



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ การวิเคราะห์และสังเคราะห์ cDNA ของฮอร์โมนที่ควบคุม การเจริญเติบโตในปมประสาทของหอยเป่าชื่อพันธุ์พื้นเมือง ”

Haliotis asinina Linnaeus

โดย โดย ผศ.ดร.วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

พฤษภาคม พ.ศ. 2545



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ การวิเคราะห์และสังเคราะห์ cDNA ของฮอร์โมนที่ควบคุม
การเจริญเติบโตในปมประสาทของหอยเป่าอื้อพันธุ์พื้นเมือง ”

Haliotis asinina Linnaeus

โดย โดย ผศ.ดร.วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

พฤษภาคม พ.ศ. 2545

Scan

สัญญาเลขที่ PDF / 76 / 2540

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ การวิเคราะห์และสังเคราะห์ cDNA ของฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโต
ในปมประสาทของหอยเป๋าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง *Haliotis asinina* Linnaeus ”

“ Characterization and cloning of cDNA encoding growth hormone
in nerve ganglia of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus ”

โดย ผศ.ดร.วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วันที่	๙ ส.ย. 254๘
เลขทะเบียน	00038
เลขเรียกหนังสือ	PDF 40
	๐๐ ๗๕

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ชั้น 4 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์

เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน

เขตปทุมธานี กรุงเทพฯ 10400

โทร 298-0455 โทรสาร 298-0476

Home page : <http://www.trf.or.th>

E-mail : trf-info@trf.or.th

ห้องสมุด



บทคัดย่อ

รหัสโครงการ PDF / 76 / 2540

ชื่อโครงการ “ การวิเคราะห์และสังเคราะห์ cDNA ของฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโต
ในปมประสาทของหอยเป่าฮ็อพพันธุ์พื้นเมือง *Halotis asinina* Linnaeus ”

ชื่อนักวิจัย ผศ. ดร.วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

E-mail Address: vanupunp@psm.swu.ac.th

ระยะเวลา 3 ปี

ในสัตว์ประเภท Mollusc นั้น growth hormone และ insulin-related hormone เป็นฮอร์โมนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยที่ฮอร์โมนเหล่านี้สร้างจากเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neuroendocrine cells) ในระบบประสาท ในงานวิจัยหอยเป่าฮ็อพพันธุ์พื้นเมือง *Halotis asinina* Linnaeus ศึกษากลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนนี้ในปมประสาท cerebral ganglion โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry และทำการวิเคราะห์ฮอร์โมนกลุ่มนี้ โดยใช้เทคนิค Protein electrophoresis และ Western blotting พบว่าน่าจะเป็นกลุ่ม pre-protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ระดับ 95 และ 130 kD จากนั้นได้ทำการศึกษาทางพันธุวิศวกรรม แยกสารพันธุกรรม RNA และศึกษาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีโมเรสแบบย้อนกลับ (reverse transcription และ polymerase chain reaction: RT-PCR) สังเคราะห์ส่วนของ cDNA fragment และ PCR-generated DNA fragment ของ growth hormone และ insulin-related hormone จากปมประสาทสมอง ปฏิกริยานี้มีการใช้โปรแกรมซึ่งออกแบบโดยการใช้คอมพิวเตอร์ระบบ Clustal-X ซึ่งมีความจำเพาะต่อลำดับของนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุกรรมเป้าหมาย การศึกษาพบว่า ในส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone นั้นมีการสังเคราะห์สองส่วนของ PCR-generated DNA fragments ซึ่งมีขนาดประมาณ 410 และ 440 นิวคลีโอไทด์ สำหรับในส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ insulin-related hormone นั้น มีการสังเคราะห์สองส่วนของ PCR-generated DNA fragments ซึ่งมีขนาดประมาณ 230 และ 380 นิวคลีโอไทด์ ได้ทำการทดลองต่อเนื่องเพื่อที่จะแสดงว่าส่วนของ PCR-generated fragments ที่ได้จากการศึกษาเป็นส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone และ insulin-related hormone ในหอยเป่าฮ็อพพันธุ์พื้นเมืองนี้ แต่เนื่องจากประสบปัญหาเกี่ยวกับความไม่บริสุทธิ์ของสารพันธุกรรมนี้ จึงมีผลทำให้การวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ยังไม่ชัดเจนสมบูรณ์ แต่การศึกษาด้านคว่ำและวิจัยเพื่อการการวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์น่าจะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต

คำหลัก หอยเป่าฮ็อพ ฮอร์โมน การเจริญเติบโต ระบบประสาท สารพันธุกรรม

Abstract

Project Code: PDF / 76 / 2540

Project Title: Characterization and cloning of cDNA encoding growth hormone in nerve ganglia of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus

Investigator: Asst. Prof. Vipavee Anupunpisit, Ph. D.
Department of Anatomy, Faculty of Medicine,
Srinakharinwirot University

E-mail Address: vanupunp@psm.swu.ac.th

Project Period: 3 years

In mollusc, growth hormone and insulin-related hormone have been shown to be key hormonal factors for growth and metabolism, and that they were synthesized from neuroendocrine cells in the nervous system. Studying in Thai abalone (*Haliotis asinina* Linnaeus), using Immunohistochemistry technique, there are neurosecretory cells in cerebral ganglion, which are classified and related to these hormones. The hypothesized specific pre-proteins were detected by Western Blot analysis at the molecular weight of approximately 95 and 130 kD. Then, the process of RNA extraction was established. The combination of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) generated and isolated distinct cDNA fragments and PCR-generated DNA fragments of growth hormone and insulin-related hormone from the cerebral ganglia of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. These reactions were made with oligonucleotide primers that were designed from the Clustal-X computer program with respect to target coding sequences. Two PCR-generated fragments of growth hormone gene were obtained corresponding in length of approximately 410 and 440 nucleotides. Moreover, two PCR-generated DNA fragments of insulin-related gene, corresponding in length of approximately 230 and 380 nucleotides, were also generated. To demonstrate that these PCR-generated DNA fragments belong to part of growth hormone and insulin-related hormone of *Haliotis asinina* Linnaeus, the continuous approaches of nucleotide sequencing of these fragments are on process. Because of the impurity problem, this process is being obtained and is not completely successful. However, the continuous studying of complete nucleotide sequences of genetic material of these hormones should be useful in the future.

Keywords: abalone, hormone, growth, nervous system, and genetic material

บทนำ

หอยเป้าฮื้อ หอยโข่งทะเล หรือหอยร้อยรู (abalone) เป็นหอยทะเลชนิดหนึ่งที่ประชากรทั่วโลกนิยมบริโภคเป็นอาหาร โดยชาวจีนและชาวญี่ปุ่นได้บริโภคหอยชนิดนี้มาเป็นเวลานานกว่า 1,500 ปี ปัจจุบันนี้ หอยเป้าฮื้อ (abalone) เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่เป็นที่ต้องการแพร่หลายทั่วโลกและมีราคาแพงในวงการอาหาร การทำประมงหอยเป้าฮื้อเพื่อนำสู่วงการอาหารมี 2 ทาง คือ การทำประมงจากแหล่งอาศัยธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ การทำประมงจากแหล่งอาศัยธรรมชาตินั้นได้ผลผลิตที่ยังไม่เพียงพอกับความต้องการในการบริโภคของประชากรโลก กอปรกับปริมาณของหอยเป้าฮื้อในแหล่งอาศัยธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงเป็นลำดับเนื่องด้วยปัจจัยหลายประการ ในปัจจุบันประเทศสำคัญที่มีศักยภาพประกอบกิจการเพาะเลี้ยงหอยเป้าฮื้อสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีหลายประเทศ ตัวอย่างเช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ ฝรั่งเศส และ ไต้หวัน (Cox, 1962; Ino, 1980; Fallu, 1991; Shepherd *et al.*, 1992; Uki, 1989) ในประเทศไทยพบหอยเป้าฮื้อที่มีความสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* (Jarayabhand *et al.*, 1991; Kakhai, N., and Petjamrat, K. 1992; Nateewathana, A., and Hylleberge, J. 1986, Nateewathana, A., and Busarawit, S. 1988) ในประเทศไทยไม่ได้มีการทำประมงจากแหล่งอาศัยธรรมชาติและเริ่มมีการเพาะเลี้ยงหอยเป้าฮื้อบางชนิดในเชิงวิจัยและในระดับอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น (Singhagraiwin, T. 1989; Singhagraiwin, T. and Sasaki, M. 1991; Tookwinas, S., *et al.*, 1986) จึงมีความจำเป็นต้องสั่งซื้อหอยเป้าฮื้อจากต่างประเทศ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงหอยเป้าฮื้อในระดับอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์จึงมีความสำคัญเพิ่มขึ้นอย่างมากในอนาคต

การเพาะเลี้ยงหอยเป้าฮื้อจะต้องมีการศึกษาวิจัยในหลายระดับและเชื่อมโยงความสัมพันธ์ทุกระดับเป็นวงจรเพื่อความสำเร็จในเชิงพาณิชย์ การศึกษาวิจัยนี้ต้องอาศัยองค์ประกอบการศึกษาพื้นฐานซึ่งครอบคลุมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ทางชีววิทยาของระบบสืบพันธุ์และระบบประสาทของหอยเป้าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง (*Haliotis asinina* Linnaeus) ในประเทศไทย โดยเน้นในด้านระยะการสร้าง การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากนี้ควรเน้นถึงการศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ ชนิดเซลล์ประสาทที่ผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์และเน้นถึงชนิดของฮอร์โมนที่ควบคุมเกี่ยวกับการเจริญเติบโต (Smit, A.B., *et al.*, 1988; Smit, A.B., *et al.*, 1991) การศึกษาอาหารตามธรรมชาติและอาหารเสริม อย่างไรก็ตาม เพื่อความสำเร็จของการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงในอนาคตควรจะคำนึงถึงการนำเอาความรู้และวิทยาการสมัยใหม่ทางมารวมศึกษาวิจัยเพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพทางการผลิตด้วย โดยเฉพาะในแง่การคัดเลือกพันธุ์ การเพาะพันธุ์ รวมไปถึงการใช้วิธีการทางเทคโนโลยีทางชีวภาพ (Van Minner, J., 1992)

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยในโครงการนี้ จะดำเนินการศึกษางานวิจัยหอยเป่าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง *Halotis asinina* Linnaeus ทางด้านกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neuroendocrine cells) ในปมประสาท cerebral ganglion โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry และทำการวิเคราะห์ฮอร์โมนกลุ่มนี้ โดยใช้เทคนิค Protein electrophoresis และ Western blotting (Sambrook *et al.*, 1989) จากนั้นจะได้ทำการศึกษาทางพันธุวิศวกรรม โดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อการวิจัยและศึกษาในระดับชีวโมเลกุล ค้นคว้าสารพันธุกรรมที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ ทั้งนี้เพื่อจะได้ข้อมูลในอีกระดับหนึ่งซึ่งจะเป็นประโยชน์และสามารถถูกนำมาใช้ในวงจรเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ได้ต่อไปในอนาคต

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงและการเลือกหอยเป่าชื่อ *H.asinina* เพื่อการทดลอง

หอยเป่าชื่อจะถูกเพาะเลี้ยงในบ่อซีเมนต์โดยให้มีน้ำไหลถ่ายเทตลอดเวลา การเพาะเลี้ยงจะถูกดำเนินการที่ สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต. อ่างศิลา จ. ชลบุรี ผู้ทำงานวิจัยได้รับความช่วยเหลือในการ เก็บตัวอย่างจาก ผศ. ดร. เติมศักดิ์ จารยะพันธ์ และ คณะ หอยเป่าชื่อที่นำมาใช้ในการวิจัยจะเป็นหอยเป่าชื่อพันธุ์พื้นเมือง *Halotis asinina* Linnaeus

2. การศึกษาทางด้านกายวิภาคศาสตร์ของกลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neuroendocrine cells) ในปมประสาท cerebral ganglion

2.1 การเตรียมการตัดแยกปมประสาทซีรีบรอล (cerebral ganglia)

นำหอยเป่าชื่อสลับด้วย $MgCl_2$ แล้วทำการผ่าตัดแยกปมประสาทซีรีบรอล (cerebral ganglia) และ มัดของเส้นประสาทที่อยู่บริเวณแกนของตำแหน่ง medulla โดยทอดตัวไปตามแนวยาวของปมประสาท cerebral ganglion ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์ โดยที่ว่ปมประสาทชนิดนี้อยู่บริเวณส่วนหัวทางด้านหน้า และมีขนาดเล็กมาก

2.2 การศึกษาลักษณะเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) ในปมประสาท cerebral ganglion

เป็นการศึกษาทางด้านกายวิภาคของปมประสาท cerebral ganglion ในระดับจุลทรรศน์ ธรรมดาเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) ในปมประสาท cerebral ganglion ทำการตัด section ของเนื้อเยื่อ แล้วใช้เทคนิคพิเศษเพื่อการย้อมเซลล์ประเภท Immunohistochemistry ที่มีการแสดงผลของ immunoperoxidase มีการใช้ Rabbit anti human growth hormone เป็น primary antibody

3. การวิเคราะห์สารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตในปมประสาท cerebral gangliaของหอยเป่าชื่อ

เป็นงานวิจัยลำดับต่อไป ที่จะทำการทดลองอย่างต่อเนื่องเพื่อเป็นการทดสอบและแสดงให้เห็นอย่างแน่นอนว่า เซลล์ประสาทใน cerebral ganglion นี้มีการทำหน้าที่ผลิตสารฮอร์โมนที่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าชื่อ โดยใช้เทคนิคการแยกสารและวิเคราะห์สารประเภทโปรตีนด้วยกรรมวิธี โปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิส (Protein electrophoresis) และ Western Blotting (Sambrook *et al.*, 1989) ซึ่งได้ดำเนินการเป็นลำดับ ดังต่อไปนี้

เซลล์ประสาทจากปมประสาท cerebral ganglion จากหอยเป่าฮือโตเต็มวัย (รูปที่ 2)

↓
บดปมประสาทให้ละเอียดใน buffer ด้วย mechanical homogenization

↓
วิเคราะห์แยกหาแถบโปรตีนตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ด้วยวิธี
10% sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

↓
ย้อมสี SDS-PAGE gel ด้วย
Coomassie blue เพื่อวิเคราะห์
การแยกแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ
ที่สกัดจากปมประสาท cerebral
ganglion

↓
การวิเคราะห์และตรวจสอบแถบโปรตีน
ที่ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับ
การเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือโดยใช้
กรรมวิธี Western immunoblotting

↓
ย้ายแถบโปรตีนทั้งหมดจาก SDS-PAGE
gel ลงไปบน nitrocellulose paper ด้วยวิธี
immunoblotting

↓
ย้อมแถบโปรตีนบน nitrocellulose blot
ด้วย primary antibody คือ rabbit anti-
human growth hormone

↓
ย้อมแถบโปรตีนบน nitrocellulose blot
ด้วย secondary antibody คือ biotin -
goat - anti rabbit IgG

↓
ย้อม nitrocellulose blot ด้วย enzyme
conjugated horseradish peroxidase
(HRP) - streptavidin

↓
ย้อมด้วย substrate คือ 3, 3' -
diaminobenzidine (DAB)

สำหรับ control ในการทดลอง ปฏิบัติการโดยแถบโปรตีน nitrocellulose blot ถูกย้อมเฉพาะ secondary antibody , HRP streptavidin และ DAB substrate เท่านั้น

4. การศึกษาและสังเคราะห์สารพันธุกรรม ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) จากเซลล์ภายในปมประสาทซีรีบรอล (cerebral ganglion)

นำปมประสาททั้งหมดใส่ในน้ำยา detergent lysis เพื่อการแยกสลายเซลล์ของเนื้อเยื่อ ให้องค์ประกอบต่าง ๆ รวมทั้งสารพันธุกรรมภายในเซลล์ถูกแยกให้เป็นอิสระต่อกัน แล้วดำเนินการทดลอง สรุปเป็นสังเขป (Sambrook *et al.*, 1989, Sanger *et al.*, 1977) ตามลำดับดังนี้

1. กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมเพื่อการ แยกสาร สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
 - 1.1 การแยกสารพันธุกรรม RNA จากเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neurosecretory cell) ในปมประสาท cerebral ganglion
 - 1.2 การสังเคราะห์สารพันธุกรรม cDNA ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR)
 - 1.3 การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีเมอเรส (cloning PCR-generated DNA fragment)
2. กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ (extraction and purification) เพื่อการเก็บรวบรวมสารพันธุกรรม PCR-generated DNA fragment
3. กระบวนการไลเกชัน (ligation) เพื่อนำ PCR-generated DNA fragment ไปเชื่อมต่อกับสายพันธุกรรมของ vector (plasmid)
4. กระบวนการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย XL-1 blue ให้มีคุณสมบัติเป็น competent cell
5. กระบวนการทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) เพื่อนำ plasmid ที่มี PCR-generated DNA fragment เข้าไปสู่ภายในของ competent cell โดยใช้เซลล์แบคทีเรีย XL-1 blue
6. กระบวนการสกัดสารพันธุกรรมสายผสม (recombinant DNA) จากเซลล์แบคทีเรีย โดยกระบวนการ DNA miniprep
7. กระบวนการวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ในส่วนหนึ่งของ PCR-generated fragments ที่นำจะมีความเกี่ยวข้องเป็นส่วนหนึ่งของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone และ insulin-related hormones

การศึกษาและสังเคราะห์สารพันธุกรรม ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) จากเซลล์ประสาทในปมประสาท cerebral ganglion มีการดำเนินการทดลองโดยละเอียด ดังต่อไปนี้

1. การแยกสารพันธุกรรม RNA โดยรวมจากเซลล์ของปมประสาท cerebral ganglion

วิธีดำเนินการเพื่อการเก็บรวบรวมและแยกสารพันธุกรรม RNA (RNA Extraction) มีลำดับพอสังเขปดังต่อไปนี้

1.1 การบดเนื้อเยื่อของปมประสาท cerebral ganglion (Tissue Homogenization)

เนื้อเยื่อปมประสาท cerebral ganglion ถูกบดในสาร TRIzol reagent (GIBCO BRL) (สารใช้ในการสกัด RNA) โดยใช้ glass-Teflon homogenizer แล้วนำไปปั่นในอุณหภูมิต่ำ เพื่อเก็บสารส่วน supernatant ซึ่งมีส่วนของ RNA อยู่

1.2 การแยกสารพันธุกรรมโดย Phase separation

สาร supernatant ที่มี RNA อยู่ ถูกเติมด้วยสาร Chloroform แล้วนำไปปั่นในอุณหภูมิต่ำ สารละลายที่ผสมกันถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น สารพันธุกรรม RNA อยู่ในชั้นสารที่ใส (aqueous phase) ถูกนำแยกออกมา

1.3 การตกตะกอนสารพันธุกรรมโดย RNA (RNA precipitation)

สารพันธุกรรม RNA ในชั้น aqueous phase ถูกเติมด้วยสาร isopropyl alcohol ภายหลังการปั่นในอุณหภูมิต่ำ สารพันธุกรรม RNA ถูกตกตะกอนลักษณะ gel-like pellet อยู่ที่ด้านล่างของหลอดทดลอง

1.4 การล้างสารพันธุกรรม RNA (RNA washing)

สารพันธุกรรม RNA pellet ถูกล้างด้วย 75% ethanol แล้วถูกนำไปปั่นในอุณหภูมิต่ำ เพื่อเก็บตะกอนของ RNA pellet อีกครั้ง แล้วปล่อยให้แห้งใน dessicator

1.5 การละลายสารพันธุกรรม RNA pellet (RNA redissolving)

สารพันธุกรรม RNA pellet ถูกละลายโดยสาร TE buffer (Tris-HCl, EDTA) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

1.6 การวิเคราะห์ตรวจสอบขนาดและการประเมินปริมาณของสารพันธุกรรม RNA

สารพันธุกรรม RNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ ถูกนำไปทดสอบด้วยวิธีแยกสารและวิเคราะห์สารแบบอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.5% agarose gel ใน TBE buffer ย้อมด้วย ethidium bromide

2. การสังเคราะห์สารพันธุกรรม c DNA ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR)

2.1 การสังเคราะห์สารพันธุกรรม cDNA ของ growth hormone และ insulin-related hormone ด้วยเทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR

การสังเคราะห์สารพันธุกรรม cDNA สายแรกที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone หรือ insulin-related hormone จากสารพันธุกรรม RNA (ที่เตรียมไว้แล้วตามข้อ 1) ของหอยเป่าฮื้อ โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (RT-PCR) โดยที่สารพันธุกรรม cDNA สายแรกถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการทำงานของ Superscript II RNASE H. Reverse transcriptase (GIBCO , BRL) โดยการเติมสารเริ่มต้น reverse primers (ภาคผนวก) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น

ปฏิกิริยาที่ถูกเตรียมขึ้นในขบวนการ RT-PCR มีลำดับดังต่อไปนี้

- RNA จากปมประสาท cerebral ganglion
- mixed nucleotides (NTPs)
- Rnase block ribonuclease inhibitor
- reverse primers สำหรับ growth hormone หรือ insulin-related hormone
- 10x PCR buffer with $MgCl_2$
- superscript II RNASE H. Reverse transcriptase
- DEPC- H_2O

จากนั้นปฏิกิริยา RT-PCR ถูกกำหนดให้ทำงานภายในเครื่อง PCR machine โดยมีการตั้งโปรแกรม ดังนี้

- 10 min($20^{\circ}C$)
- 60 min($42^{\circ}C$)
- 10 min($95^{\circ}C$)
- $4^{\circ}C$

2.2 การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เอนไซม์โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR)

ลำดับต่อไปเป็นการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม DNA ที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone หรือ insulin-related hormone ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

