

ใบรับรองปัญหาพิเศษ  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลชนิด  
*Scylla paramamosain* เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ โดยใช้ Colorimetric technique และ  
Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Studies on change in blood protein level and composition of female *Scylla*  
*paramamosain* at different ovarian developmental stages by Colorimetric technique and  
Polyacrylamide Gel Electrophoresis technique

ชื่อนักศึกษา นางสาวกุสุมา นามกุล

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. อนัญญา เจริญพรนิพัทธ์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.อรวรรณ สัตยาลัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

( ดร. อนัญญา เจริญพรนิพัทธ์ )

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

( ผศ.ดร.อรวรรณ สัตยาลัย )

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

( รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ )

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 7 เดือน พ.ค. พ.ศ. 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ปัญหาพิเศษ

## เรื่อง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลชนิด  
*Scylla paramamosain* เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ โดยใช้ Colorimetric technique  
และ Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Studies on change in blood protein level and composition of female *Scylla*  
*paramamosain* at different ovarian developmental stages by Colorimetric technique and  
Polyacrylamide Gel Electrophoresis technique



T099285

โดย

นางสาวกุสุมา นามกุล

217.  
ก 732 ก  
2549

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 99285  
วัน,เดือน,ปี.....

b. 11884277  
i. ....

สาขาวิชาสัตสตร์การประมง  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

### เรื่อง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลชนิด *Scylla paramamosain* เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่าง ๆ โดยใช้ Colorimetric technique และ Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Studies on change in blood protein level and composition of female *Scylla paramamosain* at different ovarian developmental stages by Colorimetric technique and Polyacrylamide Gel Electrophoresis technique

ในการแยกกระยะการเจริญของรังไข่ในปูทะเล *Scylla paramamosain* เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆเพื่อให้สามารถจัดการพ่อแม่พันธุ์ในฟาร์มเพาะเลี้ยงได้อย่างเหมาะสมเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก ในช่วงที่ผ่านมาผู้เสนอให้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสีของเลือดเพื่อใช้ประเมินระยะของรังไข่แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังไม่ได้มีการทดสอบถึงความแม่นยำหรืออาจมีความไม่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ แต่ค่าการหักเหแสงในเลือดของปูมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นดัชนีวัดการเจริญของรังไข่ได้ ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงต้องการยืนยันว่าค่าการหักเหแสงในเลือดของปูทะเลเป็นค่าที่เหมาะสมและสะท้อนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของปูได้ จึงทำการวัดค่าการหักเหแสงในเลือดของปูทะเลเพศเมียเปรียบเทียบกับเลือดในปูเพศผู้ และนำเลือดมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Colorimetric ของ Bradford และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดโดยใช้เทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) และ SDS-PAGE ผลการศึกษาพบว่าปริมาณโปรตีนในเลือดเพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับตามระยะการเจริญของรังไข่และมีความสอดคล้องกับค่าการหักเหแสงของเลือด เมื่อศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดพบว่าแถบโปรตีนที่พบเฉพาะในเพศเมียมีความเข้มและหนาขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ และในเพศผู้มีรูปแบบของแถบโปรตีนในเลือดคล้ายกับปูเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะที่หนึ่ง จากผลการทดลองยืนยันได้ว่าปริมาณโปรตีนในเลือดเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ ดังนั้นค่าการหักเหแสงในเลือดปูทะเลจึงมีความเหมาะสมในการใช้จำแนกระยะการเจริญของรังไข่ในปูเพศเมีย เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดและที่สำคัญยังเป็นวิธีที่สามารถจำแนกระยะของรังไข่ได้โดยที่แม่พันธุ์ปูทะเลสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตามปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนิยม

การจัดทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากผู้ที่เกี่ยวข้องหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อรรวรรณ สัตยาลัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำและให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี รวมถึงการแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำกาทดลอง ขอขอบพระคุณ ดร.อนัญญา เจริญพรนิพัทธ์ ที่ได้คำแนะนำตลอดการทำปัญหาพิเศษ ขอขอบคุณ คุณสิทธิพล อินทรพัฒน์ และคุณกฤษฎา คราวุฒิพูนพันธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือด้วยดีตลอดการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่าน รวมถึงขอบคุณเพื่อนทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือจนการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สำเร็จลงได้ และสุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาของข้าพเจ้าที่ได้ให้สิ่งดีๆในชีวิต ขอขอบพระคุณค่ะ

นางสาวกฤษมา นามกุล

เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
อนุกรมวิธาน	3
ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล	3
องค์ประกอบในเลือด (haemolymph) ของสัตว์ในกลุ่ม crustacean	8
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	17
สรุปผลการทดลอง	25
ข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	29



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะ ขนาด และสี ของไขปูทะเลในระยะเวลาต่าง ๆ	6
2	แสดงค่า ดัชนีรังไข่(GSI), ค่าหักเหแสง และ ปริมาณโปรตีน ในเลือดปูทะเล <i>S.paramamosain</i> เพศเมียระยะต่างๆและปูเพศผู้	21
ตารางผนวกที่		
1	การเตรียมสารสำหรับ standard curve	34
2	ค่าดัชนีวัดการเจริญของรังไข่ (GSI) ในระยะต่างๆของปูทะเล <i>Scylla paramamosain</i>	37
3	ค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเล <i>Scylla paramamosain</i>	38
4	ค่าปริมาณโปรตีนในเลือดปูทะเล <i>Scylla paramamosain</i> (mg/ml)	39
5	สรุปค่าหักเหแสงที่วัดได้ในเลือดปู <i>Scylla paramamosain</i> ที่มีรังไข่เจริญ ในระยะเวลาต่างๆ	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของจับปิ้งของปูทะเลเพศผู้	4
2	ลักษณะของจับปิ้งของปูทะเลเพศเมีย	5
3	ปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะเวลาต่างๆ	7
4	ค่า GSI ในปู <i>S.paramamosain</i> เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะเวลา 1,2,3,4	17
5	เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่า GSI และ Protein content	18
6	ค่าการหักเหแสง (Refractive index) ในปูทะเล เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะเวลาต่างๆ และเลือดของเพศผู้	19
7	เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่า GSI และค่าการหักเหแสงในเลือด (Refractive index) ของปูทะเล <i>S.paramamosain</i>	19
8	ค่า total protein content ในเลือดปูทะเล <i>S.paramamosain</i> เพศเมีย และเพศผู้	20
9	แสดงค่า GSI, ค่าการหักเหแสง (refractive index) และ ปริมาณโปรตีน (total protein content) ของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะเวลาต่างๆ	21
10	ลักษณะของแถบที่เกิดจากการศึกษาด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ของเลือดปูทะเล <i>Scylla paramamosain</i> (1 µg/lane)	22
11	ลักษณะของแถบที่เกิดจากการศึกษาด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ของเลือดปูทะเล <i>Scylla paramamosian</i> (1 µg/lane)	23
12	ลักษณะของแถบที่เกิดจากการย้อมเจดด้วย Periodic acid schiff (PAS)	24
ภาพผนวกที่		
1	แสดงระยะของค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเลในแต่ละระยะการเจริญของรังไข่ในเพศเมีย และในเลือดเพศผู้	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนำ

ปูทะเลเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมบริโภคมากขึ้นทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Scylla* spp. และชื่อสามัญคือ mud crab อยู่อาศัยตามป่าชายเลน โดยปูทะเลในสกุล *Scylla* พบทั่วโลกประมาณ 5 ชนิด แต่ที่พบในประเทศไทยมี 4 ชนิด คือ *S.serrata*, *S.olivacea*, *S.paramamosain* และ *S.tranqueberica* เนื่องจากความต้องการบริโภคมากขึ้นจึงส่งผลให้ปริมาณปูทะเลในธรรมชาติลดลงจากการจับ เพื่อสนองต่อความต้องการที่เพิ่มสูงขึ้น ในปัจจุบันจึงเริ่มมีการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงปูทะเลแต่เนื่องจากธุรกิจนี้ยังไม่ได้รับการพัฒนาในด้านการจัดการพ่อแม่พันธุ์เพื่อให้ได้มาซึ่งลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพซึ่งเป็นเรื่องที่สำคัญ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้การเพาะเลี้ยงปูทะเลประสบความสำเร็จทั้งในด้านธุรกิจและในด้านความยั่งยืนของปูทะเลชนิดต่างๆในธรรมชาติ

ในการจัดการพ่อแม่พันธุ์ของปูทะเลเพื่อแยกระยะการเจริญของรังไข่เป็นเรื่องที่ทำได้ยาก เนื่องจากไม่สามารถเปิดกระดองเพื่อดูระยะของรังไข่ได้โดยที่ปูไม่ตาย โดยในช่วงที่ผ่านมาได้มีผู้ศึกษาที่จะนำสีของเลือดปูทะเล และค่า FMI มาใช้เป็นตัวชี้ประเมินระยะการเจริญของรังไข่ แต่พบว่าวิธีดังกล่าวไม่สามารถนำมาใช้ได้จริง ดังนั้นสิ่งที่ทำได้ในการแยกระยะของรังไข่ คือการวัดค่าการหักเหแสงในเลือด (refractive index) ซึ่งก็ยังไม่มีการยืนยันแน่ชัดว่าจะสามารถแยกการพัฒนาของรังไข่ได้ เพื่อเป็นการยืนยันจึงได้ทำการหาปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่พัฒนาในระยะต่างๆเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดและนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเลือดของปูทะเลเพศผู้ โดยสมมติฐานของการศึกษาในครั้งนี้คือ ปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญมากขึ้น ในเลือดควรมีปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ จึงทำให้ค่าการหักเหแสงเพิ่มสูงขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่

ความรู้ที่ได้จากการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ถือเป็นรากฐานที่สำคัญที่จะนำไปใช้ในการจัดการกับพ่อแม่พันธุ์ปูทะเลสายพันธุ์ *S.paramamosain* หรือปูขาวซึ่งจะช่วยให้การเพาะขยายพันธุ์ปูทะเลชนิดนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยที่ไม่ต้องสูญเสียพ่อแม่พันธุ์จากการผ่าตัดเปิดกระดองเพื่อดูระยะการเจริญของรังไข่

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาค่าการหักเหแสงของเลือดปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้ค่าการหักเหแสงของเลือดปูเพศผู้เป็นกลุ่มควบคุม
2. เพื่อหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยมีเลือดของปูเพศผู้เป็นกลุ่มควบคุมโดยใช้วิธีของ Bradford (1976)
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปูทะเลชนิด *Scylla paramamosain* เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆเปรียบเทียบกับเลือดของปูทะเลเพศผู้ด้วยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) และ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
4. เพื่อนำข้อมูลจากปริมาณโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆมาประกอบเพื่อยืนยันความเหมาะสมในการใช้ค่าหักเหแสงเพื่อประเมินระยะการเจริญของรังไข่ในปูทะเลเมีย

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เกษตรกรหรือผู้ที่ต้องการจะเพาะขยายพันธุ์ปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla paramamosain* สามารถจะจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ในเพศเมียได้อย่างถูกต้องมากขึ้นจากการใช้ดัชนีค่าการหักเหแสงของเลือดปู โดยที่ไม่ต้องฆ่าแม่พันธุ์
2. การจัดการพ่อแม่พันธุ์สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การตรวจเอกสาร

### อนุกรมวิธานของปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla* spp.

ปูทะเลในสกุล *Scylla* มีชื่อสามัญคือ mud crab เนื่องจากมีถิ่นอาศัยอยู่ในป่าชายเลน Keenan et al.(1998) ได้จำแนกปูทะเลในสกุล *Scylla* ออกเป็น 4 ชนิดตามพันธุกรรมและทางด้านสัณฐานวิทยา ได้แก่ *Scylla serrata* (Forsk., 1775), *Scylla tranquebaricus* (Fabricius, 1798), *Scylla paramamosain* (Estampador, 1949) และ *Scylla olivacea* (Herbst, 1796) แต่ที่พบได้ทั่วโลกมี 5 ชนิดรวมกับ *Scylla oceanic* (Dana, 1852) (ประดิษฐ์, 2546) ปูทะเลมีลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom	Animal
Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Eumalacostraca
Superorder	Eucarida
Order	Decapoda
Suborder	Plecyemata
Infraorder	Brachyura
Section	Brachyrhyncha
Superfamily	Portunoidea
Family	Portunidae
Genus	<i>Scylla</i>
Species	<i>serrata</i> , <i>tranquebarica</i> <i>Olivacea</i> , <i>oceanica</i> , <i>paramamosain</i>

### ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล

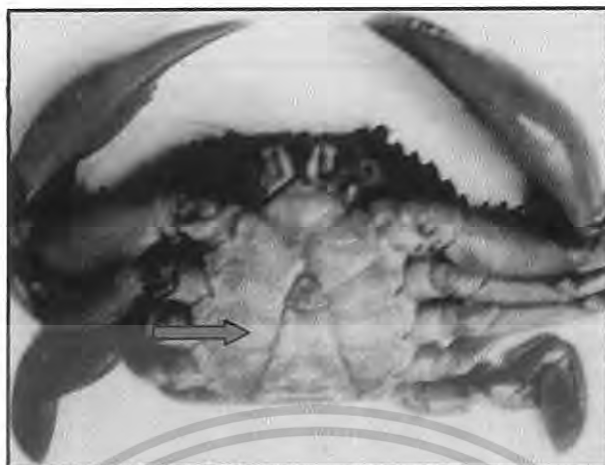
#### 1. ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเล

