



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะ ของ gonadotropin releasing hormone ในหอยเป๋าฮื้อเขตร้อน *Haliotis asinina*

Molecular cloning and characterization of gonadotropin releasing hormone-like peptide in the tropical abalone, *Haliotis asinina*

โดย

ดร. ปริญาพร หนูอุไร

ตุลาคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะของ gonadotropin releasing hormone ในหอยเป๋าฮื้อ
เขตร้อน *Haliotis asinina*

Molecular cloning and characterization of gonadotropin releasing hormone-like
peptide in the tropical abalone, *Haliotis asinina*

ดร. ปริญญาพร หนูอุไร สำนักงานจัดการศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยบูรพา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)	3
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	3
วัตถุประสงค์	4
ระเบียบวิธีวิจัย	4
ผลการวิจัย	10
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	17
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	18
เอกสารอ้างอิง	19
Output ที่ได้จากโครงการ	21
ภาคผนวก	22

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480215

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะ ของโกนาโดโทรปิน รีริสสังฮอร์โมนในหอย
เป้าฮื้อเขตร้อน *Halotis asinina*

ชื่อนักวิจัย : ดร. ปริญญาพร หนูอุไร

อีเมลล์ : fone2526@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ :

โกนาโดโทรปิน รีริสสังฮอร์โมน (GnRH) เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ ซึ่งมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาถึงลักษณะโครงสร้างทางโมเลกุลและหน้าที่ของ GnRH ในหอยเป้าฮื้อ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะของยีนและโครงสร้างของโปรตีน GnRH ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป้าฮื้อ *Halotis asinina* ตัวเต็มวัยเพศเมีย ด้วยวิธี Rapid amplification of cDNA ends (RACE) และ Immunohistochemistry และศึกษาหน้าที่ของ GnRH ในการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ด้วยวิธี *in vivo* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay การทดลองพบลำดับเบสบางส่วนของยีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกันกับ GnRH ที่พบในหอยสายพันธุ์อื่น และให้ชื่อว่า abalone GnRH (abGnRH) โดยเมื่อถอดรหัสเป็นสายโปรตีนบริเวณ active GnRH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 ตัวที่มีส่วนอนุรักษ์เหมือนกับโครงสร้างของ GnRH ที่พบในสัตว์กลุ่ม protostomians จากการศึกษากายภาพของ abGnRH ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal พบ abGnRH ในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 กระจายทั่วไปบริเวณด้านหน้าและด้านหลังของปมประสาท cerebral และบริเวณ ventral และ dorsal horn ของปมประสาท pleuropedal นอกจากนี้ยังพบ abGnRH ในเส้นใยประสาทบริเวณด้านหลังของปมประสาท cerebral และบริเวณด้านหน้าของ ventral horn ของปมประสาท pleuropedal จากการศึกษาผลของ abGnRH และ buserelin ต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ พบว่า buserelin และ abGnRH ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) สามารถกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ โดยสามารถเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และระยะ early oocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1,000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) ให้ผลดังกล่าวลดลง จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการค้นพบลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ที่สำคัญของ GnRH ในกระบวนการสืบพันธุ์ในหอยเป้าฮื้อ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มรอบการสืบพันธุ์ให้ได้ผลผลิตลูกหอยมากขึ้น

คำหลัก : โกนาโดโทรปิน รีริสสังฮอร์โมน *Halotis asinina* การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ วิธี BrdU

Abstract

Project Code : MRG5480215

Project Title : Molecular cloning and characterization of gonadotropin releasing hormone-like peptide in the tropical abalone, *Haliotis asinina*

Investigator : Parinyaporn Nuurai

E-mail Address : fone2526@yahoo.com

Project Period : 2 years

Abstract :

In various animal groups, both vertebrate and invertebrate, it has been reported that gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is an important regulator of reproductive function. However, knowledge of the molecular characteristic of GnRH and its function in the abalone is inadequate. Therefore, we have characterized the GnRH gene and its peptide sequence from the ganglia of sexually mature female *Haliotis asinina* using Rapid amplification of cDNA ends (RACE) and Immunohistochemistry techniques and study its biological function by *in vivo* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) gonadal cell proliferation assay. A partial length cDNA encoding GnRH-related gene was generated from *H. asinina* ganglia and demonstrated a high similarity with other gastropods. The deduced 12 amino acids sequence of abalone GnRH (abGnRH)-like peptide showed a high conservation with other protostomians' GnRH. An antibody generated against abGnRH showed specific localization within the cerebral and pleuropedal ganglia. abGnRH was localized in type-1 neurosecretory cells that are widely distributed within the ventral and dorsal parts of the cerebral ganglion and also observed in nerve fiber bundles extending into the dorsal part of the ganglion. In the pleuropedal ganglion, abGnRH immunoreactive cells were distributed in both ventral and dorsal horns. Nerve fibers containing abGnRH immunoreactivity were also detected primarily within the ventral region of ventral horns of the ganglion. The effect of buserelin and abGnRH on ovarian proliferation of *H. asinina* was investigated by *in vivo* BrdU assay. Groups of one-year-old female abalone were injected with buserelin and abGnRH at doses of 250 and 500 ng/g BW and exhibited a stimulatory effect on ovarian maturation and oocyte proliferation. The abGnRH at high dose of 1,000 ng/g BW had a lesser effect on inducing ovarian maturation and oocyte proliferation. These findings provide important knowledge on the molecular characteristics and function of GnRH on abalone reproduction which could be applied in aquaculture to enhance abalone reproduction.

Keywords : GnRH, *Haliotis asinina*, ovarian cell proliferation, BrdU assay

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) : การสังเคราะห์และศึกษาคุณลักษณะ ของ gonadotropin releasing hormone ใน
หอยเป้าฮือเขตร้อน *Haliotis asinina*

(ภาษาอังกฤษ) : Molecular cloning and characterization of gonadotropin releasing
hormone-like peptide in the tropical abalone, *Haliotis asinina*

2. ชื่อหัวหน้าโครงการและที่อยู่

ชื่อ – นามสกุล	ดร.ปริญญาพร หนูอุไร
หน่วยงานที่สังกัด	สำนักงานจัดการศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ที่อยู่	คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถ. ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103167
โทรสาร	038-393497
E-mail	fone2526@yahoo.com

3. งบประมาณทั้งโครงการ

480,000 บาท

4. ระยะเวลาดำเนินงาน

3 ปี 4 เดือน

5. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

หอยเป้าฮือเป็นหอยทะเลฝาเดียวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมนำบริโภคกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศเช่น จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา เนื่องจากรสชาติดี มีโปรตีนสูงและไขมันน้อย ในประเทศไทยมีหอยเป้าฮือพันธุ์พื้นเมือง *H. asinina* เป็นพันธุ์ที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ เพราะมีขนาดใหญ่ อัตราส่วนระหว่างเนื้อต่อเปลือกสูง และเจริญเติบโตเร็ว การเพาะเลี้ยงหอยเป้าฮือในประเทศไทยระยะแรกไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากขาดข้อมูลทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับวงจรการพัฒนาวัย การสืบพันธุ์ และเทคนิคการเลี้ยง ต่อมาศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์สามารถเพาะพันธุ์หอยเป้าฮือชนิดนี้ได้ในระดับหนึ่ง และสามารถผลิตลูกหอยส่งต่อให้ฟาร์มนำไปเพาะเลี้ยงได้ (Singhagraiwan and Doi, 1993) ปัจจุบันมีฟาร์มเพาะเลี้ยงหอยเป้าฮือหลายแห่งในเขตชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและอันดามัน

อย่างไรก็ตามข้อมูลทางงานวิจัยของหอยเป่าอี้อส่วนใหญ่เป็นการศึกษาจากหอยเป่าอี้อสายพันธุ์อื่น เช่น *H. rufescens* จากสหรัฐอเมริกา *H. discus hannai* จากญี่ปุ่น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มผลผลิตของลูกหอย เช่น การพัฒนาของตัวอ่อน การเลือกใช้อาหารที่เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและน้ำหนักของลูกหอย สำหรับข้อมูลพื้นฐานต่างๆ เกี่ยวกับหอยเป่าอี้อชนิด *H. asinina* เริ่มมีการศึกษาค้นคว้ามากขึ้น เช่นการศึกษาทางด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยเป่าอี้อในระยะต่างๆ ของวงจรการสืบพันธุ์ การศึกษากายวิภาคของระบบประสาท ปมประสาทและเซลล์ประสาทชนิดต่างๆ การศึกษาการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต้นจนถึงตัวเต็มวัย การกระตุ้นการตกไข่ในเพศเมีย จากการศึกษาเหล่านี้ทำให้ได้ทราบถึงข้อมูลที่มีความสำคัญในการปรับปรุงผลผลิตและการเจริญเติบโตของหอยเป่าอี้อ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงหอยเป่าอี้อยังคงประสบกับปัญหาที่เกิดจากความไม่พร้อมของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ในการผสมพันธุ์เนื่องจากระยะเวลาการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละเพศแตกต่างกัน ปัจจุบันนี้มีรายงานการศึกษาวิจัยในหอยเป่าอี้อ พบฮอร์โมนและสารสื่อประสาทต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต การกระตุ้นการลงเกาะ การกินอาหาร เช่น สารสื่อประสาท GABA และ serotonin (5-HT) สารประเภท neuropeptide ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ และกระบวนการสืบพันธุ์เช่น egg laying hormone (ELH) และ gonadotropin releasing hormone (GnRH) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับโครงสร้างระดับโมเลกุล ลำดับสารพันธุกรรม กรดอะมิโน และบทบาทหน้าที่ของ GnRH ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง รวมถึงหอยสายพันธุ์ใกล้เคียง เช่น หอยทากทะเล *Aplysia californica* หอยนางรม *Crassostrea gigas* และหอยแครง *Patinopecten yessoensis* ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบการรายงานการศึกษาถึงคุณลักษณะของโครงสร้างและหน้าที่ของ GnRH ในหอยเป่าอี้อ *H. asinina* ตัวเต็มวัยเพศเมีย

6. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคูณลักษณะของยีนและโครงสร้างของโปรตีน GnRH ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าอี้อ *Haliotis asinina* ตัวเต็มวัยเพศเมีย ด้วยวิธี Rapid amplification of cDNA ends (RACE) และ Immunohistochemistry
2. เพื่อศึกษาหน้าที่ของ GnRH ในการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ด้วยวิธี *in vivo* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay

7. ระเบียบวิธีวิจัย

7.1 การเก็บตัวอย่าง

7.1.1 การสกัด RNA

การทดลองนี้ใช้หอยเป่าอี้อ *H. asinina* เพศเมียตัวเต็มวัยขนาดประมาณ 25-30 กรัมที่มีอวัยวะสืบพันธุ์ชัดเจนจำนวน 20 ตัว มาทำให้สลบ จากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อปมประสาท cerebral และ pleuropedal นำมาบดให้ละเอียดและเติมสาร Trizol จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว

12000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บสารละลายส่วนบนและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม chloroform เขย่าประมาณ 15 วินาทีแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 12000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วดูดสารละลายส่วนบน ที่มีลักษณะใส จากนั้นทำการตกตะกอน RNA ด้วยการเติม isopropyl alcohol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทั้งสารละลายส่วนบน จะเหลือตะกอนของ RNA อยู่บริเวณก้นหลอดทำการล้างตะกอน RNA ด้วยการเติม 75% ethanol เขย่าแล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 7500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทั้งสารละลายส่วนบน และตก RNA ให้แห้ง จากนั้นทำการวัดปริมาณ RNA ทั้งหมดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร

7.2 การสังเคราะห์ยีน GnRH

7.2.1 การสังเคราะห์และเพิ่มจำนวน DNA

ใช้เทคนิค 3' Rapid amplification of cDNA ends (3'-RACE) โดยใช้น้ำยา SMARTer RACE cDNA Amplification kit (Clontech) เริ่มจากกระบวนการ reverse transcription ซึ่งจะเปลี่ยนสาย RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ total RNA 1 µg, 12 µM 3'-RACE CDS primer A ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°C และ 42°C เป็นเวลา 3 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ จากนั้นผสม 5X First-Strand buffer, 20mM DTT, 10 mM dNTPs, 40U/ul RNase inhibitor และ 100U SMARTScribe reverse transcriptase แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวนสาย DNA ด้วยเทคนิค 3'-RACE PCR โดยใช้ 3'-RACE cDNA, 50X Advantage 2 Polymerase Mix, 10 mM dNTPs, PCR-grade water, 10X advantage 2 PCR buffer, 10X Universal primer A mix (UPM) และ 10 uM degenerate primer ผสมให้เข้ากัน ซึ่ง degenerate primer นั้น ผู้วิจัยออกแบบจากบริเวณส่วนอนุรักษ์ที่สอดคล้องกับลำดับเบสของ GnRH ที่พบในสายพันธุ์ใกล้เคียงคือ *A. californica* และ *Octopus vulgaris* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แสดงดังตารางที่ 1 จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ทั้งสิ้น 25 cycles ประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดของ DNA โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการ แยก DNA ออกจากเจล โดยใช้ GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentus) เริ่มจากตัดแถบ DNA ที่มีขนาดตามที่คาดไว้ แล้วเติม binding buffer จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50-60 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลาย จากนั้นเติม isopropanol ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงใน GeneJET purification column แล้วปั่นที่ความเร็ว 14800 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม wash buffer แล้วปั่นที่ความเร็ว 14800 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นอีก 1 ครั้ง จากนั้นทำการแยก DNA ออกจาก column ด้วยการเติม elution buffer แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 14800 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20 °C

7.2.2 การเชื่อมต่อ DNA และการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำ DNA ที่ได้ผสมกับ pGEM-T Easy Vector (Promega) จากนั้นเติม T4 DNA ligase และ 2x rapid ligation buffer ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12-16 ชม. จากนั้นผสมพลาสมิดกับเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* strain DH5 α competent cells บ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วบ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ampicillin (100 มก./มล.) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1.30 ชม. จากนั้นนำแบคทีเรียที่บ่มได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar plate ที่มี ampicillin (100 มก./มล.), X-gal (50 มก./มล.) และ IPTG (50 มก./มล.) เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีเฉพาะพลาสมิดและยีนของ GnRH เท่านั้น จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชม.

