



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาโครงสร้างและเอ็นไซม์ $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ ของเหงือกและต่อม antennal gland ใน
ครอบครว้กึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ

โดย ผศ. ดร. สมลักษณ์ อสุวพงษ์พัฒนา และคณะ

28 กุมภาพันธ์ 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาโครงสร้างและเอ็นไซม์ $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ ของเหงือกและต่อม antennal gland ใน
ครกบควักกึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ

คณะผู้วิจัย

ผศ. ดร. สมลักษณ์ อสุวพงษ์พัฒนา

ศ. ดร.นพ. บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล

สังกัด

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และศูนย์วิจัยเพื่อ

ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างของ antennal gland และเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ของเหงือกและ Antennal gland จากครกบควักกึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จำนวน 8 ครกบควัก โดยแต่ละครกบควักใช้กุ้งแรกเกิด (เรียก PG) จำนวน 200 ตัว แบ่งเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ (10 ppt) และความเค็มสูง (20 ppt) เป็นเวลา 2 เดือน คัดเลือกเพื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างครกบควักที่มีค่า Biomass index (= น้ำหนักเฉลี่ย x จำนวนกุ้งที่รอดชีวิต) สูงที่สุดทั้งที่เลี้ยงในความเค็มต่ำและสูง คือ กุ้งจากครกบควัก PG9 และ PG19 ส่วนกุ้งที่มีการเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดชีวิตน้อยเมื่อเลี้ยงในความเค็มต่ำ คือกุ้งจากครกบควัก PG23 และ PG10 พบว่าระดับของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ใน antennal gland ของกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มสูง (20ppt) มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ ระดับปริมาณของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase สอดคล้องกับค่า Biomass index ในแต่ละครกบควัก กล่าวคือครกบควัก PG9 และ 19 มีระดับของเอนไซม์ และค่า Biomass index สูง ส่วนครกบควัก PG 23 และ 10 มีระดับของเอนไซม์ และค่า Biomass index ต่ำ การศึกษาดำรงตำแหน่งของเซลล์ที่มีเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีต่อ α subunit ของ Na^+/K^+ -ATPase (α -5 antibody) พบว่าเซลล์ของ labyrinth ติดสีเรืองแสงหรือสีย้อมเข้มในบริเวณ Basolateral membrane โดยเฉพาะในกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็มสูงซึ่งสอดคล้องกับผลของระดับเอนไซม์ ส่วนเซลล์ของ coelomosac ไม่พบปฏิกิริยาของการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ α subunit ของ Na^+/K^+ -ATPase ในการศึกษาปริมาณของ mRNA พบว่าปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ในกลุ่มที่เลี้ยงที่ความเค็มต่ำมีปริมาณมากกว่าที่เลี้ยงที่ความเค็มสูง ถึงแม้ว่าผลการศึกษายังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดและต้องการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป แต่ก็เห็นว่าการสร้าง การปรากฏของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ซึ่งได้จากการศึกษาวิจัยนี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการรักษาสสมดุลของ น้ำ และเกลือแร่ในร่างกาย

Abstract

This study was aimed to investigate the ultrastructure of the antennal gland and Na^+/K^+ -ATPase activities in gills and antennal glands from eight different families of *Peneaus monodon*. Each family (n = 200) of the post larva shrimp (termed, PG) were reared in both a high (20 ppt) and low salt (10 ppt) seawater for 2 months. The families of shrimp that had highest biomass index (= mean BW x no. of survived shrimp) in both low and high salinity (PG 9 and PG19) and those families with low survival rate (PG23 and PG10) were selected for comparison purpose. The level of Na^+/K^+ -ATPase enzymatic activity in shrimp reared in the high salt was higher than those in the low salt. The level of enzyme activity corresponded to the biomass index in each family, namely, PG9 and PG19 had higher enzyme activity than those of PG23 and PG10. Immunohistochemistry using monoclonal antibody against the α subunit of Na^+/K^+ -ATPase revealed the intense immunoreactivity in the basolateral membrane of labyrinth cells, especially, in the shrimp reared in the high salt condition, which supported the result of enzyme activity. The coelomosac cells, on the other hand, were devoid of staining. Unlike the two pieces of results mentioned above, quantitative mRNA assay found that the amount of Na^+/K^+ -ATPase mRNA was higher in shrimp reared in low salinity than that of high salinity. Although the results obtained were still inconclusive and required further investigation, changes of the expression level and the activity of Na^+/K^+ -ATPase monitored in the shrimp reared in different salinities are of particular importance for the animals to regulate the water and ionic balance of their homeostasis.

