ผลการฉีดเชื้อ Vibrio harveyi ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วย (Fenneropenaeus merguiensis)

Effect of Vibrio harveyi Infection on β-1, 3-Glucanase Activity in Banana Shrimp (Fenneropenaeus merguiensis)

อรัญญา คงแก้ว[1], อรณิชา รัตนาภรณ์[2], และประภาพร อุทารพันธุ์[3]

บทคัดย่อ

การป้องกันตนเองของครัสเตเชียนขึ้นกับระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะ ซึ่งประกอบด้วยการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วย พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำงานได้ดี เมื่อใช้ลามินารินเป็นสับสเตรทใน 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 20 นาที พบแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมากในสารสกัดตับ พบเล็กน้อยในฮีโมลิมฟ์ แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 2.57 และ 1.97 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ในขณะที่แอคทิวิทีของเอนไซม์นี้ของกุ้งชุดควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกัน ที่เวลาต่าง ๆ หลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เพิ่มสูงขึ้นในฮีโมลิมฟ์หรือในตับน่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย

คำสำคัญ: เอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนส, กุ้งแชบ๊วย, จุลินทรีย์ก่อโรค, Vibrio harveyi

[1,2,3]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90112 ประเทศไทย

Abstract

The defense system of crustacean is dependent on the innate immune response that involves by many proteins and enzymes. In this report, β-1, 3-glucanase was studied for its roles in defense mechanism against pathogenic infection of banana shrimp. Optimal conditions for assay of β-1,3-glucanase activity in the hemolymph and hepatopancreas extract were by using laminarin as a substrate in 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 and incubation at 60 °C for 20 min. High activity of β-1,3-glucanase was detected in the hepatopancreases extract whereas trace was found in the hemolymph. β-1,3-glucanase activities in the hemolymph and hepatopancreas extract from banana shrimp challenged by *Vibrio harveyi* were increased 2.57 and 1.97 folds, respectively. These were significantly higher than that of controls which were injected with 0.85% NaCl. Moreover, activities of β-1, 3-glucanase of the controls were not different at any times post-saline injection. These results indicate that the increase of β-1, 3-glucanase activity in the hemolymph or hepatopancreas responds to the pathogenic infection as a defense mechanism in banana shrimp.

Keywords: β-1, 3-Glucanase, Banana shrimp, Fenneropenaeus merguiensis, Pathogen, Vibrio harveyi

บทนำ

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการส่งออกกุ้งทะเลของประเทศไทย เพราะมีราคาแพงและรสชาติดีกว่ากุ้งกุลาดำหรือกุ้งขาว ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวประสบปัญหาการติดเชื้อก่อโรคซึ่งมีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก กุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นกุ้งท้องถิ่นของไทยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเพื่อการส่งออกแทนการจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งจึงเป็นสิ่งสำคัญ กุ้งเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) ที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเพื่อป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค โดยอาศัยโปรตีนและเอนไซม์บางชนิดเรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs) เพื่อจดจำความแตกต่างขององค์ประกอบบนผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด เช่น ลิโพโพลีแซคคาไรด์ เบตา-กลูแคน เป็นต้น (Medzhitov & Janeway, 2002) PRPs บางชนิดยังไม่ได้มีการศึกษาเนื่องจากในสภาวะปกติจะมีปริมาณน้อยมาก โดยจะถูกหลั่งออกมาซึ่งพบว่ามีปริมาณ

เพิ่มขึ้นในเลือด เมื่อครัสเตเชียนเกิดการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น เบตา-1,3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ส่วนที่เป็นเบตา-1,3-กลูแคนของเชื้อจุลินทรีย์ ในสัตว์กลุ่มอาร์โธรพอดที่ได้รับเชื้อ *Helix pomatia* มีระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์และสามารถย่อยสลายเบตา-กลูแคนได้ (Brimacombe, 1975) พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ cortical granule ของไข่หอยเม่น (sea urchin) ซึ่งเมื่อเกิดการผสมพันธุ์ของไข่ เอนไซม์นี้จะถูกหลั่งจาก granule เพื่อไปจับอยู่กับ hyaline layer ของไข่ โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันไข่ (Wessel, Truschel, Chamber & McClay, 1987) ในครัสเตเชียนโดยเฉพาะกุ้งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส อาจเป็นเพราะในสภาวะปกติ กุ้งมีระดับแอคทิวิที (activity) ของเอนไซม์ชนิดนี้ในเลือดต่ำทำให้ยากต่อการศึกษา แต่มีรายงานเกี่ยวกับการป้องกันตนเองของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในพืชหลายชนิดซึ่งทำหน้าที่จดจำเบตา -1,3-กลูแคนบนผนังเซลล์บุกรุกและมีแอคทิวิทีเพิ่มขึ้นจากการติดเชื้อเพื่อต่อต้านเชื้อราหรือแบคทีเรียก่อโรคพืช เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมของข้อมูลวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในอนาคต งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาบทบาทเบื้องต้นที่อาจเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วยที่เหนี่ยวนำให้ติดเชื้อก่อโรค