เอนไซม์โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction (PCR) โดยการเติมส่วนของสารเริ่มต้นประเภท forward primers (ภาคผนวก) ที่มีความเหมาะสมและเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม RNA : cDNA hybrids ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการทำปฏิกิริยา RT-PCR ในข้อ 2.1

ปฏิกิริยาที่ถูกเตรียมขึ้นในขบวนการ PCR มีลำดับสังเขปดังนี้

- สารที่ผลิตขึ้นจากขบวนการ RT-PCR สำหรับ growth hormone หรือ insulin-related hormone
- forward primers สำหรับ growth หรือ insulin-related hormones (ภาคผนวก)
- 10x PCR buffer with $MgCl_2$
- Taq-polymerase
- DEPC- H_2O

จากนั้นปฏิกิริยา PCR ถูกกำหนดให้ทำงานภายในเครื่อง PCR machine โดยมี การตั้งโปรแกรม ดังนี้

- 2 นาที ($94^{\circ}C$)
 - 30 วินาที ($94^{\circ}C$)
 - 30 วินาที ($55^{\circ}C$)
 - 1 นาที ($72^{\circ}C$)
 - 4 นาที ($72^{\circ}C$)
 - $4^{\circ}C$
- } จำนวน 40 รอบ

2.3 การวิเคราะห์ตรวจสอบและประเมินปริมาณของสารพันธุกรรม DNA ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (DNA electrophoresis)

จากปฏิกิริยา RT-PCR ในข้อ 2.1 และ PCR ในข้อ 2.2 จะเป็นการก่อให้เกิดการสังเคราะห์ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ growth hormone หรือ insulin-related hormone สายนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม DNA เหล่านี้ ถูกเรียกว่า PCR-generated DNA fragments โดยที่ขนาดความยาวของสายนิวคลีโอไทด์เหล่านี้จะมีขนาดขึ้นอยู่กับ การกำหนดตำแหน่งของ forward primers และ reverse primers การวิเคราะห์ตรวจสอบและ การประเมินปริมาณของสารพันธุกรรม DNA : PCR-generated DNA fragments ถูกดำเนินการโดยขบวนการแยกสารและวิเคราะห์สารด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 1.5% agarose gel ใน TBE buffer, ย้อมด้วย ethidium bromide และดูผลด้วยการผ่านแสง UV-light

3. กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ (extraction and purification) เพื่อการเก็บรวบรวมสารพันธุกรรม PCR - generated DNA fragment โดยใช้ QIA quick PCR purification kit (QIAGEN COMPANY) โดยที่ PCR fragment จะถูกคัดแยกออกมา และกำจัดสารกลุ่ม primers, nucleotides, polymerase และ salts ที่ถูกใช้กระบวนการ PCR ทิ้งไป

- 3.1 เติม buffer PB เป็นจำนวน 5 เท่า ของ PCR mixture ใน QIAquick spin column ทั้งนี้เพื่อทำให้เกิดการยึดเกาะ (binding) ของ PCR fragment กับ QIA quick column จากนั้นนำ QIAquick column วางลงใน 2-ml collection tube และปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็ว 13000 rpm
- 3.2 ทิ้งส่วนของสารที่เคลื่อนผ่าน (flow-through) QIA quick column และวาง QIA quick column ลงใน collection tube
- 3.3 ล้างสารส่วนที่ยึดเกาะบน QIA quick column ด้วย buffer PE จำนวน 0.75 ml แล้วปั่นเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของสารที่เคลื่อนผ่าน แล้วปั่น QIA quick column อีกครั้งหนึ่งเป็นเวลา 1 นาที
- 3.4 นำ QIA quick column ใส่ใน 1.5 ml microfuge tube
- 3.5 เติม buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) จำนวน 50 μ l ลงบนแผ่นเยื่อ (membrane) ของ QIA quick column ปั่นเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม buffer EB อีก 30 μ l บนแผ่นเยื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงปั่นอีกครั้งหนึ่ง
- 3.6 เก็บรวบรวมสารใน elution buffer (buffer EB) ซึ่งน่าจะเป็น PCR-generated DNA fragment ที่ถูกคัดเลือกและทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปทดสอบโดยวิเคราะห์สารแบบอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.5% agarose gel ใน TBE buffer ย้อมด้วย ethidium bromide

4. กระบวนการไลเกชัน (ligation) เพื่อการนำ PCR - generated DNA fragment ไปเชื่อมต่อกับสายพันธุกรรมของ vector ตรงตำแหน่งของ multiple cloning site ในการทำการทดลองครั้งนี้ ใช้ vector จำนวน 2 ชนิด

4.1 การเตรียม Vector

- 4.1.1 Ligation ที่ใช้ p-Bluescript SK(+) Vector ขนาด $\approx$ 3.0 kb (Stratagene) เนื่องจากตั้งสมมุติฐานว่า PCR-generated DNA fragment

ที่ได้ควรจะเป็น blunt-ended DNA fragment จึงได้เตรียม digested vector ตามปฏิกิริยาต่อไปนี้ ที่ 37°C, ตลอดคืน

- p-Bluescript vector
- EcoRV restriction enzyme
- Buffer for EcoRV (10X)
- H₂O

ผลที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้น ทำให้ได้ EcoRV - digested P-Bluescript vector เพื่อที่จะเตรียมพร้อมในการทำ ligation

4.1.2 ligation ที่ใช้ p-GEMT Vector ขนาด $\approx$ 3.0 kb (Promega)

เนื่องจากมีรายงานว่า โดยทั่วไป PCR-generated DNA fragment ที่ได้จะไม่เป็น blunt-ended DNA fragment อย่างสมบูรณ์ แต่จะมี deoxyadenosine (A) จำนวน 1 ตัว อยู่ปลาย 3' end ของแต่ละข้างของ PCR fragment (3'-A overhang) ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาในการ ligation กับ blunt-ended vector ได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เตรียมการทดลองเพิ่มเติม โดยใช้ p-GEMT vector เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ ligation โดยที่ p-GEMT vector เป็น vector ที่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยการใช้ restriction enzyme EcoRV ไปตัด (digest) ให้เป็น blunt-ended vector แล้ว เติม 3' thymidine (3'-T overhang) ไปทั้งสองข้างของ vector

4.2 ปฏิกิริยา ligation

ปฏิกิริยา ligation ระหว่าง PCR-generated DNA fragment และ EcoRV-digested p-Bluescript vector / หรือ p-GEMT vector ปฏิกิริยา มีดังต่อไปนี้

- EcoRV-digested p-Bluescript vector หรือ p-GEMT vector
- PCR-generated DNA fragment
- ligase (Promega)
- buffer for ligase
- H₂O

5. กระบวนการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย XL-1 Blue ให้มีคุณสมบัติเป็น competent cell เลือกแบคทีเรีย XL-1 Blue (strategene) เพื่อเตรียมให้มีคุณสมบัติเป็น competent cell ดังมีลำดับขั้นตอนต่อไปนี้

- 5.1 นำหนึ่งโคโลนี (colony) ของ *E.coli* strain XL-1 Blue เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ที่ 37°C
 - 5.2 นำ XL-1 Blue ใน LB broth ที่เตรียมแล้ว ใส่ใน 1 litre ของ LB broth เลี้ยงเซลล์ ต่อที่ 37°C , 300 rpm จนกระทั่งวัดค่า OD ได้ 0.5 ที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm
 - 5.3 นำไปปั่นที่ 600 rpm, 4°C เวลา 8 นาที รวบรวม pellet ของเซลล์ และเติม 20 ml ของ 0.1 M $MgCl_2$ พร้อมทั้งเขย่า
 - 5.4 ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามข้อ 5.3 แต่เปลี่ยนเป็นเติม 20 ml ของ 0.1 M $CaCl_2$ แล้ว วางไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
 - 5.5 นำเซลล์ไปปั่นที่ 6000 rpm, เวลา 8 นาที , 4°C รวบรวม pellet ของเซลล์ เติม 4.3 ml ของ 0.1 M $CaCl_2$ และ 7 ml ของ glycerol
 - 5.6 แบ่งเซลล์ออกเป็นจำนวนเท่า ๆ กัน ประมาณ 100 μ l ใน 1.5 ml tube พร้อมทั้ง วางใน liquid N_2 อย่างรวดเร็วเป็นเวลา 5 นาที และเก็บรักษาเซลล์ต่อไปที่อุณหภูมิ -80°C
6. กระบวนการทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) เมื่อการนำ ligated product (plasmid ที่มี PCR-generated DNA fragment) เข้าไปสู่ภายใน XL-1 Blue competent cell ดังมี ลำดับขั้นตอนต่อไปนี้
- 6.1 นำ ligated product จำนวนประมาณ 0.1 - 50 ng ใส่ใน 15 ml tube
 - 6.2 นำ competent cell 100 μ l ที่เก็บรักษาที่ 80°C ออกมาสู่อุณหภูมิห้อง เพื่อเทใส่ ไปในข้อ 6.1 แล้วเขย่าเบา ๆ วางบนน้ำแข็งประมาณ 20 นาที
 - 6.3 นำ competent cell + ligated product ไปใส่ใน water bath ที่ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที ในขั้นตอนที่เรียกว่า heat shock แล้วจึงวางในน้ำแข็ง 2 นาที
 - 6.4 เติม 0.9 ml ของ SOC medium แล้วจึงวางไว้ที่ 37°C , เป็นเวลา 30 นาที พร้อมเขย่าที่ 250 rpm
 - 6.5 นำ 100-200 μ l ของเซลล์ที่เตรียมแล้วในข้อ 6.4 ไปแผ่กระจายบน Agar plate ที่มี ampicillin (50 μ g/ml), 5% X-gal และ 100 mM IPTG เลี้ยงเซลล์ที่ 37°C, ตลอดคืน
 - 6.6 ทำการคัดเลือกโคโลนี (blue / white colony) เพื่อหา positive clone

7. กระบวนการสกัด DNA สายผสม (recombinant DNA) ของ Vector ที่มี PCR-generated DNA fragment จากแบคทีเรีย XL-1 Blue competent cell โดยกระบวนการ Mini Preparation of plasmid DNA (Birnboim and Doly, 1979)

7.1 นำ single colony สีขาวมาเลี้ยงในอาหาร LB broth 5 ml. โดย incubate ที่ 37°C ตลอดคืนและเขย่าตลอดเวลา

7.2 นำไปปั่นที่ 4000 rpm เวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป นำตะกอนไปละลายด้วย solution I จำนวน 200 μ l (ภาคผนวก) เก็บไว้ใน tube ขนาด 1.5 ml.

7.3 เติม Solution II 400 μ l (ภาคผนวก) ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

7.4 เติม Solution III 300 μ l (ภาคผนวก) นำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที

7.5 ไปปั่นที่ 12,000 g เวลา 5 นาที เทส่วนของเหลวใส่ใน tube ใหม่

7.6 เติม isopropanol (2-propanol) 0.6 เท่าของ total volume ครั้งแรก ผสมกันแล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g , 5 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol นำไปปั่นที่ 12,000 g , 5 นาที นำตะกอนใส่ใน desiccator จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer เก็บไว้ที่ 4°C หรือ -20°C

7.7 นำไปวิเคราะห์สาร DNA ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 1.5% agarose gel ใช้ λ -Hind III-Eco-RI marker เป็น standard DNA โดยเติมสาร RNAase เพื่อย่อย RNA ของแบคทีเรียทิ้ง เพื่อที่จะได้ปรากฏ band ของ DNA ที่ชัดเจนขึ้น

8. กระบวนการวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ PCR-generated fragments ที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องเป็นส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone และ insulin-related hormones

การดำเนินกิจกรรมเกี่ยวกับการศึกษาและวิจัยในส่วนนี้ ได้ทำการส่งตัวอย่างของ recombinant DNA) ของ Vector ที่มี PCR-generated DNA fragment จากแบคทีเรีย XL-1 Blue competent cell ที่เป็น positive clone ที่เตรียมได้จากข้อ 6 และ 7 โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ที่สถาบันส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

(สวทช)

ผลการทดลองและการวิเคราะห์

1. การศึกษาโครงสร้างทางด้านกายวิภาคของปมประสาท cerebral ganglia ในหอยเป่าฮือ

จากผลการศึกษาทางด้านกายวิภาคของปมประสาท cerebral ganglion ในระดับจุลทรรศน์ ธรรมดาเพื่อศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคศาสตร์ แสดงตำแหน่งด้านบน (dorsal: Dor) และด้านล่าง (ventral: Ve) ของหอยเป่าฮือ (รูปที่ 1A) ตำแหน่งของหนวด (tentacle: tt) และ ตำแหน่งของ cerebral ganglion (ลูกศร) ซึ่งอยู่ภายใน (รูปที่ 1B) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ พบตำแหน่งปมประสาทที่ 1 (cerebral ganglia) และ มัดของเส้นประสาทที่อยู่บริเวณแกนของตำแหน่ง medulla โดยทอดตัวไปตามแนวยาวของปมประสาท cerebral โดยที่ปมประสาทชนิดนี้อยู่บริเวณส่วนหัวทางด้านหน้าและด้านล่าง มีขนาดเล็กมากประมาณเฉลี่ย 0.2-0.3 มม. (รูปที่ 2 A,B)

2. การศึกษากลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neuroendocrine cells) ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต (growth and related hormones) จากปมประสาท cerebral ganglion

จากการศึกษากลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neuroendocrine cells) ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต (growth and related hormones) จากปมประสาท cerebral ganglion โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry แบบ immunoperoxidase มีการ ใช้ Rabbit anti human growth hormone เป็น primary antibody (การศึกษาในโครงการวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา เรื่อง การศึกษาโครงสร้างหน้าที่และความสัมพันธ์ของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือพันธุ์พื้นเมือง *Haliotis asinina* Linnaeus ; โครงการ ศ.ดร. ประเสริฐ โสภณ (หัวหน้า โครงการ) และคณะ พบว่ามีกลุ่มเซลล์ประสาทใน cerebral ganglion ประเภท neurosecretory cells ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตซึ่งแสดงผลออกมา โดยการย้อมติดสีอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างสารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตนี้ จากการศึกษาดังกล่าว พบว่า กลุ่มเซลล์ประสาทของปมประสาทของ cerebral ganglion โดยเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่กระจายอยู่ตามบริเวณ cortex ของปมประสาท มีการแสดงปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของตำแหน่งของสารฮอร์โมนที่ เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) โดยแสดงผลทางปฏิบัติการเป็นการติดสีน้ำตาลเข้ม จากปฏิกิริยาของ immunoperoxidase (รูปที่ 3 A-D) จากภาพกำลังขยายสูง (รูปที่ 3 C, D) พบว่า เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neurosecretory cells-NS) ประเภท growth hormone ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยไซโตพลาสซึมของเซลล์เหล่านี้แสดง แกรนูลสีน้ำตาลขนาดใหญ่เรียงตัวอยู่อย่างหนาแน่น

นอกจากนี้ มัดของเส้นประสาท (Nt) ที่อยู่บริเวณแกนของตำแหน่ง medulla โดยทอดตัวไปตามแนวยาวของปมประสาท cerebral ganglion แสดงผลทางปฏิบัติการติดสีน้ำตาลเข้มที่เป็นปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งของสารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) (รูปที่ 3 A , B)

3. การวิเคราะห์สารฮอร์โมน (กลุ่มโปรตีน) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related -hormone) ในปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป่าฮื้อ

เป็นการศึกษาทางด้านชีวเคมีและเซลล์วิทยาเพื่อศึกษาและวิเคราะห์กลุ่มฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ และวิเคราะห์ขนาดของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้เทคนิคการแยกสารและวิเคราะห์สารประเภทโปรตีน ด้วยวิธี Protein electrophoresis และ Western blotting พบว่ามีกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ที่ถูกสกัดมาจากปมประสาท cerebral ganglion แสดงตำแหน่งและขนาดของน้ำหนักโมเลกุลเป็นแถบสีน้ำตาลซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาอย่างเฉพาะเจาะจงทาง Immunity ระหว่าง primary antibody , secondary antibody และ substrate บนแผ่น nitrocellulose blot

3.1 การแยกแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่สกัดจากปมประสาท cerebral ganglion โดยกรรมวิธี SDS-PAGE electrophoresis

การวิเคราะห์การแยกแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่สกัดจากปมประสาท cerebral ganglion ด้วยกรรมวิธีแบบ SDS-PAGE electrophoresis เน้นการแยกแถบโปรตีนตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) โดยมีการใช้แถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดสูงและขนาดต่ำ (high and low molecular weight markers) เป็นตัวแถบโปรตีนเปรียบเทียบกับ SDS-PAGE gel ถูกนำมาย้อมด้วยสี Coomassie blue เพื่อแสดงถึงแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จากจากปมประสาท cerebral ganglion มองเห็นได้เป็นแถบสีน้ำเงินบนแผ่น gel (รูปที่ 4A)

แถบโปรตีนต่าง ๆ ที่ถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลจากปมประสาท cerebral ganglion ใน lanes 2 , 3 และ 4 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน แถบโปรตีนต่าง ๆ เหล่านี้อาจเป็นกลุ่มโปรตีนชนิดต่าง ๆ รวมทั้งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ (ซึ่งเป็นที่สนใจในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้) นอกจากนี้ ยังอาจมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของปมประสาท เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของปมประสาท ฉะนั้นในลำดับนี้ ผลที่แสดงออกมาบน SDS-PAGE gel มีแถบสีน้ำเงินแสดงตำแหน่งของโปรตีนที่น่าสนใจและเด่นชัดตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลจากน้ำหนักโมเลกุลมากไปหาน้อยเป็นจำนวนประมาณ 8 แถบ โดยย้อมติดสี Coomassie blue เห็นเป็นแถบสีน้ำ

เงินแต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าแถบโปรตีนใดเป็นตัวแทนของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือ (รูปที่ 4A)

3.2. การวิเคราะห์แถบโปรตีนที่เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในหอยเป่าฮือ โดยกรรมวิธี Western Blotting

แถบโปรตีนชนิดต่างๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน ถูกย้ายจาก SDS-PAGE gel ไปบน nitrocellulose blot และถูกย้อมอย่างเฉพาะเจาะจง ด้วย primary antibody คือ rabbit anti-human growth hormone ในสัดส่วน 1:100 และ 1:500 สำหรับ secondary antibody คือ biotin goat anti rabbit IgG ในสัดส่วน 1:500 จากนั้นแผ่น nitrocellulose blot ถูกย้อมด้วย Enzyme conjugated HRP - streptavidin และ DAB Substrate ตามลำดับ

แถบโปรตีนที่มี epitope ร่วมกับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตเท่านั้น จึงจะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างเฉพาะเจาะจงทางอิมมูโนบล็อตติง (Immunoblotting) ระหว่าง primary antibody , secondary antibody และ substrate ที่ถูกใช้ในการทดลองในครั้งนี้ โดยจะแสดงผลออกเป็นแถบสีน้ำตาลบนแผ่น nitrocellulose blot ตำแหน่งบน lanes 3 และ 4 ของ nitrocellulose blot แสดงแถบโปรตีนสีน้ำตาลอย่างชัดเจนจำนวน 2 แถบ เป็นแถบโปรตีนที่น่าจะเกี่ยวข้อง เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) สกัดจากปมประสาท cerebral ganglion โดยมีน้ำหนักโมเลกุลปรากฏที่ระดับ 130 และ 95 kD (รูปที่ 4B) อย่างไรก็ตาม โปรตีนเหล่านี้ มีน้ำหนักโมเลกุลที่ค่อนข้างสูงมาก จึงสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่ยังคงอยู่ในโครงสร้างที่เป็น pre-protein ซึ่งยังไม่ใช่เป็น functional form

4. การศึกษาและสังเคราะห์สารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต growth hormone และ insulin-related hormone จากเซลล์ประสาทในปมประสาท cerebral ganglion

รายละเอียดของการดำเนินกิจกรรมเกี่ยวกับการศึกษาและวิจัย พร้อมทั้งผลการทดลอง ได้กระทำซ้ำเป็นจำนวนหลายครั้ง เนื่องจากจำเป็นต้องจัดเตรียมหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด และ ได้ผลการทดลองตามวัตถุประสงค์ ดังจะนำเสนอผลการทดลองในภาพรวม ดังนี้

4.1 การแยกสารพันธุกรรม RNA โดยรวมจากเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนของปมประสาท cerebral ganglion

การวิเคราะห์ตรวจสอบและประเมินปริมาณของสารพันธุกรรม RNA ด้วยเทคนิค electrophoresis , 1.5% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide พบว่าการคัดแยกสาร

พันธกรรม RNA จากปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป้าฮื้อ *H. asinina* ได้ผลถูกต้องชัดเจน โดยมีการแสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของแถบ (bands) ของสารพันธกรรมของ RNA ชนิดต่าง ๆ แยกห่างออกจากกันได้ชัดเจนพอสมควร (รูปที่ 5, lanes 1-7, 9-10) การแยกสารพันธกรรม RNA โดยวิธีนี้ จะเป็นกลุ่มของ RNA ทั้ง Ribosomal RNA, และ mRNA จากปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป้าฮื้อ โดย RNA ที่มีขนาดเล็กจะถูกผลักดันให้เดินทางในอัตราเร็วกว่า RNA ขนาดใหญ่ ดังนั้น RNA ขนาดใหญ่แสดงตำแหน่งของ bands ทางด้านบนของ gel ในขณะที่ RNA ขนาดเล็กแสดงตำแหน่งของ bands ทางด้านล่างของ gel

4.2 การสังเคราะห์สารพันธกรรม DNA ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต growth hormone และ insulin-related hormone โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR)