Executive Summary

กึ่งกลาดำเป็นกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มแตกต่างกัน ตั้งแต่ความเค็มต่ำใกล้ 0 ppt จนถึงความเค็ม 40 ppt ซึ่งความเค็มที่เหมาะสมและทำให้กึ่งกลาดำเจริญเติบโตได้ดีอยู่ที่ 20-30 ppt แต่ในสภาวะความเป็นจริงกึ่งกลาดำที่เลี้ยงในบ่อซึ่งจะมีความเค็มแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับฤดูกาลนั้น หากเราสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทานและเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเลี้ยงที่ความเค็มต่ำได้นั้นย่อมเป็นผลดีกับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กึ่งกลาดำที่มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเลี้ยงที่ความเค็มต่ำ และศึกษาถึงกลไกที่สำคัญที่ทำให้กุ้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพความเค็มต่ำ พบว่าเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของเกลือแร่ และน้ำในร่างกายของกึ่งกลาดำ จึงทำการศึกษาวิจัยในกึ่งกลาดำแรกเกิด น้ำหนัก 1 กรัม จาก 8 ครอบครัวนำมาติดสีบ่งบอกครอบครัว และแยกเลี้ยงที่ความเค็มสูง (20 ppt) และความเค็มต่ำ (10 ppt) เป็นเวลา 2 เดือน จนกุ้งมีขนาดประมาณ 5-10 กรัม คัดเลือกกุ้งที่มีอัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (Biomass index) พบว่ากุ้งจากครอบครัว PG 9, 19, มีค่า Biomass index สูงทั้งในกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มต่ำและสูง ส่วนครอบครัว PG23 และ 10 มีค่า Biomass index ต่ำ ในกลุ่มที่เลี้ยงที่ความเค็มต่ำ จึงคัดเลือกเป็นกลุ่มตัวอย่างที่จะศึกษาเปรียบเทียบ เมื่อศึกษาปริมาณของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ตามวิธีของ Holliday, 1985 พบว่าปริมาณของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ในกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มสูงมีค่ามากกว่าในกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับค่า Biomass index คือค่าเอนไซม์จะสูงในกลุ่มที่มีค่า Biomass index สูง นอกจากนี้เมื่อศึกษาตำแหน่งที่อยู่ของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่ติดฉลากสี ต่อ α subunit ของ Na^+/K^+ -ATPase พบว่าการย้อมติดสีเข้มอยู่ตรงตำแหน่งของ Basolateral membrane ของ Labyrinth cells โดยเฉพาะในกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มสูงมากกว่าที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ แต่ย้อมไม่ติดสีใน Coelomosac cells เมื่อศึกษาปริมาณของ mRNA ด้วยเทคนิค Quantitative real time PCR พบว่า ปริมาณของ mRNA สูงในกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็มต่ำ และมีปริมาณต่ำในกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็มสูง ถึงแม้การศึกษาจะยังให้สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่ก็พบว่าการสร้าง การปรากฏของเอนไซม์มีผลต่อการรักษาสมดุลของ น้ำและเกลือแร่ในร่างกาย เพื่อการอยู่รอดและเจริญเติบโตของกุ้ง

เนื้อหางานวิจัย

การคัดเลือกครอบครัวกึ่งกุลาดำเพื่อใช้เป็นตัวแทนการศึกษาครอบครัวที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในความเค็มต่ำ

การดำเนินการวิจัย

คัดเลือกลูกกึ่งกุลาดำที่มีอายุ 1 เดือน น้ำหนักประมาณ 1 กรัม จาก 8 ครอบครัว (ตารางที่ 1) จำนวนครอบครัวละ 250 ตัว ซึ่งน้ำหนักแต่ละตัวและหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (รูปที่ 1-2) ติดฉลากแต่ละครอบครัวด้วยสี Visible elastomer implantation (VIP) แบ่งครอบครัวลูกกึ่งกุลาดำออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 125 ตัว 1) กลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ (ความเค็ม 10 ppt) และ 2) กลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มสูง (ความเค็ม 20 ppt) เลี้ยงในแท็งค์คอนกรีตขนาด 5ม. x 5ม.โดยมี 4 ครอบครัวต่อ 1 แท็งค์คอนกรีต โดยให้อาหาร 10% ของน้ำหนักตัว และออกซิเจนอย่างพอเพียง โดยเลี้ยงไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง ทำการค่อยๆปรับความเค็มในกลุ่มที่เลี้ยงที่ความเค็มต่ำจาก 20 ppt เป็น 10 ppt ภายใน 3-4 วัน ด้วยน้ำจืด เลี้ยงลูกกึ่งกุลาดำในความเค็มที่ 10 ppt และ 20 ppt เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นนับจำนวนที่กึ่งที่มีชีวิตอยู่ และชั่งน้ำหนักแต่ละตัว เพื่อใช้คำนวณหา Biomass index ซึ่งเท่ากับ น้ำหนักเฉลี่ย (รูปที่ 3) x จำนวนกึ่งที่เหลือ (รูปที่ 4)(ตารางที่ 2-3)

ผลงานวิจัย

ตารางที่ 1 แสดงครอบครัวของกึ่งกุลาดำ ที่ใช้ในการทดลอง

แม่พันธุ์กึ่ง	พ่อพันธุ์กึ่ง					
		P1	P2	T1	T2	T3
	P1		CROP 1		PG10	PG8
	P2	CROP1				
	T1					
	T2	PG17+18	PG9			PG19
	T3	PG21	PG28		PG23	

P= Philippine

T= Trung

ตารางที่ 2 กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ 10 ppt แสดงน้ำหนักเฉลี่ย จำนวนที่มีชีวิตอยู่ และ biomass index เมื่อเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง

Family	MBW (start)	No. survival (start)	Biomass index (start)	MBW (end)	No. survival	Biomass index (end)	Biomass index (net)
PG 8	0.623	125	77.875	6.808	10	68.08	-9.795
PG 9	0.469	125	58.625	8.377	39	326.703	268.078
PG 10	0.279	125	34.875	3.064	34	104.176	69.301
PG 17-18	0.614	125	76.75	6.585	30	197.55	120.8
PG 19	0.525	125	65.625	6.055	53	320.915	255.29
PG 21	0.356	125	44.5	3.936	20	78.72	34.22
PG 23	0.577	125	72.125	4.189	30	125.67	53.545
PG 28	0.954	125	119.25	6.699	14	93.786	-25.464