##### 1.1 ปูทะเลเพศผู้

ลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) ปูทะเลเพศผู้มีจับปิ้งเรียวยาวเล็กเป็นรูปสามเหลี่ยม เมื่อเปิดจับปิ้งจะพบอวัยวะเพศเรียกว่า gonopod หรือ penis เปลี่ยนมาจากกรยางค์ว่ายน้ำ (pleopod) โดยในเพศผู้อวัยวะส่วนนี้มีเพียง 2 คู่ รูปร่างยาวตรงปลายเรียวยาวเล็ก ทำหน้าที่เป็นอวัยวะนำถุงบรรจุตัวอสุจิ (spermatophore) ให้กับปูทะเลเพศเมีย ลักษณะของก้ามหนีบ (chela) มีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่กว่าเพศเมียมีไว้เพื่อป้องกันตัว, จับเหยื่อและจับปูเพศเมียในขณะที่มีการผสมพันธุ์ (ชลธิ์, 2539)



ภาพที่ 1 ลักษณะของจับปิ้งของปูทะเลเพศผู้

### 1.2 ปูทะเลเพศเมีย

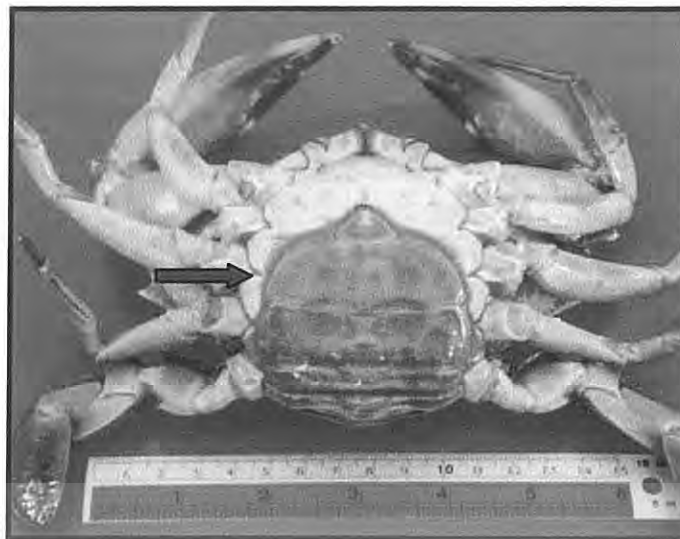
ลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) ขยายกว้างออกจนเกือบเต็มปิดด้านท้องของทรงอก มีรยางค์ขาวายน้ำ 4 คู่ เปลี่ยนไปเป็นที่สำหรับให้ไข่ยึดเกาะหลังจากไข่ได้ถูกปล่อยออกมา ภายนอก เป็นระยะที่ไข่ได้รับการผสมเจริญเป็นเอมบริโอ ลักษณะของกำหนับ (chela) ของเพศเมียจะมีขนาดเล็กกว่าเพศผู้ทำหน้าที่ป้องกันตัว และจับเหยื่อ (ชลธิ์, 2539) และจับปิ้งของเพศเมียจะเปลี่ยนแปลงลักษณะ ขนาด และสีทุกครั้งเมื่อปูลอกคราบ ดังนั้นลักษณะของขนาด และสีของจับปิ้งสามารถใช้เป็นตัวกำหนดความสมบูรณ์เพศของปูทะเลเพศเมียได้ ดังนี้ (บรรจงและบุญรัตน์, 2545)

1.2.1 ความสมบูรณ์เพศขั้นที่ 1 ระยะนี้จับปิ้งมีรูปร่างแคบ เรียวยาว ในขั้นนี้ปูทะเลลอกคราบหลายครั้ง ทุกครั้งรูปร่างและลักษณะของจับปิ้งจะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย ส่วนกว้างขยายออก

1.2.2 ความสมบูรณ์เพศขั้นที่ 2 ระยะนี้ขนาดของจับปิ้งใหญ่ขึ้น แต่ยังไม่เต็มส่วนอก ขอบของจับปิ้งมีลักษณะโค้งออก มีขนสั้นๆ สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ส่วนท้องมีสีคล้ำกว่าปูทะเลเพศเมียขั้นที่ 1 ชาวประมงเรียกปูระยะนี้ว่าปูกระเทย เพราะจับปิ้งมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างปูทะเลเพศผู้และปูทะเลเพศเมีย

1.2.3 ความสมบูรณ์เพศขั้นที่ 3 ระยะนี้ขอบของจับปิ้งจะโค้งออกคล้ายวงกลมคลุมเต็มส่วนอก ที่ขอบมีขนยาวโดยรอบ เป็นระยะของปูทะเลที่รังไข่พัฒนาอยู่ระหว่างขั้นที่ 3 และขั้นที่ 4 เป็นระยะที่ปูทะเลเพศเมียเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ หากได้รับการผสมพันธุ์กับปูทะเลเพศผู้ ไข่จะเจริญอยู่ในรังไข่ เรียกว่า ปูไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ลักษณะของจับปิ้งของปูทะเลเพศเมีย

### 2. การจับคู่และการผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์ของปูทะเลเป็นการผสมพันธุ์ภายใน (internal fertilization) ปูทะเลเพศเมียพร้อมผสมพันธุ์ เมื่อมีความสมบูรณ์เพศในชั้นที่ 3 หรือปลายชั้นที่ 2 ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ปูทะเลเพศเมียจะมีพฤติกรรมก้าวร้าว และจะปล่อยฟีโรโมน (pheromone) เพื่อกระตุ้นปูทะเลเพศผู้ให้ไล่ตาม เมื่อได้จับหวั่นปูเพศผู้จะขึ้นคร่อมและใช้ปลายขาเดินคู่ที่ 2 – 4 พยุงปูทะเลเพศเมียไว้ข้างล่าง ช่วงนี้ในเวลากลางวันปูทะเลเพศผู้จะเกาะและพาปูทะเลเพศเมียไปด้วยตลอดเวลา และจะแยกจากกันในตอนเย็นใกล้ค่ำ จะเป็นอยู่ในลักษณะนี้นาน 3 – 4 วัน จนกระทั่งปูทะเลเพศเมียลอกคราบ ขณะที่กระดองยังมีปูทะเลเพศผู้จะจับปูทะเลเพศเมียหางย้อย แล้วสอดอวัยวะเพศ (gonopod) เข้าไปในรูเปิด (gonopore) ของปูทะเลเพศเมีย เมื่อได้จับหวั่นปูทะเลเพศผู้จึงปล่อย spermatophore ไปเก็บไว้ใน sperm receptacle ของปูทะเลเพศเมีย ขั้นตอนการผสมพันธุ์ช่วงนี้ใช้เวลาประมาณ 12 – 15 ชั่วโมง น้ำเชื้อของปูทะเลเพศผู้สามารถมีชีวิตได้นานประมาณ 3 – 4 เดือน ส่วนปูทะเลเพศเมียเมื่อได้รับน้ำเชื้อแล้วจะกลับตัวอยู่ในท่าปกติ จากนั้นปูทะเลเพศผู้จะเกาะหลังปูทะเลเพศเมียอีก 2 – 3 วัน จึงแยกตัวออก ปูทะเลเพศเมียหลังจากได้รับน้ำเชื้อก็จะเริ่มสร้างไข่ (บรรจงและบุญรัตน์, 2545)

### 3. การเจริญของรังไข่

ในปูทะเลเพศเมียเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์และมีความสมบูรณ์ทางเพศ รังไข่จะเจริญและเปลี่ยนแปลงอย่างมาก รังไข่ของปูทะเลที่มีอายุยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์รังไข่จะมีลักษณะเป็นเส้นยาวและใสไม่มีสี แต่เมื่อถึงวัยที่พร้อมจะผสมพันธุ์รังไข่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าจากการผ่าตัดเปิดกระดอง เนื่องจากรังไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสัณฐานรวมทั้งสีและขนาดเมื่อเริ่มมีความสมบูรณ์ทางเพศ โดยเริ่มเปลี่ยนจากที่ไม่มีสี กลายเป็นสีขาวขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีเหลืองส้ม และสีส้มแดงตามลำดับ (ดวงใจ, 2543) จากการศึกษาของ Quinn and Kojis (1987) แบ่งการเจริญของรังไข่ของปูทะเลได้ 5 ระยะ ดังนี้

- ระยะที่ 1 รังไข่มีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นเส้นบางใส
- ระยะที่ 2 รังไข่มีขนาดเล็ก สีขาวขุ่นหลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน
- ระยะที่ 3 รังไข่ขยายขนาด มีรอยหยัก และมีสีเหลืองอ่อน
- ระยะที่ 4 รังไข่ขยายใหญ่มากขึ้น มีรอยหยักมากขึ้น มีสีเหลืองส้มปกคลุมประมาณ 1/2 ถึง 3/4 ส่วนของ hepatopancreas
- ระยะที่ 5 รังไข่เจริญเต็มที่ ขยายขนาดเกือบเต็มกระดอง มีสีส้มหรือส้มแดง ปกคลุมส่วนของ hepatopancreas เกือบหมด

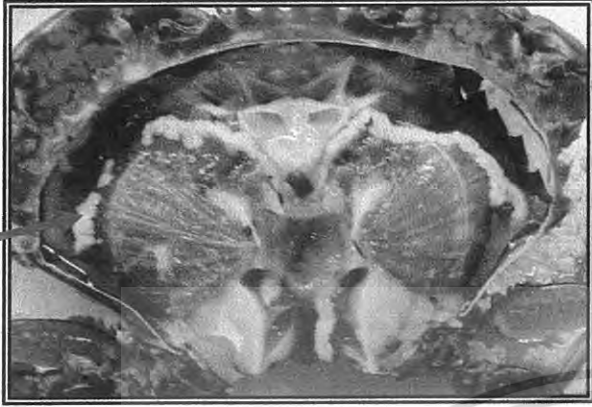
สุรชาติและลินธุวัฒน์ (2538) แบ่งระยะการเจริญของรังไข่เป็น 4 ระยะ ดังนี้

ตารางที่ 1 ลักษณะ ขนาด และสี ของไข่ปูทะเลในระยะต่าง ๆ

ระยะ	ลักษณะ	ขนาดและสี
ระยะที่ 1	เป็นเส้นยาวแบน 2 เส้นแทรกตัวอยู่ในช่องว่างภายในลำตัว ตามขอบกระดองด้านหน้า บน digestive gland	ขนาดเล็กมาก ประมาณ 1-2 % ของช่องว่างภายในลำตัว สีขาว โปร่งใส
ระยะที่ 2	เส้นแบนขอบมีรอยหยักแทรกตัวติดอยู่กับ sterno carapace บน digestive gland	ขนาดขยายใหญ่ขึ้น ประมาณ 10-20% ของช่องว่างภายในลำตัว สีครีม สีขาวนวล
ระยะที่ 3	รังไข่เริ่มขยายตัว ขดไปมาตามลักษณะของช่องว่างภายในลำตัว ไข่ยังไม่แยกเป็นเม็ดเห็นชัดเจน	ขนาดขยายประมาณ 20-75% ของช่องว่างภายในลำตัว สีส้มเหลือง เหลืองอ่อน หรือ ส้ม
ระยะที่ 4	ไข่สมบูรณ์เต็มที่ อัดแน่นในช่องว่างภายในลำตัว ผิวมันวาว มองจากด้านบนรูปร่างคล้ายสมอเรือ ไข่แยกเป็นเม็ด เห็นอย่างชัดเจน	ขยายเต็มช่องว่างภายในลำตัว ถ้าเป็นปูดำ <i>Scylla olivacea</i> ไข่ในระยะนี้จะมีสีส้มเหลืองถึงส้มแดง ถ้าเป็นปูขาว <i>Scylla paramamosain</i> รังไข่จะมีสีเหลืองอ่อน

ที่มา :สุรชาติและลินธุวัฒน์,2538

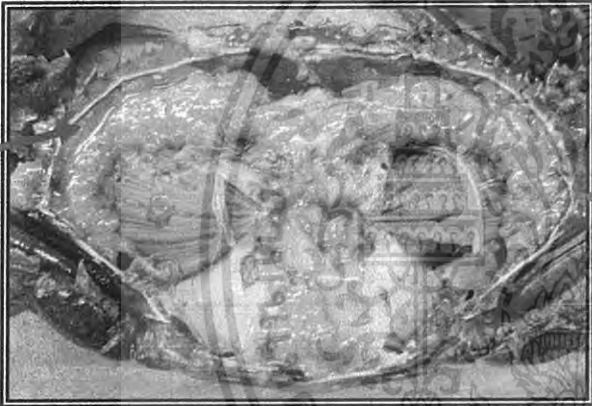
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ปฐะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 1



ปฐะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 2



ปฐะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 3



ปฐะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 4

ภาพที่ 3 ปฐะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ

บรรจงและบุญรัตน์ (2545) กล่าวว่า การเจริญรังไข่ของปูเพศเมียนั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมน 2 ชนิด คือ ฮอร์โมนควบคุมการเจริญของรังไข่ (Gonad inhibiting hormone :GHI) และฮอร์โมนกระตุ้นให้ไข่เจริญ (Gonad stimulating hormone:GSH) ฮอร์โมน GIH เป็นฮอร์โมนที่ประสาทส่วนกลาง(Neurosecretory cell) เป็นผู้ผลิตและส่งเข้าระบบเลือด ส่วนฮอร์โมน GSH นั้น Y-organ เป็นผู้ผลิตและจะเริ่มผลิตก็ต่อเมื่อระดับฮอร์โมน GIH ในเลือดต่ำกว่าฮอร์โมน GSH ซึ่งสัมพันธ์กับระยะการลอกคราบของปู โดยก่อนลอกคราบ (Proecdysis stage) หรือใน ระยะที่ปูเปลือกแข็งปลាយๆ ระดับของฮอร์โมน GIH ในเลือดจะเริ่มลดน้อยลง Y-organ จะถูกกระตุ้นให้ผลิต GSH เข้าในระบบเลือดเพื่อกระตุ้นการเจริญของรังไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hasegawa *et al.*, (1993) ที่ทำการศึกษารังไข่ที่ควบคุมการสืบพันธุ์ของสัตว์ในกลุ่ม ครัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาเขียน พบว่า แอมฟิพอด *Orchestia gammarella* ระบบสืบพันธุ์ทั้งของเพศผู้และเพศเมียถูกควบคุมด้วย Neurohormone ที่มาจากสมอง