การทดลองได้ดำเนินการตามวัตถุประสงค์เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารพันธกรรม c DNA ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR) พร้อมทั้งดำเนินการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธกรรม DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ (extraction and purification) เพื่อการเก็บรวบรวมสารพันธกรรม PCR-generated DNA fragment เพื่อการทดลองขั้นต่อไป

การวิเคราะห์ตรวจสอบและประเมินปริมาณของสารพันธกรรม PCR-generated DNA fragments ด้วยเทคนิค electrophoresis , 1.5% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide ประกอบด้วย การวิเคราะห์คำนวณขนาดของ PCR-generated DNA fragments ของ growth hormone และ insulin related hormone ทำให้ประเมินได้ว่า ขนาดของ PCR-generated DNA fragments มีขนาดประมาณ 200-450 nucleotides (รูปที่ 6, lane 2-7) การทำ electrophoresis ในช่วงนี้ มีการใช้ standard marker DNA เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยมีการใช้ Standard DNA Ladder 100 basepairs (bp) (Promega 323-15) แสดงตำแหน่ง 12 bands คือ 1500, 1200 , 1000 , 900 , 800 , 700 , 600 , 500 , 400 , 300 , 200 และ 100 bp ตามลำดับ แต่ทว่าไม่สามารถเห็นได้ชัดเจนทุกตำแหน่งของ bands สำหรับ DNA ที่ 1000 และ 500 bp มีความเข้มของ band มากที่สุด (รูปที่ 6 , lane 1)

ผลการคำนวณขนาดของ PCR-generated DNA fragments ควรมีลำดับดังนี้ (รูปที่ 6)

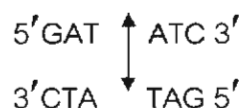
lane	Sample PCR-generated DNA fragments	reverse primer	forward primer	expected size of DNA fragment (basepairs)
2. 6	insulin-related hormone	INS R1	INS FO	380
3. 7	insulin-related hormone	INS R1	INS F1	230
4. 8	growth hormone	Growth R1	Growth F1	410
5. 9	growth hormone	Growth R1	Growth F2	440

4.3 กระบวนการไลเกชัน (ligation)

ในการทดลองที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไลเกชัน มีการใช้ vector จำนวน 2 ชนิด ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

4.3.1 EcoRV - digested P-Bluescript vector

P-Bluescript vector จาก strategene เป็น circular coiled plasmid มีขนาดประมาณ 3 kb รายละเอียดและ DNA map ของ vector นี้ เมื่อถูกนำมาตัดด้วย EcoRV ตรงบริเวณ multiple cloning site (MCS) ตามตำแหน่งลำดับของ nucleotides ต่อไปนี้



ผลที่ได้ คือ blunt-ended plasmid ที่เป็น linear form เมื่อมาวิเคราะห์และตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis พบว่า circular coiled plasmid ซึ่งมีโครงสร้างที่ขนาดเล็กกว่า จะถูกผลักดันให้เดินทางในอัตราเร็วกว่า แสดงตำแหน่งของ DNA bands ทางด้านล่างของ gel (รูปที่ 7, lane 1) แต่ linear plasmid ซึ่งมีโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่กว่า เดินทางในอัตราที่ช้ากว่า และแสดงตำแหน่งของ DNA bands ทางด้านบนของ gel โดยอยู่ตรงบริเวณตำแหน่ง 3 kb (รูปที่ 7, lane 2) เมื่อเทียบกับ marker (รูปที่ , lane 1)

ผลที่ได้จาก ligation คาดว่า มีการเชื่อมติดของ PCR-fragment กับ linear form ของ p-Bluescript vector แล้วมีผลทำให้ได้ circular form ของ p-Bluescript กลับมาอีกครั้งหนึ่ง แต่ทว่ามีการเพิ่มของสารพันธุกรรม DNA ที่กำลังศึกษา

4.3.2 p-GEMT vector

p-GEMT vector จาก Promega เดิมเป็น circular colled plasmid มีขนาดปริมาณ 3.0 kb รายละเอียดและ DNA map ของ vector นี้ แต่ได้รับการตัด

ด้วย EcoRV ตรงบริเวณ multiple cloning site กลายเป็น linear form แล้วมีการเติม 3'-T over hang ทั้งสองข้างของ linear form plasmid เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ผลที่ได้จาก ligation คาดว่าเป็น PCR-fragment ที่น่าจะมี 3'-A over hang ของ linear form ของ p-GEMT vector แล้วมีผลทำให้ได้ circular form ของ p-GEMT vector กลับมาอีกครั้งหนึ่ง แต่ทว่ามีการเพิ่มของสารพันธุกรรม DNA ที่กำลังศึกษา

4.4 XL-1 Blue competent cell และกระบวนการ transformation

ในการทดลองลำดับต่อไป จะต้องมีการเตรียมและดำเนินการทดลองที่เกี่ยวข้องและต่อเนื่องกัน ดังนี้

4.4.1 กระบวนการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย XL-1 Blue ให้มีคุณสมบัติเป็น competent cell

4.4.2 กระบวนการทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) โดยมีการนำ ligated product (plasmid ที่มี PCR-generated DNA fragment) เข้าไปสู่ภายใน XL-1 Blue competent cell

4.4.3 กระบวนการสกัด DNA สายผสม (recombinant DNA) ของ Vector ที่มี PCR-generated DNA fragment จากแบคทีเรีย XL-1 Blue competent cell โดยกระบวนการ Mini Preparation of plasmid DNA

การเตรียมเซลล์ *E. coli* XL-1 Blue ให้อยู่ในสภาพ competent cell โดยใช้ CaCl_2 เป็นตัวกระตุ้น active transport แล้วจึงมีการนำ ligated product (plasmid ที่มี PCR-generated DNA fragment) ใส่เข้าไปใน competent cell XL-1 Blue แล้วนำไปเลี้ยงบน agar plate (ภาคผนวก) ที่มี ampicillin, X-gal และ IPTG แล้วคัดเลือก white/blue colony

เนื่องจาก plasmid ที่ใช้ในการทดลองนี้มีส่วนของ lac Z gene ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิด α -complementation สำหรับการคัดเลือก blue/white colony ของ recombinant part (หมายถึง ส่วนของ ligated product) โดยทั่วไปเมื่อ plasmid ไม่มี recombinant part เข้าไปติดอยู่ T7 และ T3 promoters (ใน p-Bluescript vector) เรียงตัวสัมพันธ์กับ multiple cloning site พร้อมไปด้วยกับลำดับของ coding regio สำหรับโปรตีนของ enzyme β - galactosidase

เมื่อมีการทำงานของ promoters และ lac Z gene จึงทำให้ coding region ทำงานและสร้างโปรตีน β - galactosidase และด้วยการทำงานของ X - gal และ IPTG ทำให้ได้มีการแสดงออกของสีเป็น blue colony

แต่ถ้า plasmid มี recombinant part เข้าไปตรง multiple cloning site ซึ่งมีผลเป็น insertional inactivation ต่อกระบวนการทำงานและการแสดงออก coding region สำหรับ β - galactosidase ทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีนนี้ออกมาได้ และส่งผลให้การแสดงออกมาเป็น white colony ซึ่งถือว่าเป็น positive clone ของการทดลองครั้งนี้ เพราะแสดงว่า ใน colony นี้ competent cell มี ligated product นั้นหมายถึงมีส่วนของสารพันธุกรรม PCR - product ที่เรากำลังศึกษาอยู่ ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 8

ผลการทดลองครั้งที่ 1

จำนวน colony ที่นับได้ดังแสดงในตาราง

PCR-generated DNA fragments ที่ใช้ primer ชนิด	จำนวน colonies		
	white	blue	total
INS R1 + INS F0	4	3	7
INS R1 + INS F1	45	113	158
Growth R1 + Growth F1	38	59	97
Growth R1 + Growth F2	4	24	28

ผลการทดลองครั้งที่ 2

จำนวน colony ที่นับได้ดังแสดงในตาราง

PCR-generated DNA fragments ที่ใช้ primer ชนิด	จำนวน colonies		
	White	Blue	Total
INS R1 + INS F0	2	0	2
INS R1 + INS F1	0	3	3
Cloned p-Bluescript vector	0	12	12

ปัญหาที่เกิดขึ้น พบว่าเมื่อนำ transformed XL-1 Blue cells ที่ใช้ primers ประเภทต่างๆ กัน (จากการทดลองในช่วง RT-PCR และ PCR) ไปเลี้ยงบน agar plate ที่มี ampicillin, X-gal และ IPTG แล้วคัดเลือก white/blue colony พบว่า ไม่สามารถแยก colony เดี่ยวๆ ออกมาจากกันได้ และ colonies จำนวนมากเกิดการรวมตัวกันเนื่องจากปัจจัยในการควบคุมสภาพของ media agar ไม่ดีพอ media agar มีความชื้นและมีส่วนที่เป็นของเหลวออกมามาก จึงจำเป็นต้องทำการทดลองใหม่ ทำการเลี้ยง transformed XL-1 Blue cells cell บน media agar ใหม่ และควบคุมสภาพแวดล้อมให้ดีขึ้น ปรากฏว่าเกิด colony เดี่ยวๆ ที่มีทั้งสีขาวและสีฟ้าครบตามทุกชนิดของ primers ซึ่งทำการนับจำนวนของ white/blue colonies ได้ดังตาราง

ผลการทดลองครั้งที่ 3

จำนวน colony ที่นับได้ดังแสดงในตาราง

PCR-generated DNA fragments ที่ใช้ primer ชนิด	จำนวน colonies		
	White	Blue	Total
INS R1 + INS F0	4	3	7
INS R1 + INS F1	45	113	158
INS R2 + INS F0	48	45	93
INS R2 + INS F1	31	339	370
Growth R1 + Growth F1	38	59	97
Growth R1 + Growth F2	4	24	28
Cloned p-Bluescript vector	0	410	410

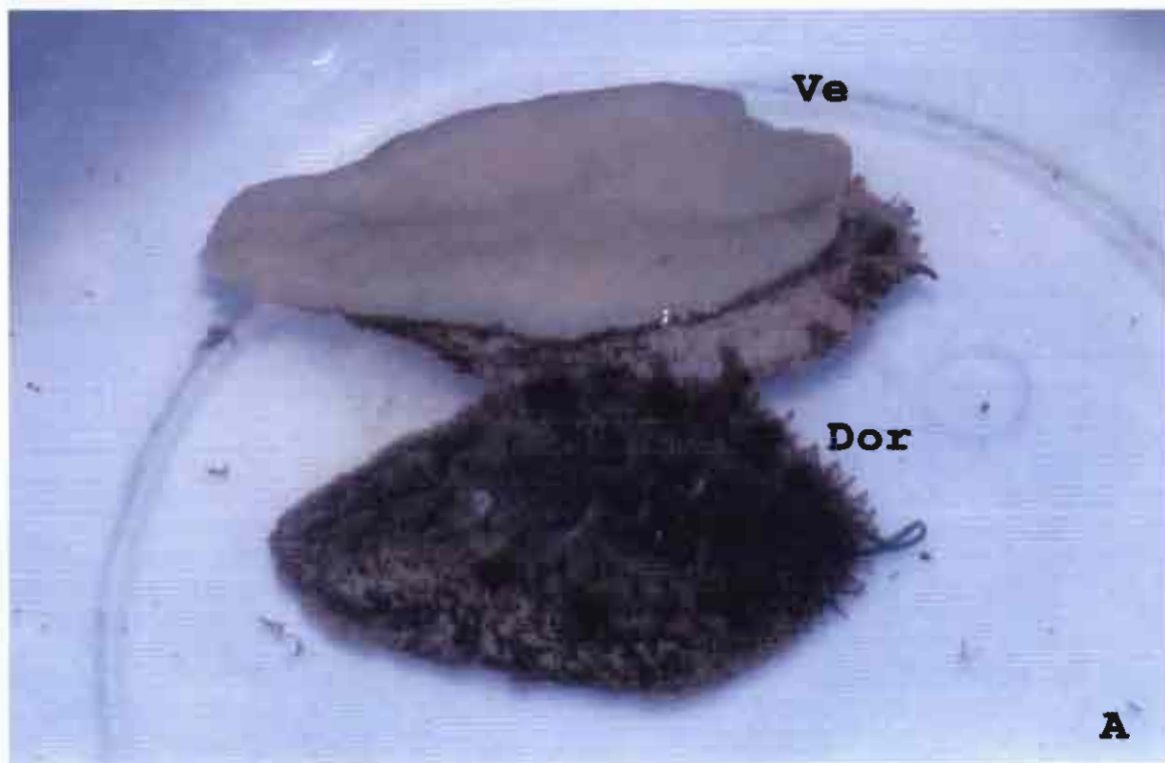
เมื่อทำการทดลองสกัด DNA สายผสมจากแบคทีเรีย (Mini-preparation of recombinant plasmid DNA) โดยนำ white colony ที่ได้โดยการใช้ forward และ reverse primers ชนิดต่างๆ กัน และนำ blue colonies ที่ได้จาก positive control ของ p-Bluescript plasmid แล้วนำ DNA สายผสมไปทดสอบโดยวิธี electrophoresis บน 1.5% agarose gel พบว่ามีผลของ DNA ที่สกัดได้จริง (รูปที่ 9) จากนั้นจึงทำกระบวนการสกัด DNA สายผสม (Vector ที่มี PCR-generated DNA fragment) จากแบคทีเรียที่เป็น positive clone ด้วยกระบวนการ mini preparation of plasmid DNA และ restriction enzymes testing (รูปที่ 10,11)

4.5 กระบวนการวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ PCR-generated fragments ที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องเป็นส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone และ insulin-related hormones

การดำเนินกิจกรรมเกี่ยวกับการศึกษาและวิจัยในส่วนนี้ ได้ทำการส่งตัวอย่างของ recombinant DNA) ของ Vector ที่มี PCR-generated DNA fragment จากแบคทีเรีย XL-1 Blue competent cell ที่เป็น positive clone ที่เตรียมได้จากข้อ 4.3 และ 4.4 โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

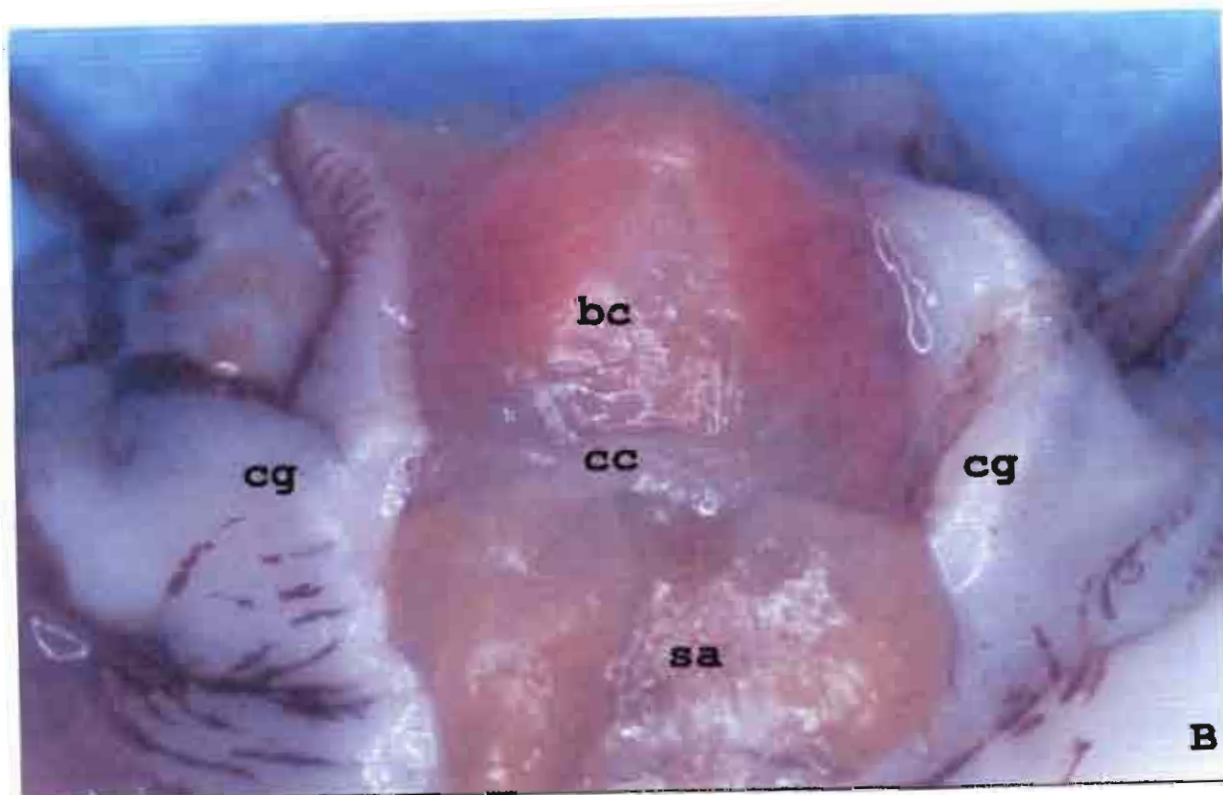
รูปที่ 1

- A) หอยเป้าฮ็อตโตเต็มวัย (*Haliotis asinina* Linnaeus) อายุประมาณ 3 ปี
 หอยเป้าฮ็อตถูกแสดงตำแหน่งการมองทางด้านบน : dorsal part (Dor) และ
 ทางด้านล่าง : Ventral part (Ven)
- B) หอยเป้าฮ็อตถูกแสดงตำแหน่งทางด้าน dorsal part โดยมีการยื่นหัวออกไป
 ทางด้านซ้ายแสดงตำแหน่งของหนวด : tentacle (tt) , ตำแหน่งของ cerebral
 ganglion (ลูกศร) ซึ่งอยู่ภายใน