MBW = Mean body weight

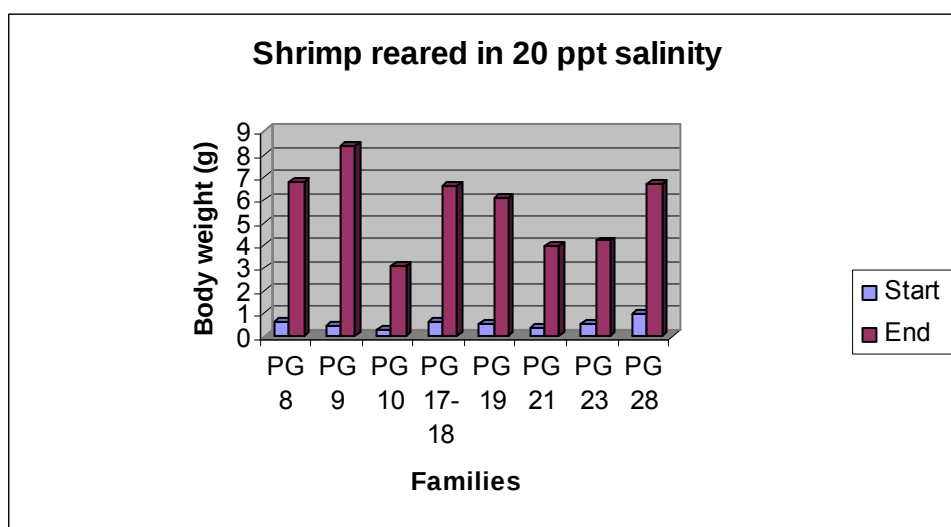
จากการศึกษาพบว่าในกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ (10 ppt) พบว่า Biomass index สูงที่สุดจนถึงต่ำที่สุดในกุ้งที่มาจากครอบครัว PG 9, 19, 17-18, 10, 23, 21, 8 และ 28 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มสูง 20 ppt แสดงน้ำหนักเฉลี่ย จำนวนที่มีชีวิตอยู่ และ biomass index เมื่อเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง

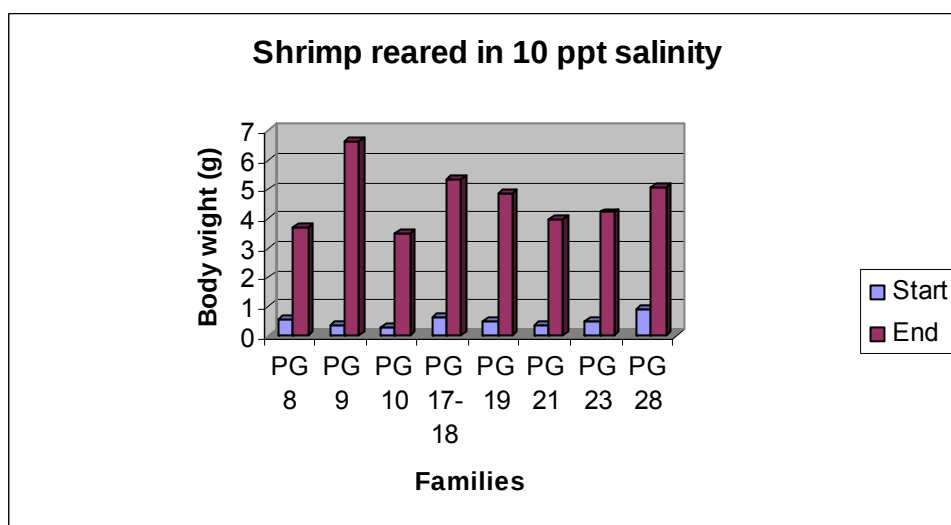
Family	MBW (start)	No. survival (start)	Biomass index (start)	MBW (end)	No. survival	Biomass index (end)	Biomass index (net)
PG 8	0.62	125	77.88	6.81	76	517.408	439.533
PG 9	0.47	125	58.63	8.38	119	996.863	938.238
PG 10	0.28	125	34.88	3.06	121	370.744	335.869
PG 17-18	0.61	125	76.75	6.59	94	618.99	542.24
PG 19	0.53	125	65.63	6.06	116	702.38	636.755

PG 21	0.36	125	44.5	3.94	107	421.152	376.652
PG 23	0.58	125	72.13	4.19	109	456.601	384.476
PG 28	0.95	125	119.25	6.70	97	649.803	530.553