### องค์ประกอบในเลือด(haemolymph) ของสัตว์ในกลุ่ม crustacean

องค์ประกอบของเลือดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ส่วนประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic components) และสารอินทรีย์ (organic components) (ประจวบ หล้าอุบล, 2537) ดังนี้

#### 1. ส่วนประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic components)

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ในเลือดของสัตว์กลุ่ม crustacea ที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดและน้ำเค็มในสารที่มีเหมือนกัน เช่น แคลเซียม จะพบว่า ในเลือดของ crustacea ที่อาศัยอยู่ในทะเลจะมีน้อยกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด แมกนีเซียมในเลือดของ crustacea ที่อาศัยอยู่ในทะเลจะมีมากกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด และโซเดียมในเลือดของ crustacea ที่อาศัยอยู่ในทะเลส่วนมากจะมีมากกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด (ประจวบ หล้าอุบล, 2537)

Chen and Chia (1997) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ในเลือด กับขนาดและช่วงการลอกคราบ ของปูทะเล *Scylla serrata* เพศเมีย ที่มีขนาดกระดอง  $101.1 \pm 2.7$  mm. และเพศผู้ที่มีขนาดกระดอง  $109.7 \pm 1.9$  mm. จากการศึกษาพบว่า ระดับ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ในเลือด ของปูเพศผู้มีสูงกว่าในเพศเมีย และระดับ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ในเลือดจะสูงขึ้นเมื่อปูทะเลมีขนาดใหญ่มากขึ้น และในช่วงก่อนการลอกคราบพบว่าระดับ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ในเลือดมีความเข้มข้นสูง และความเข้มข้นจะลดลงต่ำสุดหลังจากปูลอกคราบแล้ว

#### 2. ส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ (organic components)

สารอินทรีย์ที่ประกอบอยู่ในเลือดของสัตว์กลุ่ม crustacean ได้แก่ น้ำตาล ไขมัน และโปรตีน (ประจวบ หล้าอุบล, 2537)

##### 2.1 องค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของสัตว์กลุ่ม Crustacean

###### 2.1.1 Haemocyanin

Haemocyanin เป็นสารที่ประกอบในระบบการหายใจ ซึ่งมีประมาณ 60-93% และ 64-84 % ของโปรตีนทั้งหมดใน haemolymph ในปูทะเล (Chen and Chia, 1997) Yoganandhan (2003) พบว่า ใน haemolymph ของ crustacean พบ haemocyanin ประมาณ 80-95% จากโปรตีนทั้งหมด

Roberto *et al.* (2002) พบว่า haemocyanin เป็นโปรตีนที่มี copper (Cu) เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นตัวที่ขนส่งออกซิเจนและเก็บออกซิเจนใน mollusca และ arthropod บางเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด นอกจากนั้น Sellos *et al.* (1997) พบว่า haemocyanin ประกอบด้วยกรดอะมิโน 600-660 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล  $4.5 \times 10^5$  Da (Dalton) ซึ่งจะพบในกลุ่ม primitive crustacean เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Penaeus setiferus* หรือ *Penaeus monodon* และนอกจากนี้หน้าที่อันดับแรก ของ haemocyanin คือ เป็นตัวขนส่งออกซิเจน และ ยังเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลายอย่างเกี่ยวกับกระบวนการทางสรีระวิทยาด้วย เช่น กระบวนการ osmoregulation และกิจกรรมของ enzyme Zhang *et al.* (2004) พบว่าใน haemolymph กุ้งจะพบโปรตีน 2 ตัว ตรวจสอบพบแถบที่มีมวลโมเลกุล 73 และ 75 kDa (Kilo Dalton) ด้วยเทคนิค SDS- PAGE

Alpuche *et al.* (2005) กล่าวว่า haemocyanin เป็นโปรตีนกลุ่มใหญ่ใน haemolymph ของ crustacean ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลายอย่าง หน้าที่หลักๆในการขนส่งออกซิเจน นอกจากนั้น hemocyanin ยังสามารถเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ phenoloxidase โดย reagent บางตัว ที่ประกอบด้วย perchlorate , trypsin และ sodium dodecyl sulfate (SDS) ทำหน้าที่ในการ กระตุ้นการแข็งตัวของเลือด และป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย haemocyanin ยังมีหน้าที่หลักในการทดแทนกลไกในการต้านทานจากความเครียด โดยการเพิ่มสารตัวกลางในกระบวนการหายใจ

Yoganandhan *et al.* (2003) พบว่าปริมาณของ haemocyanin ใน haemolymph หากมีความเข้มข้นของ haemocyanin มากพอก็จะลดการจำลองตัวเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replication) ทำให้เชื้อไวรัสไม่เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนส่งผลต่อสัตว์น้ำและทำให้เชื้อไวรัสหมด แต่ถ้ามีความเข้มข้นของ haemocyanin ไม่มากพอก็จะทำให้กุ้งที่ติดเชื้อตายได้ ถ้ามีความเข้มข้นของ haemocyanin อยู่ในระดับต่ำก็จะทำให้ปริมาณของออกซิเจนในเลือดลดลงตามลำดับ เนื่องจาก Cu ที่ประกอบอยู่ใน haemocyanin เป็นตัวจับและขนส่งออกซิเจนไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย ถ้ามีน้อย Cu ก็ส่งผลต่อสัตว์น้ำโดยทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ เครียด และมีภูมิคุ้มกันโรคต่ำ นอกจากนั้น haemocyanin ยังทำให้การเพิ่มจำนวนของไวรัส ใน cell line ของปลา ไม่เหมาะสมจึงทำให้ปริมาณของไวรัสลดลง

### 2.1.2 Vitellogenin

Vitellogenin เกิดขึ้นในระยะ vitellogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่แดง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสารภายในนิวเคลียสออกสู่ไซโตพลาสซึม ระยะ vitellogenesis เป็นกระบวนการสำคัญซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของไข่ (Polylecithal egg) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย ซึ่งมีไข่ชนิดที่มีไข่แดงสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์จำนวนมาก (ดวงใจ ,2543)

กระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง หรือ ไวเทลโลเจนิซิส (vitellogenesis) เป็นกระบวนการที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของไข่ (oocyte) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย ซึ่งมีไข่ชนิดที่มีไข่แดงสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์จำนวนมาก (polylecithal egg) ไข่แดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย น้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเอ็มบริโอ ส่วนประกอบของไข่แดงจะแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิดโปรตีนหลักที่สะสมในระหว่างกระบวนการสะสมไข่แดงของไข่ที่กำลังเจริญ คือ ไวเทลลิน (vitellin) หรือ ลิโปไวเทลลิน (Lipovitelin) ไวเทลลินเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) จำนวนตั้งแต่ 2 -11 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 40-200 kDa ขึ้นอยู่กับชนิดของครัสตาเซียน จากรายงานการศึกษาในครัสตาเซียนชนิดที่รังไข่มีการเจริญจะตรวจพบโปรตีนในเลือดซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไวเทลลิน เรียกว่า ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) โดยจะพบเฉพาะในเลือดของเพศเมีย (female specific protein) ที่รังไข่กำลังมีการเจริญเท่านั้นไม่พบในเพศผู้และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่มีการเจริญ และจากการศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของครัสตาเซียนพบว่ามีทั้งชนิดที่สร้างภายในรังไข่เองและสร้างจากแหล่งอื่นนอกรังไข่ (heterosynthetic vitellogenesis) เช่น ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง (subepidermal adipose tissue) จะมีการสร้างออกมาในรูปของไวเทลโลเจนิน หลังจากนั้นปล่อยออกสู่กระแสเลือดและถูกนำเข้าสู่สะสมในรังไข่ที่กำลังมีการเจริญในรูปของ ไวเทลลิน หรือ ลิโปไวเทลลิน

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ในกลุ่ม crustacean Quinitio *et al.* (1994) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ steroid hormone และปริมาณไวเทลโลเจนินระหว่างการเจริญของรังไข่ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยวัดฮอร์โมนในเลือดรังไข่ และตับ - ตับอ่อน โดยวิธี radioimmunoassay (RIA) และ วัดไวเทลโลเจนินในเลือด โดยวิธี single radial immunodiffusion ซึ่งใช้ระยะเวลาการเจริญของรังไข่เป็นหลักโดยได้แบ่งการเจริญของรังไข่ออกเป็น 6 ระยะ พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดสามารถวัดได้ในระยะเวลาการเจริญของรังไข่ระยะที่ 3 (0.441 mg/ml) และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในระยะที่ 4 (2.640 mg/ml) และ ระยะที่ 5 (6.973 mg/ml) จากนั้นลดลงมีค่าเท่ากับ 2.546 mg/ml หลังจากที่ถูกวางไข่

Chang and Shih (1995) ศึกษาปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดระหว่างการเจริญของรังไข่ของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* โดยเทคนิค ELISA ซึ่งได้แบ่งระยะเวลาการเจริญของรังไข่ออกเป็น 5 ระยะ พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินเริ่มวัดได้ตั้งแต่ระยะที่ 1 (1.82 mg/ml) และเพิ่มขึ้นในระยะที่ 2 (2.12 mg/ml) หลังจากนั้นมียุคคงที่อยู่ในระดับนี้จนถึงระยะที่ 4 (ระยะที่ 3 มีค่าเท่ากับ 2.05 mg/ml; ระยะที่ 4 มีค่าเท่ากับ 2.48 mg/ml) และมีระดับลดลงในระยะก่อนกุ้งวางไข่หรือกำลังวางไข่ (ระยะที่ 5 มีค่าเท่ากับ 1.42 mg/ml)

Tsutsui *et al.* (2000) ได้ติดตามแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินใน *Penaeus japonicus* โดยวิธี Northern blot และ *in situ* hybridization ด้วย mRNA ของไวเทลโลเจนินของกุ้งชนิดนี้ และได้แบ่งระยะเวลาการเจริญของรังไข่ตามค่าดัชนีรังไข่ (GSI) ดังนี้ GSI เท่ากับ 0.2-0.5 % เป็นระยะเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

previtellogenesis (ระยะที่ 1) , GSI เท่ากับ 1.2-3.7% เป็นระยะ early exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 2) , GSI เท่ากับ 4.4-7.2 % เป็นระยะ late exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 3) และ GSI เท่ากับ 7.7-8.9 % เป็นระยะ late exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 4) พบ mRNA ที่ code ไวเทลโลเจนินทั้งในเซลล์ฟอลลิเคิล และเซลล์ของตับ-ตับอ่อนของกุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะที่มีการสร้างและสะสมไวเทลลิน (vitellogenic female) และระดับของ mRNA ที่พบในรังไข่มีค่าสูงที่สุดในระยะที่ 2 และลดลงอย่างรวดเร็วในระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ในขณะที่ในตับ-ตับอ่อนปริมาณ mRNA มีค่าเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่ 2 จนกระทั่งถึงระยะที่ 3 และเริ่มลดลงในระยะที่ 4 แสดงว่ากุ้งชนิดนี้มีการสร้างไวเทลโลเจนินภายในรังไข่ก่อนที่จะมีการสร้างจากตับ-ตับอ่อน

### 2.1.3 Lipovitellin

lipovitellin หรือ vitellin เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) จำนวนตั้งแต่ 2 – 11 หน่วยย่อย เป็นโปรตีนที่สะสมในระหว่างกระบวนการสะสมไข่แดงของไข่ที่กำลังเจริญ โดยมีสารตั้งต้นเป็น vitellogenin ซึ่งจะพบในเลือดของเพศเมียที่รังไข่กำลังมีการเจริญเท่านั้น ไม่พบในเพศผู้และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่เจริญ (Kerr, 1969) และนอกจากนี้ Kerr (1969) ยังพบว่าแหล่งแหล่งที่สร้าง vitellogenin ของครีตตาเซียนมีทั้งที่สร้างภายในรังไข่ และสร้างจากแหล่งอื่นนอกรังไข่ เช่น ตับ ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันที่ใต้ผิวหนัง จะมีการสร้างออกมาในรูปของ vitellogenin หลังจากนั้นปล่อยออกสู่กระแสเลือด และถูกนำเข้าสู่สะสมในรังไข่ที่กำลังเจริญในรูปของ vitellin หรือ lipovitellin