7.2.3 การแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์

ทำการแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentus) เริ่มจากนำโคโลนีสีขาวมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 12-16 ชม. จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาปั่นที่ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนบน จากนั้นเติมสารละลาย resuspension ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย lysis เขย่ากลับไปกลับมา 4-6 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย neutralization เขย่ากลับไปกลับมา 4-6 ครั้ง แล้วนำสารละลายไปปั่นที่ความเร็ว 14800 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบนใส่ลงใน GeneJET spin column แล้วปั่นที่ความเร็ว 14800 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้าง column ด้วยการเติมสารละลาย washing ปั่นที่ความเร็ว 14800 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างอีก 1 ครั้ง จากนั้นทำการแยกพลาสมิดออกจาก column ด้วยการเติม elution buffer วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 14800 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการทดลอง

Primer name	Sequence* (5' ————— 3')	Length (nucleotides)
3'-RACE CDS primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30V N	57
Ap_oct_forward	GCNCAGAACTACCACTTYAGCAAYGG	26
RACE Universal Primers		
Universal primer A mix (UPM) Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCA ACGCAGAGT	45
Universal primer A mix (UPM) Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22

หมายเหตุ * Y = C หรือ T, V = A หรือ C หรือ G, N = A หรือ C หรือ G หรือ T

7.3 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ abalone GnRH (abGnRH)

7.3.1 การเตรียมโปรตีน abGnRH

นำโปรตีน abGnRH (pGlu-Asn-Tyr-His-Phe-Ser-Asn-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂) ซึ่งสังเคราะห์จากบริษัท GenScript Cooperation (Piscataway, NJ, USA) ปริมาณ 2 มิลลิกรัม มาเชื่อมต่อกับ bovine serum albumin (BSA) ปริมาณ 10 มิลลิกรัม และใช้ตัวเชื่อมต่อคือ N-(3-di methyl aminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) ปริมาณ 20 มิลลิกรัม 50 mM NaH₂PO₄ 500 ไมโครลิตร โดยปฏิบัติตามวิธีการของ Halow and Lane (1988) จากนั้นนำสารละลายมาบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12-16 ชม. จะได้เป็น abGnRH fusion protein เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

7.3.2 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ abGnRH

การทดลองนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่ 5/2556 โดยใช้หนูแรทเพศผู้ จำนวน 2 ตัว สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180-200 กรัมที่ผลิตจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งสัตว์ทดลองถูกนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเพื่อปรับสภาพให้เกิดความเคยชินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนการทดลอง (preimmune serum) จากนั้นทำการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการฉีด immunogen เข้าทางใต้ผิวหนัง ปริมาณครั้งละ 100 ไมโครกรัม จำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ ดังนี้ ครั้งที่ 1 ฉีด abGnRH fusion protein ที่ผสมกับ complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ส่วนครั้งที่ 2 และ 3 ฉีด abGnRH fusion protein ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 หลังจากฉีด immunogen ในแต่ละครั้ง จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดครั้งละประมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บ serum ส่วนสีเหลืองใส เพื่อนำไปทดสอบความไวและความจำเพาะต่อ abGnRH ด้วยวิธี Enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA) และ Immunoblotting

7.3.3 ELISA

7.3.3.1 การเตรียม serum

Serum ที่ได้จะประกอบด้วยแอนติบอดีต่อ abGnRH และ BSA ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความจำเพาะของ แอนติบอดีต่อ abGnRH serum ที่ได้จะนำมา preabsorbed ด้วย BSA ที่อัตราส่วน 1:100 (v/v) ที่ความเข้มข้น 50, 100, and 150 mg/ml จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12-16 ชม. เพื่อนำไปทดสอบความไวและความจำเพาะต่อไป

7.3.3.2 การทดสอบ serum ด้วย วิธี ELISA

เตรียมโปรตีน abGnRH และ BSA ที่ความเข้มข้น 1.25 µg/ml ละลายใน coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH9.6) มาหยอดในแต่ละหลุมของ 96-well plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12-16 ชม. จากนั้นทำการล้าง plate ด้วย washing

buffer (0.01 M PBS, pH 7.2 และ 0.05% Tween 20) แล้วนำมากำจัด non-specific binding ด้วยการเติม blocking solution (0.25% normal goat serum (NGS, Sigma)) ใน washing buffer) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นทำการเติม primary antibody (anti-abGnRH หรือ anti-abGnRH-BSA) ที่อัตราส่วนต่างๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นทำการล้าง plate 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที แล้วบ่มด้วย secondary antibody (goat anti-rat IgG HRP-conjugated) อัตราส่วน 1:5000 เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นทำการล้าง plate 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที แล้วเติม substrate buffer (Sureblue TMB Microwell Peroxidase substrate (KPL)) เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี จนกระทั่งเกิดสี จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1N HCl แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย spectrophotometer การทดลองนี้มีกลุ่มที่เป็น Negative control ซึ่งใช้ primary antibody เป็น preimmune rat serum แทน ส่วนกลุ่มที่เป็น Positive control จะใช้ primary antibody เป็น non-absorbed abGnRH-BSA antibody แทน

7.3.3.3 การทดสอบ serum ด้วย วิธี Immunoblotting

นำโปรตีน BSA และ abGnRH fusion protein ปริมาณ 5 ไมโครกรัม มาแยกด้วยวิธี 12.5% SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli (1970) จากนั้นนำ gel ที่ได้มา ย้ายแถบโปรตีนลงใน nitrocellulose membrane แล้วนำ membrane มาล้างด้วย 0.1% Tween 20 ใน 0.1 M Tris-buffer saline (TBS), pH 8.0 เป็นเวลา 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นทำการกำจัด non-specific binding ด้วยการเติม blocking solution (5% skim milk ใน TBS-Tween 20) เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นทำการเติม primary antibody ที่ละลายใน 1% skim milk ใน TBS-Tween 20 ที่อัตราส่วน 1:500 เขย่าแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12-16 ชม. จากนั้นทำการล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วบ่มด้วย secondary antibody อัตราส่วน 1:5000 เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นทำการล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติม TMB substrate จนกระทั่งเกิดสีน้ำเงินมวง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น และฝั่ง membrane ให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์แถบโปรตีนต่อไป การทดลองนี้มีกลุ่มที่เป็น Negative control ซึ่งใช้ primary antibody เป็น preimmune rat serum แทน ส่วนกลุ่มที่เป็น Positive control จะใช้ primary antibody เป็น non-absorbed abGnRH-BSA antibody แทน

7.4 *In vivo* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) gonadal proliferation assay

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการ proliferation ของเซลล์ในช่วงของการพัฒนาของรังไข่ของหอยเป่าฮื้อโดยการฉีดสาร BrdU ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ thymidine analog ซึ่งสารดังกล่าวจะเข้าไป incorporate กับ DNA ในระยะ S-phase ของกระบวนการแบ่งเซลล์ การทดลองใช้หอยเป่าฮื้อเพศเมียตัวเต็มวัยที่มีระยะเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2-4 ฉีด abGnRH และกลุ่มที่ 5-7 ฉีด buserelin (mGnRH agonist) ปริมาณ 250 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว (กรัม) ตามลำดับ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการฉีด BrdU ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M เข้าที่

กล้ามเนื้อ adductor ของหอยเป่าฮื้อ ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วทำการตัดเนื้อเยื่อทิ้ง และนำมา fix ด้วย Bouin solution เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วย 0.1M PBS pH 7.4, 70% ethanol แล้วทำการ dehydration ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% (2 ครั้ง), 100% (3 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 30 นาที จากนั้นทำการ clearing โดยใช้ xylene (2 ครั้ง) ครั้งละ 30 นาที infiltrate และฝังเนื้อเยื่อลงใน paraffin จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตัดด้วย เครื่อง microtome ความหนาประมาณ 6 μ m ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดเป็นแผ่นบางๆจะถูกนำไปวางลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วย สาร silane