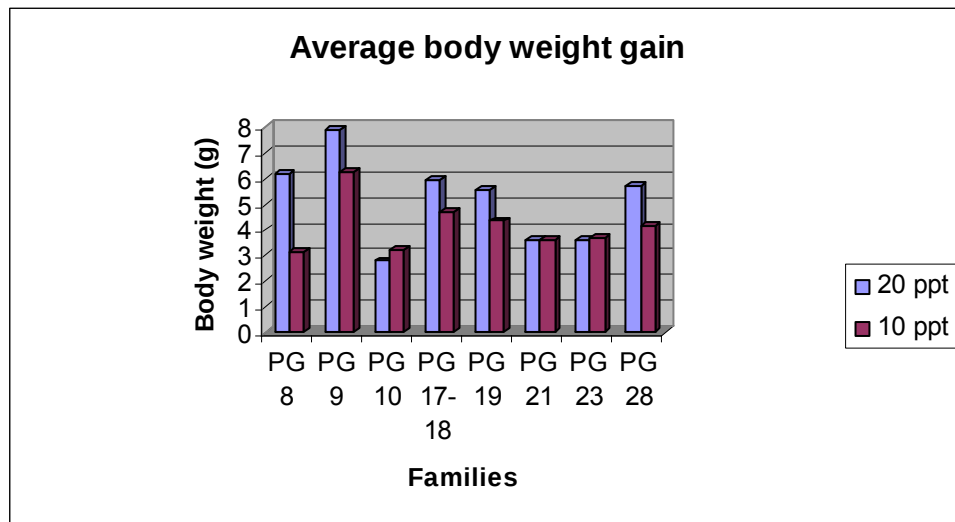
MBW = Mean body weight



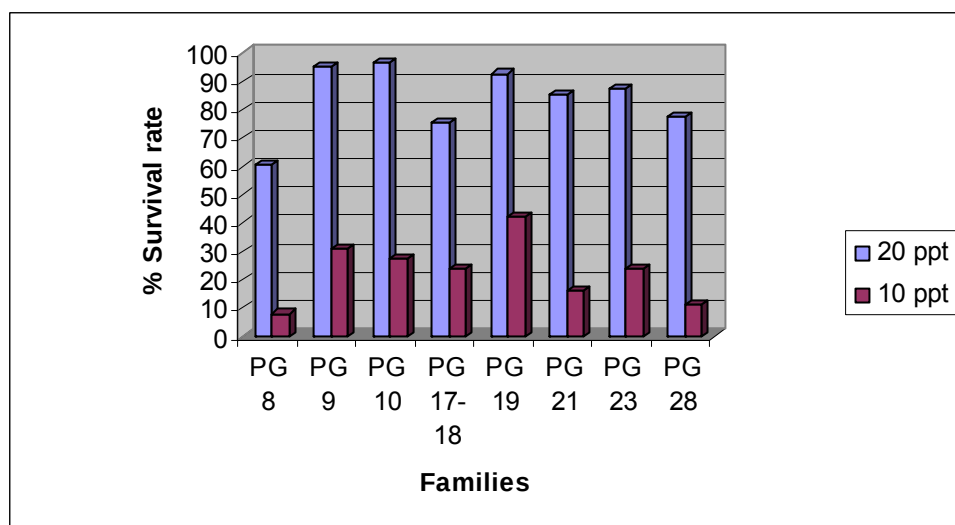
รูปที่ 1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มสูง



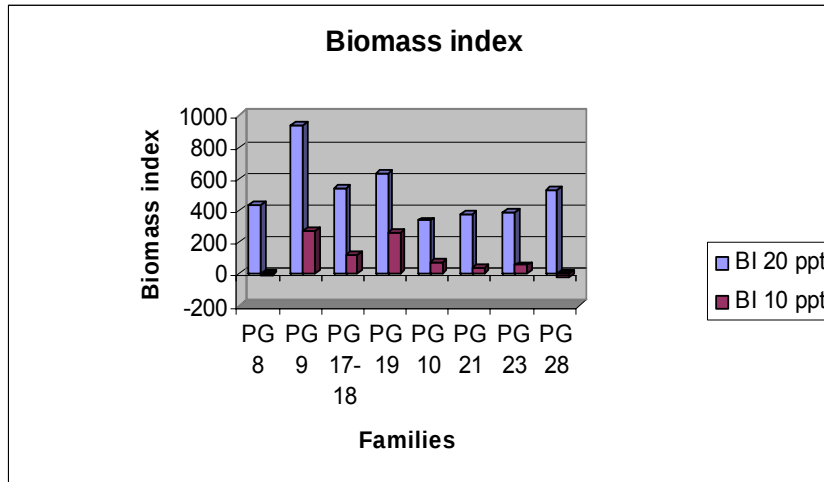
รูปที่ 2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มต่ำ



รูปที่ 3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มต่ำและสูง



รูปที่ 4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มต่ำและสูง



รูปที่ 5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบค่า Biomass index ของกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำและสูง

จากการทดลองพบว่า ได้คัดเลือกกลุ่มกุ้งที่มีค่า น้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย อัตรารอด และ Biomass index สูงในกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มสูง คือ PG 9, 19 ส่วนกลุ่มกุ้งที่มีค่า น้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย อัตรารอด และ Biomass index ต่ำ ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่ำและมีจำนวนมากพอที่จะทำการทดลองได้ ได้แก่ PG10, 23 ซึ่งการทดลองอื่นๆจะใช้กุ้ง 4 ครอบครัวนี้เป็นกลุ่มตัวอย่าง (รูปที่ 5)

การเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ในกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มต่ำและสูง