Rani and Subramonian (1997) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของปูทะเล *Scylla serrata* ซึ่งเป็นการศึกษาแบบ *in vivo* โดยใช้  $^{14}\text{C}$  phenylalanine เป็นตัวติดตามการสร้างไลโปไวเทลลินในเนื้อเยื่อรังไข่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง เนื้อเยื่อตับ- ตับอ่อน และเลือด โดยเก็บเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆมาตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ trichloroacetic acid จากนั้นนำโปรตีนไปแยกใน 3-MM Whatman chromatography paper disc (filter-paper disc method) และตรวจวัด isotope บนกระดาษโดย Liquid Scintillation Counter พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน สามารถสร้างไวเทลโลเจนินได้โดยขณะที่รังไข่มีการเจริญอยู่ในระยะที่ 1 พบว่าเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และ เนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน มีการสร้างไวเทลโลเจนินในระดับที่สูงกว่าในรังไข่ ในการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 2 ระดับของ  $^{14}\text{C}$  phenylalanine ในรังไข่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ในขณะที่ในเลือดมีระดับ  $^{14}\text{C}$  phenylalanine ลดลง ดังนั้นจึงสรุปว่าเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และ เนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน มีบทบาทในการสร้างและส่งมาตามกระแสเลือดเพื่อเข้าสู่สะสมเป็นไวเทลลินในรังไข่

Lee and Walker (1995) พบว่ามีการสะสมของ lipovitellin ใน oocytes เป็นเวลา 30 วัน หลังจากลอกคราบ ในช่วง 14 วันแรกหลังจากการลอกคราบครั้งสุดท้าย ขนาดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ oocytes ยังคงมีขนาดเล็ก lipovitellin ก็ยังน้อยกว่า 1% ที่ 10 วัน oocytes มีเส้นผ่าศูนย์กลาง  $40 \pm 11 \mu\text{m}$  และความเข้มข้นของ lipovitellin เป็น  $0.05 \pm 0.03 \text{ ng/oocyte}$  ระหว่าง 14 ถึง 30 วันหลังการลอกคราบ lipovitellin จะสะสมอย่างรวดเร็ว โดยวันที่ 19 oocytes มีเส้นผ่าศูนย์กลาง  $90 \pm 12 \mu\text{m}$  และความเข้มข้นของ lipovitellin เป็น  $3 \pm 2 \text{ ng/oocyte}$  โดยที่ 25 วัน oocytes มีเส้นผ่าศูนย์กลางเป็น  $120 \pm 30 \mu\text{m}$  และความเข้มข้นของ lipovitellin  $78 \pm 15 \text{ ng/oocyte}$

Lee *et al.* (1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของรังไข่กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ vitellogenin ใน haemolymph ของปูม้า พบว่า การเจริญของรังไข่ระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ vitellogenin ได้ แต่จะเริ่มวัดได้ในระยะที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3-6 ซึ่งปริมาณ vitellogenin ที่ตรวจวัดได้จะมีปริมาณต่ำ และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากการศึกษาการเจริญของรังไข่โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี แสดงให้เห็นว่าในช่วงการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1 และระยะที่ 2 จะไม่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนของ vitellin แต่จะพบในช่วงที่รังไข่เจริญในระยะที่ 3 - 6 และไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนของ vitellin ในส่วนของ hepatopancreas ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกันคือ ปูม้า *Callinectes sapidus* มีการสร้าง vitellin ภายในรังไข่เอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



6. Ammonium persulfate	: Promega,USA
7. Tetramethylethylene-diamine (TEMED)	: Promega,USA
8. Tris (hydroxymethyl) aminomethane	: Sigma
9. Glycerol	: Sigma
10. BSA (Bovine serum albumin)	: SERVA
11. Acrylamide	: BIO BASIC INC.
12. Bis (N, N'-methylene-bis acrylamide)	: Sigma
13. SDS (sodium dodecyl sulfate)	: BDH
14. 2- Mercaptoethanol	: BDH
15. Methanol	: MERCK
16. Acetic acid	: MERCK
17. Glycine	: Research Organic
18. Hydrochloric acid	: MERCK
19. Albumin bovin pH 7.0	: SERVA
20. Periodic acid (HIO <sub>4</sub> )	: BDH
21. 14 M Nitric acid	: MERCK
22. Basic fuchsin	: SERVA
23. Sodium metabisulfite (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	
24. Sudan black B	
25. Ethylene glycol	
26. Acetone	: MERCK
27. SDS	
28. molecular weight markers	

## วิธีการ

### แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ หรือ Completely Randomize Design (CRD) โดยสุ่มตัวอย่างปูทะเลมาจากธรรมชาติ เป็นปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ ระยะละ 20 ตัว และเป็นปูทะเลเพศผู้จำนวน 9 ตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิธีการทดลอง

### 1. สัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างปูทะเลเพศเมียชนิด *Scylla paramamosain* จากจังหวัดชุมพร โดยเป็นปูที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ และปูเพศผู้

### 2. ศึกษาลักษณะภายนอกของปูทะเล

- 2.1 นำปูทะเลมาทำให้สลบโดยการแช่ในน้ำแข็ง
- 2.2 บันทึกภาพลักษณะภายนอกทั้งด้านหลัง (dorsal) และ ท้อง (ventral)
- 2.3 ชั่งน้ำหนักและ วัดความกว้างของกระดอง (carapace width)

### 3. เก็บตัวอย่างเลือดของปูทะเล

3.1 ใช้ syringe ขนาด 1 ml และเข็มฉีดยาเบอร์ 21 G เคลือบด้วย Sodium citrate เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด - ดูดเลือดจากบริเวณโคนขาว่ายน้ำ โดยส่วนหนึ่งนำไปวัดค่าหักเหแสงด้วย Salinometer และบันทึกค่า อีกส่วนใส่ใน microcentrifuge tube แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเลือดต่อไป

### 4. ผ่าตัดเปิดกระดองปูทางด้านหลัง (dorsal)

- 4.1 จำแนกระยะการเจริญของรังไข่โดยดูจากขนาดของรังไข่ พร้อมบันทึกภาพ
- 4.2 ผ่าตัดแยกรังไข่ และ hepatopancreas ชั่งน้ำหนักรังไข่
- 4.3 นำค่าน้ำหนักรังไข่ และค่าน้ำหนักตัว มาคำนวณหาค่า Gonad somatic index (GSI) หรือค่าดัชนีวัดการเจริญของรังไข่ จาก  $GSI = (\text{น้ำหนักรังไข่} / \text{น้ำหนักตัว}) * 100$

5. วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ ด้วยวิธี Colorimetric techniques ของ Bradford (Bradford,1976)

5.1 ใช้ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็น stock solution สำหรับทำ serial dilution เพื่อทำ standard curve

5.2 นำเลือดปูทะเลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 200 เท่า แล้วผสมกับน้ำกลั่น และ Bradford จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

5.3 นำค่าการดูดกลืนแสงของเลือดปูทะเลที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในเลือดโดยใช้สมการที่ได้จากการทำ standard curve ซึ่งมีหน่วยเป็น mg/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเลือดของปูทะเล โดยใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และ Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS - PAGE)

6.1 ทำการ run electrophoresis โดยในหนึ่งชุดที่ทำการ run ประกอบไปด้วยเลือดปูทะเลเพศเมียระยะที่ 1 - 4 , เลือดปูทะเลเพศผู้ และ BSA

6.2 นำแผ่นเจลที่ได้ มาย้อมสีเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและตรวจสอบว่า band ใดมีองค์ประกอบเป็น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต หรือไขมันโดยใช้การย้อมสีที่แตกต่างกัน

#### การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกข้อมูลที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณคือในการหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูโดยการบันทึกข้อมูลที่ได้ลงในตาราง และบันทึกข้อมูลที่เป็นข้อมูลในเชิงคุณภาพคือการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนโดยการถ่ายภาพ

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณทำโดยการใช้โปรแกรมทางสถิติ (SPSS) ส่วนข้อมูลที่เป็นเชิงคุณภาพทำการวิเคราะห์โดยการเทียบกับ Marker และอ้างอิงกับเอกสารทางวิชาการที่เคยได้มีการศึกษามาแล้ว

#### สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### ระยะเวลาในการทดลอง

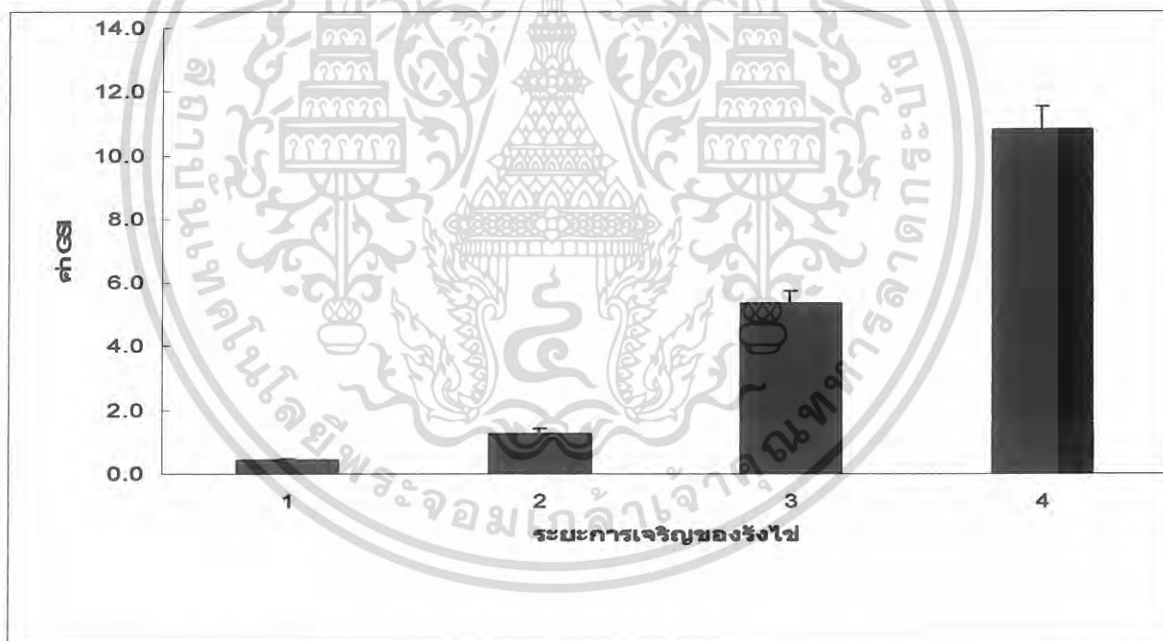
ทำการทดลองระหว่างวันที่ 27 พฤศจิกายน 2549 ถึงวันที่ 10 เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

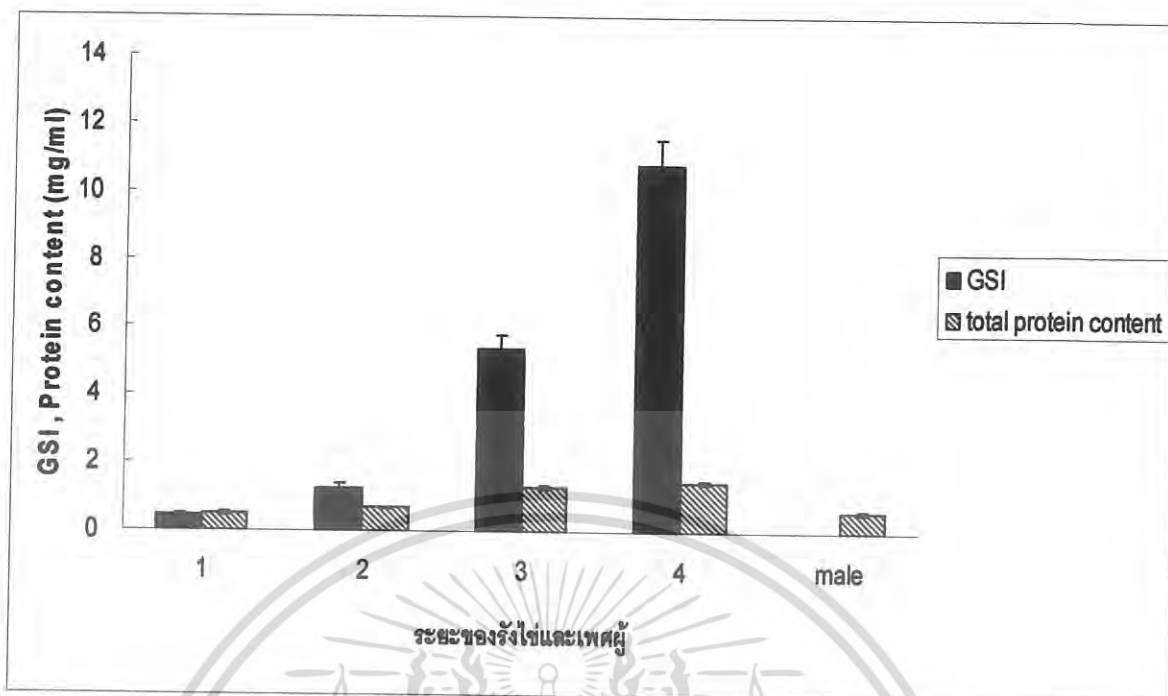
1. การศึกษาค่าดัชนีวัดการเจริญของรังไข่ Gonad somatic index (GSI) และค่าหักเหแสงของเลือด ( Refractive index) ของปูทะเล *Scylla paramamosain*

จากการศึกษาระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเล *Scylla paramamosain* พบว่าค่าดัชนีที่วัดการเจริญของรังไข่หรือ GSI ในปูเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะ 1,2,3 และ 4 คือ  $0.387 \pm 0.057$ ,  $1.168 \pm 0.158$ ,  $5.367 \pm 0.387$  และ  $10.808 \pm 0.726$  ตามลำดับ โดยรังไข่ในระยะ 1 และ 2 มีค่า GSI ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$  แต่ในระยะที่ 3 และ 4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับรังไข่ระยะอื่นๆ และพบว่าค่า GSI เพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ดังภาพที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับ Tsutsui *et al.* (2000) ที่แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ตามค่าดัชนีรังไข่ (GSI) โดยที่ค่า 0.2 – 0.5 เป็นระยะ previtellogenesis (ระยะ 1) , 1.2 – 3.7 เป็นระยะ early exogenous vitellogenesis (ระยะ 2) , 4.4 – 7.2 เป็น late exogenous vitellogenesis (ระยะ 3) และ 7.7 – 8.9 เป็นระยะ late exogenous vitellogenesis (ระยะ 4 )