การตรวจสอบ incorporated BrDU ในเซลล์ที่มีการแบ่งตัว ใช้เทคนิคทาง immunohistochemistry ตามวิธีการของ Nakamura และคณะ (2007) โดยมีวิธีการดังนี้ นำชิ้นเนื้อไปขจัด paraffin ออกด้วย xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเข้าสู่ขั้นตอนการเติมน้ำ (rehydrate) ในแผ่นชิ้นเนื้อด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นจากสูงไปต่ำ ดังนี้ 100% (3 ครั้ง), 95% (2 ครั้ง), 90%, 80%, 70% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วย 0.1M PBS pH 7.4 แล้วบ่มด้วย 0.25% Trypsin ที่ละลายใน 0.1M PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นล้างด้วย สารละลาย 0.1 M PBS, pH 7.4 ที่เติม 0.1% Tween 20 (PBST) แล้วบ่มด้วย 2N HCl ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ neutralization ด้วย 0.05M borate buffer เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย PBST และนำมา กำจัด non-specific binding ด้วยการเติม blocking solution (2% normal goat serum ใน PBST) ตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นจึงใส่ primary antibody (mouse anti-BrdU monoclonal antibody) ที่อัตราส่วน 1:100 (v/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชม. ส่วนกลุ่มควบคุมที่เป็น negative control จะใช้ preimmune mouse serum จากนั้นจึง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBST แล้วใส่ secondary antibody (anti-mouse IgG-alkaline phosphatase-conjugated) อัตราส่วน 1:500 (v/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. แล้วล้างออก และเติม detection buffer (1M Tris-HCl และ 5M NaCl, pH 9.5) เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่ม ด้วย NBT/BCIP alkaline phosphatase substrate solution จนกระทั่งเกิดการติดสีม่วงในเซลล์ ที่มีการ incorporated BrDU จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop buffer (1 M Tris-HCl and 0.5M EDTA, pH 8.1) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำแผ่นเนื้อเยื่อไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 20X โดยนับจำนวนของ BrdU immunopositive oogonia เป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยเทียบกับจำนวนของ oogonia ทั้งหมด ซึ่งนับแบบสุ่มจากบริเวณที่ถ่ายภาพจำนวน 6 บริเวณ ในแต่ละแผ่นชิ้นเนื้อ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA โดยใช้ Turkey's test ถ้าค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

8. ผลการวิจัย

8.1 การสังเคราะห์ยีน GnRH

ผลการสังเคราะห์ DNA จากปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค 3'-RACE PCR โดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากบริเวณส่วนอนุรักษ์ของลำดับเบส GnRH ของ *A. californica* และ *O. vulgaris* พบแถบของ DNA ขนาดประมาณ 500 bp และเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามียีนที่มีลักษณะโครงสร้างคล้าย GnRH โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นเพียง partial GnRH sequence ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 510 bp (รูปที่ 1) แบ่งเป็น 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GnRH 2) ตำแหน่งตัด (cleavage site) 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GnRH associated peptide (GAP) 4) ตำแหน่ง stop codon 5) 3' UTR และบริเวณปลายสาย poly A และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่าโครงสร้างของเพปไทด์ GnRH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 ตัว ซึ่งมีความเหมือนกันอย่างมากกับกลุ่ม protostomian และปลายด้าน C-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโนกลูตาเมต และปลายด้าน N-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีน ซึ่งเป็นส่วนอนุรักษ์ที่พบได้ตลอดวิวัฒนาการของสัตว์ทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (รูปที่ 2) ส่วนลำดับกรดอะมิโนของ GAP พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ โดยมีความเหมือนกันเพียง 19% และ 35% เมื่อเทียบกับ *A. californica* และ *O. vulgaris* ตามลำดับ (รูปที่ 3)

```
GCACAGAACTACCACTTCAGCAACGGTTGGTATCCGGGCGGAAAGCGGGGAAGCAAGTTC 60
A Q N Y H F S N G W Y P G G K R G S K F 20
GAGTACCTAGACATTCCGAGTCTCCAGCCAACTGCCCAATGTCCGGCCTTCATTGAGGCC 120
E Y L D I P S L Q P T A Q C P A F I Q A 40
TCGTGAGAACTACTATCTTTGGAGACAGTCAGATACTCAGCTGTTTCTTCCCTACTACT 180
S S E T T I F G D S Q I L S C F F P T T 60
TGCTCTACCAGGCAGGAGATTAAAGCCTTAATAATCAAGCTTACAGGTGAAGTGGTCAGA 240
C S T R Q E I K A L I I K L T G E V V R 80
ATTCAAGTCAATTGCGTTGGATTCAATCTTGAGGAAGCTGCCCGGCTTATTGAGGATACA 300
I Q V N C V G F N L E E A A R L I Q D T 100
TGTTGAGAGAGAATATGTGAGATCATTTTGAATAATCATTCTCAGAGTGATCTGTTGACA 360
C * 101
TCTAAAACATTTTGTACTGATGAACATGTATGTGAGAATGAAAATTTTATTCTTCAACCC 420
ACATTGTTGATGCATTTAATGTTTCGTACATTTTTTGCATAAATAAGTCCATACTTATTAAA 480
CATTTACCATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 510
```

รูปที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA encoding GnRH precursor ของ *H. asinina* และ deduced amino acid sequence โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้หนาแสดงลำดับกรดอะมิโนของ GnRH

ที่ทำนาย กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่ง amidation/peptolytic processing ดอกจันแสดงตำแหน่ง stop codon และบริเวณที่ขีดเส้นใต้สองเส้นแสดง consensus polyadenylation sequence

abGnRH	QNYHFSNGWYPG
pyGnRH	QNFHYSNGWQPG
cgGnRH	QNYHFSNGWQPG
apGnRH	QNYHFSNGWYAG
octGnRH	QNYHFSNGWHPG
lgGnRH	QHYHFSNGWKSG
caGnRH	QAYHFSHGWFPG
lGnRH-III	Q--HWSHDWKPG
sGnRH	Q--HWSYGVLPG
cGnRH-II	Q--HWSHGNYPG
mGnRH	Q--HWSYGIKPG

รูปที่ 2 แสดง deduced amino acid alignment ของ GnRH ในกลุ่ม protostomian และ deuterostomian เทียบกับ abGnRH โดยแถบสีดำแสดง identical residue ลำดับกรดอะมิโนสืบค้นจาก EMBL/GenBank accession numbers: *P. yessoensis*: py-GnRH (AB486004), *Crassostrea gigas*: cg-GnRH (HQ712119), *Aplysia californica*: ap-GnRH (ABW82703), *Octopus vulgaris*: oct-GnRH (AB037165), *Lottia gigantea*: lg-GnRH (FC805608), *Capitella sp.*: ca-GnRH (EY629959), *Lampertra ricardsoni*: lamprey-GnRH-III (AAQ77375.1), *Oryzias latipes*: salmon-GnRH (NP001098142.1), *Oncorhynchus mykiss*: chicken-II-GnRH (AAF08687), *Homo sapiens*: m-GnRH (EAW63591)

	<u>GnRH</u> ▼▼	GAP sequence	
apGnRH	QNYHFSNGWYAGKRRSSASLLRPEALGSSSSSSNSGLDVTADSSRGVSSLSGRGFGV	60	
octGnRH	QNYHFSNGWHPGGKRS-----	ALS-----	19
abGnRH	QNYHFSNGWYPPGGKRS-KFEYLDIPSLQPTAQCPAFIQASSETTIFGDSQILS-----	53	
	*****:.* **	**	
apGnRH	GEIQLVDSPCSIRLETLLINKLMQEEAARIQRTCVANVPISGLRELLEGAASKLESENK	120	
octGnRH	-----DIQCHFRQTKALIEKILDEEINRIITTCGPVN-EIADL-----	58	
abGnRH	---CFFPTTCSTRQEIKALIILKLTG-EVVRIQVNCVGFNLEEAARLIQDTC-----	100	
	* * : *** * : * ** .*, *		

รูปที่ 3 แสดง deduced amino acid alignment ของ GnRH และ GAP จาก GnRH precursor ของ *H. asinina*, *O. vulgaris* และ *A. californica* โดยดอกจันแสดง identical amino acid sequence ในทุกสปีชีส์ ส่วนเครื่องหมาย hyphen (-) แสดง gaps ในการ alignment เครื่องหมาย colon (:) และ dot (.) แสดงกรดอะมิโนที่ conserved กันปานกลาง และต่ำตามลำดับ

