ชุดการทดลองที่ 5		ชุดการทดลองที่ 6	
kDa/ตัวอย่าง	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
~200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~157	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
~130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
~58	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
~50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
~38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
~28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
จำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏ	0	0	0	2	1	2	0	0	0	1	1	3

หมายเหตุ W = วิเคราะห์แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell
S = วิเคราะห์แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

ตารางที่ 4-21 เปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

kDa/ตัวอย่าง	ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 2		ชุดการทดลองที่ 3		ชุดการทดลองที่ 4		ชุดการทดลองที่ 5		ชุดการทดลองที่ 6	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
~200	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
~157	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
~130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~104	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
~74	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
~63	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
~58	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
~50	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
~45	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
~38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~34	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
~28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~26	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
จำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏ	0	3	0	5	7	8	0	0	0	5	7	7

หมายเหตุ W = วิเคราะห์แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell
S = วิเคราะห์แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

ตารางที่ 4-22 เปรียบเทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังและแบบกึ่งแห้ง

	รังไข่								ตับ/ตับอ่อน								เลือด							
	ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 3		ชุดการทดลองที่ 4		ชุดการทดลองที่ 5		ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 3		ชุดการทดลองที่ 4		ชุดการทดลองที่ 5		ชุดการทดลองที่ 1		ชุดการทดลองที่ 3		ชุดการทดลองที่ 4		ชุดการทดลองที่ 5	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
~240	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
~200	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
~168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
~157	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
~130	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
~104	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
~74	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
~63	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~58	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
~50	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
~45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
~38	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
~34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
~26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
~23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
จำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏ	4	4	5	5	6	6	7	7	1	1	0	0	2	1	0	0	7	8	0	2	10	10	4	8

บทที่5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford

การวัดสารสกัดโปรตีนจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยสารละลาย Bradford (Biorad) พบว่า ในเลือดมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ส่วนในรังไข่และตับ/ตับอ่อนมีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกันเช่นเดียวกับงานวิจัยของสุนิสา ปู่มาก (2558) ที่ผลเป็นเช่นนี้เนื่องจากในกุ้งกุลาดำเลือดจะเป็นตัวกลางในการส่งผ่านโปรตีนไวเทลลินจากตับ/ตับอ่อนไปเก็บสะสมที่รังไข่ สรุปคือเมื่อตับ/ตับอ่อนถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จึงมีการสร้างและสะสมโปรตีนไข่แดงขึ้น (โปรตีนไวเทลลิน) จากนั้นจะส่งไปเพื่อพัฒนารังไข่ผ่านทางเลือดจึงมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดสูงกว่าในรังไข่และตับ/ตับอ่อน เนื่องจากเลือดเป็นตัวกลางในการส่งโปรตีนจากอวัยวะหนึ่งไปยังอีกอวัยวะหนึ่งส่งผลให้ในเลือดมีปริมาณโปรตีนอยู่จำนวนมาก (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร, 2550)

5.2 การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การทำอิเล็คโทรโฟริซิสเป็นวิธีการที่อาศัยสนามไฟฟ้าในการแยกโปรตีนโดยที่อัตราความเร็วในการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโปรตีน โดยการทำอิเล็คโทรโฟริซิสที่ 10% Separating gel และ 4% Stacking gel ในการทดลองนี้มีการย้อมสีด้วย Coomassie blue ซึ่งเป็นการย้อมสีที่นิยมใช้กันมากและรวดเร็ว สีจะจับจำเพาะกับโปรตีน แต่ความไวในการเห็นแถบโปรตีนจะน้อยกว่าการย้อมแบบ Silver stain แต่การย้อมสีแบบ Silver stain มีความเป็นพิษสูง มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก การทดลองนี้สนใจแถบโปรตีนที่รายงานว่าจากการทดลองอื่นๆ ที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนไวเทลลิน จำนวน 20 แถบ โดยทั้งในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน แถบโปรตีนที่ขนาดที่ 74 กิโลดาลตันจะมีความเด่นชัดที่สุดในรังไข่และเลือด แตกต่างกับแถบโปรตีนในตับ/ตับอ่อนที่แถบโปรตีนที่ 28 กิโลดาลตันมีความเด่นชัดที่สุด ใกล้เคียงกับงานวิจัยของสุนิสา ปู่มาก (2558) ที่พบว่าในเลือดและรังไข่พบการปรากฏเด่นชัดของแถบโปรตีนที่ 75 กิโลดาลตัน และโปรตีนในตับ/ตับอ่อนมีการปรากฏแถบโปรตีนที่ 30 กิโลดาลตันมีความเด่นชัดที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kung *et al*. (2004) ที่วิเคราะห์โปรตีนในอวัยวะต่างๆ ของกุ้ง *M. ensis* ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า ตับ/ตับอ่อนจะเห็นแถบของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ได้แก่ 28 และ 34 กิโลดาลตัน ได้ชัดเจนมากกว่า