รูปที่ 2

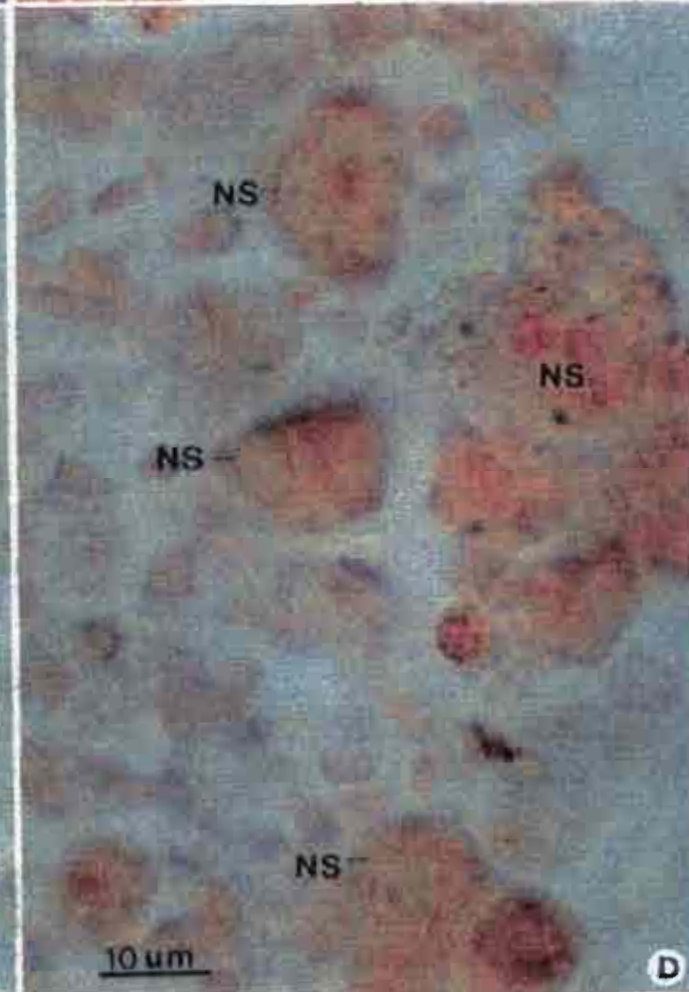
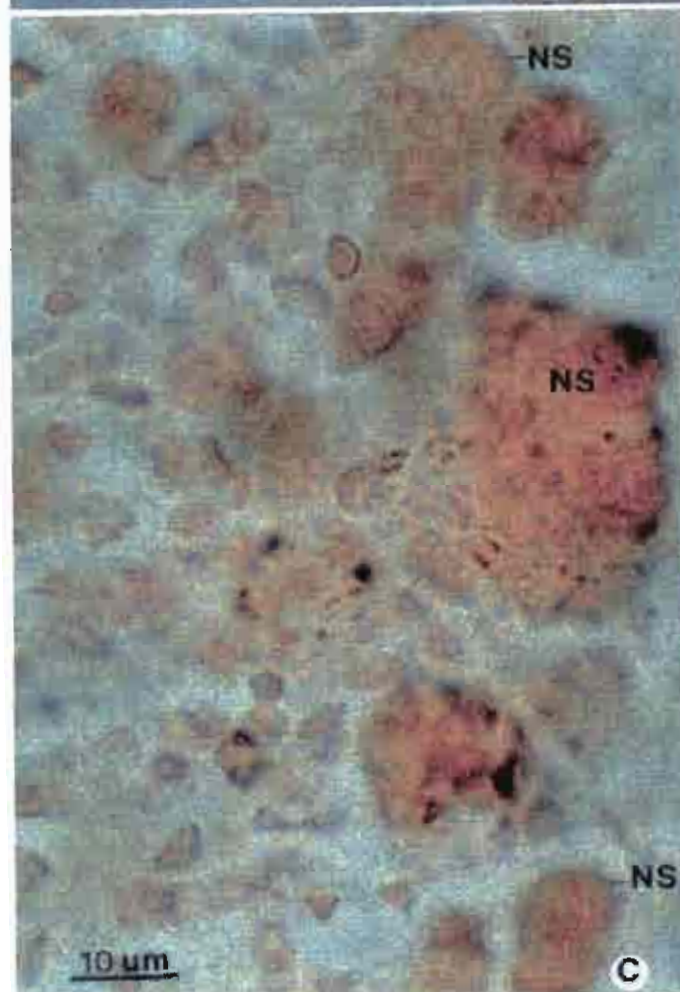
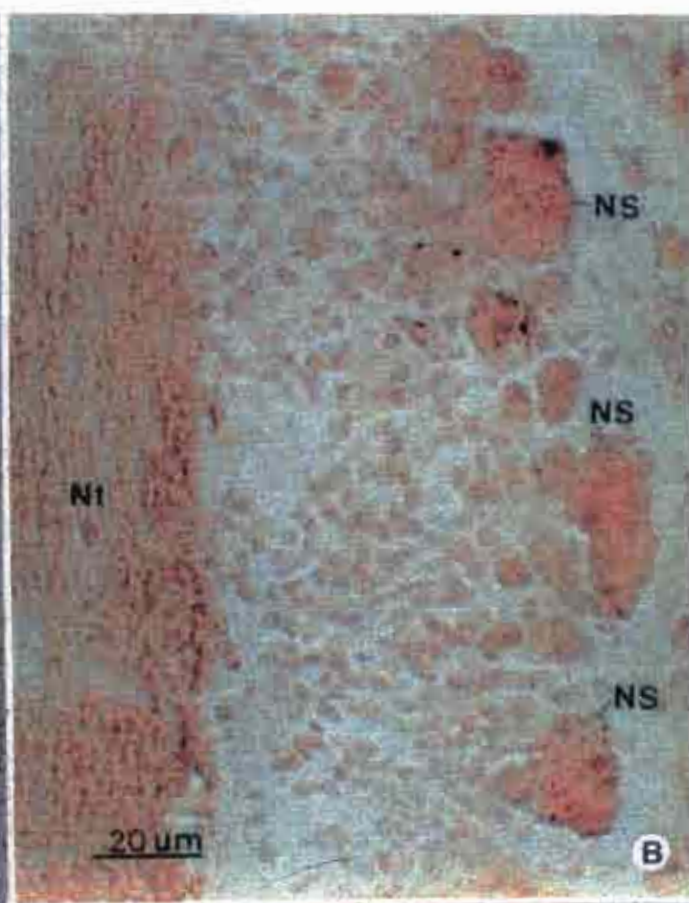
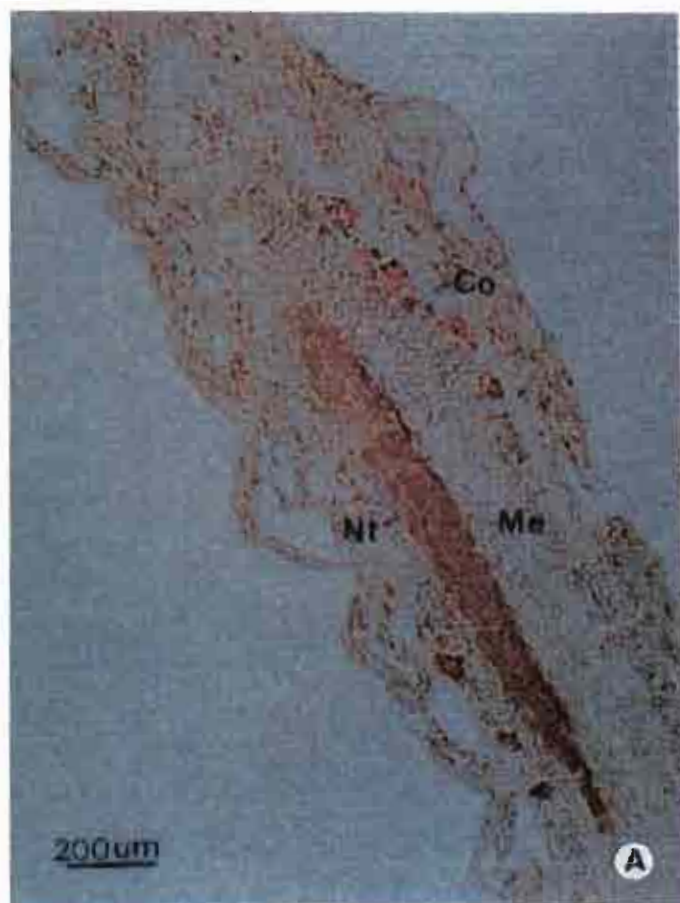
- A) หอยเป่าฮื้อในระดับกำลังขยายต่ำ เปลือกแข็งทางด้าน dorsal ถูกนำออก บริเวณที่ลูกศรชี้ แสดงตำแหน่งของปมประสาท cerebral ganglia (cg) ซึ่งวางตัวอยู่ภายใน
- B) หอยเป่าฮื้อในระดับกำลังขยายต่ำและสูงทางด้าน dorsal ที่เปลือกแข็งถูกนำออก แล้วถูกผ่าแสดงตำแหน่งและลักษณะของปมประสาท cerebral ganglia (cg) และ cerebral commissure (cc) ซึ่งวางตัวใกล้เคียงกับท่อทางเดินอาหาร ส่วนต้น : buccal mass (bc) และต่อมน้ำลาย : salivary gland (sa)



รูปที่ 3

ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โดยใช้เทคนิค immuno cytochemistry : immunoperoxidase แสดงการย้อมสี และตำแหน่งของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) จากปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป่าฮื้อ โดยใช้ rabbit anti human growth hormone (primary antibody) , biotin-goat-anti rabbit IgG (secondary antibody), HRP-Streptavidin และ DAB substrate

- A) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงการติดสีน้ำตาลเข้มของมัดประสาท (Nt) ในส่วนกลางของ medulla (Me) และการติดสีน้ำตาลเข้มของกลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในบริเวณ cortex (Co)
- B) ภาพกำลังสูงของภาพ A) แสดงการติดสีน้ำตาลเข้มของมัดประสาท (Nt) และกลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS)
- C) และ D) ภาพกำลังขยายสูงของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS) ภายในไฮโดรพลาสซึม แสดงตำแหน่งแกรนูลสีน้ำตาลขนาดใหญ่เรียงตัวอย่างหนาแน่น



รูปที่ 4

- A) ภาพของ 10% SDS-PAGE gel แสดงตำแหน่งแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่ถูกแยกตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล แถบโปรตีนเหล่านี้สกัดมาจาก cerebral ganglion และถูกย้อมด้วย Coomassie blue

lane 1 : แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดสูง : high molecular weight marker (HMW) ขนาด 205 , 116 , 97 , 66 และ 45 kD

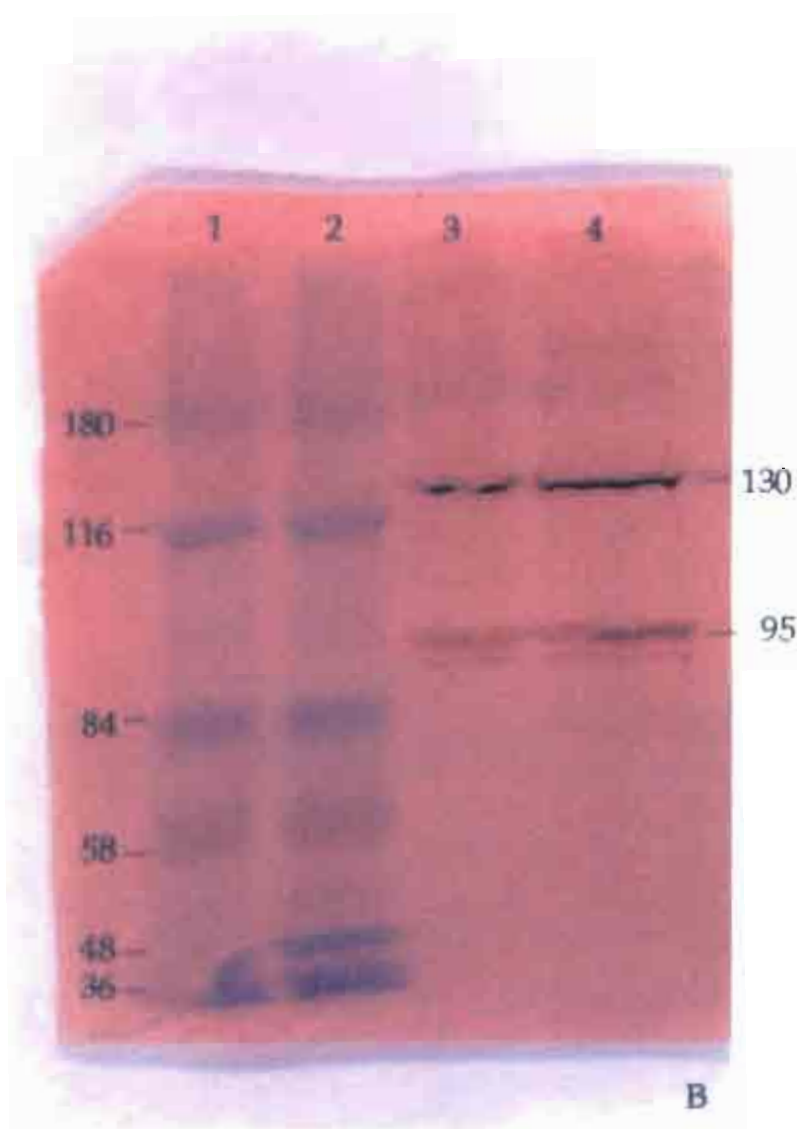
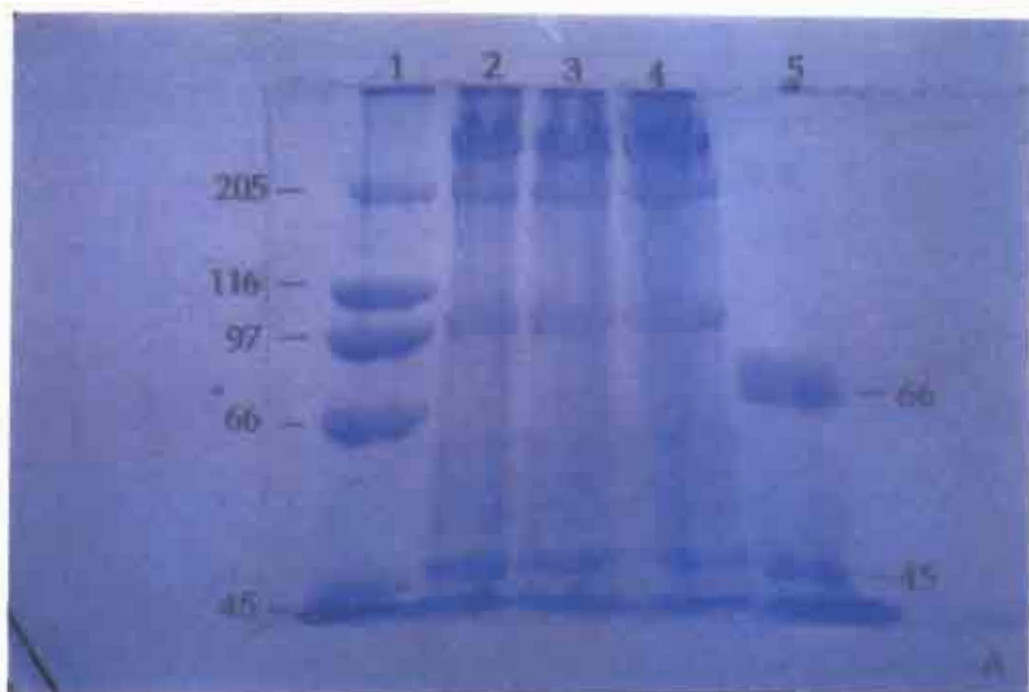
lane 2 - 4 : แถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ จาก cerebral ganglion โดยมีการใส่โปรตีนรวม 20 , 30 และ 40 μ l ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ติดสี coomassie blue เด่นชัดถูกแสดงด้วยลูกศร ประมาณ 8 แถบ

lane 5 : แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดต่ำ : low molecular weight marker (LMW) ขนาด 66 และ 45 kd

- B) ภาพของ Nitrocellulose blot จากเทคนิค Western Blotting แสดงตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ควรจะเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ แถบโปรตีนนี้สกัดมาจาก cerebral ganglion ทำปฏิกิริยา immunoblotting กับ rabbit anti-human growth hormone (Primary antibody), biotin goat anti rabbit IgG (secondary antibody) , HRP - streptavidin และ substrate DAB

lang 1 และ 2 : แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน : Prestained molecular weight marker (Pre) ขนาด 180 , 116 , 84 , 58 , 48 และ 36 kD

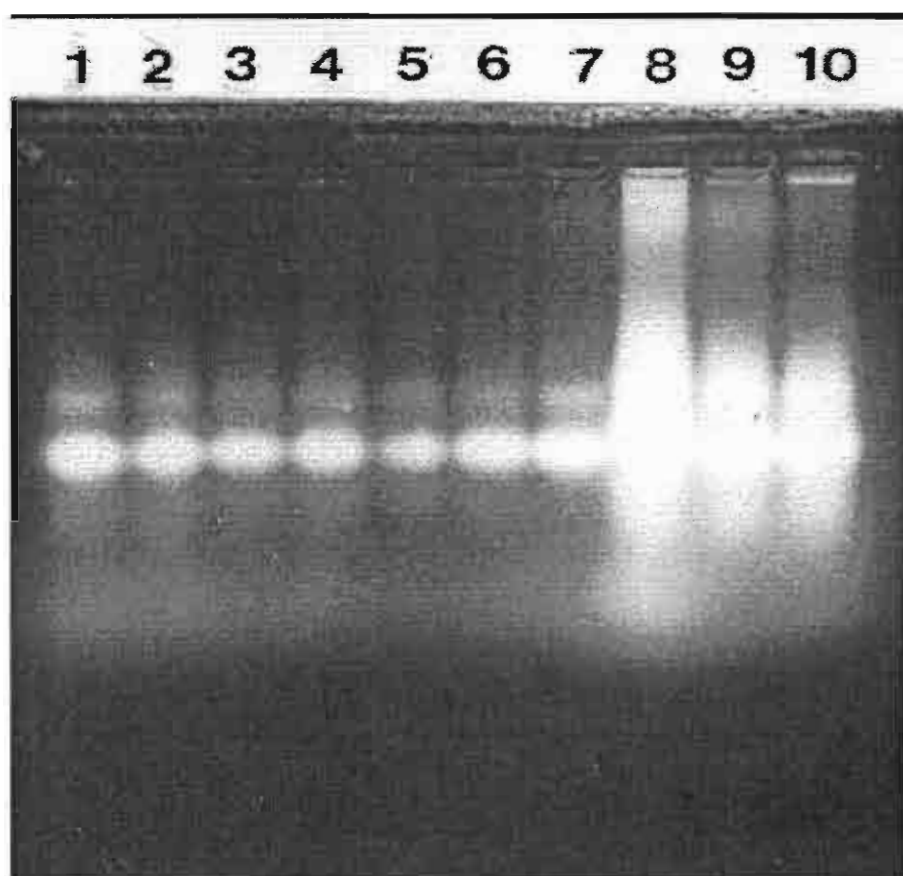
lanes 3 และ 4 : แถบโปรตีนที่สกัดจาก cerebral ganglion ของหอยเป่าฮื้อ และทำปฏิกิริยา immunoblotting โดยใส่สารโปรตีน เป็น จำนวน 30 และ 40 μ l ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ควรจะเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ แสดงโดยแถบโปรตีนที่ย้อมติดสีน้ำตาลเข้มตรงกับระดับน้ำหนักโมเลกุล 130 และ 95 kD ตามลำดับ



รูปที่ 5

ภาพแสดงตำแหน่งและรูปแบบของสารพันธุกรรม RNA โดยรวมที่สกัดมาจากบริเวณส่วนหัวของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ซึ่งมีโครงสร้าง cerebral ganglia ที่ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) โดย RNA เหล่านี้ถูกสกัดด้วยเทคนิค RNA Extraction and Isolation แสดงผลด้วยเทคนิค RNA electrophoresis บน 1.5% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide

- lanes 1-7 : RNA โดยรวมของ r RNA, t RNA, และ m RNA (มีความสำคัญต่อกระบวนการ RT-PCR และ PCR) ต่อไป ซึ่ง RNA เหล่านี้สกัดมาจากบริเวณส่วน cerebral ganglia ครั้งที่ 1
- lane 8 RNA โดยรวม ซึ่ง RNA เหล่านี้สกัดมาจากพยาธิใบไม้ในตับทั้งตัว (*Fasciola gigantica*) นำมาเป็น RNA เปรียบเทียบ
- lanes 9-10 : RNA โดยรวมของ r RNA, t RNA, และ m RNA (มีความสำคัญต่อกระบวนการ RT-PCR และ PCR) ต่อไป ซึ่ง RNA เหล่านี้สกัดมาจากบริเวณส่วน cerebral ganglia ครั้งที่ 2



รูปที่ 6

ภาพของ agarose gel 1.5% จากเทคนิค DNA electrophoresis แสดงตำแหน่ง และขนาดของสารพันธุกรรม PCR-generated DNA fragments ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ (growth hormone และ insulin-related hormones) ด้วยขบวนการวิจัยแบบ Reverse Transcriptase Polymerase chain reaction แสดงบน agarose gel ย้อมด้วย Ethidium bromide

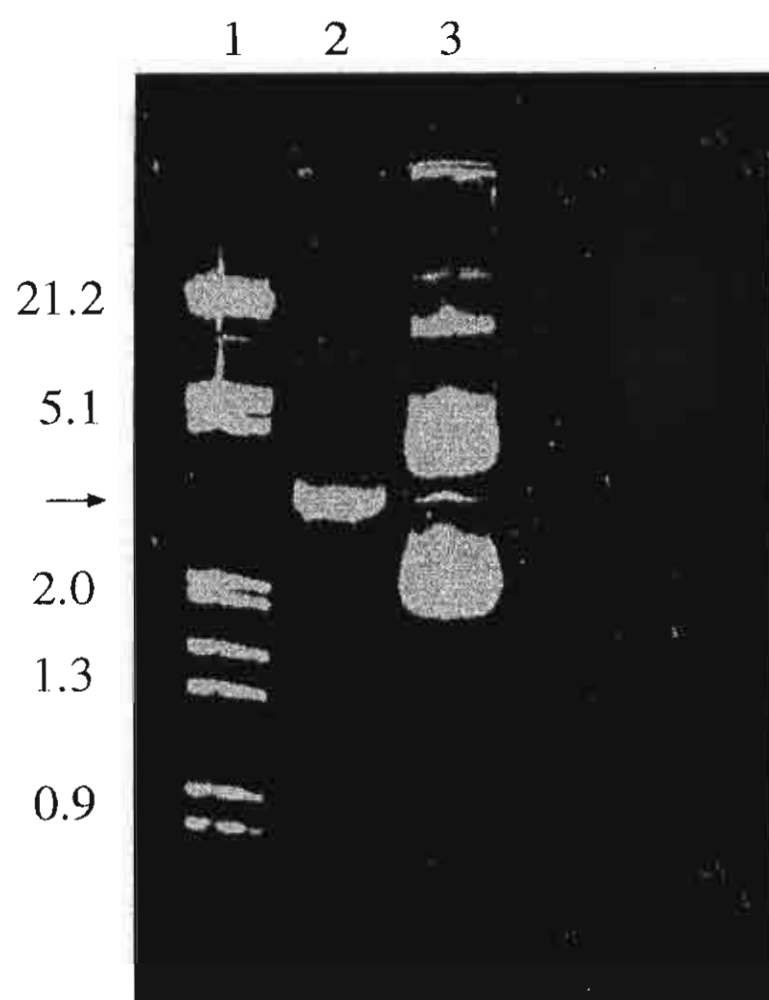
- lane 1 : standard DNA Ladder 100 base pairs (Promega)
ขนาด 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 bp ตามลำดับ
- lanes 2-9 : PCR-generated DNA samples ของ insulin-related product และ growth hormone product โดยมีการใช้ primers ดังต่อไปนี้
- lane 2, 6 : primer INS F0 + INS R1
- lane 3, 7 : primer INS F1 + INS R1
- lane 4-8 : primer GROWTH F1 + GROWTH R1
- lane 5, 9 : primer GROWTH F2 + GROWTH R1



รูปที่ 7

ภาพของ agarose gel 1.5% จากเทคนิค DNA electrophoresis แสดงตำแหน่งและรูปแบบการเดินทางของ p-Bluescript vector ย้อมด้วย ethidium bromide

- lane 1 : standard DNA ซึ่งเป็น Lamda DNA ที่ถูกตัดด้วย EcoRI + Hind III แสดงตำแหน่ง 13 bands คือ 21.2, 5.1, 4.9, 4.2, 3.5, 2.0, 1.9, 1.5, 1.3, 0.9, 0.8, 0.5 และ 0.1 kb ตามลำดับ (ไม่สามารถเห็นได้ชัดเจนทุกตำแหน่งของ bands)
- lanes 2 : EcoRV - p-Bluescript ซึ่งเป็น linear form ของ vector ซึ่งมีขนาดใหญ่ และ band แสดงตำแหน่งตรง ≈ 3 kb
- lane 3 : p-Bluescript ซึ่งเป็น circular coiled form ของ vector ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า และมีหลายขนาด แสดง bands สีเข้มในหลายตำแหน่งบน gel



รูปที่ 8

ภาพถ่ายตัวอย่าง competent cell XL-1 Blue ที่เพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนแล้วนำไปเลี้ยงบน agar plate (ภาคผนวก) ที่มี ampicillin, X-gal และ IPTG แล้วคัดเลือก white/blue colony