8.2 ELISA

ผลการทดสอบความไวและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนสังเคราะห์ abGnRH ด้วยวิธี ELISA แสดงดังตารางที่ 2 พบว่า abGnRH-BSA antibody สามารถทำปฏิกิริยาต่อทั้งโปรตีน abGnRH และ BSA โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูง และลดลงตามอัตราส่วนของแอนติบอดีที่ลดลง (คอลัมน์ที่ 3 และ 4) และเมื่อนำ abGnRH-BSA antibody มาดูดซับด้วยโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 50, 100, and 150 mg/ml พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงลดลงในหลุมที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA (คอลัมน์ที่ 5, 7 และ 9) จนมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่ม negative control ส่วนในหลุมที่เคลือบด้วยโปรตีน abGnRH ยังมีค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับสูงอยู่ (คอลัมน์ที่ 6, 8 และ 10) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมีความไวและความจำเพาะต่อโปรตีน abGnRH

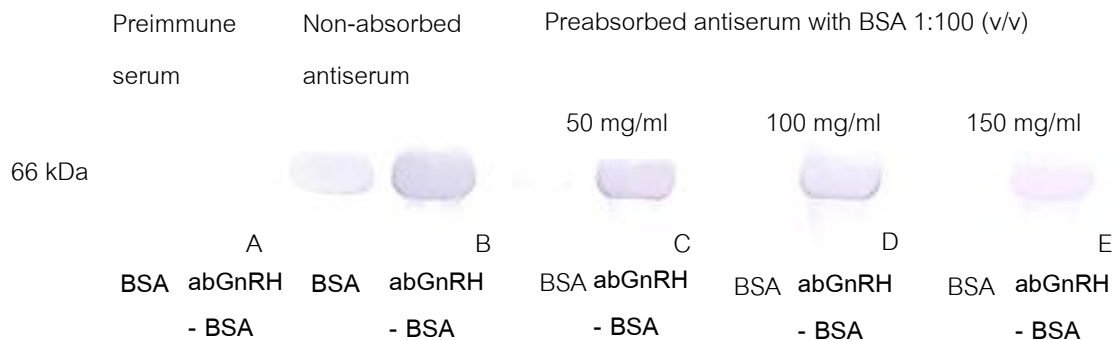
ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีต่อโปรตีน BSA และ abGnRH ก่อนและหลังการดูดซับด้วยโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Protein coated	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	BSA	abGnRH	BSA	abGnRH	BSA	abGnRH	BSA	abGnRH	BSA	abGnRH
Antibody dilution (v:v)	Preimmune		No preabsorption with BSA		Preabsorbed antibody with BSA 1:100 (v:v)					
					50 mg/ml		100 mg/ml		150 mg/ml	
1:100	0.286	0.259	1.912	1.783	0.56	1.635	0.263	1.325	0.234	1.275
1:200	0.255	0.244	1.909	1.738	0.476	1.472	0.273	1.182	0.221	1.096
1:400	0.221	0.210	1.834	1.661	0.387	0.985	0.261	1.024	0.168	0.752
1:800	0.153	0.150	1.669	1.580	0.244	0.764	0.199	0.656	0.154	0.568
1:1600	0.085	0.076	1.421	1.429	0.233	0.632	0.180	0.386	0.145	0.351

8.3 Immunoblotting

ผลการทดสอบจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนสังเคราะห์ abGnRH ด้วยวิธี Immunoblotting แสดงดังรูปที่ 4 พบว่า กลุ่มที่เป็น negative control ไม่พบปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีนและแอนติบอดี (รูปที่ 4A) ส่วนกลุ่มที่เป็น positive control สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน abGnRH และ BSA โดยพบแถบโปรตีนของ BSA และ abGnRH-BSA ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66.5 และ 68 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 4B) และเมื่อนำแอนติบอดีมาดูดซับด้วยโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 50, 100, and 150 mg/ml พบว่าที่ความเข้มข้น 50 mg/ml ยังคงพบปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับโปรตีน BSA (รูปที่ 4C) แต่มีการแสดงออกที่ลดลง ส่วนแถบที่เป็นโปรตีน abGnRH-BSA ยังคงเห็นการเกิดปฏิกิริยาอย่างชัดเจน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 100, and 150 mg/ml ไม่พบปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับโปรตีน BSA ส่วนในแถวที่แสดงแถบของโปรตีน abGnRH-BSA ยังคงพบปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีนกับแอนติบอดีอยู่ (รูปที่ 4D และ E) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมีความจำเพาะต่อโปรตีน abGnRH โดยความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการกำจัด cross-reactivity ของโปรตีน BSA คือ

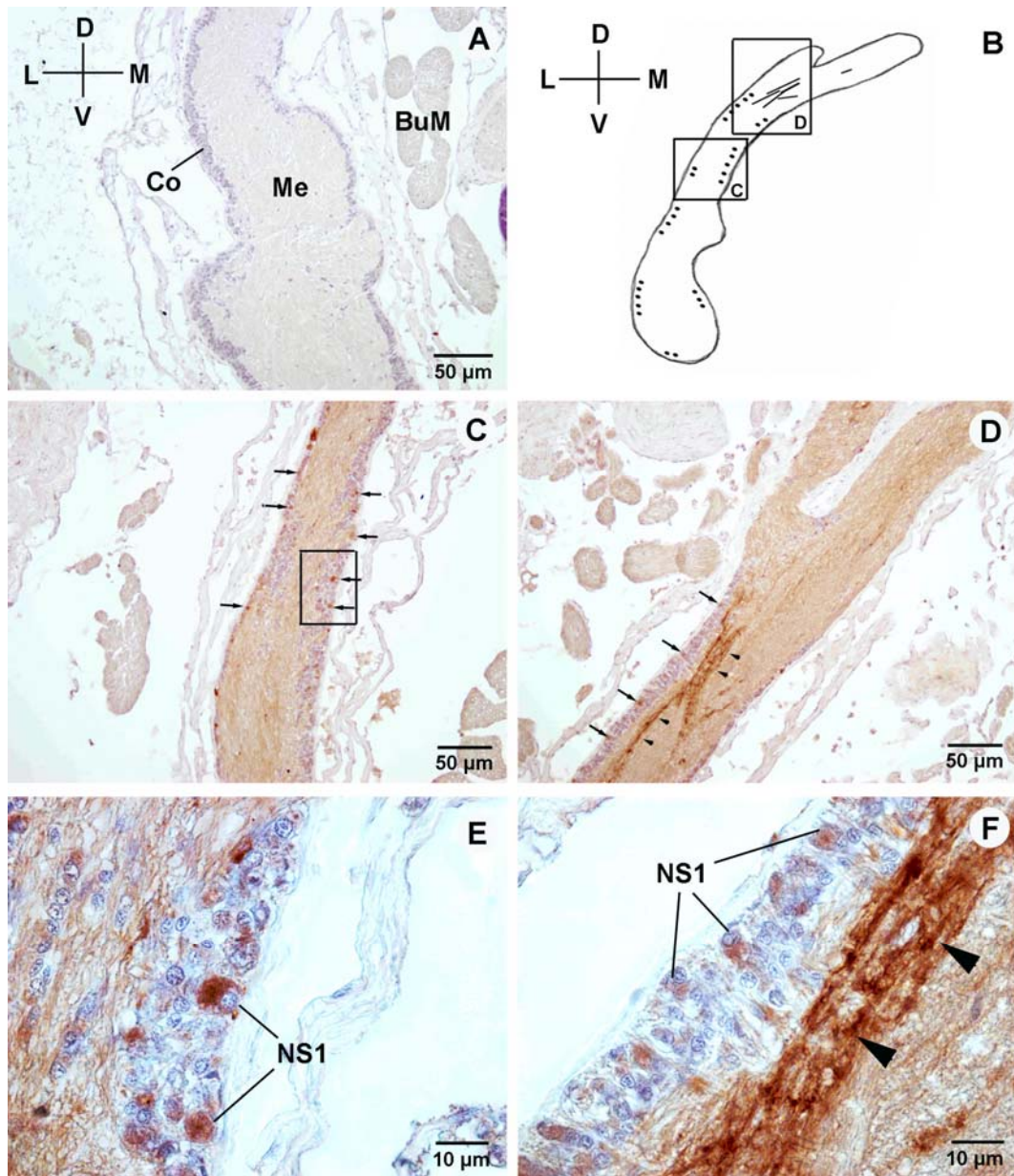
100 mg/ml ซึ่งสามารถนำไปทำการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน abGnRH ในเนื้อเยื่อปมประสาทของหอยเป่าฮือต่อไป