5.3 การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

จากการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือด ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน (Western blot) แบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และ แบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System พบว่า โปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ที่ได้จาก 2 วิธี พบแถบโปรตีนไวเทลลิน 13 ขนาด ได้แก่ 200, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 28 และ 26 กิโลดาลตัน และ โปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่ได้จาก 2 วิธี พบแถบโปรตีนไวเทลลิน 15 ขนาด ได้แก่ 240, 200, 168, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 26 และ 23 กิโลดาลตัน โดยในตัวอย่างที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน มีการปรากฏแถบโปรตีนขนาด 240 168 และ 23 กิโลดาลตันเพิ่มมาจากการทดลองที่ 35 วัน และ โปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตันที่พบในการทดลองที่ 35 วันกลับหายไป

จากการทดลองที่ 35 วัน พบโปรตีนขนาด 130 และ 38 กิโลดาลตันเฉพาะในรังไข่ พบโปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตันเฉพาะในเลือด และพบโปรตีนขนาด 50 กิโลดาลตัน ในรังไข่และเลือดแต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน ส่วนการทดลองที่ 60 วัน พบโปรตีนขนาด 63 และ 58 กิโลดาลตัน เฉพาะในรังไข่ พบโปรตีนขนาด 168, 45, 38 และ 23 กิโลดาลตันเฉพาะในเลือด และ พบโปรตีนขนาด 240, 157, 74, 50 และ 38 กิโลดาลตันในรังไข่และเลือดแต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Hirunsuchalert *et al.* (2013) ที่ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนไวเทลโลเจนินในรังไข่ระยะต่างๆ ในกุ้งกุลาดำโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท โดยรันโปรตีนจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินพบแถบโปรตีนที่ 104 และ 74 กิโลดาลตัน ในรังไข่แต่ไม่พบโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตันในตับ/ตับอ่อน ซึ่งจากการทดลองมีแนวโน้มที่มีทิศทางเดียวกับ Hirunsuchalert *et al*. (2013) ที่พบแถบโปรตีนที่ 74 กิโลดาลตันในเลือดและรังไข่มากกว่าในตับ/ตับอ่อน

Longyant *et al*., 2000 ได้วิเคราะห์โปรตีนไวเทลลินในรังไข่และเลือดของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท พบว่า ในรังไข่มีโปรตีนไวเทลลิน 5 ขนาด ได้แก่ 104, 83, 74, 58 และ 45 กิโลดาลตัน และในเลือดมีโปรตีนไวเทลลิน 4 ขนาด ได้แก่ 200, 104, 83 and 74 กิโลดาลตัน โดยได้อธิบายความสัมพันธ์ทางอิมมูโนแอคทีฟระหว่างโปรตีนเหล่านี้ว่า vitellogenin อาจถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือดในรูปแบบสองรูปแบบ คือ ขนาด 200 และ 74 กิโลดาลตัน จากนั้นโพลีเปปไทด์ขนาด 200 กิโลดาลตัน จะถูกประมวลผลเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 104 และ 83 กิโลดาลตัน หรือนำเข้าสู่เซลล์ไข่โดยตรง ในโอโอไซต์โปรตีนขนาด 104 กิโลดาลตัน จะถูกแยกออกเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 58 และ 45 กิโลดาลตัน ในขณะที่โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน จะได้รับการดัดแปลงเล็กน้อยหรือยังคงไม่เปลี่ยนแปลง การวิเคราะห์แบบตะวันตกของหน่วยย่อย vitellin ในระยะต่างๆ ของการพัฒนารังไข่ โปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตัน จะปรากฏในไข่ในระหว่างการพัฒนาของรังไข่ตอนต้นและโปรตีนขนาด 45 และ 58 กิโลดาลตัน จะปรากฏขึ้นในระหว่างการพัฒนาในช่วงปลาย ในขณะที่การวิจัยนี้ไม่พบโปรตีนไวเทลลินขนาด 83 กิโลดาลตัน จากการปรียบเทียบผลการศึกษางานวิจัยอื่นๆ ที่ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนไวเทลลินในอวัยวะต่างๆ ของกุ้งหลายชนิดกับผลการทดลองในครั้งนี้ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5-1