รูปที่ 9

ภาพ แสดงสารพันธุกรรม PCR-generated DNA fragments ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ (growth hormone และ insulin-related hormones) ที่ได้จากกระบวนการแยกและวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค DNA miniprep preparation ภายหลังจากการทำกระบวนการ ligation และ transformation ใน competent XL-1 Blue cells แสดงผลจากเทคนิค DNA electrophoresis บน 1.5% agarose gel ย้อมด้วย Ethidium bromide

lanes 1-10: DNA samples ของ cloned p-Bluescript plasmid

lane 11-12: DNA samples ของ cloned insulin-related hormone ที่ใช้ primers INS R1 + INS F0

lane 13: standard DNA marker : λ Hind III-EcoR-1 (Promega)

Kb

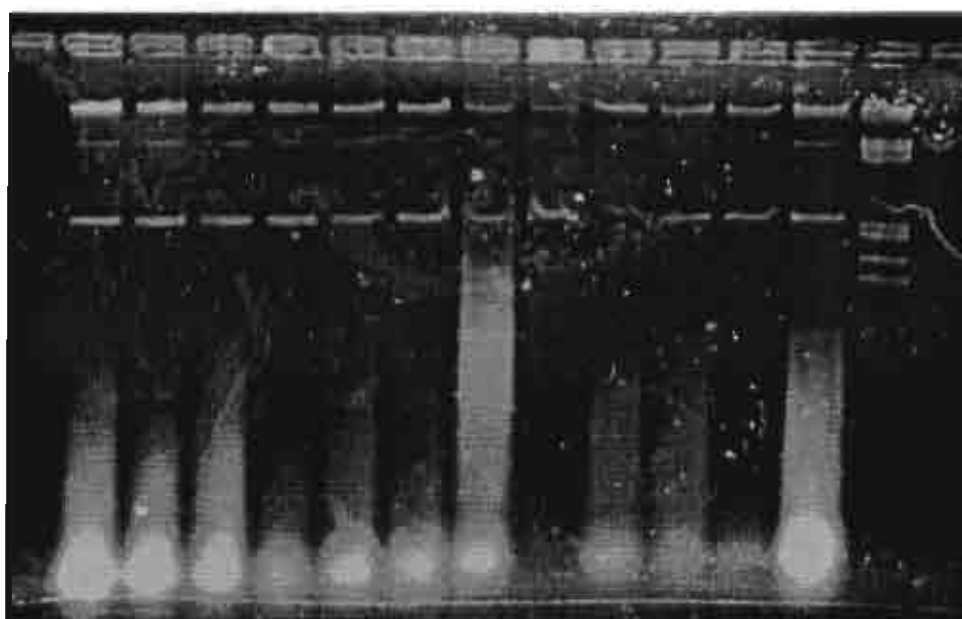
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

21.2

5.1

2.0

0.9



รูปที่ 10

ภาพ แสดงสารพันธุกรรม PCR-generated DNA fragments ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ (growth hormone และ insulin-related hormones) ที่ได้จากการกระบวนการแยกและวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค DNA miniprep preparation และ restriction enzyme testing แสดงผลจากเทคนิค DNA electrophoresis บน 1.5% agarose gel ย้อมด้วย Ethidium bromide

lane 1: standard DNA marker : λ Hind III-EcoR-1 (Promega)

lanes 2-3: DNA ของ p-Bluescript vector

lanes 4-5: DNA sample ของ clone insulin-related hormone ที่ใช้
primers INS R2 + INS F1

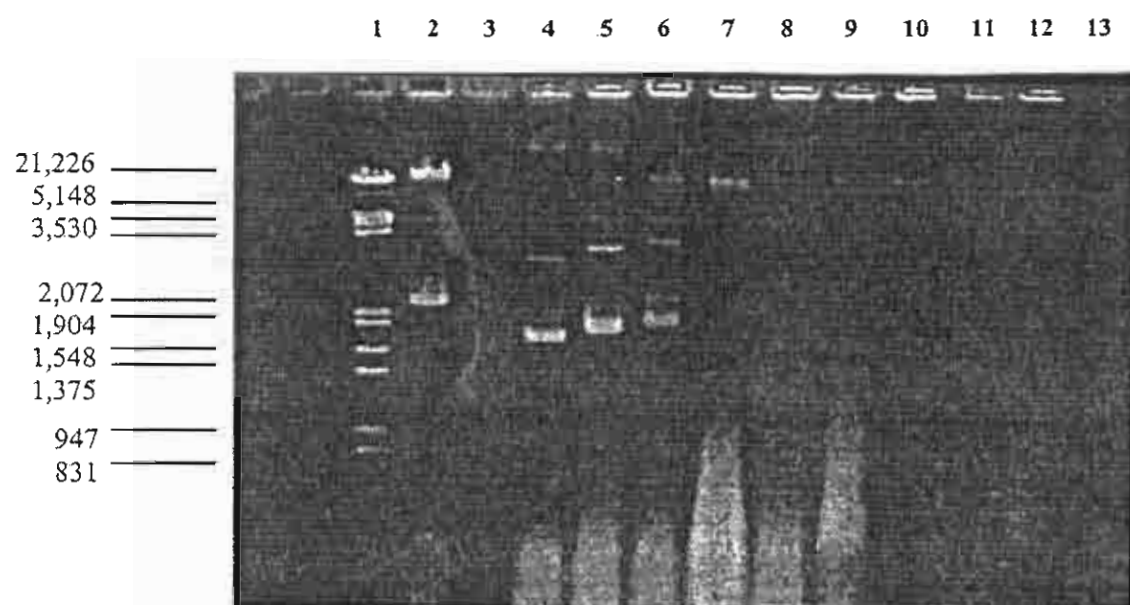
lanes 6-7: DNA sample ของ clone growth hormone ที่ใช้
primers GROWTH R1 +GROWTH F1

lane 8-11: DNA sample ของ insulin-related hormone ที่ใช้
primers INS R2 + INS F0

lanes 12: DNA sample ของ clone growth hormone ที่ใช้
primers GROWTH R1 +GROWTH F2

lane 8-11: DNA sample ของ clone insulin-related hormone ที่ใช้
primers INS R1 + INS F0

หมายเหตุ: ปริมาณของ samples ที่เตรียมได้จากการกระบวนการ DNA miniprep preparation มีจำนวนน้อย จึงนำ samples มาตรวจสอบผลจากเทคนิค DNA electrophoresis บน 1.5% agarose gel ในปริมาณที่น้อยมาก เพื่อมิให้เป็นการสูญเสีย DNA โดยเปล่าประโยชน์ และเพื่อเก็บปริมาณ DNA ที่ได้ไว้เพื่อเป็นประโยชน์ในการทำการทดลองขั้นต่อไปของกระบวนการหาลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) กอปรกับมีปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายรูปทำให้ภาพถ่ายไม่ชัดเจน แต่ทว่าสามารถมองเห็นผลได้จาก agarose gel ในขณะส่องดูด้วย UV light



รูปที่ 11

ภาพ แสดงสารพันธุกรรม PCR-generated DNA fragments ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ (growth hormone และ insulin-related hormones) ที่ได้จากกระบวนการแยกและวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค DNA miniprep preparation และ restriction enzyme testing แสดงผลจากเทคนิค DNA electrophoresis บน 1.5% agarose gel ย้อมด้วย Ethidium bromide

lane 1: standard DNA marker : λ Hind III-EcoR-1 (Promega)

lanes 2: DNA sample ของ clone insulin-related hormone ที่ใช้
primers INS R2 + INS F1

lanes 3-4: DNA sample ของ clone insulin-related hormone ที่ใช้
primers INS R1 + INS F0

lanes 5-8: DNA sample ของ clone insulin-related hormone ที่ใช้
primers INS R2 + INS F1

lane 10-15: DNA sample ของ clone insulin-related hormone ที่ใช้
primers INS R2 + INS F0

หมายเหตุ: ปริมาณของ samples ที่เตรียมได้จากกระบวนการ DNA miniprep preparation มีจำนวนน้อย จึงนำ samples มาตรวจสอบผลจากเทคนิค DNA electrophoresis บน 1.5% agarose gel ในปริมาณที่น้อยมาก เพื่อมิให้เป็นการสูญเสีย DNA โดยเปล่าประโยชน์ และเพื่อเก็บปริมาณ DNA ที่ได้ไว้เพื่อเป็นประโยชน์ในการทำการทดลองขั้นตอนต่อไปของกระบวนการหาลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) กอปรกับมีปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายรูปทำให้ภาพถ่ายไม่ชัดเจน แต่ทว่าสามารถมองเห็นผลได้จาก agarose gel ในขณะที่ส่องดูด้วย UV light

bp

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

21,226 _____
5,148 _____
3,530 _____

2,072 _____
1,904 _____
1,548 _____
1,375 _____

947 _____
831 _____



สรุปผลการทดลอง

การดำเนินงานวิจัยในโครงการนี้เน้นที่การศึกษาสารฮอรโมน (กลุ่มโปรตีน) ในปมประสาท cerebral ganglia ที่มีความเกี่ยวข้องต่อการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือพันธุ์พื้นเมือง *Haliotis asinina* Linnaeus โดยมีวัตถุประสงค์หลัก ดังนี้ 1. การวิเคราะห์สารฮอรโมน (กลุ่มโปรตีน) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือ ได้แก่ กลุ่ม growth hormone และ insulin-related hormone และ 2. การวิเคราะห์และสังเคราะห์ส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือ กลุ่ม growth hormone และ insulin-related hormone สามารถสรุปผลงานวิจัยโดยสังเขป ดังนี้

1. การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอรโมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) ในปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป่าฮือ

เป็นการศึกษาทางด้านกายวิภาคของปมประสาท cerebral ganglion ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคศาสตร์ และเพื่อศึกษาวิเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry แบบ immunoperoxidase พบว่า มีกลุ่มเซลล์ประสาทผลิตฮอรโมน (Neurosecretory cells: NS) ในปมประสาท cerebral ganglion ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอรโมนกลุ่มเหล่านี้ แสดงผลออกมาโดยการย้อมติดสีน้ำตาลเข้มอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างฮอรโมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและเซลล์ประสาทผลิตฮอรโมนเหล่านี้

2. การวิเคราะห์สารฮอรโมน (กลุ่มโปรตีน) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) ในปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป่าฮือ

เป็นการศึกษาทางด้านชีวเคมีและเซลล์วิทยาเพื่อศึกษาและวิเคราะห์กลุ่มฮอรโมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือ และวิเคราะห์ขนาดของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้เทคนิคการแยกสารและวิเคราะห์สารประเภทโปรตีนด้วยวิธี Protein electrophoresis และ Western blotting พบว่ามีกลุ่มโปรตีนที่น่าจะเป็น pre-protein ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่ถูกสกัดมาจากปมประสาท cerebral ganglion แสดงตำแหน่ง และขนาดของน้ำหนักโมเลกุล ที่ 95 และ 130 kd โดยแสดงผลเป็นแถบสีน้ำตาลซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาอย่างเฉพาะเจาะจงทาง Immunity ระหว่าง specific primary antibody, secondary antibody และ DAB substrate บนแผ่น nitrocellulose blot

3. การคัดแยกสารพันธุกรรม RNA โดยรวมจากบริเวณปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป่าฮื้อ

เป็นการศึกษาและคัดแยกสารพันธุกรรม กลุ่ม RNA โดยรวมจากปมประสาท cerebral ganglion ด้วยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ molecular biology of RNA extraction ผลจากการคัดแยกสารพันธุกรรม กลุ่ม RNA โดยรวมจากบริเวณปมประสาท cerebral ganglion นำไปแสดงผลด้วยเทคนิค RNA electrophoresis แสดงตำแหน่งและรูปแบบของสารพันธุกรรม ทั้งกลุ่ม ribosomal RNA , mRNA และ tRNA อย่างถูกต้องบน agarose gel 1.5 % ย้อมด้วย ethidium bromide

5. การวิเคราะห์และคัดแยกสารพันธุกรรม DNA ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตจากสารพันธุกรรม RNA ที่ถูกคัดแยกจากบริเวณปมประสาท cerebral ganglion ของหอยเป่าฮื้อ

เป็นการศึกษา วิเคราะห์ และสังเคราะห์ส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในหอยเป่าฮื้อ ด้วย เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ molecular biology of polymerase chain reaction (PCR) การวิเคราะห์และสังเคราะห์พันธุกรรมสาย cDNA สายแรกเริ่มต้นขึ้นด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่เอนไซม์โพลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcriptase polymerase - realion : RT-PCR) จากนั้นสารพันธุกรรม DNA ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต กลุ่ม growth hormone และ insulin related hormone ถูกสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนอย่างมาก ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่เอนไซม์โพลิเมอเรส (PCR) ทำให้ได้ส่วนของสารพันธุกรรมที่เรียกว่า PCR-related DNA fragments เกิดขึ้นซึ่งได้ถูกนำมาวิเคราะห์ตรวจสอบด้วยเทคนิค DNA electrophoresis บน agarose gel 1.5 % ย้อมด้วย ethidium bromide การศึกษาพบว่า ในส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone นั้นมีการสังเคราะห์สองส่วนของ PCR-generated DNA fragments ซึ่งมีขนาดประมาณ 410 และ 440 นิวคลีโอไทด์ สำหรับในส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ insulin-related hormone นั้น มีการสังเคราะห์สองส่วนของ PCR-generated DNA fragments ซึ่งมีขนาดประมาณ 230 และ 380 นิวคลีโอไทด์

6. การวิเคราะห์และสังเคราะห์ส่วนของสารพันธุกรรม DNA ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตภายในเซลล์แบคทีเรีย

วิเคราะห์และสังเคราะห์ส่วนของสารพันธุกรรม DNA ด้วยกระบวนการไลเกชัน (ligation) เพื่อนำ PCR –generated DNA fragment ไปเชื่อมต่อกับสายพันธุกรรมของ vector ตรงตำแหน่งของ multiple cloning site ซึ่ง vector ที่ใช้เป็น p-Bluescript SK(+) plasmid และ p-GEMT vector ผลการทดลอง ทำให้ได้ ligated product หรือ recombinant DNA (plasmid ที่มี PCR-

generated DNA fragment เชื่อมอยู่) โดยทำการเปรียบเทียบบน agarose gel 1.5 % ถึงขนาดโมเลกุลของ ligated product (plasmid ที่มี PCR-generated DNA fragment เชื่อมอยู่) ที่มีขนาดใหญ่กว่า pure plasmid (plasmid ที่ไม่มี PCR-generated DNA fragment เชื่อมอยู่) จากนั้นมีการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านโดยเลือกใช้แบคทีเรีย XL-1 Blue ทำให้มีคุณสมบัติเป็น competent cell แล้วจึงดำเนินการไปสู่กระบวนการทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) ผลการทดลองทำให้ได้ ligated product เข้าไปสู่ภายใน XL-1 Blue competent cell

7. การคัดเลือกและสกัดสารพันธุกรรมสายผสม (recombinant DNA) จากเซลล์แบคทีเรีย โดยกระบวนการ DNA miniprep preparation และ restriction enzymes testing

เป็นการนำเอา DNAสายผสม เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้ว มีการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรียให้มากขึ้นในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่มี recombinant DNA ตามต้องการ วิธีการคัดเลือกใช้คุณสมบัติของ plasmid ที่มียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (ampicillin) และคัดเลือกจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยการใส่สาร X-gal และ IPTG ลงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและอาศัยคุณสมบัติยับยั้งของ β -galactosidase ที่สามารถย่อย X-gal ได้เกิดสารสีฟ้าขึ้น ทำให้ colony มีสีฟ้าจึงสามารถคัดเลือก blue/white colony เพื่อหา positive clone ได้ จากนั้นจึงทำกระบวนการสกัด DNA สายผสม (Vector ที่มี PCR-generated DNA fragment) จากแบคทีเรียที่เป็น positive clone ด้วยกระบวนการ mini preparation of plasmid DNA และ restriction enzymes testing

8. กระบวนการวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ PCR-generated fragments ที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องเป็นส่วนของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone และ insulin-related hormones

เป็นการทำการคัดแยกและคัดเลือก PCR-generated DNA fragments ที่เพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย XL – 1 Blue ออกจาก p-Bluescript vector โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยทำการทดสอบเพื่อหาขนาดและปริมาณของ PCR-generated DNA fragments ที่ได้ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นจึงนำส่ง positive clones ที่ทดสอบว่ามี PCR-generated DNA fragments ที่กำลังศึกษาอยู่ไปหาลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) ที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) แต่เนื่องจากประสบปัญหาเกี่ยวกับความไม่บริสุทธิ์ของสารพันธุกรรมนี้ จึงมีผลทำให้การวิเคราะห์ลำดับของสารนิวคลีโอไทด์ยังไม่ชัดเจนสมบูรณ์แน่นอน

เอกสารอ้างอิง

- Cox, K.W. 1962. Review of the abalones of California. *Calif. Fish and Game*. 46: 381-406
- Ebberink, R.H.M., Smit, A.B., and Van Minner, J. 1989. The insulin family: Evolution of structure and function in vertebrates and invertebrates. *Biol. Bull.* 177: 176-182
- Fallu, R. 1991. *Abalone Farming*. Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford. 195 pages.
- Hahn, K.O. 1989. *Handbook of Culture of Abalone and other Marine Gastropods*. CRC Press, Florida, 348 pages.
- Jarayabhand, P., Piyateeratitivorakul, S., Choonhabandit, S. and Rungsupha, S. 1991. *Final Report on "Research and Development on Some Aspects of Abalone Culture" to the Toray Science International Research grant 1990*, Thailand, 52 pages.
- Kakhai, N., and Petjamrat, K. 1992. Survey on species and broodstock collection of abalone (*Haliotis*) in Chonburi, Rayong, and Trad Provinces. *Technical Paper No. 6/1992, Rayong Coastal Agriculture and Cooperatives*, Thailand. 31 pages (in Thai).
- Nateewathana, A., and Hylleberg, J. 1986. A survey on Thai abalone around Phuket Island and feasibility study of abalone culture in Thailand. *Thai. Fish. Gazette*. 39: 177-190.
- Nateewathana, A., and Busarawit, S. 1988. Abundance and distribution of abalones along the Andaman Sea Coast of Thailand, *Kasetsart J. (Nat. Sci)*. 22: 8-15 (in Thai).
- Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis, Y. 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual* (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Miklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 543-546

- Shepherd, S.A. and Steinberg, P.D. 1992. Food preferences of three Australian abalone species with a review of the algal food of abalone. In: *Abalone of the World, Biology, Fisheries and Culture* (edited by Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzman del Proo, S.A.) pp 169-181.
- Singhagraiwin, T. 1989. The experiment on breeding and nursing of denkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne). *EMDEC Technical Paper No. 21, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand*. 26 pages (in Thai).
- Singhagraiwin, T. and Sasaki, M. 1991. Breeding and early development of the denkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne. *Thai Mar. Fish. Res. Bull.* 2: 83-94.
- Smit, A.B., Vreugden E. Ebberink R.H.M. 1988. Growth controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature* 331: 535-537.
- Smit, A.B., Wijnand, P.M., Geraerts, P.M., Meester, I., Heerikhuizen, H.V., and Joose, J. 1991. Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related peptide II of *Lymnaea stagnalis*. *Eur. J. Biochem.* 199: 699-703.
- Tookwinas, S., Leknim, W., Donyadol, Y., Preeda-Lampabutra, Y. and Perngmak, P. 1986. Survey on species and distribution of abalone (*Haliotis spp*) in Surajthani, Nakornsrihammaraj and Songkhla provinces. *Technical paper No.1/1986, National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand*. 16 pages (in Thai).
- Uki, N. 1989. Abalone seeding production and its theory. *Int. J. Ag. Fish. Tech.*, 1:3-15.
- Van Minner, J., Schallig, F.H., and Ramkema, M.D. 1992. Identification of putative egg-laying hormone containing neuronal systems in gastropod molluscs. *Gen. Com. Endocrin.* 86: 96-102

ภาคผนวก

Output: การเข้าร่วมและเสนอผลงานวิจัย

1. ได้เข้าร่วมประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัย 14th International Conference of Endocrinology. ที่ Sorronto , Italy วันที่ 25-31 พฤษภาคม 2544

IDENTIFICATION OF NEUROSECRETORY CELLS IN CEREBRAL GANGLIA OF *HALIOTIS ASININA* (LINNAEUS)

P. Saitongdee¹, V. Anupunpisit², P. Rabintossaporn¹, P. Sobhon¹, M. Kruatrachue³, and E.S. Upatham³

Department of Anatomy¹ and Biology³, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400 Thailand

Department of Anatomy², Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

The pioneer study demonstrated the immunolabelling result for growth hormone in neurosecretory cells (NS) of cerebral ganglion of *Haliotis asinina* (Linnaeus). The present investigation is to identify types of NS using TEM techniques and to study protein contents using Western blots. The cytoplasm of most NS contain numerous organelles i.e. mitochondria, free ribosome, strikingly dilated RER and secretory granules in the area of well-developed Golgi complexes that may indicate the involvement in active granule formation. The varying size and form of secretory vesicles could distinguish NS into 4 subtypes. NS1 posses ovoid nucleus with heterochromatin and remarkably large membrane-bound vesicles containing irregular dense crystal, and agranulated vesicles in the perinuclear cytoplasm. NS2 and NS3 exhibit round euchromatin nuclei and the cytoplasm are filled with multivesicular bodies, dense core vesicle and agranulated vesicles. The granulated electron dense vesicles is also found in NS3. The last subtype, NS4, contains round euchromatic nucleus. The cytoplasm contains multivesicular bodies, lysosome and agranulated vesicles. To demonstrate the proteins produced by these cells, it was analyzed by Western blots with rabbit anti human growth hormone. The large groups of proteins were detected at the molecular weight of 95 and 130 kD. However, attempts are underway to characterize more specific proteins functioned as the target proteins.