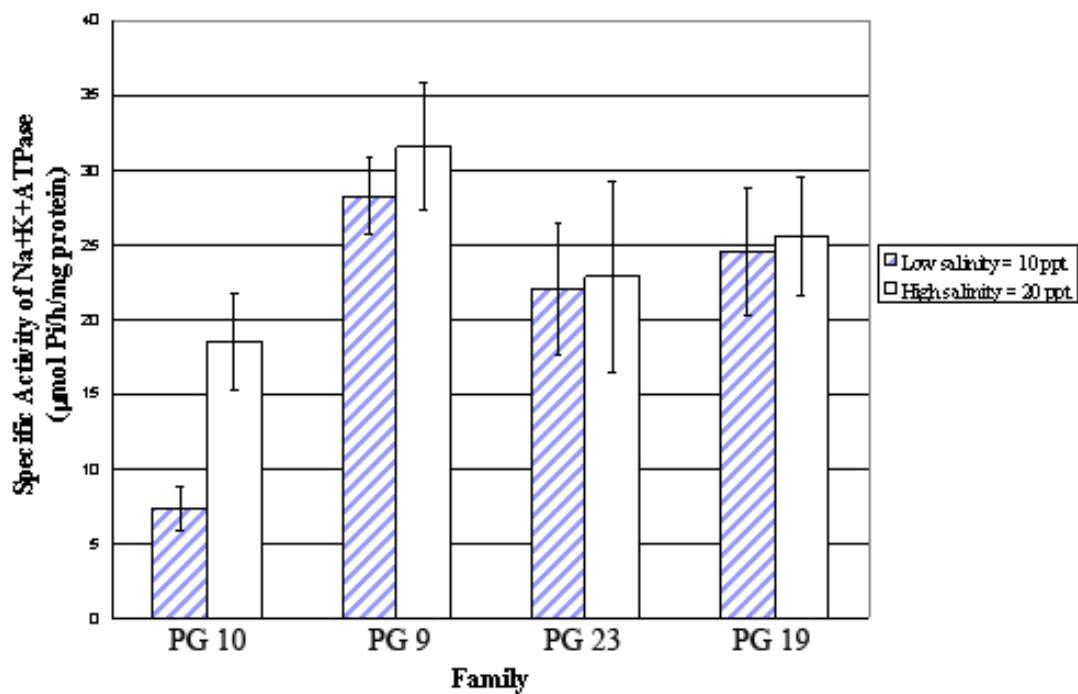
การดำเนินการวิจัย

เก็บตัวอย่างกุ้งจาก 4 ครอบครัว ที่เลี้ยงในความเค็มต่ำและสูงภายหลังเลี้ยงไว้ 2 เดือน นำ antennal gland ของกุ้งมาบดใน homogenizing medium บั่นเพื่อแยก cell debris ออก นำ supernatant มาวัดค่าโปรตีนโดยการดูดกลืนแสงที่ OD 595 และวัดระดับของ เอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase โดยการเปรียบเทียบระหว่าง medium ที่มี K^+ และ ไม่มี K^+ ซึ่งใส่ inhibitor (ouabain) ของเอนไซม์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 700 คำนวณปริมาณของ Na^+/K^+ -ATPase โดยใช้สูตร

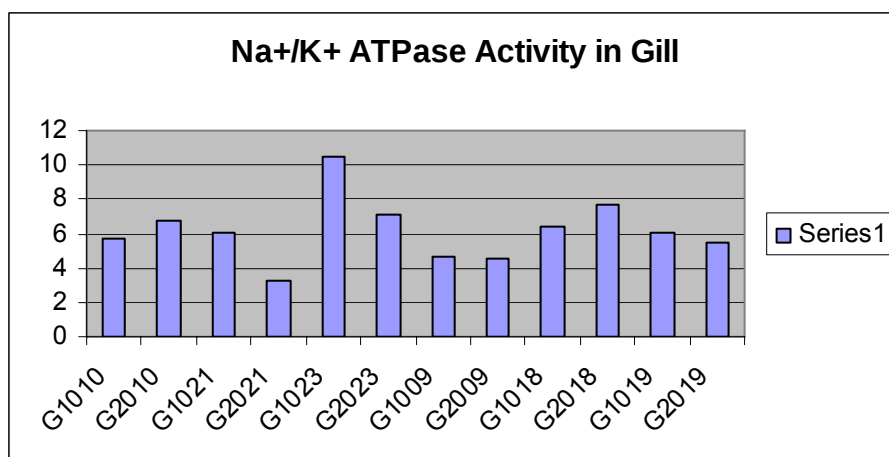
$$\text{OD595 protein std. / OD595 homogenate} \times \{ [+KOD700] - [-KOD700] \} / \text{PO4 std. OD700} \} \times 23.96$$
 โดยมีหน่วยเป็น $\mu\text{PO}_4 / \text{mg protein/ hour}$

ผลงานวิจัย

จากการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบกุ้งที่มาจากครอบครัวเดียวกันแต่เลี้ยงที่ความเค็มต่างกัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงความเค็มสูง จะมีค่าของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ใน Antennal gland สูงกว่าที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ (รูปที่ 6) ส่วนใน Gill ปริมาณของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าความเค็มมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของ เอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase หรือไม่ (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ใน Antennal gland จาก 4 ครอบครัวของกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มต่ำและสูง



รูปที่ 7 แสดงกราฟเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ใน Gill จาก 4 ครอบครัวของกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มต่ำและสูง

