The Sci J of Phetchaburi Rajabhat University.
2020.17(1) : 11-23

การศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 17เบต้า-เอสตราไดออล

Identification of Size and Pattern of Vitellin in the Female Domesticated Giant Tiger Shrimp (*Penaeusmonodon)* Broodstock Fed with Supplemented 17**β**-estradiol Hormone Diets

ศรีภาพรรณ ธาระนารถ[1,*] บัลลังก์ เนื่องแสง[1] วศิน ยุวนะเตมีย์[1] และ รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ[1,2]

Sripapan Tharanart[1*], Bunlung Nuangsaeng[1], Vasin Yuvanatemiya[1] and RachanimukHiransuchalert[1,2]

[1]*คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี22170*

[2]*หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลคณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี22170*

[1]*Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus, 22170*

[2]*Marine Biotechnology Research Unit, Faculty of Marine Technology, Burapha University Chanthaburi Campus, 22170*

***Corresponding author; E-mail:** sripapan@buu.ac.th

Received: 19 March 2020 /Revised: 30 April 2020 /Accepted: 29 May 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุด คือ กุ้งไม่ถูกตัดตาได้รับอาหารเม็ดปกติ (N=12) กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติ (N=12)กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร (N=16, 16, 16 และ 8) ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยเก็บตัวอย่างรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือด ในวันที่ 35 และ 60 ของการเลี้ยง เพื่อวิเคราะห์หาดัชนีรังไข่ โปรตีนทั้งหมด และขนาดของโปรตีนไวเทลลินจากการหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของวันที่ 35 พบว่า กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติมีค่าสูงกว่าการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนกุ้งที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน เปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่มีค่าไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง จากการวัดปริมาณโปรตีนในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่าในเลือดมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับรังไข่ และตับ/ตับอ่อนซึ่งมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน ในการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนทั้งหมดด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จำนวน 20-40 แถบ และเมื่อศึกษาขนาดของโปรตีนไวเทลลินด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอทโดยใช้แอนติ้บอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนไวเทลลินของกุ้งกุลาดำที่ขนาด 74 กิโลดาลตัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหารที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน มีการผลิตโปรตีนไวเทลลินสูงที่สุด โดยพบแถบโปรตีนไวเทลลินชัดเจนที่สุดในรังไข่และเลือดตามลำดับ แต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน

คำสำคัญ: เวสเทิร์นบลอท17เบต้า-เอสตราไดออลโปรตีนไวเทลลิน กุ้งกุลาดำ

Abstract

This study was to examine the vitellin protein levels in term of size and pattern in the female domesticated giant tiger shrimp (*Penaeusmonodon)* broodstockfed with supplemented 17 beta estradiol at various levels.The samples were divided into 6 treatments, i.e., shrimps fed with diets without hormone (N=12), eyestalk-ablation shrimps fed with diets without hormone (N=12), shrimps fed with diets enhanced with 17β-estradiol hormone at 10, 50, 100 and 500 mg/kg (N=16, 16, 16 and8),respectivelyfor 60 days. The samples of ovaries, hepatopancreas and hemolymphwere collected at day 35 and 60 for determinations ofGSI, total protein and size of vitellin. The results showed that the average GSI of eyestalk-ablation shrimp fed with diets without hormonesupplementedwas significantly higher than other groups ($p<0.05$) at day 35. While, there was no statistically significant difference of the GSI in each experimental groups at day 60. The protein levels in hemolymph were higher than the one in ovary and hepatopancreas. Moreover, analysis protein patterns by SDS-PAGE in ovaries, hepatopancreas and hemolymph were found that the protein bands could be seen with 20-40 bands.Size of vitellinprotein was analyzed by Western blotting through using anti-vitellin of giant tiger shrimp at the size of 74 kilodaltons. It was found that shrimp fed with hormonemixed diets of 17β-estradiol hormone at 100 mg/kg of diet at 35 days showed the highest production of vitellin protein. The most clearly vitellin protein was found in the ovaries and blood, respectively, but not in the hepatopancreas.