ตารางที่ 5-1 สรุปข้อมูลเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

สิ่งมีชีวิต (อ้างอิง)	ขนาดโปรตีนไวเทลลิน (กิโลดาลตัน)	ผลจากการทำเวสเทิร์นบลอทของงานวิจัยนี้		
		OV	HP	HL
กุ้งกุลาดำ *P. monodon*	104	✓	✓	✓
(Hirunsuchalert *et al*., 2013)	74	✓	✓	✓
	50	✓	×	✓
	45	✓	✓	✓
กุ้งกุลาดำ *P. monodon*	220	×	×	×
(ChunChen and NanChen, 1994)	168	×	×	✓
	130	✓	×	✓
	74	✓	✓	✓
กุ้งกุลาดำ *P. monodon*	200	×	×	✓
(Longyant *et al*., 2000)	104	✓	✓	✓
	83	×	×	×
	74	✓	✓	✓
	58	✓	✓	✓
	45	✓	✓	✓
กุ้งแดง (*Pandalus hypsinotus*)	190	×	×	×
(Okumura et al., 2000)	98	×	×	×
	89	×	×	×
	57	×	×	×
	38	✓	×	✓
	26	✓	×	✓
กุ้งตะกาดกรีจุด *Metapenaeus ensis*	76	×	×	×
(Kung et al., 2004)	34	✓	✓	✓

5.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนระหว่างแบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง ในการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

ในการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) รุ่น Trans- Blot® Turbo™ Transfer System ให้แถบโปรตีนที่มีความชัดเจนมากกว่าการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบถังเปียก (Wet/Tank Blotting Systems) รุ่น Mini Trans-Blot® Cell และเมื่อเปรียบ- เทียบจำนวนแถบโปรตีนไวเทลลินที่วิเคราะห์แบบถังเปียกและแบบกึ่งแห้ง พบว่า ทั้ง 2 วิธี ให้ผลของการปรากฏแถบโปรตีนจำนวนเท่ากันคิดเป็นร้อยละ 50 ผลการวิเคราะห์แบบกึ่งแห้งให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบถังเปียกคิดเป็นร้อยละ 46.67 และ ผลการวิเคราะห์แบบถังเปียกให้แถบโปรตีนมากกว่าแบบกึ่งแห้งคิดเป็นร้อยละ 3.33 ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับข้อมูลของบริษัท thermofisher Scientific ที่เปรียบเทียบการส่งถ่ายโปรตีน 3 วิธี ได้แก่ แบบแห้ง (dry transfer) แบบเปียก (wet transfer) และแบบกึ่งแห้ง (Semi dry) ผลที่ได้คือแบบแห้งมีความไวในการถ่ายโอนดีที่สุด รองลงมาคือแบบกึ่งแห้ง และเมื่อเปรียบเทียบการปราฏของแถบโปรตีนกับแบบแห้ง พบว่า แบบกึ่งแห้งจำนวนแถบโปรตีนหายไปเพียง 3 แถบ ส่วนแบบเปียกแถบโปรตีนหายไปจำนวน 6 แถบ (https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/western-blotting/transfer-proteins-western-blot/iblot-dry-blotting-system/iblot-dry-blotting-comparison-to-semi-dry-and-wet.html)