วัตถุประสงค์

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เพื่อนำไปใช้วัดระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์นี้ในเลือดและในเนื้อเยื่อของกุ้งปกติ และศึกษาผลการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อก่อโรค Vibrio harveyi ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วย

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในปัจจุบันสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ แต่ก็มีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากซึ่งมักเกิดโรคติดเชื้อที่เกิดจากจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส รา หรือปรสิตต่าง ๆ แบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งในไทยคือ *Vibrio* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio harveyi* ปัจจุบันโรคระบาดของกุ้งก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การศึกษากลไกการป้องกันตนเองของกุ้งจึงมีความสำคัญเพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

กุ้งที่มีระบบไหลเวียนเลือดที่มีน้ำเลือดที่เรียกว่าฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) อาศัยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเพื่อป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค 2 แบบ คือ cellular immunity โดย

อาศัยเซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ (hemocyte) ในการทำลายเชื้อก่อโรค และแบบ humoral immunity โดยอาศัยโปรตีนและเอนไซม์ PRPs บางชนิดที่หลั่งมาจากเซลล์ฮีโมไซท์หรือจากตับออกสู่ฮีโมลิมฟ์เมื่อถูกกระตุ้นโดยการติดเชื้อ โครงสร้างของจุลินทรีย์มีรูปแบบที่เฉพาะตัวเรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Wang, Song, Li, Zhao, Zhang, Ni, & Xu, 2007; Medzhitov & Janeway, 2002) PRPs จะจดจำ PAMPs และช่วยเซลล์ฮีโมไซท์ในการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก หรือเป็นตัวทำลายเชื้อบุกรุกโดยตรง ในสภาวะปกติจะมีปริมาณของ PRPs ต่ำ แต่จะเพิ่มสูงขึ้นในสภาวะที่มีการติดเชื้อ หรือถูกกระตุ้น เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเป็น PRP ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของพืชเพื่อต่อต้านเชื้อราหรือแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยสามารถย่อยผนังเซลล์ส่วนที่เป็นเบตา-1,3-กลูแคนของเชื้อจุลินทรีย์ ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของกุ้งหรือครัสเตเชียน แต่พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของอาร์โธรพอดสามารถย่อยสลายพันธะเบตา-1,3-ไกลโคซิดิกของเบตา-กลูแคน และมีระดับเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่อได้รับเชื้อ *Helix pomatia* (Brimacombe, 1975) คณะผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน PRPs หลายชนิดที่เกี่ยวข้องระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วย จึงสนใจที่จะศึกษาบทบาทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในการป้องกันตนเองของกุ้ง เพื่อจะได้เชื่อมโยงกลไกการทำงานของโปรตีนเหล่านี้ในระบบภูมิคุ้มกันได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น งานวิจัยที่รายงานนี้จึงเป็นการตรวจสอบบทบาทเบื้องต้นในระบบภูมิคุ้มกันของเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยเลือกศึกษาในกุ้งแชบ๊วย ซึ่งเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างจากกุ้งแชบ๊วย

ในการเตรียมฮีโมลิมฟ์ ดูดเลือดจากกุ้งแชบ๊วย ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นโฮโมจีไนซ์ (homogenize) และเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 20 นาที เก็บส่วนใสหรือฮีโมลิมฟ์ไว้ที่ -20 °ซ สำหรับสารสกัดเนื้อเยื่อ เตรียมโดยตัดตับ กระเพาะ และกล้ามเนื้อจากกุ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 0.85% NaCl) นำไปโฮโมจีไนซ์ใน TBS หลังการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 20 นาที นำส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดเนื้อเยื่อเก็บไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ต่อไป

การวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยใช้ลามินาริน (laminarin) เป็นสับสเตรท ทำโดยใช้เอนไซม์ตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ในสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 0.1 M sodium acetate, pH 6 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด 2 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น แล้วเติม 40 mM DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ตั้งให้เย็นบนน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (A540) คำนวณแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากกราฟมาตรฐานกลูโคส กำหนดให้ค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit, U) เท่ากับปริมาณกลูโคส 1 นาโนโมล (nmole) ที่เกิดขึ้นจากการที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายลามินารินได้ในเวลา 1 นาที