Keywords:Western Blot, 17β-estradiol, vitellin protein, *Penaeusmonodon*

บทนำ

กุ้งกุลาดำ (Penaeusmonodon) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยมูลค่ามากถึง 622.35 ล้านบาท [1] แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบปัญหาด้านการผลิตกุ้งที่มีคุณภาพ ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งคือการไม่เจริญพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในโรงเรือน [2] ปัจจุบันเกษตรกรกระตุ้นการวางไข่ของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีการตัดก้านตา เนื่องจากบริเวณก้านตาของแม่พันธุ์กุ้งมีฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนารังไข่ หากตัดก้านตาออกจะส่งผลให้แม่พันธุ์กุ้งพัฒนารังไข่ไปจนถึงระยะสมบูรณ์เพศและพร้อมที่จะผสมพันธุ์ตามเวลาที่ต้องการ แต่การตัดก้านตากุ้งส่งผลให้ฮอร์โมนต่าง ๆ ในตัวกุ้งทำงานผิดปกติ ลูกกุ้งที่ได้ไม่แข็งแรง แม่พันธุ์บอบช้ำ สิ้นเปลืองแม่พันธุ์ที่ราคาแพงและหาได้ยาก นอกจากนี้ยังมีการใช้ฮอร์โมน 17เบต้า-เอสตราไดออล (17β-estradiol) ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ [2] ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน และ ฮอร์โมน 17 แอลฟา-ไฮดรอกซีโพ

รเจสเตอโรนโดย 17β-estradiolเป็นฮอร์โมนกลุ่มสเตียรอยด์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลจีเนซีส(vitellogenesis) ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ [2]โดยกระบวนการไวเทลโลจีเนซีสคือกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนไข่แดงแล้วเปลี่ยนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กเพื่อเข้าสู่เซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาเริ่มจากการผลิตโปรตีนตั้งต้น (ไวเทลโลจีนิน vitellogenin; VTG) ของโปรตีนไข่แดงในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจงแล้วผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็นโมเลกุลที่เล็กลงและมีการสะสมเพื่อใช้ในการพัฒนาเซลล์ไข่ในรูปของโปรตีนไวเทลลินในภายหลัง [2] โดยโปรตีนไวเทลโลจีนินในกุ้งกุลาดำถือเป็นองค์ ประกอบตั้งต้นในการสร้างโปรตีนไข่แดงหรือโปรตีนโยล์ค (Yolk protein) [3] โปรตีนไวเทลโลจีนินสังเคราะห์ขึ้นที่เนื้อเยื่อตับภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจนโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะลำเลียงผ่านกระแสเลือดไปสะสมที่เซลล์ไข่ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการพัฒนาของเอ็มบริโอกระบวนการสร้างและสะสมโปรตีนโยล์คทำให้เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น [4] นอกจากนี้ ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonadosomatic index; GSI) มักนิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยเช่นกัน โดยช่วงที่สัตว์น้ำเริ่มวางไข่จะมีค่า GSI สูงสุดแล้วหลังจากวางไข่ไปแล้วจะมีค่าลดลง [5] โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศในกุ้งกุลาดำที่แม่นยำสามารถทำได้โดยการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในอวัยวะต่าง ๆ เช่น เลือด ตับ/ตับอ่อน และรังไข่ ซึ่งการตรวจสอบมีหลายวิธี เช่น การให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลในการแยกโปรตีน การวัดปริมาณโปรตีนโดยตรงด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอท ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่จะมีความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีสูง จึงเล็งเห็นความสำคัญในการพัฒนาข้อมูลรูปแบบโปรตีนที่มีอยู่รังไข่ของกุ้งกุลาดำ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการเพิ่มองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นพื้นฐานที่สำคัญนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นข้อมูลในการเข้าใจกลไกการสมบูรณ์เพศของกุ้งกุลาดำ และสามารถเพาะผลิตแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในสภาพกักขังได้

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมาบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.1 ไมครอน ละลายฮอร์โมนในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.99 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นผสมฮอร์โมนในอาหารที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg และ 500 mg/kg ของอาหาร นำส่วนผสมเข้าเครื่องอัดเม็ดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ยาว 4 มิลลิเมตร เข้าตู้อบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วคัดอาหารผ่านตะแกรง บรรจุใส่ถุงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. วิธีดำเนินการทดลองและการเก็บตัวอย่าง

เลี้ยงกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์จากศูนย์เพิ่มจำนวนพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อายุ 20 เดือน ที่มีน้ำหนักตัวและ