2. ได้เข้าร่วมประชุมการเสนอผลงานวิจัยของกลุ่มเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ.ดร. ประเสริฐ ไศยกุล เรื่อง "การควบคุมกระบวนการสร้างและหลังเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอร์โมนในหอยเป๋าฮื้อ : Neuroendocrine control of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina*" ที่ ตึกกายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2545

3. ได้เข้าร่วมการอบรมและการปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ระดับ Molecular Biology เรื่อง "Workshop on usage of RT-PCR techniques for isolation of specific CDNA fragments from *F. gigantica*" ที่ ตึกกายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วันที่ 17-22 กุมภาพันธ์ 2541

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ประโยชน์เชิงวิชาการ:** การพัฒนาการเรียนการสอน ได้นำเทคนิคจากการวิจัยไปร่วมสอนนิสิตระดับปริญญาตรี (แพทยศาสตร์) และนิสิตระดับปริญญาโท (หลักสูตรธรรมาภิบาล) ได้เสริมสร้างศักยภาพทางการทำวิจัยของนิสิตระดับปริญญาตรี (สาขาวิทยาศาสตร์) จำนวน 7 คน ที่เข้าร่วมในโครงการนี้ (เป็นส่วนของ senior project)
- ประโยชน์เชิงสาธารณะ:** มีการสร้างเครือข่ายความร่วมมือ ขอความอนุเคราะห์และขอความช่วยเหลือจากนักวิชาการและนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยและสถาบันทางวิชาการอื่นๆ เป็นจำนวนหลายแห่ง
- ประโยชน์เชิงนโยบาย:** มีผลงานนโยบายการบริหารและพัฒนาศักยภาพของหน่วยงาน การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการใหม่และครุภัณฑ์ใหม่มีโอกาสได้รับงบประมาณจัดซื้อครุภัณฑ์ใหม่ประเภท ชุดอิเล็กทรอนิกส์อย่างครบถ้วน พร้อมชุดถ่ายรูปแบบ จำนวน 1 ชุด จากงบประมาณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มศว ปี 2543 มีเวลาและโอกาสในการทำวิจัยมากขึ้น มีโอกาสที่จะพัฒนาและสร้างความก้าวหน้าของห้องปฏิบัติการทางวิจัยของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มศว

สารเริ่มต้น (primers)

- การวิเคราะห์และสังเคราะห์สารเริ่มต้น (primers ; oligonucleotides) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) ซึ่งมี 2 กลุ่ม ดังนี้
 - Forward primers (F)
 - Growth F1: 5' CGG CTC TTC AAC ATC GCC GT3'
 - Growth F2: 5' GAC TTT GAA GGT ACC CTG TT3'
 - Reverse primers (R)
 - GROWTH R1: 5' TGC ATG TCC TTC TTG AAG CA 3'
- การวิเคราะห์และสังเคราะห์สารเริ่มต้น (primers ; oligonucleotides) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในสัตว์ประเภทแมลงและหอย (insulin-related hormone) ซึ่งมี 2 กลุ่ม ดังนี้
 - Forward primers (F)
 - INS F0: 5' CAG CTA AAA TCC AAA ATG G 3'
 - INS F1: 5' TTT GTG GCT CGA ATT TGG C3'

2.2. Reverse primers (R)

- INS R1: 5' AAA CAG CAT TCA CAC ACT A 3'
- INS R2: : 5' AAT CGA CAA ACT CCA TTA 3'

การเตรียม TE buffer	- Tris-HCl	10	mM ; (pH8)
	- EDTA	1	mM
การเตรียม 5x TBE buffe	- Tris base	52	g
	- Boric acid	27.5	g
	- Disodium EDTA.2H ₂ O	4.65	g
	- water to	1	liter
	(Adjust pH to 8.4)		
การเตรียม 10x loading solution	0.25% xylene cyanole FF		
(in 5x TBE)	0.20 M EDTA , pH 8		
	30% Ficoll (in 5x TBE)		
การเตรียม agarose gel 1.5%	- agarose	1.8	g
(total volume 120 ml)	- TBE buffer	120	ml
การเตรียม Ethidium bromide	- TBE buffer	1	ml
	- Ethidium bromide	0.5	μg
การเตรียมน้ำ DEPC-H ₂ O	- Tri water	100	ml
	- DEPC-H ₂ O	1	ml
LB-medium (1000 ml)	10 g Bacto tryptone		
	5 g Bacto yeast extract		
	5 g NaCl		
Solution I:	25 mM Tris, pH8		
	50 mM glucose		
	10 mM EDTA		
Solution II (prepare fresh)	0.1 N NaOH		
	1% SDS		
Solution III	2.7 M potassium acetate, pH 4.8		

ตัวอย่าง ผลการค้นคว้าเกี่ยวกับสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ growth hormone จากข้อมูลที่น่ามาแสดง มีรายละเอียดพอสังเขป ดังนี้

Internet: molecular databank

แหล่งข้อมูล: [http://www.Embl-heidelberg.de/srs5 bin/](http://www.Embl-heidelberg.de/srs5/bin/)

ชื่อเรื่อง: Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormone

accession: M27325

sequence: >BTGHC

link save view EMBL

ID BTGHC standard; RNA; MAM; 783 BP.
 XX
 AC M27325;
 XX
 NI g163089
 XX
 DT 02-FEB-1990 (Rel. 22, Created)
 DT 04-JUN-1991 (Rel. 28, Last updated, Version 2)
 XX
 DE Bovine growth hormone mRNA, complete cds.
 XX
 KW grqwth 'hormone.
 XX
 OS Bos taurus
 OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
 OC Artiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovoidea; Bovidae; Bovinae; Bos.
 XX
 RN [1]
 RP 1-783
 RX MEDLINE; 83209123.
 RA Seeburg P.H., Sias S., Adelman J., de Boer H.A., Hayflick J.,
 RA Jhurani P., Goeddel D.V., Heyneker H.L.;
 RT "Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones";
 RL DNA 2:37-45(1983).
 XX
 DR SWISS-PROT; P01246; SOMA_BOVIN.

Key	Location/Qualifiers
source	1..783
	/organism="Bos taurus"
CDS	28..681
	/codon_start=1
	/db_xref="PID:g163090"
	/db_xref="SWISS-PROT:P01246"
	/note="growth hormone precursor"
	/translation="MMAAGPRTSLLLAFAALLCLPWTQVVGAFPPAMSLSGLFANAVLRAQ
	HLHQLAADTFKEFERTYIPEGQRYSIQNTQVAFCESETIPAPTGKNEAQKSDLELLRI
	SLLLIQSWLGLPLQFLSRVFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGILALMRELEDGTPRAGQI
	LKQTYDKFDTNMRSDALLKNYGLLSCFRKDLHKTETYLVRVMKCRRFGEASCAF"
sig_peptide	28..108
	/codon_start=1
	/note="growth hormone signal peptide"
mat_peptide	109..678
	/codon_start=1
	/note="growth hormone"

SQ Sequence 783 BP; 151 A; 257 C; 208 G; 167 T; 0 other;
 >BTGHC

cagggtcctgtggacagctcaccagctatgatggctgcaggcccccgacctccctgctc
 ctggctttcgccctgctctgcctgccctggactcaggtgggtggcgcccttcccagccatg
 tccttgtccggcctgtttgccaacgctgtgctccgggctcagcacctgcacagctggct
 gctgacaccttcaaagagtttgagcgcacctacatcccggaggacagagatactccatc
 cagaacacccaggttgcttctgcttctctgaaaccatcccggccccacgggcaagaat
 gaggccagcagaaatcagacttgagctgcttcgcacatctcactgctcctcatccagtcg
 tggctcgggccccctgcagttcctcagcagagtcttcaccaacagcttggtgtttggcacc
 tcggaccgtgtctatgagaagctgaaggacctggaggaaggcatcctggccctgatgcgg
 gagctggaagatggcaccccccggtgggcagatcctcaagcagacctatgacaaattt
 gacacaaacatgcgcagtgcgcgcgctgctcaagaactacggtctgctctcctgcttc
 cggaaggacctgcataagacggagacgtacctgagggcatgaagtgcgcggcgttcggg
 gaggccagctgcgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgctgccttc
 cttgaccttggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcac
 gca

ตัวอย่าง ผลการค้นคว้าเกี่ยวกับสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ insulin-related hormone จากข้อมูลที่น่าสนใจ มาแสดง มีรายละเอียดพอสังเขป ดังนี้

Internet: molecular databank

แหล่งข้อมูล: [http://www.Embl-heidelberg.de/srs](http://www.Embi-heidelberg.de/srs) 5 bin/

ชื่อเรื่อง: Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related peptide II of *Lymnaea stagnalis*

accession: X59032 S42163

sequence: LSMIP II

<http://www.ebi.ac.uk/EMBL/seq/...> [GENBANK-ID:LSMIP1]

<http://www.ebi.ac.uk/EMBL/seq/...> [GENBANK-ID:LSMIP1]

LOCUS LSMIP11 555 bp RNA INV 30-JUN-1993
 DEFINITION L.stagnalis mRNA for molluscan insulin-related peptide MIP11.
 ACCESSION X59302.942163
 NID q9639
 KEYWORDS hormone; insulin-related peptide; neuropeptide.
 SOURCE great pond snail.
 ORGANISM Lymnaea stagnalis
 Eukaryota; Eukaryotes; Metazoa; Mollusca;
 Gastropoda; Pulmonata; Basommatophora; Lymnaeidae; Lymnaea.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 555)
 AUTHORS Smit, A.B.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-APR-1991) A.B. Smit, Free University, Biology Dept,
 Unit of Molecular Neurobiology, De Boelelaan 1087, 1081 HV
 AMSTERDAM, THE NETHERLANDS
 REFERENCE 2 (bases 1 to 555)
 AUTHORS Smit, A.B., Geraerts, P.M., Meester, I., van Heerikhuizen, H. and
 Joosse, J.
 TITLE Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related
 peptide II of Lymnaea stagnalis
 JOURNAL Eur. J. Biochem. 199 (3), 699-703 (1991)
 MEDLINE 91330924
 REFERENCE 3 (bases 1 to 555)
 AUTHORS Smit, A.B., Thijsen, S.F., Geraerts, W.P., Meester, I., van
 Heerikhuizen, H. and Joosse, J.
 TITLE Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related
 peptide V of Lymnaea stagnalis
 JOURNAL Brain Res. Mol. Brain Res. 11 (1-2), 7-12 (1992)
 MEDLINE 92356799
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..555
 /organism="Lymnaea stagnalis"
 /db_xref="taxon:6523"
 /tissue_type="central nervous system"
 /clone_lib="lambda gt10"
 mRNA 1..555
 /gene="MIP11"
 /note="molluscan insulin-related peptide"
 /evidence=experimental
 gene 1..555
 /gene="MIP11"
 CDS / 60..473
 /gene="MIP11"
 /codon_start=1
 /product="molluscan insulin-related peptide, /
 prepropeptide"
 /db_xref="PID:q9640"
 /db_xref="SWISS-PROT:P25289"
 /translation="MVGVRIVETNAFVVTVLLTLLLDVVVKPAEGQSCSLSSRPHP
 GICGSNLAGFRAFCNQNPSMVKRDATGWLLEPMVKRNAETDLDLPLRNKLS
 ESALTYLTKRQRTTNLVCECCFNYCTPDVVRKYCY"
 sig_peptide 60..152
 /gene="MIP11"
 /note="molluscan insulin-related peptide"
 mat_peptide 153..263
 /gene="MIP11"

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/...>[GENBANK-ID:LSM111]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/...>[GENBANK-ID:LSM111]

```

mat_peptide    /product="molluscan insulin-related peptide, mature
                B-chain"
                396..473
                /gene="MIP11"
                /product="molluscan insulin-related peptide, A-chain"
BASE COUNT      160 a    134 c    126 g    135 t
ORIGIN
Length: 555 Check: 8938 ..

```

```

1  acacaaccac ggcctgtcag accaaccagg aagttcttca tctccagcta aaatccaaaa
61  tggctggcgt ggcctcgtt ttcaaccaac ccttctgtgt cacagtgtt ctcaccctgt
121  tgctggagct tgcctgaaa cctgcagagg gccaatcctc ttgcagtta tcagccgac
181  cacatccccg tggcatttgt ggcctgaatt ttgctggctt cggggcgttc atatgttga
241  accaauaact accgtcaatg gtcaagaggg acgcagaaac aggctgttta ctgccagaaa
301  ccatggtcaa gaggaaacga gaaacagatc tggacgaccc actgcgtaac ataaagctga
361  gcagcgagag cgttttgacc tatctgacca agagacaacg gaccaccaac ttagtgtgtg
421  aatgcigtgt taattattgc acccctgatg tggcgcaaaa gtactgctat taatggagtt
481  tgcaattaaa aaattatgat gtcttaataa caacatttct tataggcctg taattaaaaa
541  tttatattga aacagg

```

28/3/15

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Clustal X (1.64b) multiple sequence alignment

ตัวอย่าง แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างลำดับสายพันธุ์กรรม growth hormone จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาลำดับของสายพันธุ์กรรมในแง่ที่มีความคล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกันในเชิงวิวัฒนาการ โดยพยายามวิเคราะห์หาลำดับที่เป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด (conserved region) ตำแหน่งของ Forward primers ; GROWTH F1 , GROWTH F2 และตำแหน่งของ Reverse primer ; GROWTH R1 ถูกแสดงบนลำดับ สายพันธุ์กรรมที่นำมาเปรียบเทียบกันเหล่านี้โดยมีลำดับชื่อของสิ่งมีชีวิตแสดงไว้ในลำดับต่อไป

GROWTH HORMONE NUCLEOTIDE SEQUENCES

TTGHR:	<i>Thunnus thynnus</i> (Tuna fish)
POFGH:	<i>Paralichthys olivaceus</i> (Flounder)
SSALGHI:	<i>Salmo salar</i> (Salmon)
OKGHCOHO:	<i>Oncorhynchus kisutch</i> (Coho salmon)
SGGH2:	<i>Oncorhynchus mykss</i> (Trout)
CIGRH:	<i>Ctenopharyngodon idella</i> (Carp)
RCGHR:	<i>Rana catesbeiana</i> (Bullfrog)
MMGH:	<i>Macaca mulatta</i> (Monkey)
HSGROW1:	<i>Homo sapiens</i> (Human)
OOGHM6:	<i>Ovis aries</i> (Ovine)
CHGH:	<i>Capra hircus</i> (Goat)
BTBGROW:	<i>Bos taurus</i> (Bovine)
BTGHC:	<i>Bos taurus</i> (Bovine)
SSGHMA:	<i>Sus scrofa</i> (Pig)
GGGHA:	<i>Gallus gallus</i> (Chicken)

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

```

OOGHM6 -----
CHGH -----
BTGROW -----
BTGHC -----
SSGHMA -----TTT-----TTTGGTGGGGAAGAGGACTTTTATTGGGATGTTAGTGGGGGACTCC
MMGH -----
HSGROW1 -----
RNJSOMAT -----
MMGHR1 -----
GGGHA -----
RCGHR -----
TTGHR -----
POFGH -----
SSALGHI -----
OKGHCOHO -----
SGGH2 -----
CIGRH -----

```

```

OOGHM6 -----
CHGH -----AGGGTCCTGCTGACAGCTC
BTGROW -----ACGGCTCAGGGTCC-GTG-ACAGCTC
BTGHC -----CAGGGTCCTGTGGACAGCTC
SSGHMA AGGGAACAACAACACTAGGACCCAGCTCCCCAGACCACTCAGGGACCTGTGGACAGCTC
MMGH -----CCAACCTCCCCGAACCACTCAGGGTCCTGTGGCAAGCCC
HSGROW1 -----CGAACCACTCAGGGTCCTGTGGACAGCTC
RNJSOMAT -----TTCAAACGTCG----GTCC-GTGGACAGATC
MMGHR1 -----AGCATCCTAGAGTCCAGATTCCAACTGCTCAGAGTCCTGTGGACAGATC
GGGHA -----GTTCAAGCAACA-----CCTGAGCAACTCTC
RCGHR -----GGCGGAACCCCA-ATATACATCAGGAACACTG
TTGHR -----AGATCGCA--CTGAA--GAAC-TGAGCTCAGATC
POFGH -----AACTGAAGAACTGAACCAGTACCTGAACCTGAACCTGAACC
SSALGHI -----CAACC--GACCACCGCACTTTCA
OKGHCOHO -----TACATACTCAACC--GACCACCGCACTTTCA
SGGH2 -----
CIGRH -----GAATT

```

```

OOGHM6 ----C----AGCTATGATGGCTGCAGGCCCCCGGACCTCCCTGCTCCTG-GCTTTACACC
CHGH --ACC---AACTATGATGGCTGCAGGCCCCCGGACCTCCCTGCTCCTG-GCTTTACACC
BTGROW --ACC---AGCTATGATGGCTGCAGGCCCCCGGACCTCCCTGCTCCTG-GCTTTGCCCC
BTGHC --ACC---AGCTATGATGGCTGCAGGCCCCCGGACCTCCCTGCTCCTG-GCTTTGCCCC
SSGHMA --ACC---GGCTGTGATGGCTGCAGGCCCCCGGACCTCCCTGCTCCTG-GCTTTGCCCC
MMGH --ACCT--AGCTGCAATGGCTGCAGGCTCCCGGACATCCCTGCTCCTG-GCTTTTGCCC
HSGROW1 --ACCT--AGCTGCAATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTG-GCTTTTGCCC
RNJSOMAT --ACTG--AGTGGCGATGGCTGCAGACTCTCAGACTCCCTGGCTCCTG-ACCTTCAGCC
MMGHR1 --ACTG--CTTGGAATGGCTACAGACTCTCGGACCTCCTGGCTCCTG-ACCGTCAGCC
GGGHA ----CC---GGCAGGAATGGCTCCAGGCTCGTGGTTTTCTCCTCTCCT----CATCGCTG
RCGHR CTAACC--TCAATCAATGGCTTCAGGGTTAGGCTCATCTCTTGTA--CTTGGTTG
TTGHR AGATT--AACCAGAACCAGAAC--TGAACCCAGACCAGCCATGGACAGAGTCTTTCTCT
POFGH AGAATCTGAACCTGAACCAGAAC--TGAACCCAGACCAGCCATGAACAGAGTCATCCTCC
SSALGHI AGTTAAGTAATCATCCTTGGA--TTAAGAGTAAAAA--TGGGACA-AGTGTTTCTGC
OKGHCOHO AGTTAAGTAACCATCCTTGGA--TTAAGAGTAAAAA--TGGGACA-AGTGTTTCTGC
SGGH2 -----GGTGA--TTAAGAGAAAAA--TGGGACA-AGTGTTTCTGC
CIGRH CCCTTC--AACTAAGACTGTAAGAATCTACCCTGAGCGAA-ATGGCTAGAGCATTAGTGC

```

*

OOGHM6 TGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGTGGTGGGCGCC---TTCCCAGCCATGTCCTTGTCC
CHGH TGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGTGGTGGGCGCC---TTCCCAGCCATGTCCTTGTCC
BTGROW TGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGTGGTGGGCGCC---TTCCCAGCCATGTCCTTGTCC
BTGHC TGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGTGGTGGGCGCC---TTCCCAGCCATGTCCTTGTCC
SSGHMA TGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGAGGTGGGCGCC---TTCCCAGCCATGCCCTTGTCC
MMGH TGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGGAGTGCC---TTCCCAACCATTCCCTTATCC
HSGROW1 TGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGGAGTGCC---TTCCCAACCATTCCCTTATCC
RNJSOMAT TGCTCTGCCTGCTGTGGCCTCAAGAGGGCTGGTGCT---TTACCTGCCATGCCCTTGTCC
MMGHR1 TGCTCTGCCTGCTGTGGCCTCAGGAGGCTAGTGCT---TTTCCCGCCATGCCCTTGTCC
GGGHA TGCTCACGCTGGGACTGCCGAGGAAGCTGCTGCCACC-TTCCCTGCCATGCCCTTCTCC
RCGHR TAATATGTCTTCAAAGCCCGCAAGGGTTCAATGCC---TTTCCACAGATGTCTCTTTCC
TTGHR TGCTGTCAGTCCTGTCTCTGGGTGTCTCCTCTCAGC-----CAATCACAGACAGCCAG
POFGH TGCTGTCAGTCATGTGTGTGGGCGTGTCTCTCAGC-----CAATCACAGAGAACCAG
SSALGHI TGATGCCAGTCTTACTGGTCAGT-TGTTTTCTGAGCCAAGGGGAGCGATGGAAAACCAA
OKGHCOHO TGATGCCAGTCTTACTGGTCAGT-TGTTTTCTGAGTCAAGGGGAGCGATAGAAAACCAA
SGGH2 TGATGCCAGTCTTACTGGTCAGT-TGTTTTCTGGGTCAAGGGGCGGCGATGGAAAACCAA
CIGRH TGTTGTCCGTGGTGCTGGTTAGTTTGTGG-TGAACCAGGGGAGGCGCTCAGAGAACCAG
* * *