กราฟมาตรฐานกลูโคสทำโดยเตรียม 5 mM D-glucose ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6 ให้มีปริมาณต่าง ๆ กันในช่วง 0-500 นาโนโมล ในปริมาตร 210 ไมโครลิตร แล้วผสมกับ 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็นบนน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร แล้ววัดค่า A540 พล็อตกราฟระหว่างค่า A540 กับปริมาณกลูโคสที่ใช้

การหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

จากการศึกษาเบื้องต้นพบแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมากสุดในสารสกัดตับและพบน้อยกว่าในฮีโมลิมฟ์ แต่งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีดเชื้อเชื้อก่อโรคด้วย ดังนั้นจึงได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ทั้งในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดตับ โดยวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสตามวิธีการข้างต้น แต่หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ในประเด็นต่อไปนี้คือ

1. หาปริมาณเอนไซม์ตัวอย่างที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิที โดยใช้ฮีโมลิมฟ์หรือสารสกัดตับปริมาณต่าง ๆ กัน
2. หาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยทำปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ ในช่วง 0-50 นาที
3. หา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้สารผสมปฏิกิริยาที่มีบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ในช่วง pH 3-11
4. หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 0-90 °ซ

5. หาปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาเมื่อใช้ 4 mg/ml laminarin ปริมาตรต่าง ๆ ในช่วง 0-50 ไมโครลิตร

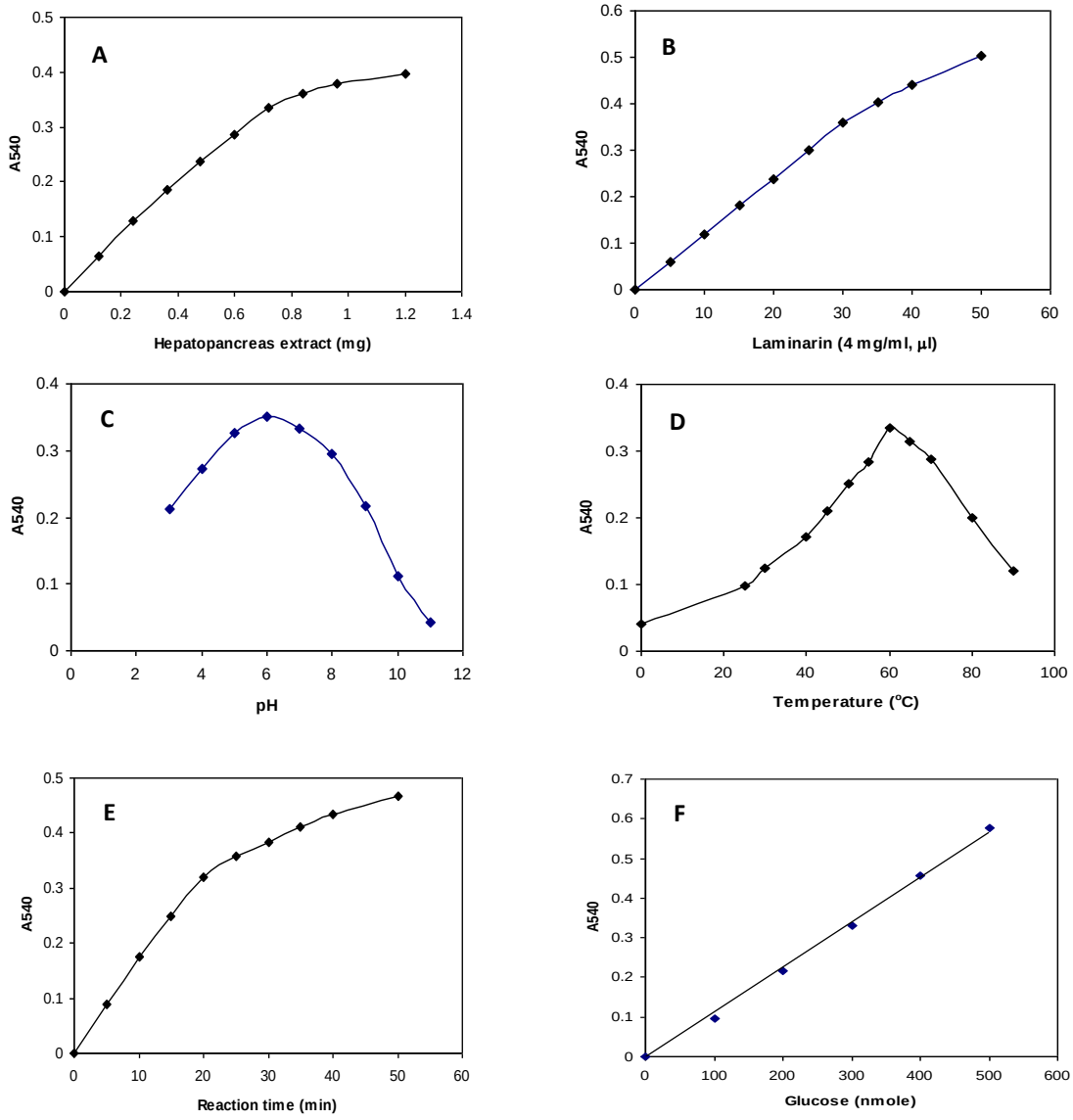
ผลการฉีด V. harveyi ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วย