ความยาวเริ่มต้น ดังแสดงใน Table 1 ในถังพลาสติกสีดำทรงกลมขนาด 1,000 ลิตรด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 60 วัน ในโรงเรือนระบบปิด ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรีโดยมีแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมนหรือชุดควบคุม (T1), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน (T2), กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg (T3), 50 mg/kg (T4), 100 mg/kg (T5) และ 500 mg/kg (T6) เก็บตัวอย่างในวันที่ 35 วัน และ 60 วัน มาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ชั่งน้ำหนักรังไข่ เก็บเลือด (HE) รังไข่ (OV) และตับ/ตับอ่อน (HP) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสโดยในแต่ละถังการทดลองจะมีแม่พันธุ์กุ้ง 8 ตัว และ พ่อพันธุ์กุ้ง 1 ตัว

3. การสร้างกราฟสารสะลายโปรตีนมาตรฐาน

สร้างกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยใช้สารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin) ที่ความเข้มข้น 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 จากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford[6]นำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA โดยรายงานเป็นค่ามิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

นำรังไข่ และตับ/ตับอ่อนมาสกัดโปรตีนทั้งหมด โดยดัดแปลงจากวิธีของ อรัญญา และประภาพร[7] โดยบดในสารละลาย TBS-PMSF (50mM Tris-HCl, pH7.5 ที่มี 0.9%NaCl และ 1mMphenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)) โดยใช้อัตราส่วนเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม ต่อ TBS-PMSF 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอาส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดโปรตีนไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford[6]

Table 1. Mean of body weight and length of the female domesticated giant tiger shrimp broodstock before fed with supplemented 17β-estradiol hormone diets.

Treatment	Mean of body weight (grams)	Mean of length (centimeter)	Samples (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

Treatment	Mean of body weight (grams)	Mean of length (centimeter)	Samples (N)
5	108.13±14.66^{ab}	21.88±1.02^{ab}	16
6	110.18±16.85^{ab}	21.48±1.59^{a}	8

Same letters within a column are not significantly different at p>0.05 level.

5. การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

นำสารสกัดจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดเจือจางไปผสมกับ Sample buffer (0.5 tris-HCl pH 7.4, Glycerol, 10% SDS, bromo- phenol blue และ *β*-Mercep-toethanol) (อัตราส่วน 1:2) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน 30 ไมโครกรัม นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกปริมาณโปรตีนด้วย 10% polyacry- lamide gel ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ย้อมสีด้วย Coomassie blue R-250 ประมาณ 15 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วย destainingSolution ตามวิธีของ Laemmli [8]

6.การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

นำสารสกัดจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดมาแยกโปรตีนใน 10% Separating gel จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลลงแผ่น PVDFเมมเบรน แช่แผ่นเมมเบรนใน Blocking Bufferเขย่า 1 ชั่วโมง เทสารละลายออก จากนั้นเติม washing buffer เขย่าเป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายออกแล้วเติม Anti-rabbit VTG, 1°Ab (1:5000) เขย่า 2 ชั่วโมง นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นเท 1°Ab ออก แล้วเติม washing bufferและเขย่า 5นาที ทำ 3 ซ้ำ และเทออก จากนั้นเติม Goat Anti-Rabbit IgG-AP Conjugate, 2°Ab (1:3000) นำไปเขย่า 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลาเท 2°Ab ออก ตรวจสอบการปรากฏของแถบโปรตีนด้วยการเติมน้ำยา develop (Ap color Reagent A, Ap color Reagent B, 25x Ap color Development Buffer)เขย่าจนปรากฏแถบสี ล้างสีส่วนเกินแล้วบันทึกผลการทำปฏิกิริยา[9]โดยโปรตีนไวเทลลินที่คาดหวังมีขนาด 74 กิโลดาลตัน

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการนำตัวอย่างแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน มาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และ ชั่งน้ำหนักของรังไข่พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของแม่พันธุ์กุ้ง ความยาวของแม่พันธุ์กุ้ง และค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) มีค่าดังแสดงในTable 2

2.การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA มาสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานได้ผลดังFigure 1

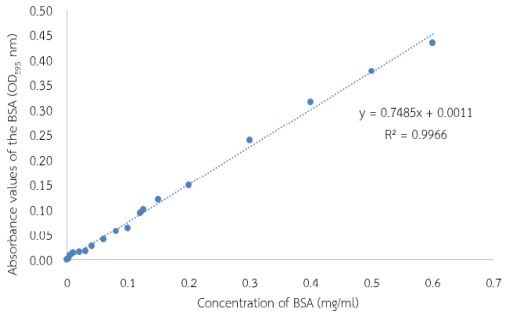

Figure 1. Standard curve of Bovine Serum Albumin (BSA)