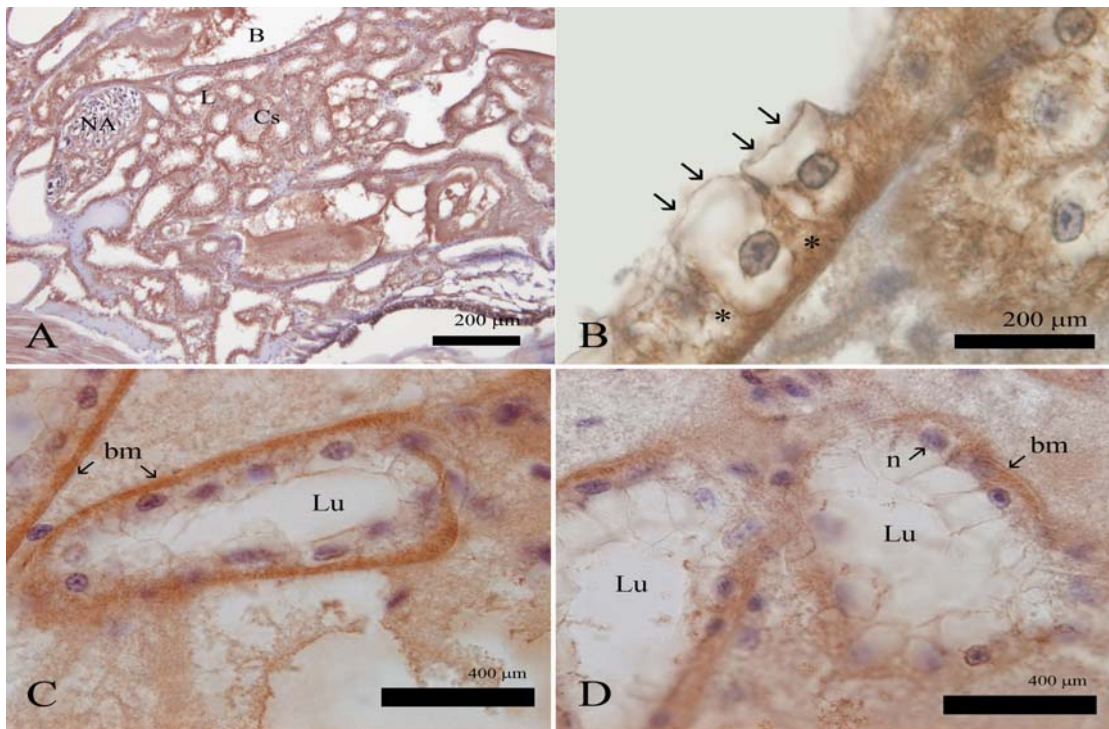
การศึกษาตำแหน่งที่อยู่ของ เอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase โดยวิธี Immunohistochemistry

การดำเนินการวิจัย

เก็บตัวอย่างกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำและสูงภายหลังเลี้ยงไว้ 2 เดือน มาฉีดตรึงเนื้อเยื่อด้วยน้ำยา Davidson's และผ่านขั้นตอนของการเตรียมเนื้อเยื่อแบบการฝังลงใน paraffin ตัดเนื้อเยื่อให้มีความบางประมาณ 5 ไมโครเมตร ผ่านขั้นตอนการนำ paraffin ออก และนำน้ำเข้า กำจัด endogenous peroxidase ด้วย 3% H_2O_2 ย้อมด้วย antibody ต่อ α subunit ของ Na^+/K^+ -ATPase ตามด้วย biotinylated second antibody และ peroxidase-conjugated streptavidin ตรวจสอบการมีอยู่ของ Na^+/K^+ -ATPase จากการย้อมด้วย DAB หรือ การใช้ FITC conjugated

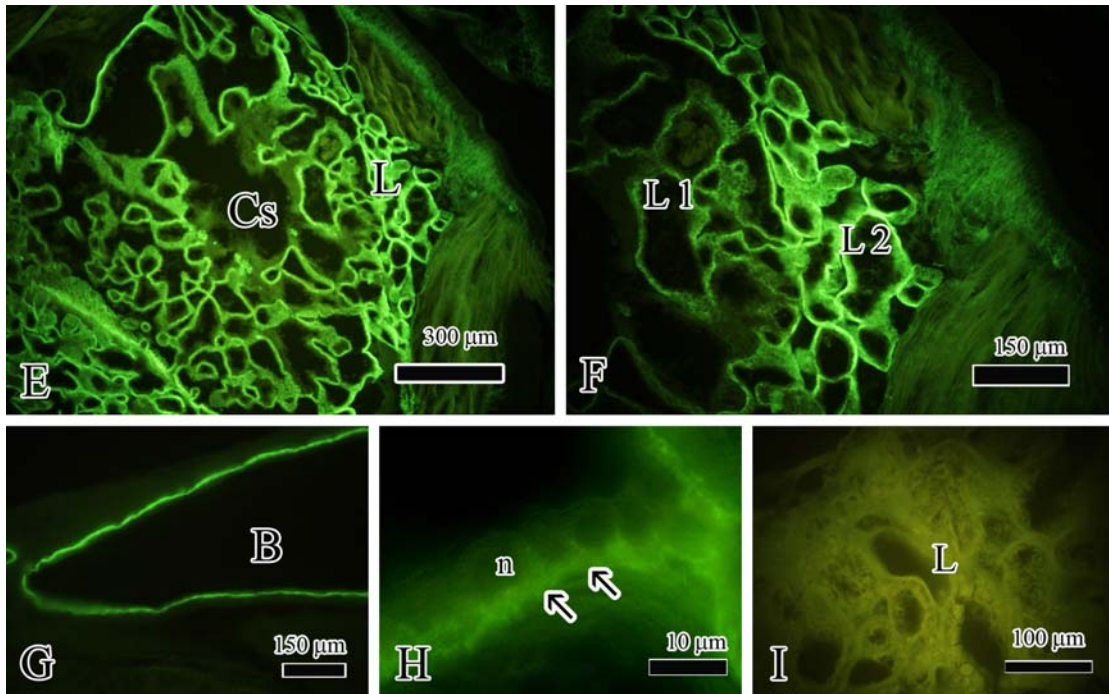
ผลงานวิจัย

จากการศึกษาพบว่าตำแหน่งที่อยู่ของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase อยู่ที่บริเวณ Basolateral membrane ของ labyrinth cells ของ antennal gland แต่ไม่พบที่บริเวณ coelomosac cells และพบการย้อมแอนติบอดีต่อ Na^+/K^+ -ATPase ติดสีเข้มในกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็มสูงมากกว่าที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ (รูปที่ 8-9)