ภาพที่ 4 ค่า GSI ในปู *S.paramamosain* เพศเมียที่รังไข่เจริญในระยะ 1,2,3,4

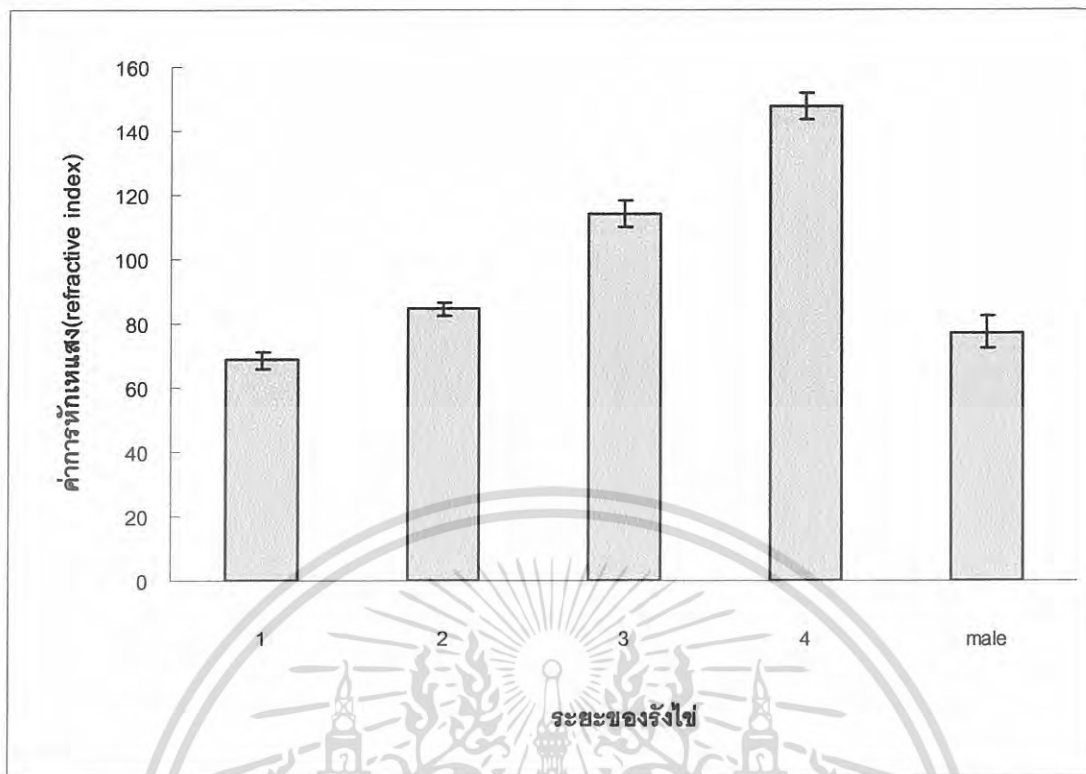
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



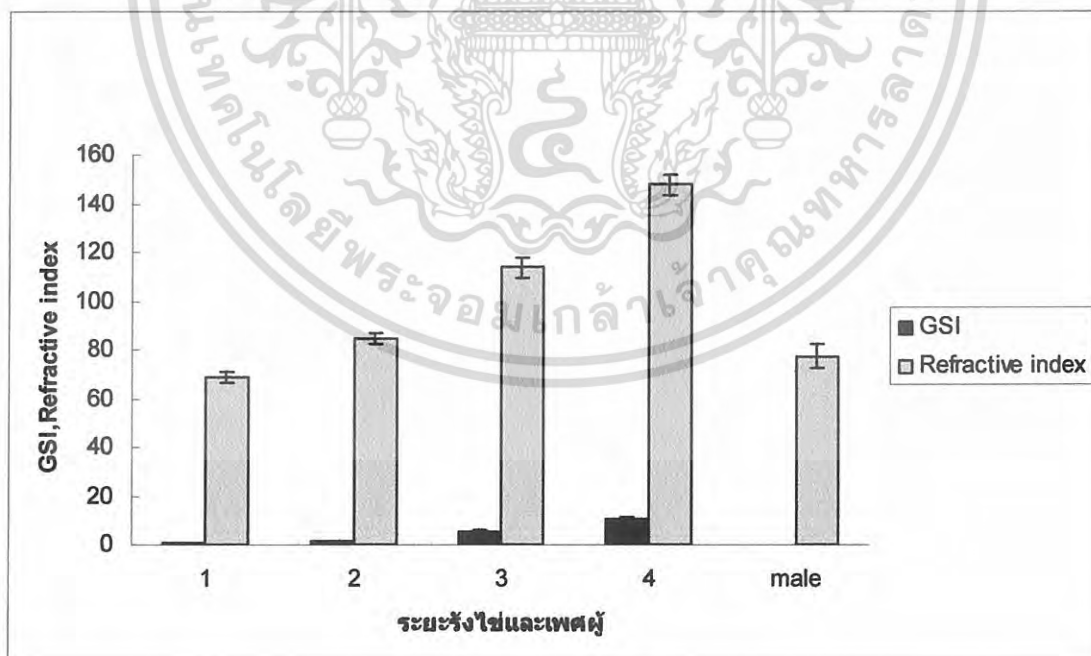
ภาพที่ 5 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่า GSI และ Protein content

ค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเล *Scylla paramamosian* หรือ Refractive index ในเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะ 1, 2, 3, 4 และ เพศผู้ มีค่า  $68.60 \pm 2.497$ ,  $84.60 \pm 2.047$ ,  $113.90 \pm 4.112$ ,  $147.70 \pm 4.173$  และ  $77.33 \pm 4.876$  ตามลำดับ โดยในระยะ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$  กับเลือดของปูเพศผู้ แต่แตกต่างกับเลือดของเพศเมียในระยะอื่นๆ ส่วนเลือดของปูทะเลเพศเมียในระยะ 3 และ 4 มีค่าหักเหแสงแตกต่างทางสถิติกับเลือดของปูทะเลเพศเมียในระยะอื่นๆ รวมถึงในเลือดปูทะเลเพศผู้ด้วย และพบว่าค่าหักเหแสงในเลือดของปูเพศผู้มีค่าอยู่ระหว่างปูเพศเมียระยะ 2 และ 3

จะเห็นได้ว่าค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเลและค่า GSI หรือค่าดัชนีรังไข่มีความสอดคล้องในทางเดียวกัน คือมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนารังไข่ในเพศเมีย ดังในภาพที่ 7



ภาพที่ 6 ค่าการหักเหแสง (Refractive index) ในปูทะเล เพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆและเลือดของเพศผู้



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าGSIและค่าการหักเหแสงในเลือด (Refractive index) ของปูทะเล S.paramamosain

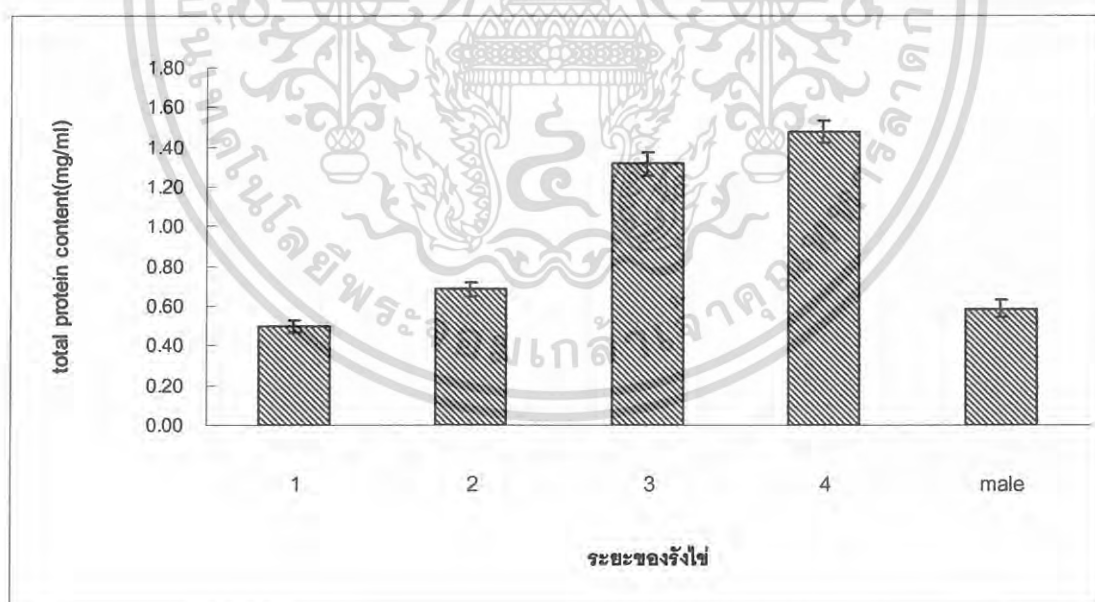
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain*

การหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลโดยใช้ Bradford technique ซึ่งเป็นการหาค่าดูดกลืนแสงเทียบกับ standard curve ที่ได้จาก BSA ซึ่งจะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีน (total protein content) จากสมการที่ได้จาก standard curve ผลที่ได้คือในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะ 1,2,3,4 และเลือดของปูเพศผู้ มีค่า  $0.496 \pm 0.031$ ,  $0.684 \pm 0.035$ ,  $1.315 \pm 0.058$ ,  $1.475 \pm 0.053$  และ  $0.585 \pm 0.044$  mg/ml ตามลำดับ

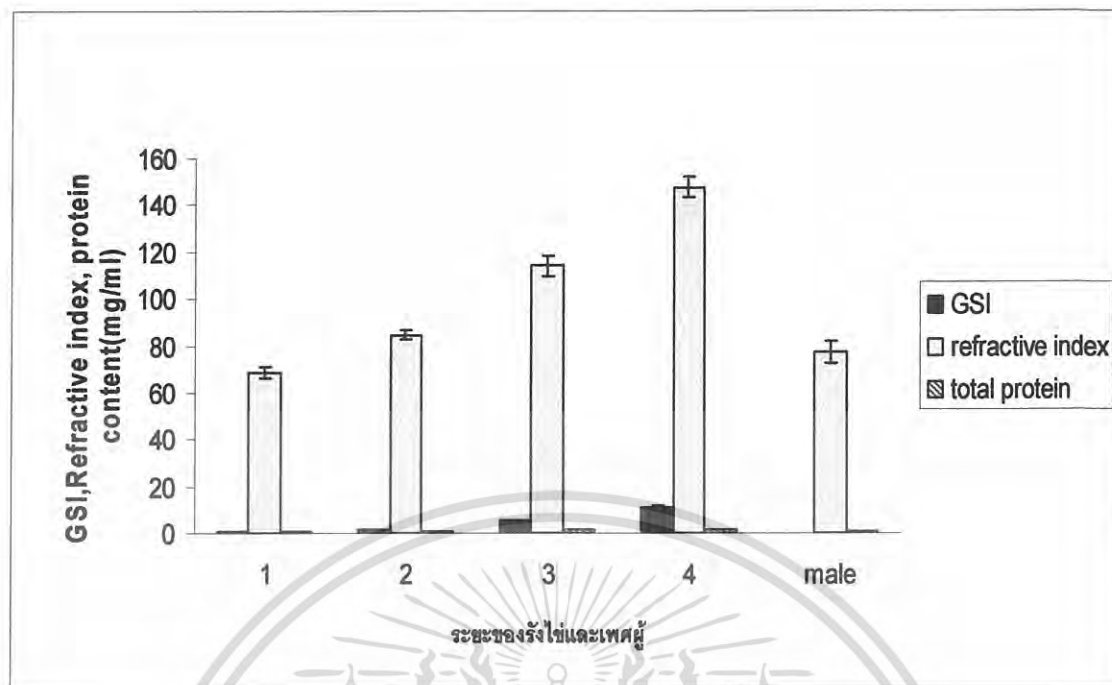
โดยพบว่าปูเพศเมียในระยะ 1 และ 2 และปูทะเลเพศผู้มีค่าโปรตีนในเลือดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่แตกต่างกับเพศเมียในระยะอื่นๆ ส่วนเพศเมียระยะที่ 3 และ 4 มีค่า total protein content แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเพศเมียทุกระยะรวมถึงเลือดของเพศผู้ด้วย

จากผลการศึกษาพบว่าค่าปริมาณโปรตีนในเลือดมีความสอดคล้องกับค่าการหักเหแสง (refractive index) โดยปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนารังไข่ ดังภาพที่ 9 และค่าปริมาณโปรตีน (total protein content) ในเลือดของเพศผู้มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับเลือดปูเพศเมียระยะ 1 และ 2 เช่นเดียวกับค่าการหักเหแสง (refractive index)



ภาพที่ 8 ค่าปริมาณโปรตีน (total protein content) ในเลือดปูทะเล *S.paramamosain* เพศเมีย และเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 แสดงค่า GSI, ค่าการหักเหแสง(refractive index) และ ปริมาณโปรตีน (total protein content) ของปูเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะเวลาต่างๆ