OOGHM6 GGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCATCAACTGGCTGCTGACACC
CHGH GGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCATCAACTGGCTGCTGACACC
BTGROW GGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCACCAGCTGGCTGCTGACACC
BTGHC GGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCATCAGCTGGCTGCTGACACC
SSGHMA AGCCTATTTGCCAACGCGTGTCTCCGGGCGCCAGCACCTGCACCAACTGGCTGCCGACACC
MMGH AGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACC
HSGROW1 AGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACC
RNJSOMAT AGTCTGTTTGCCAATGCTGTGCTCCGAGCCAGCACCTGCACCAGCTGGCTGCTGACACC
MMGHR1 AGTCTGTTTCTAATGCTGTGCTCCGAGCCAGCACCTGCACCAGCTGGCTGCTGACACC
GGGHA AACCTGTTTGCCAACGCTGTGCTGAGGGGCTCAGCACCTCCACCTCCTGGCTGCCGAGACA
RCGHR AACCTCTTTACAAATGCTGTGCTATTCGAGCTCAGCACCTTCACCAGATGGTTGCCGATACC
TTGHR CGTCTGTTCTCCATCGCTGTGCTCAGCAGAGTGCAACACCTCCACCTGCTCGCCAGAGACTC
POFGH CGCCTGTTCTCCATCGCTGTGGTTCGAGTTTCACTATCTTCACCTGGTTGCTAAGAACTC
SSALGHI CGGCTCTTCAACATCGCGGTCAACCGGGTGCAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAGATG
OKGHCOHO CGGCTCTTCAACATCGCGGTGAGTCCGGGTGCAACATCTCCACCTATTGGCTCAGAAAATG
SGGH2 CGGCTCTTCAACATCGCGGTGAGTCCGGGTGCAACATCTCCACCTATTGGCTCAGAAAATG
CIGRH CGGCTCTTCAACAACGAGTCAACGTTTCAACACCTGCACCAGCTGGCTGCAAAAATG
* * *
L---*GROWTH F1*---* * * * * * *

OOGHM6 TTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCC---AGAAC
CHGH TTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCC---AGAAC
BTGROW TTCAAAGAGTTTGAGCGTACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCC---AGAAC
BTGHC TTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCC---AGAAC
SSGHMA TACAAGGAGTTTGAGCGCGCTACATCCCGGAGGGACAGAGTACTCCATCC---AGAAC
MMGH TACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCTTCTGCAGAAC
HSGROW1 TACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCTTCTGCAGAAC
RNJSOMAT TACAAGAGTTTCGAGCGTGCCTACATTCCCGAGGGACAGCGCTATTCCATTC---AGAAT
MMGHR1 TACAAGAGTTTCGAGCGTGCCTACATTCCCGAGGGACAGCGCTATTCCATTC---AGAAT
GGGHA TATAAAGAGTTTGAAGCGCACCTATATTCCGGAGGACCAGAGGTACACCAACA---AAAAC
RCGHR TACAGAGACTATGAAAGAACATATATACCTGAAGATCAGAGATTCA--AACA---AACAC
TTGHR TTCTCTGACTTTGAGAGCTCTCTGCAGACAGAGGAGCAGCGTCAGCTCAACA---AAATC
POFGH TTCAGTGACTTTGAGAACTCACTACAGTTGGAGGATCAACGTCTTCTCAACA---AAATC
SSALGHI TTCAATGACTTTGAAGGTACCTGTTGCCTGATGAACGCAGACAGCTGAACA---AGATA
OKGHCOHO TTCAATGACTTTGACGGTACCTGTTGCCTGATGAACGCAGACAGCTGAACA---AGATA
SGGH2 TTCAACGACTTTGAAGGCACCTGTTGCCTGATGAACGCAGACAGCTGAACA---AGATA
CIGRH ATTAACGACTTTGAGGACAACCTGTTGCCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGTA---AAATC
* * *
L---*GROWTH F2*---* * *

OOGHM6 ACCCAGGTT---GCCTTCTGCTTCTCTCGAAACCATCCCGGCCCCCAGGGCAAGAATGA
CHGH ACCCAGGTT---GCCTTCTGCTTCTCTGAAACCATCCCGGCCCCCAGGGCAAGAATGA
BTGROW ACCCAGGTT---GCCTTCTGCTTCTCTCGAAACCATCCCGGCCCCCAGGGCAAGAATGA

BTGHC	ACCCAGGTT---GCCTTCTGCTTCTCTGAAACCATCCCGGCCCCACAGGGCAAGAATGA
SSGHMA	GCCCAGGCT---GCCTTCTGCTTCTCGGAGACCATCCCGGCCCCACAGGGCAAGGACGA
MMGH	CCCCAGACC---TCCCTCTGCTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGA
HSGROW1	CCCCAGACC---TCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGA
RNJSOMAT	GCCCAGGCT---GCGTTCTGCTTCTCAGAGACCATCCCGGCCCCACAGGGCAAGGAGGA
MMGHR1	GCCCAGGCT---GCTTTCTGCTTCTCAGAGACCATCCCGGCCCCACAGGGCAAGGAGGA
GGGHA	TCCCAGGCT---GCGTTTTGTTACTCAGAAACCATCCAGCTCCACAGGGGAAGGATGA
RCGHR	TTCTTATTTCA--GTGTATTGCTACTCAGAAACCATCCAGCACCAACAGACAAAGACAA
TTGHR	TTCTTGCTGAG---GATTTCTGCAACTCTGATTACATCATCAGCCCGATCGACAAGCATGA
POFGH	--GCTTCAAAA--GAATTTTGTCAATTCAGATAATTTCTTGAGTCCGATCGACAACACGA
SSALGHI	TTCTTGCTG---GACTTCTGTAACCTCTGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCTTGA
OKGHCOHO	TTCTTGCTG---GACTTCTGTAACCTCTGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCACGA
SGGH2	TTCTTGCTG---GACTTCTGTAACCTCTGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAGGA
CIGRH	TTCTTGCTG---TCTTTCTGCAACTGTGACTCAATTGAGGCGCCCACTGGAAAAGATGA

* * * * *

OOGHM6	GGCCCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTTATCCAGTCGTG
CHGH	GGCCCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTTATCCAGTCGTG
BTGROW	GGCCCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTTATCCAGTCGTG
BTGHC	GGCCCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTTATCCAGTCGTG
SSGHMA	GGCCCAGCAGAGATCGGACGTGGAGCTGCTGCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCGTG
MMGH	AACACAGCAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTTCTCATCCAGTCGTG
HSGROW1	AACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTG
RNJSOMAT	GGCCCAGCAGAGAACTGACATGGAATTGCTTCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCATG
MMGHR1	GGCCCAGCAGAGAACCGACATGGAATTGCTTCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCATG
GGGHA	CGCCCAGCAGAAGTCAGACATGGAGCTGCTTCGGTTTTCTACTGGTTCTCATCCAGTCCTG
RCGHR	TACTCACCAGAAATCAGATATAGACCTCCTCCGCTTCTCCCTCACACTCCTGCAGTCATG
TTGHR	GACACAACGCAGCTCTGTTCTGAAGCTGCTGTGATCTCCTATCGATTGGTGGAAATCGTG
POFGH	GACACAAGGCAGCTCAGTTTCAGAAGCTTTTATCGGTCTCTTATCGATTGATTGAGTCCTG
SSALGHI	GACTCAGAAGAGTTTCACTCCTGAAGCTGCTCCATATCTCTTTCCGTCTGATTGAATCCTG
OKGHCOHO	GACTCAGAAGAGTTTCACTCCTGAAGCTGCTCCATATCTCTTTCCGTCTGATTGAATCCTG
SGGH2	GACTCAGAAGAGTTTCACTCCTGAAGCTGCTCCATATCTCTTTCCGTCTGATTGAATCCTG
CIGRH	AACGCAGAAGAGCTCTATGTTGAAGCTCCTTCGCATCTCTTTCCGCCTCATTGAGTCCTG

* * * * *

OOGHM6	GCTTGGGGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTCTTACCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTC
CHGH	GCTTGGGGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTCTTACCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTC
BTGROW	GCTTGGGGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTCTTACCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTC
BTGHC	GCTCGGGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTCTTACCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTC
SSGHMA	GCTCGGGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTCTTACCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTC
MMGH	GCTGGAGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTC
HSGROW1	GCTGGAGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTC
RNJSOMAT	GCTGGGGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTCTTACCAACAGCCTGATGTTTGGTACCTC
MMGHR1	GCTGGGGCCCCTGCAGTTTCTCAGCAGAGTCTTACCAACAGCCTGATGTTTGGTACCTC
GGGHA	GCTGACTCCCCTGCAATACCTAAGCAAGGTGTTACGGAACAACCTGGTGTGTTGGCACCTC
RCGHR	GATGACCCCTATCCAAATCGTCAACAGAGTCTTGGCAACAACAGGTGTTTGGAAACAT
TTGHR	GGAGTTCCCAGCCGTTCTCTGTCCG--GAGGT-----TCTG-----CTCCAAGG-
POFGH	GGAGTTTTTTCAGTCGCTTCTGCTCG--CAAGT-----TTTG-----CTGTGAGG-
SSALGHI	GGAGTACCCTAGCCAGACCCTGACCA-----TCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAAACTC
OKGHCOHO	GGAGTACCCTAGCCAGACCCTGATCA-----TCTCCAACAGCCTAATGGTCGGAACGC
SGGH2	GGAGTACCCTAGCCAGACCCTGATCA-----TCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAAACTC
CIGRH	GGAGTTCCCAGCCAGACCCTGAGCGCCAGGTCTCAAACAGTCTGACCGTCGGGAACCC

* * * * *

OOGHM6	GGACCGT---GTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCG
CHGH	GGACCGT---GTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCG
BTGROW	GGACCGT---GTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCG
BTGHC	GGACCGT---GTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCG
SSGHMA	AGACCGC---GTCTACGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCAGGCCCTGATGCG
MMGH	GTACAGTGACGTCTATGACCTCTTAAACGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACACTGATGGG

HSGROW1	TGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGG
RNJSOMAT	GGACCGC---GTCTATGAGAAACTGAAGGACCTGGAAGAGGGCATCCAGGCTCTGATGCA
MMGHR1	GGACCGT---GTCTATGAGAAACTGAAGGACCTGGAAGAGGGCATCCAGGCTCTGATGCA
GGGHA	AGACAGA---GTGTTTGAGAAACTAAAGGACCTGGAAGAAGGGATCCAAGCCCTGATGAG
RCGHR	TGACAGA---GTTTATGACAGACTGAGGGACCTCGATGAAGGACTACACATTCTCATAAG
TTGHR	-AACC-AA--ATCTCACCAAAACCTGTCTGAACCTGAAGACAGGAATCCACCTGCTGATCAG
POFGH	-ACCC-AG--GTTACATCCAAACTGTCAGAACTGAAGATGGGTCTCCTGAAGCTGATAGA
SSALGHI	CAACC-AG--ATCTCTGAGAAGCTCAGCGACCTCAAAGTGGGCATCAACCTGCTCATCAA
OKGHCOHO	CAACC-AG--ATCTCTGAGAAGCTCAGCGACCTCAAAGTGGGCATCAACCTGCTCATCAT
SGGH2	CAACC-AG--ATCTCTGAGAAGCTCAGCGACCTCAAAGTGGGCATCAACCTGCTCATCAA
CIGRH	CAACC-AG--ATCACTGAGAAGCTGGCCGACTTGAAGTGGGCATCAGCGTGTCTCATCAA
	* * * ** * ** *

```

OOGHM6      GGAGCTGGAAGATGTTACCCCCCGGGCTGGGCAGAT-----CCTCAAGCAG--ACCTA
CHGH        GGAGCTGGAAGATGTTACCCCCCGGGCTGGGCAGAT-----CCTCAAGCAG--ACCTA
BTGROW      GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCCGGGCTGGGCAGAT-----CCTCAAGCAG--ACCTA
BTGHC       GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCCGGGCTGGGCAGAT-----CCTCAAGCAG--ACCTA
SSGHMA      GGAGCTGGAGGATGGCAGCCCCCGGGCAGGACAGAT-----CCTCAAGCAA--ACCTA
MMGH        GAGGCTGGAAGATGGCAGCTCCCGGACTGGACAGAT-----CTTCAAGCAG--ACCTA
HSGROW1     GAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGAT-----CTTCAAGCAG--ACCTA
RNJSOMAT    GGAGCTGGAAGACGGCAGCCCCCGTATTGGGCAGAT-----CCTCAAGCAA--ACCTA
MMGHR1      GGAGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGTGTGGGCAGAT-----CCTCAAGCAA--ACCTA
GGGHA       GGAGCTGGAGGACCGCAGCCCCGCGGGGCCCGCAGCT-----CCTCAGACCC--ACCTA
RCGHR       AGAGCTGGATGATGGAATGTTGGAACCTACGGTGT-----GCTGACTTTT--ACATA
TTGHR       GGCCAATCAGGATGGAGACGAGATGTTGCTGACAGCTCTGCCCTCCAGCTCGCTCCGTA
POFGH       GGCCAATCAGGATGGAGCAGGTGGATTCTCTGAGAGTTCGGTGCTCCAGCTCACGCCGTA
SSALGHI     GGGGAGCCAGGATGGCGTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCCTA
OKGHCOHO    GGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCGCTA
SGGH2       GGGGAGCCAGGATCTGGCACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCATCTGCCCCCCTA
CIGRH       GGGATGTCTGGATGGTCAACCAAACATGGATGATAA--CGACTCCCTGCCAC-TGCCCTTT

```

```

OOGHM6      TGACAAATTTGACACAAACATGCGCAGTGATGATGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGCT
CHGH        TGACAAATTTGACACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGCT
BTGROW      TGACAAATTTGACACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGCT
BTGHC       TGACAAATTTGACACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGCT
SSGHMA      CGACAAATTTGACACAAACTTGCGCAGTGATGACGCGCTGCTTAAGAACTACGGGCTGCT
MMGH        CAGCAAGTTTGACACAAACTCACACAACAATGATGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCT
HSGROW1     CAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCT
RNJSOMAT    TGACAAGTTTGACGCCAACATGCGCAGCGATGACGCTCTGCTCAAAAACCTATGGGCTGCT
MMGHR1      TGACAAGTTTGACGCCAACATGCGCAGCGACGACGCGCTGCTCAAAAACCTATGGGCTGCT
GGGHA       CGACAAGTTTCGACATCCACCTGCGCAACGAGGACGCGCTGCTGAAGAACTACGGCTGCT
RCGHR       TGATAAGTTTGATGTCAATCTGCGCAGTGAAGAAGGCCGGGCGAAGAATTACGGTCTACT
TTGHR       TGGAACTATTATCAAAGTCTGGGAGCTGACGAGTCACTGAGACGGAGCTACGAGCTGCT
POFGH       TGGAACT-----CT--GAA-----CTGTT
SSALGHI     CGGGAACTACTACCAGAACCTGGGGGGCGACGGCAACGTCAGGAGGAACCTATGAGTTGTT
OKGHCOHO    CGGGAACTACTACCAGAACCCGGGGGGCGACGGAAACGTCAGGAGGAACCTACGAGTTGTT
SGGH2       CGGGAACTACTACCAGAACCTGGGGGGCGACGGCAACGTCAGGAGGAACCTACGAGCTGTT
CIGRH       TGAGGATTCTACTTGACCATGGG---GGAGAGCAGCCTCAGAGAGAGCTTTTCGTCTTCT

```

OOGHM6	CTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCACAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGTGCG
CHGH	CTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCACAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGTGCG
BTGROW	CTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCG
BTGHC	CTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCG
SSGHMA	CTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCTGAGACATACCTGCGGGTCATGAAGTGTGCG
MMGH	CTATTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGATCGAGACATTCTGCGCATTGTGTCAGTG---
HSGROW1	CTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCTGCGCATCGTGCAGTG---
RNJSOMAT	CTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCAGAGACCTACCTGCGGGTCATGAAGTGTGCG
MMGHR1	CTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGCGGAGACCTACCTGCGGGTCATGAAGTGTGCG

GGGHA	GTCCTGCTTCAAGAAGGATCTGCACAAGGTGGAGACCTACCTGAAGGTGATGAAGTGCCG
RCGHR	CTCCTGCTTCAAGAAAGACATGCATAAAGTAGAGACCTACCTGAAGGTGATGAAATGCCG
TTGHR	TGCCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTGGCTAAATGTCCG
POFGH	CGCCTGCTTAAAGAAGGATATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACCGTGGCCAAATGCCG
SSALGHI	GGCCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACCGTGGCCAAATGCCG
OKGHCOHO	GGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACCGTGGCCAAATGCCG
SGGH2	GGCCTGCTTCAAGAAGGACATGCATAAAGGTGGAGACCTACCTGACCGTGGCTAAGTGCG
CIGRH	GGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAAACTTACCTGAGGGTTGCGAATTGCAG

 |-----GROWTH R1-----|

OOGHM6	CCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGCGCCTTCTAGTTGCCAGC---CAT---CTGTTGTTA-
CHGH	CCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGCGCCTTCTAGTTGCCAGC---CAT---CTGTTGTTA-
BTGROW	CCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGC---CAT---CTGTTGTTTG
BTGHC	CCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGCGCCTTCTAGTTGCCAGC---CAT---CTGTTGTTTG
SSGHMA	CCGCTTCGTGGAGAGCAGCTGTGCTTCTAGTTGCTGGG---CAT---CTCT-GTTG-
MMGH	CCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGATGCCTGGGTGGCAT---CC-T-GTGA-
HSGROW1	CCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCTGCCCGGTGGCAT---CCCT-GTGA-
RNJSOMAT	CCGCTTTGCGGAAAGCAGCTGTGCTTCTAGGCCACACAC-TGGTGT---CTCTGCGG--
MMGHR1	CCGCTTTGTGGAAAGCAGCTGTGCTTCTAGCCACTCAC-CAGTGT---CTCTGCTG--
GGGHA	GCGCTTCGGAGAGAGCAACTGCACCATCTGA-----GG-----CC-----
RCGHR	GAGATTTGTGGAGAGCAACTGCACCTTTTAAT--CAAGA---AA-----AAAATGTTAC
TTGHR	ACTCTCTCCAGAAGCTAACTGCACCCTGTAGCCC-CGCTCTCTGAT--GACGTCATCCT
POFGH	ACTCTTTCCAGAAGCTAACTGCACCCTGTAGCCC-CGCTCTC-----CGCCAA---
SSALGHI	GAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAGACGTGGGCTGGAGAGGCAGCCAGCAAGAG
OKGHCOHO	GAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAAACGTGGGGCGGAGCGCGACGCAGCAAGAG
SGGH2	GAGATCCCTGATTCAAACCTGCACCCTGTAGATGGCGCCAATGTATT--GCTAGCCAAAG
CIGRH	

* * * * *

OOGHM6	CC--CCTCCCCCTGTGCCTTCCTAGA---CCCTGGAAGGT-GCCACTCCAGTGCCCACT-G
CHGH	CC--CCTCCCC-GTGCTTCCTAGA---CCCTGGAAGGT-GCCACTCCAGTGCCCACT-G
BTGROW	CC--CCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA---CCCTGGAAGGT-GCCACTCC-----CACT-G
BTGHC	CC--CCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA---CCCTGGAAGGT-GCCACTCC-----CACT-G
SSGHMA	CC--CCTCCCCAGTACCTCCCCCTGGT-GCCCTGGAAGT-GCCACCCCAATGCCTGCT-G
MMGH	CC--CCTCCCAATTGCCAATCCTGG---CCATGGAAGT-GCCACTCCAGTGCCCACTG
HSGROW1	CC--CCTCCCCAGTGCCTTCCTGG---CCCTGGAAGT-GCCACTCCAGTGCCCACTG
RNJSOMAT	-C--ACTCCCCCGTTACCCCCCTGTA--CTTGGCAACT-GCCACCCC--TA--CACT--
MMGHR1	-C--ACTCTCCTGTG-CCTCCCTGCC--CCCTGGCAACT-GCCACCCC--TG-----
GGGHA	----CCGTGCCTGCGCCATGGCTGATGGCCCTGTCCC--CCCCCCCCCTTCCTCCCCG
RCGHR	AT--CCTCCATAGTCACCCCACCT---CCTGCAGGACACCCGCTGCATTTTTATATCT
TTGHR	GTGTGTTCTGGAGCCCCGCTCTCTGATGACGTAATCATGTGTGTTCTGTAGCCCCGCT
POFGH	-----GAAGTACCTCCCCCGCAGATGAC--ATCATATGCATTCTGT-GCCCCACCC
SSALGHI	CCTGTCTCCAGGGTTTCGGTTTCCAGATACA--GATTA-GGCCTTGCCCTGCACTGAAGA
OKGHCOHO	CCTGTCTCCAGGGTTTCGGTTTCCAGATACA--GATTA-GGCCTTGCCCTGCACTGAGGT
SGGH2	CCTGTCTCCAGGGTTTCGGTTTCCAGATACA--GATGA-GACCTTGCCCTGCACTGAAGA
CIGRH	CCTGTGACACACTTTGCTGCAATCTAAAACCAAGTTTAAGTCCTCAAAAATCTCCTAATA

OOGHM6	TCCTTTTCTAATAAAGCGAGGAAATTGCATCAC-----
CHGH	TCCTTTTCTAATAAAGCGAGGAAATTGCATCAA-----
BTGROW	TCCTTTTCTAATAAAGCGAGGAAATTGCATCGC-----
BTGHC	TCCTTTTCTAATAAAGCGAGGAAATTGCATCGCA-----
SSGHMA	TCCTTTTCTAATAAACCAGG---TTGCATCG-----
MMGH	ATGTGTCTAATAAATAAAG---TTGCATCAAAAA-----
HSGROW1	CCTTGTCTAATAAATAAAG---TTGCATC-----
RNJSOMAT	-T-TGTCTAATAAATAAAG---ATGCATCATATC-----
MMGHR1	-----
GGGHA	TC----ACCAAAACACGAGGAATAAACCCACAGCGCC-----
RCGHR	TCAGGAGGTAGGGCCCACTGATAATTGTCCCTTTTAACTTCCTGACCAATTGCACATTT
TTGHR	CCATGTTCTC---TTTGCTGGTTAGCATTAGCCTGTGATGGTTT---TCTGATGTCATC