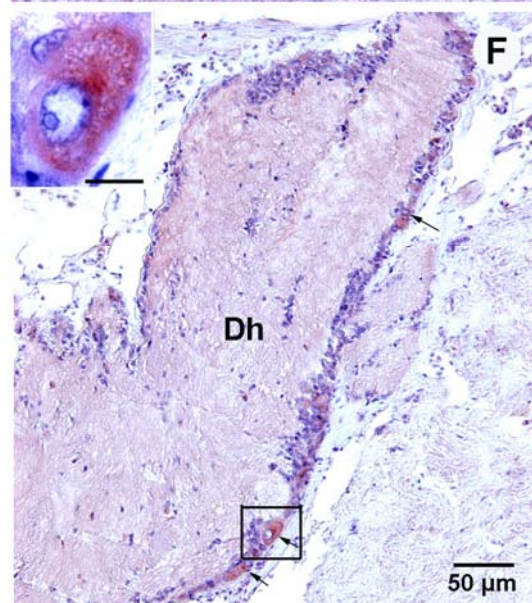
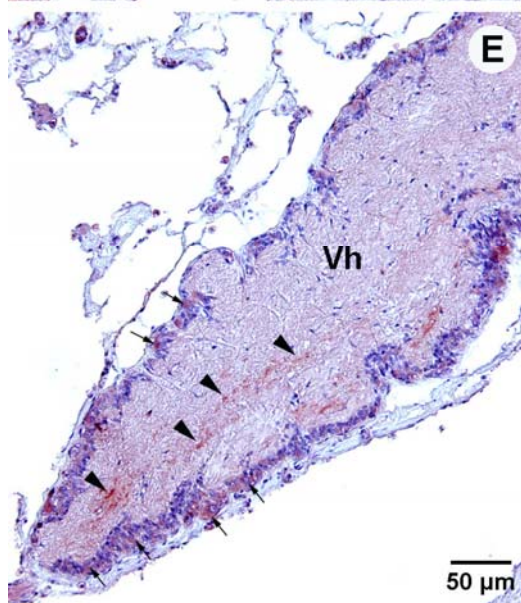
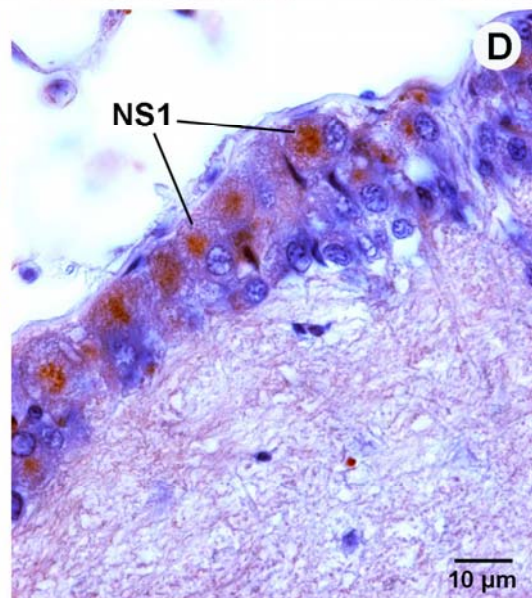
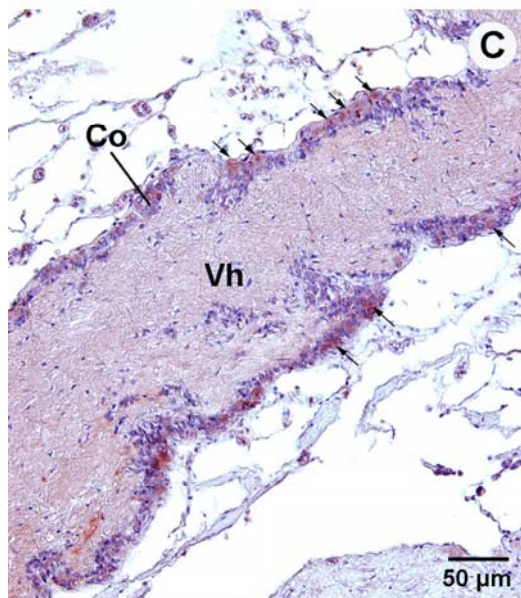
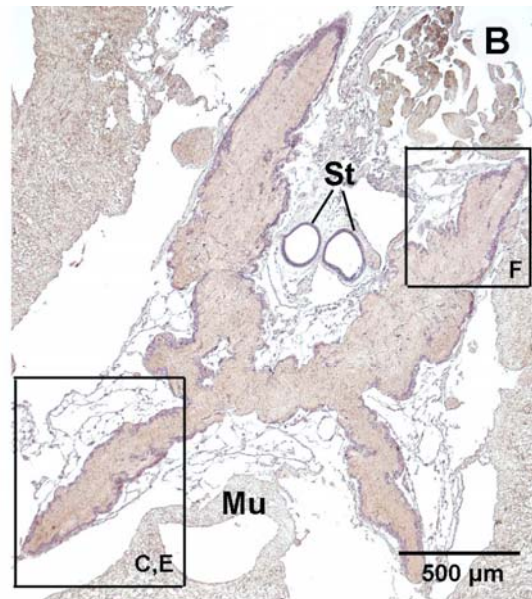
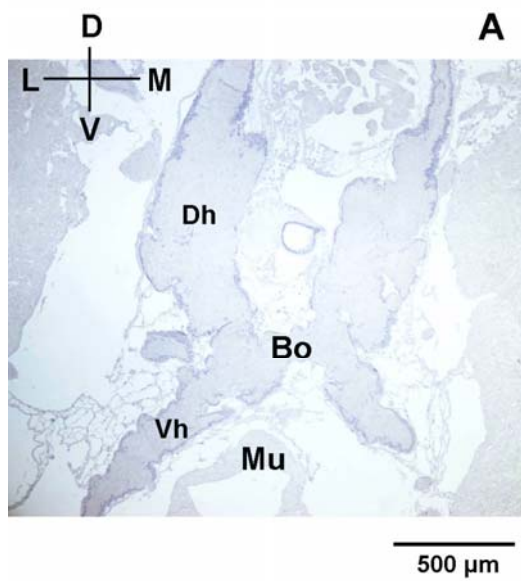
รูปที่ 4 แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของ abGnRH antibody ต่อโปรตีน abGnRH ด้วยวิธี Immunoblotting A) กลุ่ม Negative control ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อโปรตีน BSA และ abGnRH B) กลุ่ม Positive control พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีทั้งต่อโปรตีน BSA และ abGnRH-BSA โดยเห็นแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66.5 และ 68 kDa ตามลำดับ C) กลุ่มที่ทำการดูดซับแอนติบอดีด้วย BSA ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีทั้งต่อโปรตีน BSA และ abGnRH-BSA D, E) กลุ่มที่ทำการดูดซับแอนติบอดีด้วย BSA ที่ความเข้มข้น 100 และ 150 mg/ml ตามลำดับ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อโปรตีน BSA แต่พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อ abGnRH-BSA โดยเห็นแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68 kDa