ตารางที่ 2 แสดงค่า ดัชนีรังไข่(GSI), ค่าหักเหแสง และ ปริมาณโปรตีนในเลือดปูทะเล *S.paramamosain* เพศเมียระยะต่างๆและปูเพศผู้

เพศ	ดัชนีรังไข่(GSI)	ค่าหักเหแสง	ปริมาณโปรตีน
เมีย ระยะ 1	0.387±0.057 <sup>a</sup>	68.60±2.497 <sup>a</sup>	0.496±0.031 <sup>a</sup>
เมีย ระยะ 2	1.168±0.158 <sup>a</sup>	84.60±2.047 <sup>b</sup>	0.684±0.035 <sup>b</sup>
เมีย ระยะ 3	5.367±0.387 <sup>b</sup>	113.90±4.112 <sup>c</sup>	1.315±0.058 <sup>c</sup>
เมีย ระยะ 4	10.808±0.726 <sup>c</sup>	147.70±4.173 <sup>d</sup>	1.475±0.053 <sup>d</sup>
ผู้	-	77.33±4.876 <sup>ab</sup>	0.585±0.044 <sup>ab</sup>

อักษรเหมือนกันในหลักเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P<0.05)

อักษรที่ต่างกันหลักเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปูทะเล

#### *Scylla paramamosain*

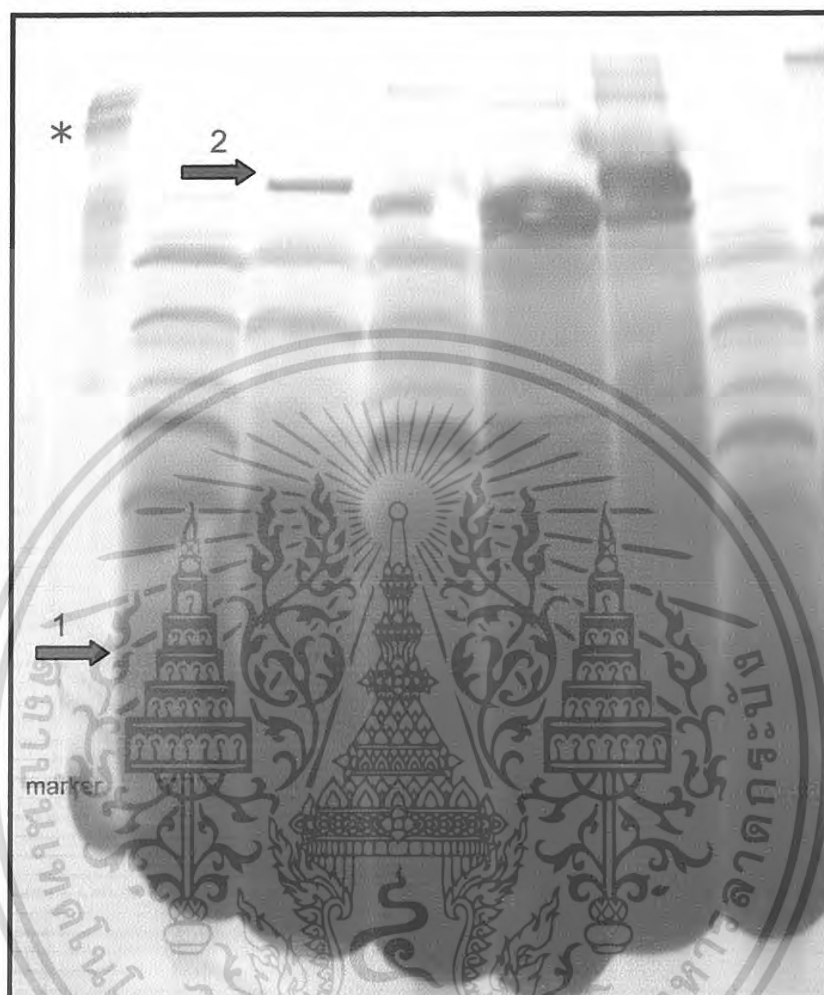
จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นย้อมด้วยสี Coomassie blue G250 แล้วพบว่ามีการเกิดแถบสีขึ้นหลังจากที่ run gel ดังภาพที่ 10 และภาพที่ 11



ภาพที่ 10 ลักษณะของแถบที่เกิดจากการศึกษาด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ของเลือดปูทะเล *Scylla paramamosain* (1  $\mu$ g/lane)

จากภาพที่ 10 เป็นภาพเจลที่ได้จากการ run แบบ PAGE ซึ่งพบว่าในเลือดของปูทะเลทุกตัวทั้งเพศผู้และเพศเมียมีองค์ประกอบหลักในเลือดที่เหมือนกันคือ haemocyanin ซึ่งเห็นได้จาก band ดังลูกศรที่ 1 ที่เท่ากันทุกระยะการเจริญของรังไข่ในเพศเมีย และในเพศผู้ นั้นแสดงว่าเป็นสารชนิดเดียวกันเพราะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ส่วนองค์ประกอบในเลือดที่แตกต่างกันที่เห็นได้คือ แถบที่มีความเข้มต่างกัน ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นสาร vitellogenin พบในเพศเมียเท่านั้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยแถบจะติดสีเข้มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ที่เพิ่มขึ้น ดังในลูกศรที่ 2 คือ เลือดของเพศเมีย ระยะ IV เห็นแถบเข้มที่สุด



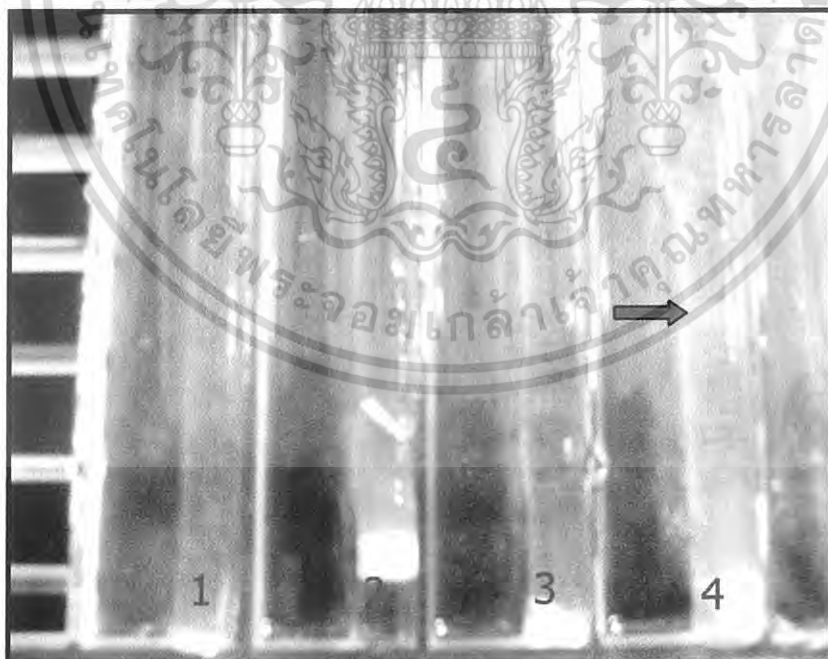
ภาพที่ 11 ลักษณะของแถบที่เกิดจากการศึกษาด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ของเลือดปูทะเล *Scylla paramamosain* (1 µg/lane)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนแบบ SDS-PAGE ทำให้สามารถแยกหน่วยย่อย (subunit) ที่อยู่ในโปรตีนได้ โดยในภาพจะเห็นว่า มีแถบย่อยๆ เกิดขึ้น เมื่อ run โดยใช้ marker เป็นตัวเปรียบเทียบทำให้ทราบได้ว่า สารใดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณเท่าใด จากภาพที่ 11 marker แสดงแถบของสารที่มีน้ำหนัก โมเลกุล 125 กิโลดาลตัน (เครื่องหมาย \*) แต่แถบที่ปรากฏขึ้นในเลือดของเพศเมียระยะที่ 1 – 4 มีระดับที่ต่ำกว่าแถบของ marker 125 กิโลดาลตัน จากการศึกษ ของดวงใจ (2543) พบว่าสาร vitellogenin มีน้ำหนักโมเลกุล 107 กิโลดาลตัน ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ แถบที่อยู่ในตำแหน่งดังลูกศร 2 จึงน่าจะเป็นสาร vitellogenin ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107 กิโลดาลตัน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงคือ มีสีเข้มขึ้นตามระยะของรังไข่ที่พัฒนาเป็นระยะต่างๆ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับการศึกษาของ Lee and Chang (1997) ซึ่งใช้ เทคนิค ELISA ตรวจวัดปริมาณ vitellogenin และโปรตีนในเลือด รังไข่ และตับอ่อน ของกิ้งก่ามกราม *M. rosenbergii* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ พบว่าปริมาณ vitellogenin ในเลือดมีค่าในขณะที่ยังมีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1 ( $0.05 \pm 0.01$  mg/ml) และเพิ่มขึ้นในระยะที่ 2 ( $1.19 \pm 0.16$  mg/ml) จากนั้นจะเพิ่มสูงสุดในระยะที่ 3 ( $2.89 \pm 0.32$ ) และยังคงมีปริมาณสูงในระยะที่ 4 ( $2.67 \pm 0.31$ ) และระยะที่ 5 ( $2.51 \pm 0.36$ ) หลังจากนั้นพบว่าปริมาณ vitellogenin ลดลงจนเกือบตรวจวัดไม่ได้เมื่อถึงเวลาที่กิ้งจะวางไข่

การตรวจสอบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบในเลือดของปูนั้นเป็นสารชนิดใด ทำโดยการให้เทคนิคย้อมด้วยสีตามวิธี periodic acid schiff (PAS) ซึ่งเป็นการย้อมดูคาร์โบไฮเดรตถ้าเจลดิสดีดั่งกล่าวมาจะสามารถบอกได้ว่ามีองค์ประกอบในเลือดที่เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรต จากการศึกษาพบว่าเจลด้อมติดสีโดยปรากฏเป็นแถบ ดังภาพที่ 11 แสดงว่ามีสารที่เป็นประเภทคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ในเลือดของปูทะเลเพศเมีย สอดคล้องกับการศึกษาของประจวบ หล้าอุบล (2537) ที่บอกว่าในเลือดปูมีองค์ประกอบที่เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตอยู่ แต่การที่จะบอกว่าเป็นสารชนิดใดนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

การตรวจสอบชนิดขององค์ประกอบในเลือดของปูโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสี sudan black B เพื่อย้อมดูไขมัน พบว่าไม่สามารถย้อมเจลดได้ เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการ run ไม่เพียงพอทำให้ไม่เกิดแถบที่เจลด และไม่สามารถย้อมดูได้



ภาพที่ 12 ลักษณะของแถบที่เกิดจากการย้อมเจลดด้วย Periodic acid schiff (PAS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สรุป

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain* โดยใช้วิธีของ Bradford เพื่อหาข้อมูลที่ชัดเจนในการนำมายืนยันความเหมาะสมที่จะใช้ค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเลเพศเมียมาประเมินระยะการเจริญของรังไข่ พบว่าสามารถใช้ค่าหักเหแสงของเลือดปูมาประเมินการพัฒนาของรังไข่ได้ เนื่องจากค่าหักเหแสงที่วัดได้มีค่าสูงขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ซึ่งสอดคล้องกับค่าปริมาณโปรตีนในเลือดที่เพิ่มขึ้น และค่าดัชนีรังไข่(GSI) ที่เพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่เช่นเดียวกัน

การที่ปริมาณโปรตีนในเลือดเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเจริญของรังไข่จะมีการสะสม vitellogenin ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งเพิ่มขึ้น จากภาพที่ 7 แต่ในปูทะเลเพศผู้ไม่มีการสะสมโปรตีนชนิดนี้จึงทำให้ค่าโปรตีนในเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นในเลือดของปูทะเลเพศผู้จึงมีองค์ประกอบหลักเป็น haemocyanin ส่วนในปูเพศเมียระยะ 1 และ 2 เป็นระยะ previtellogenesis ยังไม่มีการสะสม vitellogenin มากนักจึงทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับเลือดของปูเพศผู้

จากข้อมูลที่ได้น่าจะประเมินได้ว่า ปูทะเลเพศเมียที่มีค่าหักเหแสงต่ำกว่า 68 เป็นปูที่มีรังไข่เจริญในระยะ 1 ค่า 68-74 สรุปไม่ได้ว่าเป็นปูระยะ 1 หรือ 2 เนื่องจากค่าที่วัดได้มีการ overlap กันอยู่ การจะยืนยันให้แน่ชัดต้องทำการเลี้ยงต่อไปแล้ววัดค่าหักเหแสงอีกครั้ง ถ้ามีค่าเพิ่มสูงขึ้นแสดงว่าเป็นปูที่มีรังไข่เจริญในระยะ 2 ค่า 74-92 สรุปไม่ได้ว่าเป็นระยะที่ 1, 2 หรือ 3 ค่า 92-100 ยังสรุปไม่ได้ว่าเป็นระยะ 2 หรือ 3 ค่า 100-114 สรุปได้ว่าเป็นปูที่มีรังไข่ในระยะที่ 3 ค่า 114-154 ยังสรุปไม่ได้ว่าเป็นระยะที่ 3 หรือ 4 ค่า มากกว่า 154 สรุปได้ว่าเป็นระยะ 4 ดังในภาพที่ และตารางที่ ในภาคผนวก ค

### ข้อเสนอแนะ

1. ในการหาค่าหักเหแสง หรือ refractive index ควรจะทำทันทีหลังจากที่จับปฏิตัวอย่างมา เพื่อลดปัจจัยต่างๆที่ทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดมีการเปลี่ยนแปลง เช่น ความเครียด
2. การเก็บเลือดปฏิตัวอย่าง ควรมีการเก็บรักษาอย่างดีในที่มีอุณหภูมิต่ำ และไม่ควรถูกเก็บไว้นานเกินไป เนื่องจากจะส่งผลให้องค์ประกอบของโปรตีนในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงไป
3. เมื่อพบว่าค่าหักเหแสงในเลือดที่วัดได้ มีการซ้อนทับ (overlap) กันระหว่างระยะเวลาเจริญของรังไข่ ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นระยะไหน ควรทำการเลี้ยงต่อไปแล้วจึงวัดค่าใหม่ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงค่าหักเหแสงที่เกิดขึ้น และบันทึกระยะเวลา เพื่อที่จะนำมาบอกได้ว่าปฏิตัวอย่างในแต่ละระยะใช้เวลาในการเปลี่ยนแปลงระยะของรังไข่นานเท่าใด เพื่อจะได้จัดการกับแม่พันธุ์ได้อย่างเหมาะสมต่อไป ส่วนระยะเวลาที่ควรทิ้งระยะสำหรับการเจาะดูดเลือดในครั้งถัดไป ควรมีการศึกษาต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### เอกสารอ้างอิง

ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539. การเลี้ยงปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal) แผนกวิชาเทคโนโลยี ประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 127 หน้า.