3. การศึกษาปริมาณโปรตีน

จากการวัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดรังไข่ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA

Table 2. Mean of body weight, length, ovary weight and ovarian index (% GSI)

Treatments	Mean of body weight (grams)		Mean of length (cm.)		Mean of GSI (%)	
	Day 35	Day 60	Day 35	Day 60	Day 35	Day 60
1	100.81±13.26^{a}	95.00±11.18^{a}	21.35±1.14^{a}	20.63±1.00^{a}	1.08±0.35^{ab}	1.15±0.30^{a}
2	108.86±24.10^{a}	-	22.08±1.81^{a}	-	1.78±0.65^{b}	-
3	91.53±11.26^{a}	81.06±4.22^{a}	20.48±0.85^{a}	19.40±1.01^{a}	0.97±0.56^{a}	1.10±0.34^{a}
4	108.61±22.93^{a}	95.47±26.34^{a}	21.78±1.28^{a}	20.85±2.18^{a}	1.36±0.53^{ab}	1.29±0.76^{a}
5	111.05±16.72^{a}	99.60±16.83^{a}	21.58±1.28^{a}	21.53±1.34^{a}	1.12±0.24^{ab}	1.37±0.70^{a}
6	104.58±21.88^{a}	-	20.67±1.36^{a}	-	1.04±0.16^{ab}	-

Same letters within a column are not significantly different at p>0.05 level.

(Figure 1) พบว่า ปริมาณโปรตีนในรังไข่ ปริมาณโปรตีนในตับ/ตับอ่อน และ ปริมาณโปรตีนในเลือด ของแม่กุ้งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 2.09-4.05 และ 2.99-5.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2.03-4.55และ 2.58-4.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ 90.70-176.46 และ 131.72-199.88มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table3)

4. การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

จากการเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนประมาณ 20 ถึง 40 แถบ ในตัวอย่างที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 พบว่า โปรตีนที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อนและเลือด ของทุกการทดลองมีจำนวน 5 แถบที่เหมือนกัน ได้แก่ 104, 74, 58, 28

และ 23 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในรังไข่มีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 157 และ 130 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในตับ/ตับอ่อน มีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 53 และ 45 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนที่พบเฉพาะในเลือดมีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 240 และ 34 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนขนาด 240, 220, 200 และ 168 กิโลดาลตัน ไม่พบในตับ/ตับอ่อนของทุกการทดลอง และในทุกอวัยวะของชุดควบคุมไม่พบแถบโปรตีนที่ 200 กิโลดาลตัน (Figure2) และจากตัวอย่างที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 พบว่า โปรตีนที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อนและเลือดของทุกการทดลองมีจำนวน 9 แถบที่เหมือนกัน ได้แก่ 104, 58, 50, 45, 38, 34, 28, 26 และ 23 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในรังไข่มีจำนวน 3 แถบ ได้แก่ 83, 63 และ 20 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในเลือดมีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 168 และ 157 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนขนาด 240, 200, 168 และ 83 กิโลดาลตัน ไม่พบในตับ/ตับอ่อนของทุกการทดลอง แถบโปรตีนขนาด 83 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในรังไข่และเลือดเท่านั้น และในทุกอวัยวะของชุดควบคุมไม่พบแถบโปรตีนขนาด 240, 200 และ 53กิโลดาลตัน (Figure3)

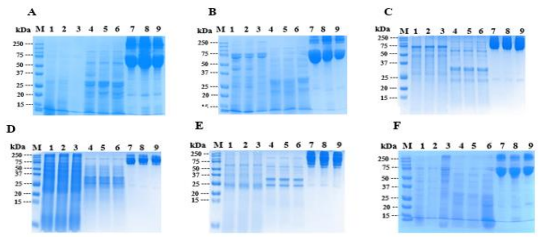

Figure2. The pattern of protein of *P. monodon*using SDS-PAGE analysisof 35 day. A-F = Treatment 1-6. M = DNA marker,1-3 = ovary, 4-6 = hepatopancreasand7-9 = hemolymph.