จากการทดลองสามารถเปรียบเทียบเวลาและปริมาตรของสารที่ใช้ในการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง รุ่น Trans- Blot® Turbo™ Transfer System และแบบถังเปียก รุ่น Mini Trans-Blot® Cell ได้ดังตารางที่ 5-2 ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Caitlin Smith (2011) ที่กล่าวว่าการเลือกระบบในการทำเวสเทิร์นบลอทควรคำนึงถึงเรื่องของระยะเวลาและประสิทธิภาพในการถ่ายโอน เวสเทิร์นบลอทแบ่งออกเป็น 3 ระบบ ตามประเภทของอุปกรณ์และโปรโตคอลที่ใช้ ได้แก่ แบบแห้ง แบบกึ่งแห้ง และแบบเปียก ซึ่งแต่ละระบบมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน โดยระบบแบบแห้งใช้เวลาในการถ่ายโอนเร็วที่สุดแต่ประสิทธิภาพการถ่ายโอนต่ำที่สุด ระบบถ่ายโอนแบบเปียกให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนที่ดีที่สุด (เหมาะสำหรับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลาย) แต่ใช้เวลานานที่สุดและยุ่งยากที่สุด ในขณะที่ระบบแบบกึ่งแห้งให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนและใช้เวลาในการถ่ายโอนอยู่ระหว่างระบบการถ่ายโอนแบบเปียกและแบบแห้ง แต่จะไม่เหมาะสำหรับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

ตารางที่ 5-2 ระยะเวลาและปริมาตรของสารที่ใช้ในการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง รุ่น Trans- Blot® Turbo™ Transfer System และแบบถังเปียก รุ่น Mini Trans-Blot® Cell

	เวลาที่ใช้		**ปริมาตรสารที่ใช้**	
	แบบกึ่งแห้ง	**แบบถังเปียก**	**แบบกึ่งแห้ง**	**แบบถังเปียก**
การเตรียมบัฟเฟอร์	30 นาที	30 นาที	-	-
การเตรียมเมมเบรน	20 นาที	20 นาที	20 มล.	20 มล.
การเตรียม tick paper	5 นาที	5 นาที	70 มล.	120 มล.
การเตรียม filter pad	0 นาที	15 นาที	0 มล.	300 มล.
การแช่เจลในบัฟเฟอร์	20 นาที	20 นาที	60 มล.	60 มล.
การประกอบชั้น	10 นาที	10 นาที	-	-
การถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน	30 นาที	1 ชั่วโมง	5 มล.	1.4 ลิตร
การทำความสะอาด	10 นาที	15 นาที	-	-
รวม	2 ชม. 5 นาที	2 ชม., 55 นาที	155	1.9

5.4 ข้อเสนอแนะ

5.6.2 ควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและจำนวนซ้ำของตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อความสมบูรณ์ของงานวิจัย

5.6.4 การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ควรระวังสารจำพวก Acrylamide เนื่องจากเป็นสารที่อันตรายต่อร่างกาย

5.6.7 การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ควรทำความสะอาดกระจกสำหรับรันเจลให้สะอาดหลีกเลี่ยงการใช้มือสัมผัสกระจกส่วนที่ใช้สำหรับเตรียมแผ่นเจล เนื่องจากอาจทำให้โปรตีนที่รันออกมาไม่ใช่โปรตีนที่เราสนใจที่แท้จริง

5.6.8 การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ควรเตรียม 10% APS ใหม่ทุกครั้ง เพื่อประสิทธิภาพในการแข็งตัวของแผ่นเจล

5.4.6 ในระหว่างทำ SDS-PAGE และ เวสเทิร์นบลอท ควรควบคุมอุณหภูมิของบัฟเฟอร์ไม่ให้มีอุณหภูมิสูงเกินไป เนื่องจากอุณหภูมิของบัฟเฟอร์มีผลต่อระยะเวลาในการทำงาน

บรรณานุกรม

กรมประมง. (2538). สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี 2538 Fisheries Statistics of Thailand 1995. กรุงเทพฯ : กรมประมง, ฉบับที่5 /2541. 86หน้า.

การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer) วันที่ค้นข้อมูล 31 มีนาคม 2562, เข้าถึงได้จาก https://www.gibthai.com/service/note_detail/18

ชมพูนุช โพธิ์อาสา (2558) ผลของอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol ต่อการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่เลี้ยงจากบ่อดิน. สาขาเทคโนโลยีทางทะล; วท.บ (เทคโนโลยีทางทะเล) 91 หน้า

นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. (*2550*). ชีววิทยาของครัสเตเชียน พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์ โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์ บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 245 หน้า

พรรณิภา หาญวิวัฒนกิจ. (2531). การวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตกุ้งกุลาดำในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรณู ยาชิโร และยุพาพร ไชยสีหา. (2534). ผลการฉีดสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ ระดับฮอร์โมนเพศในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ, *Penaeus monodon.* เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2534. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 16 น.

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ. (2556). กระบวนการสร้างไข่แดงของกุ้งกุลาดา.*แก่นเกษตร*, 2556, หน้า 286-287.

สุนิสา ปู่มาก (2558). ผลของอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-estradiol ต่อระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงจากบ่อดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีทางทะล; บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา 101 หน้า .

Árni M. Mathiesen. (2009). FAO yearbook annuaire anuario. Fishery and Aquaculture Statistics 2009. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome. 79 Page

Caitlin Smith, 2011 Western Transfer Systems: The Speed and Efficiency of Protein Blotting Increases วันที่ค้นข้อมูล 31 มีนาคม 2562, เข้าถึงได้จาก https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/41805-Western-Transfer-Systems-The-Speed-and-Efficiency-of-Protein-Blotting-Increases/

CAYMAN CHEMICAL. 17β-Estradiol. 1180 East Ellsworth Road Ann Arbor, Michigan 48108 USA วันที่ค้นข้อมูล 31 มีนาคม 2562, เข้าถึงได้จาก https://www.caymanchem.com/product/10006315

ChunChen, C. and NanChen, S. (1994). Vitellogenesis in the giant tiger prawn, Penaeus monodon Fabricius, 1789. Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 107(3): 453-460

Ghosh, D. and Ray, A. K. (1993). Subcellular action of estradiol-17β in a freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii. General and Comparative Endocrinnology,* 90, 274-281.

General Western Blot Protocol วันที่ค้นข้อมูล 31 มีนาคม 2562, เข้าถึงได้จาก http://www.ispybio.com/search/protocols/Westernblot%20protocol36.htm

Herberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191: 191-208.

Hiransuchalert, R., Thamniemdee, N., Khamnamtong, B., Yamano, K. and Klinbunga, S. (2013). Expression profiles and localization of vitellogenin mRNA and proteinduring ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 412-412: 193-201.

Kung, S. Y., Chan, S-M., Hui, J. H. L., Tsang, W. S., Mak, A., and He, J. G. (2004). Vitellogenesis in the Sand Shrimp, *Metapenaeus ensis*: The Contribution from the Hepatopancreas-Specific Vitellogenin Gene (MeVg2). *Biology of Reproduction*, 7:863–870.

Longyant, S., Sithigorngul, p. Thammapalerd, N., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. (2000). Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. *Invertebrate Reproduction and Development,* 37(3):211-221.

Motoh H. 1981. Studies on the fisheries biology of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* in the Philippines. Technical report, (7). Tigbauan, Iloilo: *SEAFDEC Aquaculture Department*. 128 p.

Motoh, H. (1985). Biology and ecology of *Penaeus monodon.* Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shimp*. SEAFDEC Aquaculture*, 27-36

Okumura, T., Yoshida, K. and Nikaido, H. (2000). Ovarian Development and Hemolymph vitellogenin levels in laboratory-maintained protandric shrimp,

Pandalus hypsinotus: Measurement by a newly developed time-resolved Ffuoroimmunoassay (TR-FIA). *Zoological Science*, 21(10): 1037-1047

Primavera, J.H. (1988). Maturation, reproduction and broodstock technology. In: Biology and Culture of *Penaeus monodon* SEAFDEC: Iloilo, Philippines, pp. 37–57.