8.4 การศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเนื้อเยื่อปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* เพศเมีย

พบโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ชนิดที่ 1 (neurosecretory (NS1) cell) ซึ่งพบกระจายทั่วไปทั้งบริเวณด้านหน้าและด้านหลังของชั้นนอกของปมประสาท cerebral (รูปที่ 5B-F) นอกจากนี้ยังพบการติดสีของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH บริเวณเส้นใยประสาท ซึ่งพบเฉพาะทางด้านหลังของปมประสาท cerebral (รูปที่ 5D และ F) จากการทดสอบกระจายตัวของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเนื้อเยื่อปมประสาท pleuropedal พบการติดสีแดงเข้มของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ชนิดที่ 1 เป็นจำนวนมากกระจายตัวอยู่ทั้งบริเวณ ventral horn และ dorsal horn (รูปที่ 6C-F) และพบได้บ้างในบริเวณ body ของปมประสาท นอกจากนี้ยังพบการติดสีแดงเข้มของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเส้นใยประสาทซึ่งพบเฉพาะบริเวณด้านหน้าของ ventral horn ของปมประสาท (รูปที่ 6B และ E) ส่วนกลุ่มควบคุมเชิงลบไม่พบการติดสีของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH (รูปที่ 5A และ 6A)



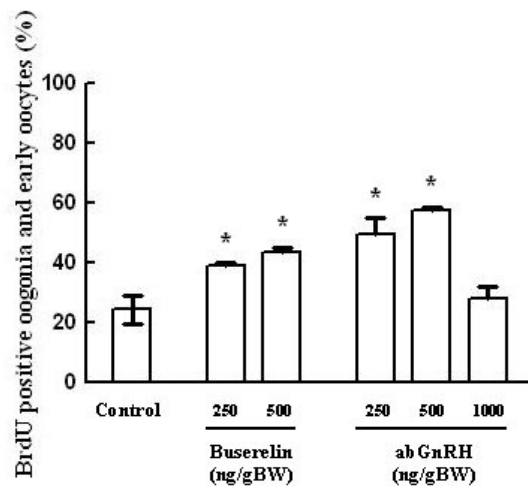
รูปที่ 5 Immunohistochemical localization โปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในปมประสาท cerebral ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศเมีย ภาพ A กำลังขยายต่ำของกลุ่มควบคุม (negative control section) ไม่พบการเกิด abGnRH immunoreactivity ภาพ B ภาพวาดแสดงการกระจายตัวของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในปมประสาท cerebral ภาพ C และ D กำลังขยายปานกลางของบริเวณภาพ B แสดงการติดสีแดงเข้มของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเซลล์ (ลูกศร) และเส้นใยประสาท (หัวลูกศร) บริเวณด้านหลังของปมประสาท ภาพ E และ F กำลังขยายสูงจากภาพ C และ D แสดงการติดสีแดงเข้มในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ชนิดที่ 1 (NS1) และเส้นใยประสาท (หัวลูกศร) V, ventral; D, dorsal; M, Medial; L, lateral; Co, cortex; Me, medulla; BuM, buccal mass; NS1, neurosecretory cell type 1.



รูปที่ 6 Immunohistochemical localization โปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในปมประสาท cerebral ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศเมีย **ภาพ A** กำลังขยายต่ำของกลุ่มควบคุม (negative control section) ไม่พบการเกิด abGnRH immunoreactivity **ภาพ B** กำลังขยายต่ำแสดงการกระจายตัวของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในปมประสาท pleuropedal **ภาพ C** กำลังขยายปานกลางของบริเวณภาพ B แสดงการติดสีแดงเข้มของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเซลล์บริเวณ ventral horn ของปมประสาท (ลูกศร) **ภาพ D** กำลังขยายสูงจากภาพ C แสดงการติดสีแดงเข้มในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ชนิดที่ 1 (NS1) **ภาพ E** กำลังขยายปานกลางของบริเวณภาพ B แสดงการติดสีแดงเข้มของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเซลล์ (ลูกศร) และเส้นใยประสาท (หัวลูกศร) บริเวณ ventral horn ของปมประสาท **ภาพ F** กำลังขยายปานกลางของบริเวณภาพ B แสดงแสดงการติดสีแดงเข้มของโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในเซลล์บริเวณ dorsal horn ของปมประสาท (ลูกศร) กรอบสี่เหลี่ยมในภาพ F แสดงการติดสีแดงเข้มในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ชนิดที่ 1 เส้น bar แสดงขนาด 10 μ m V, ventral; D, dorsal; M, Medial; L, lateral; Co, Cortex; Vh, Ventral horn; Dh, Dorsal horn; Bo, Body; Mu, Muscle; St, Statocyst; NS1, neurosecretory cell type 1

8.5 *In vivo* 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) gonadal proliferation assay

จากการทดสอบการ proliferation ของเซลล์ในช่วงของการพัฒนาของรังไข่ของหอยเป่าชื่อโดยการฉีดสาร Buserelin และ abGnRH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการฉีดด้วยสาร BrdU เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า กลุ่มที่ฉีดด้วย Buserelin ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ng/g BW มีจำนวนการเจริญของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oöcyte เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 39% และ 43% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีจำนวนการเจริญของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oöcyte เป็น 24% (รูปที่ 7) ซึ่งผลดังกล่าวจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อฉีดด้วย abGnRH ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ng/g BW โดยมีจำนวนการเจริญของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oöcyte เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 49% และ 50% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อฉีดด้วย abGnRH ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปเป็น 1000 ng/g BW มีจำนวนการเจริญของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oöcyte ลดลงเป็น 28%



รูปที่ 7 ผลของ buserelin และ abGnRH ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oögonia และ early oocyte ในรังไข่ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศเมีย แถบแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3) ดอกจันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$).

9. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้พบยีนที่มีคุณลักษณะคล้าย GnRH ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศเมีย และได้ให้ชื่อยีน abalone GnRH (abGnRH) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบเพียงบางส่วนของยีน abGnRH ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาลำดับเต็มของนิวคลีโอไทด์ของ GnRH ต่อไป เมื่อนำยีน abGnRH มาแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่ามีความยาวของกรดอะมิโนจำนวน 101 ตัว ที่ประกอบด้วยตำแหน่งตัดซึ่งเมื่อโปรตีนถูกตัดแล้วจะได้เป็นเพปไทด์สายสั้นของ mature abGnRH เรียกชื่อย่อเป็น abGnRH และ GnRH-associated peptide (GAP) โดยเพปไทด์ abGnRH ประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 ตัว ที่มีโครงสร้างเหมือนหรือคล้ายคลึงกับ GnRH ที่พบในสัตว์ชนิดอื่นๆ ของไฟลัม Mollusca และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ GnRH ที่พบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังมาเปรียบเทียบกันพบว่า บริเวณด้านปลาย N-terminal ประกอบด้วย pyro-glutamate และบริเวณปลายด้าน C-terminal ประกอบด้วย glycine ที่เกิดกระบวนการ amidation แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวเป็นโครงสร้างส่วนอนุรักษ์ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่หลักของเพปไทด์ GnRH ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน GAP ระหว่างสัตว์สายพันธุ์ใกล้เคียงกับหอยเป่าชื่อ คือหอย *A. californica* และปลาหมึก *O. vulgaris* พบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนเพียง 19% และ 35% ตามลำดับ แต่พบแบบแผนของกรดอะมิโน cysteine เป็นส่วนที่คงอนุรักษ์ไว้เช่นกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน GAP อาจมีบทบาทหน้าที่เป็นตัวช่วยในการทำให้เกิด strengthening ของโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน GnRH ขณะที่หลั่งออกมา (Bigot et al., 2012)

จากการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้าย GnRH ในเนื้อเยื่อปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ด้วยวิธี immunohistochemistry พบการติดสีแดงส้มในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ชนิดที่ 1 กระจายทั่วไปในปมประสาท ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Nuurai และคณะ (2010b; 2014) ที่พบโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้าย octopus GnRH และ tunicate I GnRH ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* เพศเมียและเพศผู้ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า abGnRH ที่พบอยู่ในปมประสาท pleuropedal มีปริมาณมากกว่า abGnRH ที่พบในปมประสาท cerebral นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้าย abGnRH ในเส้นใยประสาทบริเวณด้านหลังของปมประสาท cerebral ganglion และบริเวณด้านหน้าของ ventral horn ของปมประสาท pleuropedal แสดงให้เห็นว่ามีบทบาทสำคัญในการติดต่อสื่อสารทางสัญญาณประสาทกันระหว่างสองปมประสาท

จากการศึกษาหน้าที่ของ GnRH ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ด้วยวิธี BrDU assay พบว่า buserelin และ abGnRH ให้ผลกระตุ้นการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ oogonia และ early oocyte โดยที่ abGnRH ให้ผลในการกระตุ้นที่ดีกว่าการใช้ buserelin แสดงให้เห็นว่า HasGnRH มีประสิทธิภาพในการจับกับตัวรับที่อยู่ในรังไข่ได้จำเพาะกว่า buserelin อย่างไรก็ดีตาม เมื่อเพิ่มปริมาณของ abGnRH กลับส่งผลให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากปริมาณ abGnRH ที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดการ down-regulate ตัวรับของ GnRH (Nuurai et al., 2010a) หรืออาจเกิดการยับยั้งการทำงานของ GnRH โดยกระบวนการ negative feedback mechanism มีรายงานการศึกษาที่ผ่านมาถึงหน้าที่ของ GnRH ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่ระยะ gonial โดยผ่านกระบวนการ steroidogenesis ซึ่งช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (Nakamura et al., 2007; Treen et al., 2012) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า GnRH ถูกสังเคราะห์จากเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 ของปมประสาท cerebral และ pleuropedal และหลั่งออกมาที่เซลล์เป้าหมายซึ่งอาจเป็นเซลล์ประสาทใกล้เคียง หรือรังไข่เพื่อไปกระตุ้นกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ การสังเคราะห์หรือการหลั่งฮอร์โมนชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์เพื่อไปควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือ

10. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การศึกษางานวิจัยในอนาคตจำเป็นต้องศึกษาลำดับเบสเต็มของยีน GnRH และบทบาทหน้าที่ของ GnRH ในการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละช่วงวงจรการสืบพันธุ์ รวมถึงหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้องในหอยเป่าฮือ *H. asinina* เพศเมียและเพศผู้ ซึ่งหากการศึกษานี้ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาจะทำให้สามารถนำ GnRH สังเคราะห์ไปประยุกต์ใช้ในการเร่งพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์หอยเป่าฮือในฟาร์มเพาะเลี้ยง

11. เอกสารอ้างอิง

- Bigot, L., Zatylny, G. C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P., and Favrel, P. 2012. Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* 34: 303-310.
- Gorbman, A., and Sower, S.A. 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. *Gen Comp Endocrinol* 134: 207-213.
- Halow, E., and Lane, D. 1988. Antibodies: a laboratory manual. In E. Halow & D. Lane(Eds), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jarayabhand, P, & Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture*, 140, 159-168.
- King, J.A., and Millar, R.P. 1995. Evolutionary aspects of gonadotropin releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol* 15: 5-23.
- Najmudeen, T. M., & Victor, A. C. C. (2004). Seed production and juvenile rearing of the tropical abalone *Haliotis varia* Linnaeus 1758. *Aquaculture*, 234, 277-292.
- Nakamura, S, Osada, M, and Kijima, A. 2007. Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Mol Reprod Dev* 74: 108-115.
- Nurrai, P., Engsusophon, A., Poomtong, T., Sretarugsa, P., Hanna, P., Sobhon, P., and Wanichanon, C. 2010a. Stimulatory effects of egg laying hormone and gonadotropin releasing hormone on reproduction of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Shellfish Res* 29: 627-635.
- Nurrai P, Poljaroen J, Tinikul Y, Cummins S, Sretarugsa P, Hanna P, Wanichanon C, Sobhon P. 2010b. The existence of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the neural ganglia and ovary of the abalone, *Haliotis asinina* L. *Acta histochem* 112:557-566.
- Nurrai P, Primphon J, Seangcharoen T, Tinikul Y, Wanichanon C, Sobhon P. 2014. Immunohistochemical detection of GnRH-like peptides in the neural ganglia and testis of *Haliotis asinina*. *Microscopy Research and Technique* 77:110-119.
- Pazos, A. J., and Mathieu, M. 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen Comp Endocrinol* 113: 112-120.
- Singhagraiwan, T., & Doi, M. (1993). *Seed production and culture of a tropical abalone, Haliotis asinina* Linne. Thailand: The Eastern Marine Fisheries Development Center, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.

- Sobhon, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., & Poomtong, T. (1999) Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonad in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Science Asia*, 25, 3-21.
- Treen, N., Itoh, N., Miura, H., Kikuchi, I., Ueda, T., Takahashi, K. G., Ubuka, T., Yamamoto, K., Sharp, P. J., Tsutsui, K., and Osada, M. 2012. Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: a primitive endocrine system controlling reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 176: 167-172.
- Tsai, P. S. 2006. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *Gen Comp Endocrinol* 148: 48-53.
- Twan, W. H., Hwang, J. S., Lee, Y. H., Jeng, S. R., Yueh, W. S., Tung, Y. H., Wu, H. F., Dufour, S., and Chang, C. F. 2006. The presence and ancestral role of gonadotropin releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinol* 147: 397-406.
- Upatham, E. S., Thongkukiatkul, A., Kruatrachue, M., Wanichanon, C., Chitramvong, V. P., Sahavacharin, S., & Sobhon, P. (1998). Classification of neurosecretory cells, neurons and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *J. Shellfish Res.*, 17, 737-742.
- Young, K. G., Zalizach, R., Chang, J. P., and Goldberg, J. I. 1997. Distribution and possible reproductive role of a gonadotropin-releasing hormone-like peptide in the pond snail, *Helisoma trivolvis*. *Soc Neurosci Abstr* 23: 696.
- Zhang, L., Tello, J. A., Zhang, W., and Tsai, P. S. 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* 156: 201-209.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 1 เรื่อง คือ Characterization of abalone gonadotropin releasing hormone and its effect on ovarian cell proliferation ขณะนี้อยู่ระหว่างรอการ submit
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - มีการนำข้อมูลงานวิจัยไปศึกษาต่อยอดการศึกษาบทบาทหน้าที่ของ GnRH ในการเร่งพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในแต่ละช่วงวงจรการสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อโดยคาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงต่อไป
3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 1 เรื่อง

Nuurai, P., and Sobhon, P. Characterization of gonadotropin releasing hormone and its effect on gonadal cell proliferation in the tropical abalone, *Haliotis asinina*. Proceeding of the Burapha University International Conference, Pattaya, Chonburi, Thailand (July 3-4, 2014).

ภาคผนวก