รูปที่ 8 รูปการย้อม immunohistochemistry แสดง Antennal gland (รูป A) เมื่อย้อมด้วย antibody ต่อ α subunit ของ Na^+/K^+ -ATPase จะเห็นว่าบริเวณ Basolateral membrane ของ labyrinth cell

(รูป B) จะติดสีย้อมของ antibody มากกว่าด้าน apical surface และจะย้อมติดสีเข้มมากในกึ่งที่เลี้ยงที่ความเค็มสูง (รูป C) และย้อมติดสีจางในกึ่งที่เลี้ยงที่ความเค็มต่ำ (รูป D)



รูปที่ 9 รูปการย้อม immunofluorescence แสดง Antennal gland (รูป E) เมื่อย้อมด้วย antibody ต่อ α subunit ของ Na^+/K^+ -ATPase จะเห็นว่าการติดสีฟลูออเรสเซนต์เฉพาะที่ labyrinth cell (รูป E) และติดเข้มใน labyrinth type II มากกว่า labyrinth type I (รูป F) นอกจากนี้ bladder (B) ก็พบการติดสีย้อมด้วยเช่นกัน (รูป G) และการติดสีฟลูออเรสเซนต์จะเข้มตรงตำแหน่ง Basolateral membrane (รูป H) และไม่ติดสีฟลูออเรสเซนต์ใน negative control (รูป I)

ศึกษาปริมาณของ mRNA ของ เอ็นไซม์ Na^+/K^+ -ATPase

การดำเนินการวิจัย

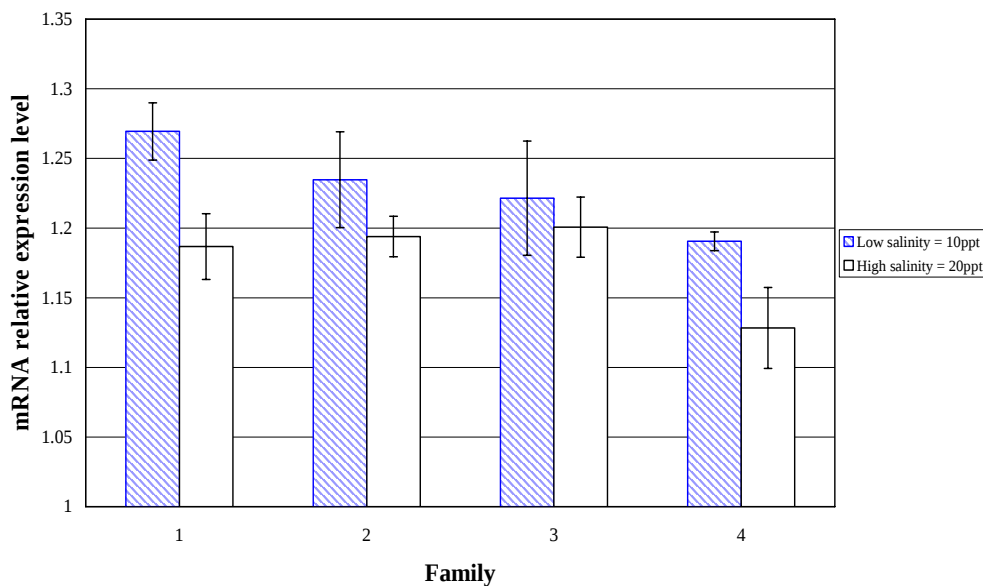
เก็บ Antennal gland ใส่ใน RNA/ater[®] (Ambion) จากนั้นสกัด RNA ด้วย Trizol reagent (Life Technologies) จากนั้นนำไปสร้างสาย cDNA ด้วย PCR โดยการใช้ oligo-dT primer และ Superscript II[®] reverse transcriptase (Invitrogen) เมื่อได้ cDNA แล้วเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการศึกษา real-time quantitative PCR (qPCR) โดยการใช้ SYBR Green master mix (ABI) ติดตามด้วยระบบ ABI PRISM 7500 ส่วนของ primer ออกแบบจากลำดับของ Na^+/K^+ ATPase α -subunit (NKA 553) และ Elongation factor (EF) ดังนี้ NKA 553 (183 bp) forward: 5'-CGATACGGGCAGAACGATT-3', reverse: 5'-ATTGGGACCTTGTGCTCATC-3' and EF (150 bp)

forward: 5'-GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC-3',
CGTTCGGGTGATCATGTTCTTGATG-3'.