Technical Note: ข้อมูลทางเทคนิค Gel electrophoresis of protein. วันที่ค้นข้อมูล 31 มีนาคม 2562, เข้าถึงได้จาก https://www.gibthai.com/service/note_detail/20

Trans-Blot® Turbo™ Blotting System Instruction Manual. 2010. by Bio-Rad Laboratories. All rights reserved. Bio-Rad Laboratories, Inc. United States. 23Page.

Tseng, D-Y., Chen, Y-N., Liu, K-F. and Kou, G-H. (2002). Hepatopancreas and ovary are sites of vitellogenin synthesis as determined from partial cDNA encoding of vitellogenin in the marine shrimp, *Penaeus vannamei. Invertebrate Reproduction and Development*. 42(2): 137-143

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายสำหรับงาน SDS-PAGE

1. Acrylamide/Bis (30%T/2.67%C)

Acrylamide	146 กรัม
N, N'-Methylene-bis Acrylamide	4 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน

2. Tris-HCl, pH 8.8 1.5 โมลาร์

Tris base	54.45 กรัม
Distilled water	150 มิลลิลิตร

ปรับ pH 8.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. Tris-HCl, pH 6.8 1.5 โมลาร์

Tris base	6 กรัม
Distilled water	60 มิลลิลิตร

ปรับ pH 6.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4. 10 เปอร์เซ็นต์ SDS

SDS	10 กรัม
น้ำกลั่น	60 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. Ammonium Persulfate 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

Ammonium Persulfate	0.05 กรัม
น้ำกลั่น	500 ไมโครลิตร

เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

6. Sample Buffer

0.5 โมลาร์ Tris-HCl pH 6.8	1.25 มิลลิลิตร
Glycerol	1.0 มิลลิลิตร
10% SDS	2.0 มิลลิลิตร
DTT	0.155 กรัม
0.5% (w/v) bromophenol blue (ในน้ำ)	0.25 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5.5 มิลลิลิตร

7. 10x Running buffer (SDS-PAGE)

Tris-Base	30.31 กรัม
Glycine	150 กรัม
SDS	10 กรัม

ปรับ pH 8.3 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

8. Coomassie-blue

0.2% Coomassie-blue R-250

50% methanol

70% acetic acid

9. Destain solution

25% methanol

7% acetic acid

10. 10x transfer buffer (Towbin buffer)

Tris-Base	30.2 กรัม
Glycine	144 กรัม
น้ำกลั่น	900 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml นำไปฆ่าเชื้อ

11. 1X Transfer buffer (20%Methanol)

10x transfer buffer	100 มิลลิลิตร
Methanol	200 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	700 มิลลิลิตร

ควรเตรียมใหม่เสมอ เก็บ 4 องศาเซลเซียส

12. 10X TBST

1M Tris pH 7.5	0.25 ลิตร
NaCl	43.83 กรัม
Tween-20	2.5 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

13. Washing buffer (1X TBST)

10X TBST	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900 มิลลิลิตร

14. blocking buffer (1xTPST+5%Skim milk)

10X TBS	3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	27 มิลลิลิตร
Skim milk	1.5 กรัม

15. primary Antibody (1:5000)

5% BSA ใน TBST	30 มิลลิลิตร
Primary Antibody (1°Ab Vtg-PM)	6 ไมโครลิตร

พลิกหลอดไปมา หลายๆ ครั้ง สามารถใช้ซ้ำได้ 3-4 ครั้ง

16. secondary Antibody (1:3000)

Blocking Skim milk	30 มิลลิลิตร
Secondary Antibody (IGG mouse)	10 ไมโครลิตร

พลิกหลอดไปมา หลายๆ ครั้ง

17. น้ำยา Development ในกรณีที่เป็น AP

25X development ของ Bio-Rad	1.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.8 มิลลิลิตร
AP CYA	0.3 ลิตร
AP CYB	0.3 มิลลิลิตร