เลี้ยงกุ้งที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน (ตัวละประมาณ 25 กรัม) ในถังละ 4-5 ตัว ให้อาหารทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม 3 วัน โดยสังเกตว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำ *V. harveyi* (5 x 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดเข้ากุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหางเพื่อกระตุ้นให้กุ้งติดโรค ตามวิธีการของ Rattanaporn และ Utarabhand (2011) สำหรับกุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ปริมาตรเท่ากัน แล้วดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแต่ละตัวที่เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด และตัดตับจากกุ้งแต่ละตัวที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังการฉีด นำไปเตรียมเอนไซม์ตัวอย่างตามวิธีการข้างต้น แล้วหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

สภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและในฮีโมลิมฟ์มีรูปแบบที่เหมือนกัน จึงเสนอผลการทดลองเฉพาะสารสกัดตับเท่านั้น ซึ่งสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เป็นดังนี้คือ ใช้สารสกัดตับปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.72 มิลลิกรัม (รูปที่ 1A) หรือใช้ฮีโมลิมฟ์ปริมาณที่เหมาะสมคือ 3.6 มิลลิกรัม ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใช้สับสเตรทลามินารินที่ความเข้มข้น 4 mg/ml ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (รูปที่ 1B) ทำปฏิกิริยาใน 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 (รูปที่ 1C) ที่อุณหภูมิ 60 °ซ (รูปที่ 1D) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานาน 20 นาที (รูปที่ 1E) และใช้กลูโคสปริมาณในช่วง 0-500 นาโนโมล เป็นกราฟมาตรฐานซึ่งให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (รูปที่ 1F) ผลงานวิจัยที่เหลือทั้งหมดได้ใช้สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและฮีโมลิมฟ์ มีรายละเอียดตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 สภาวะต่าง ๆ ของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ

แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในเนื้อเยื่อของกุ้งปกติ

จากการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วยตัวอย่างชุดเดียวกันที่จับจากธรรมชาติ พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับมากที่สุด (100%) รองลงมาได้แก่ กระเพาะ (6.5%) กล้ามเนื้อ (2.9%) และในฮีโมลิมฟ์ (1.8%) ตามลำดับ การที่พบแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับและกระเพาะมากแสดงถึงบทบาทของเอนไซม์นี้ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นส่วนเบตากลูแคนเพื่อการ

เดาบทบาทของเอนไซม์ได้แน่ชัด อาจเป็นระดับแอคทิวิทีพื้นฐานของเอนไซม์ที่มีทั่วไปเพื่อ metabolism ของเซลล์ ในทำนองเดียวกับการพบเอนไซม์นี้ในฮีโมลิมฟ์ แต่ยังไม่สามารถบอกบทบาทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งในภาวะปกติที่ไม่ได้ติดเชื้อก่อโรคได้

ผลการฉีด V. harveyi ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วย

จากการกระตุ้นกุ้งแชบ๊วยให้ติดเชื้อโดยการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่ปริมาณ 5 x 10^9 เซลล์ต่อตัวกุ้ง ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้กุ้งติดเชื้อได้ดีและไม่ตายภายใน 12 ชั่วโมง เมื่อวัดระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อเทียบกับกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและไม่แสดงอาการติดเชื้อ ณ เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด พบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งชุดควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกัน ณ เวลาต่าง ๆ (ตารางที่ 1) ในขณะที่แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีด *V. harveyi* เพิ่มสูงขึ้นจากระดับก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 1.54 และ 2.57 เท่า ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นตามเวลาหลังการฉีดเชื้อ ซึ่งเป็นการตอบสนองของกุ้งแชบ๊วยต่อการติดเชื้อก่อโรค รูปแบบการเพิ่มขึ้นของระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ แต่พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในข้าวบาร์เลย์จะถูกกระตุ้นให้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อถูกรุกรานจากเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราแป้ง และมีการแสดงออกของยีนของเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้นด้วย โดยเมื่อพืชได้รับการรุกรานจากเชื้อโรคพืชจะป้องกันตนเองโดยไปกระตุ้นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสให้มีการสร้างเอนไซม์มากขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อก่อโรค และได้มีการเตรียม cDNA ของเอนไซม์นี้จากข้าวบาร์เลย์เพื่อใช้เป็น hybridization probe วัดการแสดงออกของยีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวเจ้าและข้าวฟ่างที่ถูกรุกรานจากเชื้อรา (Jutidamronphan, Anderson, Mackinnon, Manners, Simpson & Scott, 1991)

ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* มีระดับสูงขึ้นกว่าของกุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวัดที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังการฉีด โดยเพิ่มขึ้นเป็น 1.97 เท่า (ตารางที่ 1) เนื่องจากตับเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด ดังนั้นกุ้งแชบ๊วยอาจตอบสนองการติดเชื้อก่อโรค โดยมีการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับเพิ่มขึ้นจึงพบระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์นี้ในตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมและระดับเอนไซม์

เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เนื่องมาจากการติดเชื้ออาจหลั่งมาจากตับของกุ้งแชบ๊วย เพราะจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสพบว่าเอนไซม์ในตับและในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยมีสมบัติต่าง ๆ คล้ายกันมาก ดังนั้นการที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการการติดเชื้อก่อโรค อาจมีผลต่อส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ เช่น เบตา-1,3-กลูแคนซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเองต่อเชื้อก่อโรคเช่นเดียวกับพืช แต่กลไกของเอนไซม์ชนิดนี้ในการป้องกันตนเองของกุ้งต่อเชื้อก่อโรคเป็นเช่นไร ยังไม่สามารถสรุปได้ ณ ที่นี้ ซึ่งควรมีการศึกษาการแสดงออกระดับยีนของเอนไซม์นี้ในสภาวะที่กุ้งมีการติดเชื้อต่อไป

ตารางที่ 1 แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi*

β-1,3-Glucanase Specific activity (U/mg protein)	Time after injection (hour)	Injection			
		Control (0.85% NaCl)		*V. harveyi*	
		Activity	Fold	Activity	Fold
In hemolymph	0	0.97 ± 0.15	1.00	0.64 ± 0.41	1.00
	6	0.95 ± 0.19	0.98	0.98 ± 0.56	1.54
	12	0.94 ± 0.25	0.97	*1.63 ± 0.60	*2.57
In hepatopancreas	12	58.60 ±12.86	1.00	*115.25 ±20.39	*1.97

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้กุ้งตัวอย่างในการทดลองละ 3-5 ตัว

* เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส และเมื่อนำสภาวะนี้ไปวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์พบว่ากุ้งปกติมีแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับมากที่สุด พบน้อยในฮีโมลิมฟ์ ในกุ้งที่เหนี่ยวนำด้วยการฉีดเชื้อก่อโรค V. harveyi พบว่ามีแอคทิวิทีของเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญทั้งในตับและในฮีโมลิมฟ์ บ่งชี้ว่าเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนสอาจมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคในกุ้ง ซึ่งต้องมีการศึกษาอย่างละเอียดทั้งกลไกและระดับยีนของเอนไซม์นี้ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550 และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ ตลอดจนให้ทุนการศึกษาแก่ นางสาวอรัญญา คงแก้ว จากโครงการความเป็นเลิศสาขาชีวเคมี

เอกสารอ้างอิง

Brimacombe, J. S. (1975). Carbohydrate Chemistry. In: *The Chemical Society* (Vol. 6, pp. 465-472). London: Burlington House.

Jutidamrongphan, W., Anderson, J. B., Mackinnon, G., Manners, J. M., Simpson, R. S., & Scott, K. J. (1991). Induction of β-1, 3-glucanase in barley in response to infection by fungal pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 4*, 234-238.

Medzhitov, R., & Janeway, Jr. C. A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, *296*, 298-300.

Rattanaporn, O., & Utarabhand, P. (2011). Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*: Early gene-up regulation after *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Invertebrate & Pathology*, *106*, 196-204.

Wang, H., L. Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D., & Xu, W. (2007). Cloning and characterization of a novel C-type lectin from zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology*, *44*(5), 722-731.

Wessel, G. M., Truschel, M. R., Chamber, S. A., & McClay, D. R. (1987). A cortical granule-specific enzyme, β-1,3-glucanase, in sea urchin eggs. *Gamete Research*, *18*, 339-348.