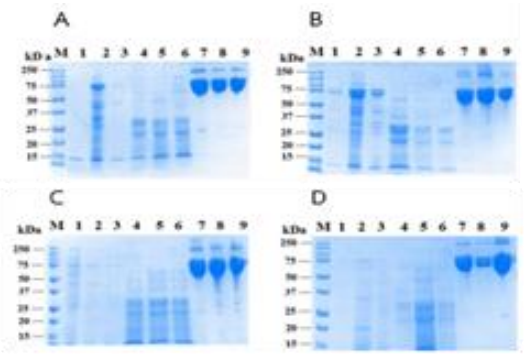

Figure3. The pattern of protein of *P. monodon*using SDS-PAGE analysisof 60 day A = Treatment 1-, B = Treatment 3, C = Treatment 4, D = Treatment 5, M = DNA,1-3 = ovary, 4-6 = hepatopancreasand7-9 = hemolymph.

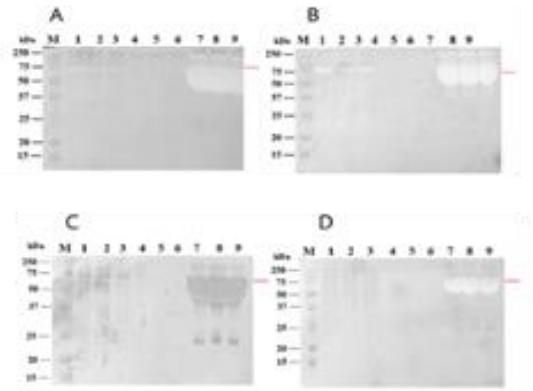

Figure4. Western blotting detection of vitellin protein in the female domesticated giant tiger shrimp broodstockof 35 day. A-F = Treatment 1-6. M = DNA marker,1-3 = ovary, 4-6 = hepatopancreasand7-9 = hemolymph.

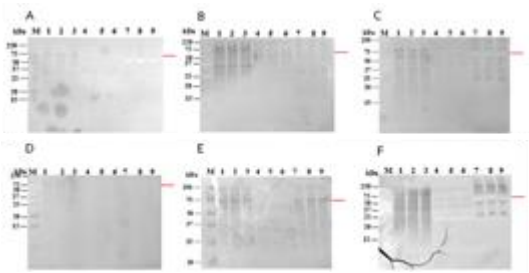

Figure5. Western blotting detection of vitellin protein in the female domesticated giant tiger shrimp broodstockof 60 day. A = Treatment 1, B = Treatment 3, C = Treatment 4, D = Treatment 5, M = DNA,1-3 = ovary, 4-6 = hepatopancreasand7-9 = hemolymph.

5. การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

จากการวิเคราะห์ระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 และ 60 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง โดยโปรตีนไวเทลลินที่คาดหวังมีขนาด 74 กิโลดาลตัน พบว่า ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร พบแถบโปรตีนไวเทลลินขนาด 74 กิโลดาลตันชัดเจนที่สุดในรังไข่และเลือดตามลำดับ แต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน(Figure4and Table4)และ ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร พบแถบโปรตีนไวเทลลินขนาด 74 กิโลดาลตันชัดเจนที่สุดในรังไข่และเลือดตามลำดับ แต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน(Figure5and Table4)

Table3. Mean of total protein levelsof the female domesticated giant tiger shrimp

Day	Treatments	Protein levels (mg/ml)		
		Ovary	Hepatopancreas	Hemolymph
35	1	2.76±1.83	4.55±2.88	76.51±48.73
	2	2.52±1.21	2.03±0.48	91.64±40.36
	3	2.09±1.26	2.46±0.99	104.52±52.10
	4	3.62±0.67	2.79±1.31	90.70±75.40
	5	4.05±3.17	3.40±2.58	176.46±87.32
	6	3.79±0.93	2.46±0.71	124.40±63.81
60	1	2.99±1.19	3.36±1.10	131.72±52.65
	3	4.40±1.03	3.08±3.48	199.88±114.25
	4	5.17±2.07	2.58±1.24	140.01±62.29
	5	4.76±1.67	4.08±0.82	157.49±56.48

Table4. The vitelline protein levels examination in ovary, hepatopancreas and hemolymph of the female domesticated giant tiger shrimp broodstock

		Treatments																	
		1			2			3			4			5			6		
	kDa	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
35 day	104	++	-	+	++	-	+	++	-	+	+	-	-	++	-	+	-	-	+
	74	+	-	-	++	+	+	+	-	+	+	-	-	+++	-	++	++	-	-
60day	104	+	-	+	No	No	No	+	-	-	-	-	+	+	-	+	No	No	No
	74	-	-	-	No	No	No	-	-	-	++	-	++	+	-	-	No	No	No