reverse:5'-

ผลงานวิจัย

การปริมาณของ mRNA ของ Na^+/K^+ ATPase α -subunit ที่ศึกษาใน antennal gland พบว่าในกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มต่ำมีปริมาณของ mRNA สูงกว่าในกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มสูงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง 4 ครอบครัว และเมื่อเปรียบเทียบในครอบครัวเดียวกันพบว่ากึ่งที่เลี้ยงความเค็มต่ำมีปริมาณของ mRNA ของ Na^+/K^+ ATPase α -subunit สูงกว่ากึ่งที่เลี้ยงความเค็มสูงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 กราฟแสดง Quantitative real-time PCR ของ Na^+/K^+ ATPase mRNA ของ antennal gland ในกึ่งกลุ่มที่เลี้ยงความเค็มต่ำ (10ppt) และความเค็มสูง (20 ppt)

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะตีพิมพ์ได้ ได้แก่

1. Decha Buranajitpirom, Somluk Asuvapongpatana, Wattana Weerachatanukul, Kanokpan Wongprasert, Wisa Namwong, Pisit Poltana, and Boonsirm Withyachumnarnkul

Seawater salinities affect morphology of antennal gland and activity of Na^+/K^+ -ATPase in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Cell&Tissue Research, 2010 (in submission).

2. Decha Buranajitpirom^{1,2}, Somluk Asuvapongpatana¹, Boonsirm Withyachumnarnkul^{1,2,3}, Somjai Wngtripop³, Kallaya Sritunyalucksana^{2,4}. Ultrastructure and Na^+/K^+ ATPase Activity in the Antennal Gland of different Families of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Reared under Different Salinity. Aquaculture 2010 (in preparation).

การนำเสนอผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการนานาชาติ

1. Decha Buranajitpirom, Somluk Asuvapongpatana, Kallaya Sritunyalucksana, Boonsirm Withyachumnarnkul. Ultrastructure and expression sequence tags (EST) of the antennal gland of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. The 7th symposium on disease in Asian aquaculture, 6/22-6/26, 2008, Howard International House, Taipei, Taiwan
2. Somluk Asuvapongpatana, Kanokpan Wongprasert, Decha Buranajitpirom, Wattana Weerachathanukul, Wisuit Pradidarcheep, Boonsirm Withayachumnarnkul. Ultrastructure and Biochemistry of Antennal Gland of the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Reared under Different Salinity. The 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), November 2-7, 2008, Jeju, Korea

การนำเสนอผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการในประเทศ

1. **สมลักษณ์ อสุวพงษ์พัฒนา**, เดชา บุรณจิตภิรมย์, กนกพรรณ วงศ์ประเสริฐ, วัฒนา วีระชาติยานุกูล, วิสุทธิ์ ประดิษฐ์อาชีพ, พิธิษฐ์ พลชนะ, บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล “การศึกษาโครงสร้างและเอ็นไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ” การประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์ (ประเทศไทย) ครั้งที่ 31 ณ โรงแรมเมทวาลย์ อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี วันที่ 30 เม.ย.-2 พ.ค. 2551 และได้รับรางวัล การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ดีเด่น จากการประชุมในครั้งนี้

บทความสำหรับการเผยแพร่

ธุรกิจการส่งออกกุ้งกุลาดำของไทย นับเป็นอาชีพที่สร้างรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนเงินหลาย พันล้านบาทต่อปี แต่ลักษณะการทำฟาร์มของเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อขนาดใหญ่ ที่เป็นพื้นที่โล่ง และห่างไกลจากน้ำทะเล ประกอบกับฤดูต่างๆของไทยมีผลให้ความเค็มของน้ำในบ่อ เลี้ยงมีความผันแปรโดยเฉพาะในฤดูฝน เพราะค่าความเค็มของน้ำมีผลต่อการอยู่รอดและการ เจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ จากปัญหาดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะหาพันธุ์กุ้งกุลาดำที่ สามารถเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดสูงเมื่อต้องเลี้ยงในน้ำที่มีค่าความเค็มต่ำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ เลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษาของผู้วิจัยทำการคัดเลือกสายพันธุ์กุ้งกุลาดำจาก 8 ครอบครัว โดยการทดลองเลี้ยงกุ้งแรกเกิดอายุ 12 วัน (PL12) ที่ความเค็มต่ำ (10 ppt) และ ความเค็มสูง (20 ppt) เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นวัดค่าเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ซึ่งมีผลกับการดูดกลืนขับออกของเกลือแร่ที่ จำเป็นต่อการรักษาสมดุลของน้ำ และเกลือแร่ในร่างกาย เช่น โซเดียม และ โพแทสเซียม จากผลการ ทดลองพบว่า ค่าของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase สูงในกลุ่มกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มสูง และค่าของเอนไซม์ จะต่ำในกลุ่มที่เลี้ยงที่ความเค็มต่ำ จากผลการศึกษาของตำแหน่งของเอนไซม์นี้พบในส่วนองไตที่มี หน้าที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนขับออกของเกลือแร่ และพบปริมาณมากในกลุ่มกุ้งที่เลี้ยงในความเค็ม สูงซึ่งสอดคล้องกับการวัดค่าของเอนไซม์ดังกล่าว แต่เมื่อศึกษาถึงการสร้างของเอนไซม์นี้กลับพบว่ากุ้ง ที่เลี้ยงในความเค็มต่ำมีการสร้างเอนไซม์นี้มากกว่ากุ้งที่เลี้ยงในความเค็มสูง ถึงแม้การทดลองจะยังไม่ สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่ก็แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase มีความสำคัญกับการรักษาสมดุล ของเกลือแร่ และน้ำของร่างกายทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี และอัตราการอยู่รอดสูง