ดวงใจ งามสม.2543.ความสัมพันธ์ของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ของปูทะเล *Scylla serrata* (FORSKAL,1775) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่เสียสภาพ.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บรรจง เทียนสงรัสมิ์ และ บุญรัตน์ ประทุมชาติ.2545.ปูทะเล ชีววิทยา การอนุรักษทรัพยากร และการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์แบบยั่งยืน.เอกสารเผยแพร่เครือข่ายวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมพืชและสัตว์น้ำ.สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 264 หน้า

สุรชาติ ฉวีภักดิ์ และสิทธิวัฒน์ สุทธิอาจ.2538 . การเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal) ให้มีไข่นอกกระดองในบ่อซีเมนต์ 4 วิธี.เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2538 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 39 หน้า

Alpuchea, J., A., Pereyrab , C., Agundisb, C., Rosasa, C., Pascuala, M.C., Slomiannyc, L., Vazquezd, E., Zenteno.2005.Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta* .1724 : 86 – 93.

Chang ,C.F. and Shih ,T.W. 1995 . Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater , *Macrobrachium rosenbergii* . *Invert .Reprod.Dev.*27(1) :11-20.

Chen,J.C.,Peng-Gek Chia.1997.Oxyhemocyanin,protein,osmolality and electrolyte levels in the hemolymph of *Scylla serrata* in relation to size in and molt cycle.*Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*217:93-105.

Keenan , C.P. , Davie , P.J.F. and Mann , D.L. 1998 . A revision of the genus *Scylla* De Haan,1833. (Crustacea : Decapod : Brachyura : Potunidae). *The Raffles Bull.Zool.* 46(1): 215-245.

Kerr, M.S. 1969. The hemolymph protein of the blue crab *Callinectes sapidus* II a lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. *Dev. Biol.* 20: 1-17.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lee,C.Y.and Walker,A.1995.Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab *Callinectes sapidus*. J .Exp.Zool. 271: 401-412.
- Lee ,C.Y. and Watson ,R.D. 1995 . In vitro study of vitellogenesis in the blue crab *Callinectes sapidus*: Site and Control of Vitellin Synthesis. J.Exp.Zool. 271:364-372.
- Quinitio.E.T.,Hara,A.,Yamauchi,K. and Nakao,S.1994. Change in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gamatogenic cycle of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*.Comp.Biochem.Physiol.109C (1):21-26.
- Quinn.N.J. and Kojis,B.L.1987. Reproductive Biology of *Scylla* sp. (Crustacea:Portuidae) from the Labu Estuary in Papua New Guinea.Bull Mar.Sci.41(2):234-241.
- Rani, K. and Subramonium, T. 1997. Vitellogenesis in the Mud crab (*Scylla serrata*): an in vivo isotope study. J. Crust. Biol. 17 (4): 659-665
- Tsutsui ,N., Kawazoe ,I. ,Ohira ,T. , Jasmani , S. , Yang , W.J. , Wilder , M.N.and Aida ,K.2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*.Zool .Sci. 17 :651-660.
- Yoganandhan K.,S.Thirupathi., A.S. Sahul Hameed.,2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus - infected shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture. 221 :1 – 11.

## ภาคผนวก ก

สารเคมีและการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

## 1. สารละลายสำหรับการวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน (Total protein content)

## 1.1 Bradford Reagent

วิธีการเตรียม	- Coomassie Brilliant Blue G-250	10	mg
	- Ethanol 95 %	5	ml
	- Phosphoric acid 85 %	10	ml
	- เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรรวมเป็น	100	ml

กรองและเก็บในขวดสีชาที่ 4 °C และกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

## 2. สารละลายสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือด

## 2.1 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

2.1.1 Monomer solution (30%T, 2.7%C<sub>Bis</sub>)

วิธีการเตรียม	- Acrylamide	14.6	g
	- Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	0.4	g
	- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น	50	ml

เก็บสารละลายไว้ในที่มืดที่ 4 °C

## 2.1.2 4X 1.5 M tris-Cl pH 8.8

## 2.1.3 4X 0.5 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane pH 6.8

## 2.1.4 2X treatment buffer (0.125M trisCl pH6.8, 4%SDS, 20%glycol, 10% 2-mercaptoethanol)

วิธีการเตรียม	- 0.5 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane	2.5	ml
	-Glycerol	2	ml
	- เติมน้ำกลั่นปริมาตร	5.3	ml
	- เติม 0.05% Bromophenol blue	0.2	ml

## 2.1.5 PAGE- Upper tank buffer ( 37.6 mM tris, 40 mM HCl, pH 8.89 )

วิธีการเตรียม	- Tris(hydroxymethyl) aminomethane	4.56	g
	- Glycine	3	g
	- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000	ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.6 PAGE- Lower tank buffer ( 63 mM tris, 50 mM HCl,pH 7.47 )

วิธีการเตรียม	- Tris(hydroxymethyl) aminomethane	22.7	g
	- 1 N Hydrochloric acid	150	ml
	- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000	ml

### 2.1.7 Separating gel and stacking gel for PAGE

วิธีการเตรียม	- Monomer solution	5	ml
	- 1.5 M tris-Cl	7.5	ml
	- น้ำกลั่น	17.05	ml
	- ทำการ Degas เป็นเวลา 15 นาที		
	- 10% Ammonium persulfate	150	µl
	- Tetramethylethylene-diamine (TEMED)	20	µl

### 2.1.8 Running gel overlay for PAGE (0.375 M tris-Cl pH 8.8)

วิธีการเตรียม	- 1.5 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane	25	ml
	- H <sub>2</sub> O (distilled water) adjust volume to	100	ml

## 2.2 sodium dodecyl sulfate -Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

### 2.2.1 Monomer solution เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

### 2.2.2 10% SDS (sodium dodecyl sulfate )

วิธีการเตรียม	- SDS	5	g
	- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น	50	ml

### 2.2.3 Ammonium persulfate

วิธีการเตรียม	- Ammonium persulfate	0.1	g
	- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น	50	ml

ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

### 2.2.4 0.5 M tris-Cl pH 6.8

วิธีการเตรียม	- 4X 0.5 M tris-Cl pH 6.8	2.5	ml
	- เติมน้ำกลั่น	7.5	ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2.5 SDS-PAGE tank buffer (0.0025 M tris pH 8.3, 0.192 M glycine ,0.1%SDS)**

วิธีการเตรียม	-Tris	3	g
	- Glycine	14.4	g
	-10% SDS	10	ml
	-ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น	1000	ml

**2.2.6 2X treatment buffer ( 0.125 M tris Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycol , 10% 2-mercaptoethanol)**

วิธีการเตรียม	- 0.5 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane	2.5	ml
	-Glycerol	2	ml
	-เติมน้ำกลั่นปริมาตร	5.3	ml
	- เติม 0.05% Bromophenol blue	0.2	ml
	-10% SDS	4	ml
	- 2- Mercaptoethanol	1	ml

**2.2.7 Separating gel for SDS-PAGE 7.5% gel (7.5% T, 2.7% C<sub>Bis</sub>)**

วิธีการเตรียม	- Monomer solution	7.5	ml
	- 1.5 M tris-Cl pH8.8	7.5	ml
	- 10% SDS	0.3	ml
	- น้ำกลั่น	14.55	ml
	- ทำการ Degas เป็นเวลา 15 นาที		
	- 10% Ammonium persulfate	150	μl
	- Tetramethylethylene-diamine (TEMED)	20	μl

**2.2.8 Stacking gel for SDS-PAGE 4% gel (4% T, 2.7% C<sub>Bis</sub>)**

วิธีการเตรียม	- Monomer solution	1.33	ml
	- 1.5 M tris-Cl pH8.8	2.5	ml
	- 10% SDS	0.1	ml
	- น้ำกลั่น	6.1	ml
	- ทำการ Degas เป็นเวลา 15 นาที		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 10% Ammonium persulfate	50	μl
- Tetramethylethylene-diamine (TEMED)	5	μl

## 2.2.9 Running gel overlay for SDS0-PAGE (0.375 M tris-Cl pH 8.8, 0.1

% SDS)

วิธีการเตรียม	- 1.5 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane	25	ml
	- 10% SDS	1	ml
	- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น	100	ml

## 1.1 สีย้อมโปรตีน

### 1.1.1 Coomassie Blue

วิธีการเตรียม	- 1 %Coomassie Brilliant Blue G-250	50	ml
	- Methanol	250	ml
	- Acetic acid	50	ml
	- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น	500	ml

## 1.2 Destain solution for Coomassie Blue ( Destain I , II )

### 1.2.1 Destain I

วิธีการเตรียม	- Methanol	250	ml
	- Acetic acid	50	ml
	- เติมน้ำกลั่นปริมาตร	1000	ml

### 1.2.2 Destain II

วิธีการเตรียม	- Methanol	50	ml
	- Acetic acid	70	ml
	- เติมน้ำกลั่นปริมาตร	1000	ml

## 1.3 สีย้อมคาร์โบไฮเดรต Periodic Acid Schiff (PAS)

### 1.3.1 Periodic Schiff reagent

วิธีการเตรียม	- Periodic acid (HIO <sub>4</sub> )	0.6	g
	- 14 M Nitric acid	0.3	ml
	- H <sub>2</sub> O (distilled water)	100	ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3.2 Schiff reagent

วิธีการเตรียม	- Basic fuchsin	0.5-1	g
	- Sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	1.9	g
	- 1N Hydrochloric acid	15	ml
	- $\text{H}_2\text{O}$ (distilled water)	85	ml

เขย่าสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นเติม activated charcoal เขย่าเป็นเวลา 1 นาที จนกระทั่งสารละลายเป็นสีขาว

### 1.3.3 Sodium metabisulfite solution

วิธีการเตรียม	- Sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	0.5	g
	- $\text{H}_2\text{O}$ (distilled water)	100	ml

## 1.4 สีย้อมไขมัน

### 1.4.1 Sudan black B-SBB

วิธีการเตรียม	- Sudan black B	0.7	g
	- Ethylene glycol	100	ml

### 1.4 Destain solution for Sudan black B

วิธีการเตรียม	- Acetone	20	ml
	- Acetic acid	15	ml
	- $\text{H}_2\text{O}$ (distilled water)	65	ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### 1. การหา Total protein content

#### 1.1 การทำ standard curve

โดยใช้ BSA ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml เตรียมสารละลายตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเตรียมสารสำหรับ standard curve

หลอดที่	จำนวน µl ของ BSA	น้ำกลั่น (µl)	Bradford (µl)	ปริมาณ BSA ในหลอด(µg/2ml)
1	0	1600	400	0
2	40	1560	400	4
3	80	1520	400	8
4	120	1480	400	12
5	160	1440	400	16
6	200	1400	400	20

แต่ละความเข้มข้นของ BSA เตรียม duplicate เมื่อทำการผสมสารเข้ากันดีแล้ว วัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 595 nm ภายใน 5 นาที – 1 ชั่วโมง นำค่า OD ที่วัดได้มา plot ในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า ดูดกลืนแสงกับค่าปริมาณ BSA ในหลอด จะได้ standard curve

#### 1.2 การวิเคราะห์หา Total protein content ในเลือดของปูทะเล

นำเอาเลือดปูทะเลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 เท่า โดยทำการเจือจางเป็นสองครั้ง เพื่อลดความผิดพลาดเนื่องจากใช้เลือดในปริมาณที่น้อยมาก คือ ครั้งแรกเจือจาง 20 เท่า แล้วครั้งที่สองเจือจาง 10 เท่า จะได้เลือดที่มีความเจือจาง 200 เท่า ใช้เลือดที่เจือจางแล้ว 40 µl เติมน้ำกลั่น และ Bradford reagent ตามในสูตรที่ 1.1 แต่ละตัวอย่างทำเป็น duplicate (2 ซ้ำ) เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว นำมาวัดค่า OD ที่ 595 nm แล้วนำค่า OD ที่วัดได้มาเทียบกับ standard curve เพื่อหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในหลอดตัวอย่าง จากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาคำนวณหา Total protein content ในเลือด หน่วยเป็น mg/ml

### 2. การวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือด

#### 2.1 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

2.1.1 เตรียม Gel cassette สำหรับเทเจลตามวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้อุปกรณ์ (Polyacrylamide Gel Electrophoresis set) นำส่วนผสมสารละลาย Separating gel and for