Remark: +++ = high expression level, ++ = moderate expression level, + = low expression level, - = not expression, No = Not analyzed

อภิปรายผล และสรุปผลการวิจัย

1. ผลของฮอร์โมน 17เบต้า-เอสตราไดออลต่อน้ำหนักตัว ความยาว และ เปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว และความยาวของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว และความยาวของแม่พันธุ์กุ้งทั้ง 6 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในกุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่มากกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองอื่นที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน ส่วนในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่า แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ถูกตัดตา 1ข้างได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน และ กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kgมีการตายระหว่างการเลี้ยง ทำให้การเก็บตัวอย่างในวันที่ 60 เหลือตัวอย่างเพียง 4 ชุดการทดลองเท่านั้น เนื่องจาก กุ้งที่ผ่านการตัดตาอาจบอบช้ำ หรืออาจติดเชื้อระหว่างการเลี้ยง ในขณะที่กุ้งไม่ตัดตาที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg อาจได้รับฮอร์โมนในปริมาณที่มากเกินไป และเมื่อนำตัวอย่างแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่เหลือมาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ชั่งน้ำหนักของรังไข่ และตับ/ตับอ่อนพบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาว และค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน (Table2) อาจมีผลมาจากการถูกตัดก้านตาส่งผลให้ฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการพัฒนาเซลสืบพันธุ์บกพร่องหรือถูกทำลายทำให้รังไข่มีการพัฒนาเร็วกว่าปกติ เนื่องจากการตัดก้านตากุ้งเป็นการทำลาย X-Organ และ Sinus Gland ซึ่งเป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนที่ไปยับยั้งการพัฒนาของไข่ในกุ้งเพศเมีย (gonad inhibiting hormone: GIH) โดยการยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนิน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไวเทลลิน และสะสมในไข่ที่กำลังเจริญ ซึ่งจะทำงานร่วมกับระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับของฮอร์โมนสองชนิด คือ GIH และ

ฮอร์โมนที่กระตุ้นการวางไข่ (gonad stimulating hormone: GSH) [10] กล่าวคือเมื่อ GIH ถูกทำลาย ส่งผลให้ GSH ทำงานได้มากกว่าปกติ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นที่ได้รับฮอร์โมน พบว่า ไม่แตกต่างทางสถิติ อาจเป็นเพราะฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลจีเนซีสและการพัฒนารังไข่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำได้ ซึ่งมีผลไปในทางเดียวกับศึกษาอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน17เบต้า-เอสตราไดออลต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่กุ้งกุลาดำที่ถูกตัดก้านตา 1 ข้าง และกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล 1 mg/kg มีค่าสูงกว่ากุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)[11]อย่างไรก็ตาม โครงสร้างของฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนไวเทลลินในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มครัซเตเชียนในระยะสั้นๆ จึงทำให้รังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำพัฒนาไม่ถึงระยะสุดท้าย

2. การศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

จากการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากสารสกัดโปรตีนจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่า เลือดมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ส่วนรังไข่และตับ/ตับอ่อนมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน เนื่องจากในกุ้งกุลาดำเลือดจะเป็นตัวกลางในการส่งผ่านโปรตีนไวเทลลินจากตับ/ตับอ่อนไปเก็บสะสมที่รังไข่ สรุปคือเมื่อตับ/ตับอ่อนถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จึงมีการสร้างและสะสมโปรตีนไข่แดงขึ้น (โปรตีนไวเทลลิน) จากนั้นจะส่งไปเพื่อพัฒนารังไข่ผ่านทางเลือด จึงมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดสูงกว่าในรังไข่และตับ/ตับอ่อน เนื่องจากเลือดเป็นตัวกลางในการส่งโปรตีนจากอวัยวะหนึ่งไปยังอีกอวัยวะหนึ่ง [12]

3. การศึกษารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

จากการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือด ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนไวเทลลิน จำนวน 20 แถบ โดยทั้งในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน แถบโปรตีนที่ขนาดที่ 74 กิโลดาลตันจะมีความเด่นชัดที่สุดในรังไข่และเลือด แตกต่างกับแถบโปรตีนในตับ/ตับอ่อนที่แถบโปรตีนที่ 28 กิโลดาลตันมีความเด่นชัดที่สุด ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่พบว่าในเลือดและรังไข่พบการปรากฏเด่นชัดของแถบโปรตีนที่ 75 กิโลดาลตัน [13]

4. การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท

จากการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือด ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอทแบบกึ่งแห้งรุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System โดยใช้แอนติ้บอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนไวเทลลินของกุ้งกุลาดำที่ขนาด 74 กิโลดาลตันพบว่า ในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน พบแถบโปรตีน 13 ขนาด ได้แก่ 200, 157, 130, 104,74, 63, 58, 50, 45,38, 34, 28 และ 26 กิโลดาลตันและ ในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบแถบโปรตีน 15 ขนาด ได้แก่ 240, 200, 168, 157, 130, 104, 74,63, 58, 50, 45,38, 34, 26 และ 23 กิโลดาลตันโดยในตัวอย่างที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน มีแถบโปรตีนขนาด 240168 และ

23 กิโลดาลตันเพิ่มมาจากการทดลองที่ 35 วัน แต่ไม่พบโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตันการที่พบแถบโปรตีนนอกเหนือจากขนาดที่คาดหวังอาจคล้ายกับงานวิจัยที่วิเคราะห์โปรตีนไวเทลลินในรังไข่และเลือดของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอทแล้วพบว่าในรังไข่มีโปรตีนไวเทลลิน5 ขนาด ได้แก่ 104, 83, 74, 58 และ 45 กิโลดาลตันและในเลือดมีโปรตีนไวเทลลิน4 ขนาด ได้แก่ 200, 104, 83 และ 74 กิโลดาลตันโดยได้อธิบายความสัมพันธ์ทางอิมมูโนแอคทีฟระหว่างโปรตีนเหล่านี้ว่า ไวเทลโลจีนินอาจถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือดสองรูปแบบ คือ ขนาด 200 และ 74 กิโลดาลตันจากนั้นโพลีเปปไทด์ขนาด 200 กิโลดาลตันจะถูกประมวลผลเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 104 และ 83 กิโลดาลตันหรือนำเข้าสู่เซลล์ไข่โดยตรง ในโอโอไซต์โปรตีนขนาด 104 กิโลดาลตันจะถูกแยกออกเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 58 และ 45 กิโลดาลตันในขณะที่โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตันจะได้รับการดัดแปลงเล็กน้อยหรือยังคงไม่เปลี่ยนแปลง [14]จากงานวิจัยพบว่า โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ในกุ้งที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในกุ้งไม่ถูกตัดตาได้รับอาหารเม็ดปกติ และ ในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10และ 50mg/kg ของอาหาร จะพบโปรตีนเป็นแถบจางๆ ในกุ้งที่ถูกตัดตา 1ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติ และในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500mg/kg ของอาหารแถบโปรตีนชัดขึ้น และชัดเจนที่สุดในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100mg/kg ของอาหารการที่กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100mg/kg ของอาหาร มีการผลิตโปรตีนสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500mg/kg ของอาหาร อาจเป็นเพราะในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100mg/kg ของอาหาร ยังคงมีการส่งโปรตีนจากเลือดไปสู่รังไข่ สังเกตุได้จากในเลือดพบแถบโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตันค่อนข้างชัดเจน แต่ไม่พบในเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500mg/kg ของอาหาร ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ไม่พบโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ในกุ้งไม่ถูกตัดตาได้รับอาหารเม็ดปกติ และ ในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร ในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100mg/kg ของอาหารจะเห็นแถบโปรตีนจางๆและชัดเจนขึ้นในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50mg/kg ของอาหารแต่ก็ยังไม่ชัดเจนเท่ากุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100mg/kg ของอาหารที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน เนื่องจากโครงสร้างของฮอร์โมน17เบต้า-เอสตราไดออลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนไวเทลลินในระยะสั้นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนินในรังไข่ระยะต่างๆ ในกุ้งกุลาดำโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอทพบแถบโปรตีนที่ 104 และ 74 กิโลดาลตันในรังไข่แต่ไม่พบโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ในตับ/ตับอ่อน ซึ่งจากการทดลองมีแนวโน้มที่มีทิศทางเดียวกับงานวิจัย[15] ที่พบแถบโปรตีนที่ 74 กิโลดาลตันในเลือดและรังไข่มากกว่าในตับ/ตับอ่อน ฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจนจะไปกระตุ้นตับ/ตับอ่อนให้สร้างไวเทลโลจีนินแล้วส่งผ่านเลือดไปเก็บสะสมในรังไข่และทำให้รังไข่สร้างเอสโตรเจนเพื่อกระตุ้นให้ไข่สุก เกิดความสมบูรณ์ของโอโอไซต์ (Oocyte maturation)และเกิดการวางไข่ของแม่กุ้ง [16] อาจเป็นสาเหตุให้ไม่พบแถบโปรตีนไวเทลลินขนาด 74 กิโลดาลตัน ในตับ/ตับอ่อนจากการวิจัยนี้ เมื่อดู