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PAGE ดังในข้อ 2.1.7 ในภาคผนวก ก เทลลงใน cassette ที่เตรียมไว้ให้สูงประมาณ 10 เซนติเมตร แล้ว Overlay ด้วย Running gel overlay for PAGE ที่ไว้จนสารละลายแข็งตัว จากนั้นเท overlay ออกและใช้กระดาษซับออกให้หมด แล้วเท stacking gel for PAGE และใส่ comb plate เมื่อ stacking gel แข็งตัวเอา comb plate ประกอบแผ่นเจลเข้าชุด จากนั้นเท Upper tank buffer และ Bromphenol blue

2.1.2 เตรียมหลอดปุททะเลที่จะ run โดยผสมเลือดกับ Treatment buffer ในอัตราส่วน 1:1

2.1.3 ใส่เลือดปูลงในร่องที่เกิดจาก comb plate โดยให้เลือดที่ใส่ลงไปมีปริมาณโปรตีนอยู่ 1  $\mu\text{g}$  ในการใส่เลือดลงในร่องจัดตำแหน่ง โดยให้ร่องแรกเป็น BSA และตามด้วย เลือดตัวผู้, เลือดตัวเมียระยะที่ 1, เลือดตัวเมียระยะที่ 2, เลือดตัวเมียระยะที่ 3, เลือดตัวเมียระยะที่ 4 และปิดด้วยเลือดของตัวผู้

2.1.4 เติม Lower tank buffer

2.1.5 ประกอบอุปกรณ์เข้าด้วยกัน ปิดฝา ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply

2.1.6 ทำการ Run gel ที่ constant voltage 100 V ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง กระแสไฟจะไหลจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ

2.1.7 เมื่อหยุดการ run gel นำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie Blue 5 – 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการ Destain ด้วย Destain I และ II ตามสูตร 1.2.1 และ 1.2.2 ตามลำดับ

2.1.8 Dry gel และบันทึกภาพ

## 2.2 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

2.2.1 เตรียม Gel cassette สำหรับเทเจลตามวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้อุปกรณ์ (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis set) นำส่วนผสมสารละลาย Separating gel and for SDS-PAGE ดังในข้อ 2.2.7 ในภาคผนวก ก เทลลงใน cassette ที่เตรียมไว้ให้สูงประมาณ 10 เซนติเมตร แล้ว Overlay ด้วย Running gel overlay for SDS-PAGE ที่ไว้จนสารละลายแข็งตัว จากนั้นเท overlay ออกและใช้กระดาษซับออกให้หมด แล้วเท stacking gel for SDS-PAGE และใส่ comb plate เมื่อ stacking gel แข็งตัวเอา comb plate ประกอบแผ่นเจลเข้าชุด จากนั้นเท SDS-PAGE tank buffer และ Bromcoomassie blue

2.2.2 เตรียมหลอดปุททะเลที่จะ run โดยผสมเลือดกับ Treatment buffer ในอัตราส่วน 1:1

2.2.3 ใส่เลือดปูลงในร่องที่เกิดจาก comb plate โดยให้เลือดที่ใส่ลงไปมีปริมาณโปรตีนอยู่ 1  $\mu\text{g}$  ในการใส่เลือดลงในร่องจัดตำแหน่ง โดยให้ร่องแรกเป็น BSA และตามด้วย เลือดตัวผู้, เลือดตัวเมียระยะที่ 1, เลือดตัวเมียระยะที่ 2, เลือดตัวเมียระยะที่ 3, เลือดตัวเมียระยะที่ 4 และปิดด้วยเลือดของตัวผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 เติม SDS-PAGE tank buffer

2.2.5 ประกอบอุปกรณ์เข้าด้วยกัน ปิดฝา ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply

2.2.6 ทำการ Run gel ที่ constant voltage 100 V ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง กระแสไฟจะไหลจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ

2.2.7 เมื่อหยุดการ run gel นำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie Blue 5 – 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการ Destain ด้วย Destain I และ II ตามสูตร 1.2.1 และ 1.2.2 ตามลำดับ จนกระทั่งเจลใส

2.2.8 Dry gel และบันทึกภาพ

2.3 วิธีการย้อมไขมันด้วย Sudan Black B (ดัดแปลงจากวิธีของ Humason, 1979)

นำแผ่นเจลที่ได้จากการ run PAGE แผลงใน 10% ฟอรัมาลิน ที่งัวข้ามคืน เพื่อ fix แถบโปรตีนบนเจลให้อยู่ในตำแหน่งเดิม ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แช่เจลใน Ethyleneglycol 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เพื่อให้สี Sudan Black B แทรกซึมเข้าไปในเนื้อเจลได้ดีเนื่องจากทำละลาย Sudan Black B ด้วย Ethyleneglycol จากนั้นแช่เจลใน Sudan Black B นาน 4-6 ชั่วโมง ล้างด้วย destian solution for Sudan Black B จนแผ่นเจลใส ล้างน้ำกลั่นก่อนนำไปทำให้แห้ง

2.4 วิธีการย้อมคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิค Periodic Acid Schiff (PAS) (ดัดแปลงจากวิธีของ Humason, 1979) มีขั้นตอนดังนี้

นำเจลที่ได้จากการ run PAGE แผลงใน 10 % ฟอรัมาลิน ที่งัวข้ามคืน ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ใส่ Periodic acid แช่ไว้เป็นเวลา 30 – 40 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที จากนั้นใส่ Schiff reagent ที่งัวข้ามคืน ล้างด้วยสารละลาย Sodiummetabisulfite จนแผ่นเจลใส แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปทำให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

## ข้อมูลดิบ

1. การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพที่ใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของ  
รังไข่ของปูทะเล *Scylla paramamosian*

ตารางที่ 2 ค่าดัชนีวัดการเจริญของรังไข่(GSI)ในระยะต่างๆของปูทะเล *Scylla paramamosian*

ตัวที่	เพศเมีย			
	ระยะ 1	ระยะ 2	ระยะ 3	ระยะ 4
1	0.33	0.95	5.12	8.98
2	0.38	1.44	9.80	10.48
3	0.33	1.21	6.60	15.40
4	0.31	0.69	5.60	13.08
5	0.10	0.75	4.68	13.20
6	0.30	0.74	2.47	7.49
7	0.33	1.40	6.78	7.13
8	0.50	0.79	8.82	5.95
9	0.70	0.98	4.23	10.14
10	0.74	1.97	3.64	10.17
11	0.45	1.31	5.78	12.34
12	0.41	3.35	4.39	11.89
13	0.47	1.38	5.83	7.11
14	0.62	0.69	4.52	10.63
15	0.30	0.75	6.21	3.75
16	0.44	0.54	4.12	12.22
17	0.40	1.44	4.37	15.2
18	0.56	2.84	4.45	15.12
19	0.52	1.23	6.05	12.56
20	0.39	0.66	3.89	13.33
Mean	0.429	1.256	5.367	10.808
SD	0.258	0.710	1.734	3.250
SE	0.057	0.158	0.387	0.726

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเล *Scylla paramamosain*

ตัวที่	เพศเมีย				เพศผู้
	ระยะ 1	ระยะ 2	ระยะ 3	ระยะ 4	
1	84	78	108	140	62
2	52	84	128	170	70
3	62	82	154	166	94
4	92	92	116	114	68
5	52	84	100	184	102
6	78	68	92	156	72
7	60	86	112	130	88
8	70	88	132	118	80
9	73	96	100	130	60
10	74	100	114	140	-
11	76	76	122	140	-
12	83	96	102	150	-
13	66	86	108	150	-
14	76	82	102	140	-
15	62	80	118	140	-
16	68	78	130	150	-
17	68	76	128	158	-
18	64	100	74	184	-
19	50	90	140	144	-
20	62	70	98	150	-
Mean	68.600	84.600	113.900	147.700	77.300
SD	11.170	9.150	18.390	18.660	14.620
SE	2.490	2.040	4.110	4.170	4.870

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ค่าปริมาณโปรตีนในเลือดปูทะเล *Scylla paramamosain* (mg/ml)

ตัวที่	เพศเมีย				เพศผู้
	ระยะ 1	ระยะ 2	ระยะ 3	ระยะ 4	
1	0.46	0.51	1.43	1.53	0.58
2	0.23	0.50	1.33	1.58	0.43
3	0.37	0.79	1.57	1.58	0.76
4	0.64	0.86	1.40	1.34	0.60
5	0.28	0.74	1.34	1.37	0.78
6	0.63	0.48	1.02	1.45	0.39
7	0.65	0.69	1.07	1.32	0.62
8	0.35	0.66	1.23	1.34	0.59
9	0.49	0.62	1.00	1.35	0.52
10	0.47	0.72	1.17	0.90	-
11	0.56	0.50	0.70	1.29	-
12	0.66	0.37	1.16	1.68	-
13	0.71	0.68	1.11	1.53	-
14	0.54	0.74	1.32	1.30	-
15	0.41	0.84	1.39	1.14	-
16	0.60	0.87	1.67	1.81	-
17	0.66	0.88	1.60	1.74	-
18	0.45	0.95	1.64	1.84	-
19	0.33	0.68	1.74	1.65	-
20	0.44	0.61	1.41	1.76	-
Mean	0.496	0.684	1.315	1.475	0.585
SD	0.140	0.157	0.263	0.239	0.133
SE	0.031	0.035	0.058	0.053	0.044

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

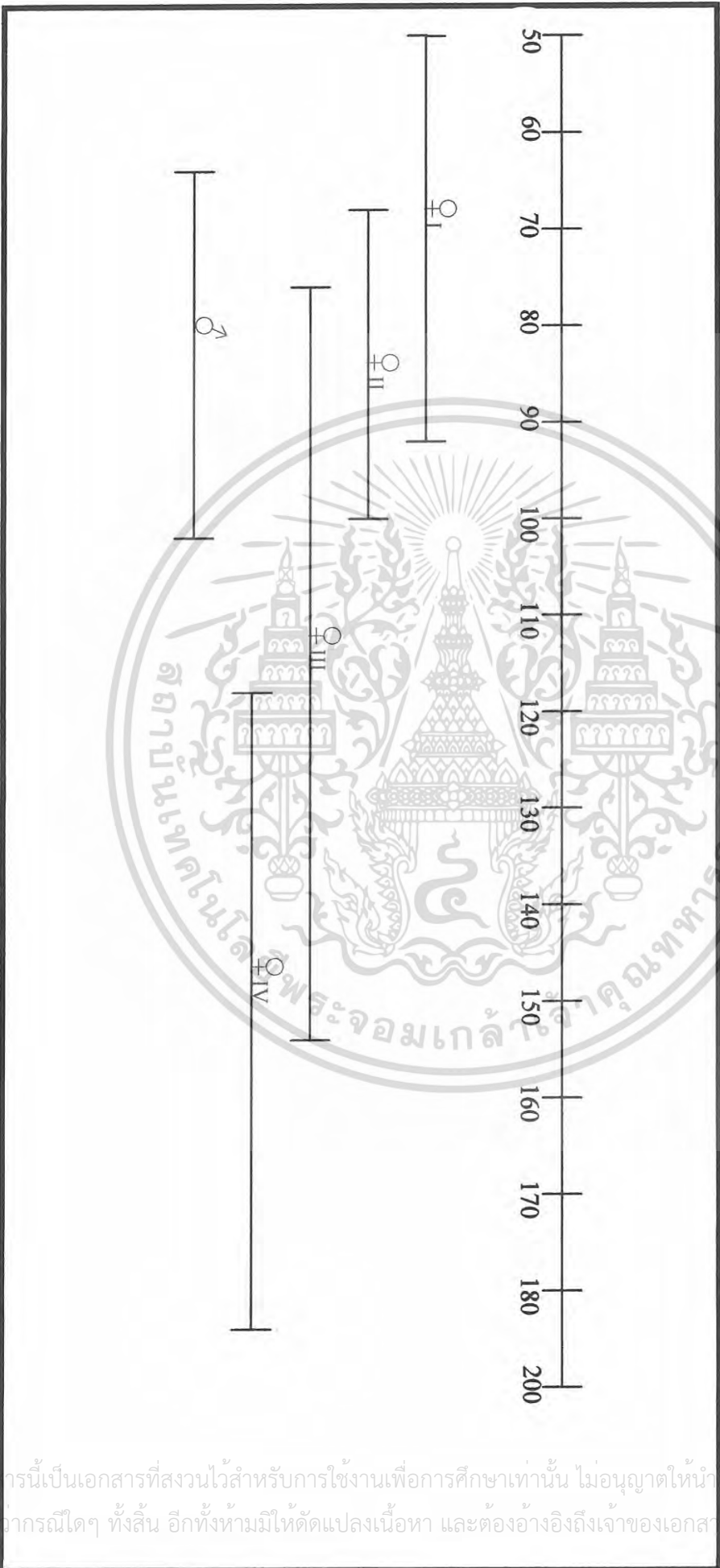
ตารางที่ 5 สรุปค่าหักเหแสงที่วัดได้ในเลือดปู *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญในระยะเวลาต่างๆ

ค่าหักเหแสง	ระยะการเจริญของรังไข่
น้อยกว่า 68	1
68 - 74	1 หรือ 2
74 - 92	1 หรือ 2 หรือ 3
92 - 100	2 หรือ 3
100 - 114	3
114 - 154	3 หรือ 4
มากกว่า 154	4



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 แสดงช่วงของค่าที่ก้นและของเต้านมของผู้หญิงแต่ละคนในแต่ละระยะเวลาการเจริญของรังไข่ในเพศเมีย และในเต้านมของผู้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้