จากปริมาณโปรตีนในรังไข่ ค่าดัชนีรังไข่ และรูปแบบโปรตีนไวเทลลินในรังไข่และเลือด สามารถสรุปได้ว่าอาหารเม็ดผสมฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 100 mg/kg ของอาหาร สามารถใช้แทนการตัดการตัดตากุ้งได้ แต่ยังไม่สามารถทำให้กุ้งกุลาดำมีการพัฒนารังไข่จนถึงระยะวางไข่ได้ ดังนั้น การใช้อาหารเม็ดผสมฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 100 mg/kg ของอาหารร่วมกับอาหารสดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น แม่เพรียงทราย หมึกสด และหอยสด อาจเป็นทางเลือกที่ช่วยให้กุ้งกุลาดำมีการพัฒนารังไข่ที่สมบูรณ์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้คณะเทคโนโลยีทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

เอกสารอ้างอิง

1. สุทธสินี สนธิรัตน. 2560. *สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ในช่วง 3 เดือนแรก ปี 2561 กลุ่มเศรษฐกิจการประมงกองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง*. กรุงเทพมหานคร: กรมประมง.
2. รชนิมุขหิรัญสัจจาเลิศ. 2556. กระบวนการสร้างไข่แดงของกุ้งกุลาดำ.*แก่นเกษตร*. 41(2): 286-287.
3. 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. *Penaeusvannamei Invertebrate Reproduction and Development.* 42(2): 137-143.
4. Wang, Y. S. and Lou, S. W. 2006. Structural and expression analysis of hepatic vitellogenin gene during ovarian maturation in Anguilla japonica. *Steroid BiochemMol Biol*. 100*:* 193-201.
5. ธนิษฐา ทรรพนันทน์ใจดี และ อมรศักดิ์สวัสดี. 2550. *คู่มือชีววิทยาประมงภาคปฏิบัติ.* กรุงเทพมหานคร: มิสเตอร์ก๊อปปี้ (ประเทศไทย) จำกัด.
6. Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistr.* 72: 248-254.
7. อรัญญา คงแก้ว และ ประภาพร อุทารพันธุ์. 2557. ผลการฉีดเชื้อ Vibrioharveyiต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วย. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*.6(2): 1-11.
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. *Nature.* 227(5259): 680-685.
9. Towbin, H., Starhelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

National Academy of Sciences. 76: 4350-4354.

10. อภินันท์ อุดมกิจ. 2555. *การโคลนและศึกษาหน้าที่ของ gonad-inhibiting hormone ในกุ้งกุลาดำ การโคลนและศึกษาหน้าที่ของ gonad-inhibiting hormone ในกุ้งกุลาดำ*. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
11. รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ ธนัช เลิศพัฒนาไพบูรณ์ และ พัชธีราพร ทิพยพชรโรจน์. 2556. การพัฒนาอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-estradiol เพื่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ (Penaeusmonodon) ในโรงเรือน. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*. 7(2): 14-26.
12. นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. 2550. *ชีววิทยาของครัสเตเชียน*. กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์ บางกอกน้อย.
13. สุนิสา ปู่มาก. 2558. *ผลของอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-estradiolต่อระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (Penaeusmonodon) ที่เลี้ยงจากบ่อดิน*. วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
14. Longyant, S., Sithigorngul, p., Thammapalerd, N., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2000. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn*Penaeusmonodon* using monoclonal anti bodies specific to vitellin subunits. *Invertebrate Reproduction and Development*. 37(3): 211-221.
15. 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 Penaeusmonodon. *Aquaculture*. 412*:* 193-201.
16. นพคุณภักดีณรงค์. 2555. ฮอร์โมนเอสโตรเจนบทบาทในงานวิจัยกุ้ง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 14(2): 45-54.