POFGH	CTGTGGTTGCCGAGTCTGCTGACTAGCATT--ATGTTAGCATCT---GTTGGT---TC
SSALGHI	GCATTTTCAATTGAGATTCTCCATTGAACGTGCTTTTT--AGTCTTGAGTAGATTTAATT
OKGHCOHO	GCATTTTCAATTGAGATTCTCCATTGAACATGCTTTTC--AGTCTAGAGTAATTTCAATT
SGGH2	GCATGTTCAATTGAGATTCTCCATTGGGCATGTTTTTTTTTAGTCTAGAGTAGATTTTCATT
CIGRH	TAATTATTATCTGGTCTTATATATGCAGGAAATGTCAACCAGGCATGGCTAGGTCTGTTT

OOGHM6	-----
CHGH	-----
BTGROW	-----
BTGHC	-----
SSGHMA	-----
MMGH	-----
HSGROW1	-----
RNJSOMAT	-----
MMGHR1	-----
GGGHA	-----
RCGHR	TTTGCAGATGTATTTTGCCTTGTGCTTTTGTGTCTTTGTATGTTGTTAAAAAATAAAG
TTGHR	ATCAGATAAATAGTACAAGCTATGAACAGGAAGTGATGTCAGACTGTCGGCCTTTTCTC-
POFGH	TGCAT-----TCCACCTGATGATGTCAATTGTGATGTCATACTGTCAGCAAATA---
SSALGHI	TGGAT---CTGGTAGAGCC--TGA-CTCCAGGGGTTTTTCAGGAATTTGCA-TTTTGTT-
OKGHCOHO	TGGAT---CTGGTAGAGCC--TGA-CTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTTGCACTTTTTTT-
SGGH2	TGGAT---CTGGTAGAGCC--TGG-CTCCAGGGGTTTTCAAGCATTTTGCATTTTGT-
CIGRH	TCTAGTTCCC--TCCCATATCTAAACCCAACACTATTGTATTTATTCTTCTCATTGGG-

OOGHM6	-----
CHGH	-----
BTGROW	-----
BTGHC	-----
SSGHMA	-----
MMGH	-----
HSGROW1	-----
RNJSOMAT	-----
MMGHR1	-----
GGGHA	-----
RCGHR	TATAGGAGGCATTTTCATGA-----
TTGHR	---AGCATGTGAAATAAACTGCGCTG-AGTTGCATTC-----
POFGH	---AAGATTTTCATTTCAGTC-----
SSALGHI	-CTCTGAAATCAACAACAGCACTTTCTATATTGACT---ATTACTCTGAGCTACCATTG
OKGHCOHO	-CTCTGAAATCAACAACAACACTTTCTATATTGACTC--TATCACTCTGAGCTACCATTG
SGGH2	-CTCTGAA-TCAACTTT---CTATG-ATTTTCACTC--CATTACTCGGAGCTACCACTG
CIGRH	-GAGTGCTCGTAAATTAAAGACATTAAGATCTGATTTAACATTTACAGTGGTGCTAAGC

OOGHM6	-----
CHGH	-----
BTGROW	-----
BTGHC	-----
SSGHMA	-----
MMGH	-----
HSGROW1	-----
RNJSOMAT	-----
MMGHR1	-----
GGGHA	-----
RCGHR	-----
TTGHR	-----
POFGH	-----
SSALGHI	AT-----TAGTACATTTATAGAAAAGGTTATTAAATGTCTTATTTAGA
OKGHCOHO	AT-----TAGTACATTTATAGAAAAGGTTATTAAATGTCTTATTTAGA

SGGH2	ATCCATGGACATTTTAGATTAGTACATTTATTTGAAAAGGTTATTAAATATGCTATTTAGA
CIGRH	AATATATGGCAATATATTTTCAAATGTGCCCCAAATCGCTTTGACTCTAGTATTTTATGGC
OOGHM6	-----
CHGH	-----
BTGROW	-----
BTGHC	-----
SSGHMA	-----
MMGH	-----
HSGROW1	-----
RNJSOMAT	-----
MMGHR1	-----
GGGHA	-----
RCGHR	-----
TTGHR	-----
POFGH	-----
SSALGHI	TATATGATTTCATGGTGGTGCTA-CTGTTTATGCATACATTCATATTTAGGGGTGAAATGG
OKGHCOHO	TATATGGTTCATGGCGGTGCTA-CTGTTTATGCATACGTTAATATTTAGGGGTGAAATGG
SGGH2	TATATGATTCAAGGTGGTGGTGGCCATTTATGCATAAATTAATATTTAGAGGTGAAATGG
CIGRH	TCCAAATGGCTAAAGCATGCCTTTTGTGCGAAACTGTCATTTGGATGGATGGGTTCACTCC
OOGHM6	-----
CHGH	-----
BTGROW	-----
BTGHC	-----
SSGHMA	-----
MMGH	-----
HSGROW1	-----
RNJSOMAT	-----
MMGHR1	-----
GGGHA	-----
RCGHR	-----
TTGHR	-----
POFGH	-----
SSALGHI	GAAC---GTGTAGAGCTCCAAGCTTT-----TGGATAATATATTTTAGAG
OKGHCOHO	GAAC---TTGTAGAGCTCCAAGCTTT-----TGGATAATATATTTTAGAG
SGGH2	GAAC---ATGTAGAGCTCCAATCTTTAGGTACGTCCACAGATGGATAATATATTTTAGAG
CIGRH	CAACCAAGTGTATGAATGTAAACATTTGT-----CTGTCTGATAGATTATGTCCATA
OOGHM6	-----
CHGH	-----
BTGROW	-----
BTGHC	-----
SSGHMA	-----
MMGH	-----
HSGROW1	-----
RNJSOMAT	-----
MMGHR1	-----
GGGHA	-----
RCGHR	-----
TTGHR	-----
POFGH	-----
SSALGHI	TTATTTCCCTTTAAGTATTTTCATTTCTTAATCTTATTGTTTGAAACTAATAGTGATACAT
OKGHCOHO	TAATTTCCCTTTAAGTATTTTCATTTCTTAATCTTATTGTTTGAAACTAATAGTGATTCAT
SGGH2	TCATTTCCCTTGAAGTATTTTCATTTCTTTATCTTACTGTTTGAAACGAATAGTGATTCGT
CIGRH	TTATTAGCTCATGCTGTTCTCTTGAAGCTGTGTGTCTTTATCCATTAAATTTCTAAACTG

OOGHM6	-----
CHGH	-----
BTGROW	-----
BTGHC	-----
SSGHMA	-----
MMGH	-----
HSGROW1	-----
RNJSOMAT	-----
MMGHR1	-----
GGGHA	-----
RCGHR	-----
TTGHR	-----
POFGH	-----
SSALGHI	TTTTCAATAAAGCTGTTGTTCTCTGC-----
OKGHCOHO	GTTTCAATAAAGATGTTCTTCTCTGCAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
SGGH2	-TTTCAATAAA-----CTTCTCTGCGGT-----
CIGRH	C-----

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Clustal X (1.64b) multiple sequence alignment

ตัวอย่าง แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างลำดับสายพันธุ์กรรม insulin-related hormone จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาลำดับสายพันธุ์กรรมในแง่ที่มีความคล้ายคลึงกันหรือใกล้เคียงในเชิงวิวัฒนาการ โดยพยายามวิเคราะห์หาลำดับที่เป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด (conserved region) ตำแหน่งของ Forward primers ; INS F0 , INS F1 และ Reverse Primers ; INS R1 , INS R2 ถูกแสดงบนลำดับสายพันธุ์กรรมที่นำมาเปรียบเทียบกันเหล่านี้ โดยได้แสดงลำดับชื่อของสิ่งมีชีวิตในลำดับต่อไป

INSULIN-RELATED HORMONE

NUCLEOTIDE SEQUENCES

LM5KDINS:	<i>Locusta migratoria</i> (Insect)
LMGIRP3:	<i>Locusta migratoria</i> (Insect)
LSMIIPII:	<i>Lymnaea stagnalis</i> (Freshwater snail, mollusca)
LSMIPR:	<i>Lymnaea stagnalis</i> (Freshwater snail, mollusca)

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

```

LM5KDINS      GCCGCCCCGACACCGCACCCAGAGATGTGGAAGCTGTGCCTCCGACTGCTCGCCGTGCTGG
LMGIRP3      -----
LSMIP11      -----
LSMIPR      -----

LM5KDINS      CGGTCTGCCTGTGCGACGGCCACGCAGGCGCAGTCCGACCTGTTCTCTCTGTGCGCCCAAGC
LMGIRP3      -----
LSMIP11      -----
LSMIPR      -----

LM5KDINS      GCAGCGGCGCGCCGCGAGCCCGTCGCCCCGCTACTGCGGCGAGAAGCTCTCCAACGCGCTCA
LMGIRP3      -----
LSMIP11      -----
LSMIPR      -----AGTCGTGTTCAACTGAGTTT

LM5KDINS      AGCTCGTCTGTGCTGGCAACTACAACACCATGTTCAAGAAGGCTTCACAAGATGTGTTCAG
LMGIRP3      -----TGCGCCGCTCGGGTGTTCAGATGTGTTCAG
LSMIP11      -----ACACAACCACGGCCGTCGAGACCAACCAGGAAGTTCTTC
LSMIPR      GAACTACTTGCCAGTGTTAATAGAAAACG-CGGAC-TAACCACATATCAGATAATATTTT
                                   *  *                               *

LM5KDINS      ACTCGGAGTCTGAAGACAACACTACTGGAGCGGGCAGTCCG-----CGGACGAGGCGGCGG
LMGIRP3      ACTCGGAGTCTGAAGACAACACTACTGGAGCGGGCAGTCCG-----CGGACGAGGCGGCGG
LSMIP11      ATCTCCAGCTAAAATCCAAAATGGTCGGCGTGCCTCGTTTTCACCAACGCCTTTGTGG
LSMIPR      ATT---AGCTAAAATCCAAAATGGCCGGCGTTTCGCTCGTTTTCACCAAAGCCTTCATGG
*      * *      * *      * *      * *      * *      * *      * *
      [-----INS FO-----]

LM5KDINS      AGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCCGCCGTACCCCATCTGGCGCG-GCCGAGCGCGGCGGG
LMGIRP3      AGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCCGCCGTACCCCATCTGGCGCG-GCCGAGCGCGGCGGG
LSMIP11      TCACAGTGCTTCTCACCCTGTTGCTGGACGTTGTCTGTGAAACCTGCAGAGGGCCAAT---
LSMIPR      TCACAGTGCTTCTCACCCTGTTGCTGAACATTGGCGTGAAACCTGCAGAGGGTCAATTTT
      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *

LM5KDINS      CTGCTGACGGGCGCGGTGTTCCGGCGGCGCACGCGCGGCGTCT----TCGACGAGTGCT
LMGIRP3      CTGCTGACGGGCGCGGTGTTCCGGCGGCGCACGCGCGGCGTCT----TCGACGAGTGCT
LSMIP11      CATCTTGAGTTTATCAAG-CCGACCACATCCCGTGGCATTGTGTGGCTCGAATTTGGCT
LSMIPR      CAGCTTGCAACATCAACGA-CCGACCACATCGCCGTGGGTGTGTGGCTCGGCTCTGGCC
* * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *
      [-----INS F1-----]

LM5KDINS      GCCGCAAGACCTGCAGCATCAGCGAGCTGCAGACCTACTGCGGCCGCGCTAGCCGCCGC
LMGIRP3      GCCGCAAGAGCTGCAGCATCAGCGAGCTGCAGACCTACTGCGGCCGCGCTAGCCGCCGC
LSMIP11      GGCTTCCGGGCGTTTCATATGTTTGAACCAAACTACCGTCAATGGTCAAGAGGGACGCA
LSMIPR      GACCTCGTGACTTCGCGTGTTCGAGCAGCAACCAACCGGCAATGGTCAAGAGG-----
* *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *

LM5KDINS      GCCCCACACCGCCGCCCTCCT--ATTTATTGTCCCT-GCACGGCTCTCCAGCTCACGGG
LMGIRP3      GCCCCACACCGCCGCCCTCCT--ATTTATTGTCCCT-GCACGGCTCTCCAGCTCACGGG
LSMIP11      GAAACAGGCTGGTTACTGCCAGAAACCATGGTCAAGAGGAACGCAGAAACAGATCT-GGA
LSMIPR      ---A-----ATGCAGAAACAGATCT-GGA
                                   * *      * * *      * * *

LM5KDINS      GCGGCCACGGCCTCCCATCAGTATTATTCCTTCTTATTTTCGATTTGTTTTACTGA--AA
LMGIRP3      GCGGCCACGGCCTCCCATCAGTATTATTCCTTCTTATTTTCGATTTGTTTTACTGA--AA
LSMIP11      CGACCCACTGCGTAACATAAAGCTGAG-CAGCG-AGAGCGC-TTTGACCTATCTGACCAA

```



```
LSMIPR      CGACCCACTGCGTAACATAAAAGCTGAG-CAGCG-AGAGCGC-TTGACCTACCTGACCAA
             *  * * * * *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
LM5KDINS    TTGTATACGTTCCATGTGATTCGTAAGACGAAAGTTGGTACAAAAA----ACTGTTCAAA
LMGIRP3      TTGTATACGTTCCATGTGATTCGTAAGACGAAAGTTGGTACAAAAA----ATCGTTCAAA
LSMIPR      GAGACAACGGACCACCAACTTAGTGTTG-GAATGCTGTTTTAATTATGCACCCCTGATG
LSMIPR      GAGACAAGGGACAACCAACATAGTGTTG-GAATGCTGCATGAAACCGTGCACACTGAGTG
             *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
             [ * * * * * ] INS R1 [ * * * * * ]
LM5KDINS    ACTCGTCAAAATAAATTTACATGTGCACAATAAAAAAAAAAANNAAAA-----
LMGIRP3      ACTCGTCAAAATAAATTTACATGTGCACAATAAAAAAAAAATGGTGTCTCTACTTCTTTTAA
LSMIPR      TGGTGCGAAAGTACTGCTATTAATGGAGTTTG-CAATTAAAAAATTATAATGTCTTAATA
LSMIPR      AGCTGAGACAGTACTGCCCCGTAATGGAGTTTGACGATT-----
             *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
             [ * * * * * ] INS R2 [ * * * * * ]
LM5KDINS    -----
LMGIRP3      CTCTCCTGTTCCTTTAGCCACTAATGGTTCACACTTTTG-----
LSMIPR      ACAACAATTCTTATAGGCCTGTAAATAAAAAATTTAGATTGAAACGG
LSMIPR      -----
```

กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

1. การเชื่อมโยงทางวิชาการ กับนักวิชาการอื่น

1.1 ด้านเทคนิคและครุภัณฑ์ในการดำเนินงานวิจัย

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการจัดหาตัวอย่างหอยเป่าชื่อขนาดใหญ่ตามที่ต้องการในสภาพที่มีชีวิตอยู่ ผู้ทำงานวิจัยได้รับความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดีจาก ศ. ดร. สุชาติ อุปถัมภ์ และ ศ. ดร. ประเสริฐ โศภน (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ส่วนเทคนิคทางด้านการผ่าตัดชำแหละหอยเป่าชื่อเพื่อการรวบรวมปมประสาท ได้รับความช่วยเหลือจาก ดร. อัมพร ทองกู่เกียรติกุล (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา) ส่วนเทคนิคทางด้านการถ่ายภาพผลการทดลอง ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ชัยทิพย์ วนิชานนท์ (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) เทคนิคทางปฏิบัติการ Protein electrophoresis ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ไพศาล ลิทธิกรกุล (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ)

ในการดำเนินงานวิจัยในช่วงการเตรียม competent cell และ transformation ต้องการสถานที่และครุภัณฑ์ที่เฉพาะเจาะจงบางรายการ ทางผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลืออนุเคราะห์จาก ดร. สุขศิริ แกรมส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ส่วนเทคนิคทางด้านวิชาการและเทคนิคทาง Molecular Biology ได้รับความช่วยเหลืออนุเคราะห์จาก Dr. Rudi Grams, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

1.2 ด้านวัสดุวิทยาศาสตร์

วัสดุวิทยาศาสตร์บางรายการต้องใช้เวลานานมากในการสั่งซื้อจากต่างประเทศ บางครั้งนาน 1-2 เดือน มีผลกระทบทำให้เกิดความล่าช้าต่อเนื่องในการวางแผนและดำเนินการทดลอง จึงต้องขอความอนุเคราะห์และขอความช่วยเหลือด้านวัสดุวิทยาศาสตร์ จากนักวิชาการดังมีรายนามต่อไปนี้

ผศ.ดร.เบญจมาศ ถนอมทรัพย์ (ภาควิชาจุลชีววิทยา)*

ผศ.ดร.โกสุม จันทรศิริ (ภาควิชาชีวเคมี)*

ผศ.ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ (ภาควิชาชีวเคมี)*

อ.จันทรทัรา ตันนัฏยุทธวงศ์ (ภาควิชาชีวเคมี)*

* คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ปัญหาและอุปสรรค

1 ปัญหาการเก็บตัวอย่างหอยเป่าฮื้อ

ในการทดลองมีปัญหาเกี่ยวกับการหาและเก็บตัวอย่างของหอยเป่าฮื้อ เพื่อจะเก็บตัวอย่างเฉพาะ cerebral ganglion ซึ่งมีขนาดเล็กมาก แต่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างหอยเป่าฮื้อได้ในบางช่วงระยะเวลาของปี เมื่อปัญหาด้านการเก็บตัวอย่างหอยเป่าฮื้อคลี่คลายไปในทางที่ดี ทำให้เริ่มสามารถเก็บตัวอย่างและดำเนินการทดลองตามแผนที่ได้วางไว้ต่อไป แต่ก็ทำให้เกิดความล่าช้าในการทำงาน นอกจากนี้การทดลองส่วนใหญ่เน้นไปที่สารพันธุกรรมของหอยเป่าฮื้อ ซึ่งผู้ทำการวิจัยได้เก็บรวบรวมและรักษาไว้ในสภาพที่เย็น แต่ทว่า เมื่อต้องมีการทดลองวิจัยย้อนกลับ去做 PCR-product ของบาง fragment ที่ยังไม่ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องหรือชัดเจน ก็ต้องมีการติดต่อประสานงานและขอความช่วยเหลือเพื่อขอตัวอย่างหอยเป่าฮื้อเป็นครั้งๆ ไป

2. ปัญหาด้านงบประมาณและเศรษฐกิจ

ปัญหาด้านงบประมาณและเศรษฐกิจที่ตกต่ำในปัจจุบันนี้ ส่งผลต่อเนื่องและกระทบกระเทือนต่อภาวะการทำงานวิจัย รวมทั้งผู้ดำเนินการวิจัยก็มิได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากหน่วยงานหรือองค์กรอื่นใด ปัญหาที่รวบรวมได้มีดังนี้

2.1 ปัญหาด้านราคาที่สูงขึ้นมากของวัสดุและเคมีภัณฑ์ทางวิทยาศาสตร์

ในการปฏิบัติการทดลอง จำเป็นต้องใช้วัสดุและเคมีภัณฑ์ส่วนใหญ่จากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูงและแพงมากขึ้น ทำให้มีผลกระทบกระเทือนต่อการวางแผนงานวิจัยเป็นอย่างมาก บางครั้งผู้วิจัยต้องใช้เวลาพอสมควรเพื่อการตรวจสอบเปรียบเทียบราคาของวัสดุและเคมีภัณฑ์จากหลายบริษัทตัวแทนจำหน่ายเพื่อให้ได้ราคาที่เหมาะสมและราคาถูก

2.2 ปัญหาด้านความล่าช้าในการสั่งซื้อวัสดุและเคมีภัณฑ์ทางวิทยาศาสตร์

ปัจจุบันนี้ บริษัทผู้เป็นตัวแทนการจำหน่ายวัสดุและเคมีภัณฑ์ (จากต่างประเทศ) มีปัญหาด้านเศรษฐกิจพอสมควร จึงไม่มีการสั่งสินค้าเพื่อเก็บสำรองไว้ในบริษัทเลย เมื่อผู้ทำการวิจัยสั่งซื้อสินค้าวัสดุและเคมีภัณฑ์วิทยาศาสตร์จากบริษัทตัวแทนจำหน่าย จำเป็นต้องใช้เวลาอย่างมาก บางครั้งเป็นเวลานานถึง 45 วัน ทำให้ส่งผลกระทบต่อการวางแผนการทดลอง

ผู้ทำการวิจัยก็พยายามวางแผนการทดลองล่วงหน้า และเตรียมสั่งซื้อวัสดุและเคมีภัณฑ์ล่วงหน้า แต่ทว่า ผลการทดลองในการวิจัยนี้ ถูกวิเคราะห์เป็นระยะ ๆ ตามวิธีการดำเนินการทดลอง เมื่อผลการทดลองแสดงว่าถูกต้องแล้ว จึงจะดำเนินการในระยะ

ต่อไป ซึ่งต้องใช้เวลาพอสมควร การเตรียมส่งซื้อวัสดุเคมีภัณฑ์ล่วงหน้าเป็นเวลานาน บางครั้งอาจไม่ดีเพราะเหตุเกี่ยวกับการหาค่าอายุการทำงานของวัสดุ และเคมีภัณฑ์บางชนิด กอปรกับเงินทุนในการดำเนินการวิจัยก็มีจำกัด จึงต้องพยายามบริหารจัดการด้านการเงินอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพอย่างที่สุด

3. ปัญหาด้านเวลา

ผู้ดำเนินงานวิจัยได้ขออนุมัติ สกว ตามหนังสือที่ ทม 1021(2)/278 เพื่อไปปฏิบัติราชการในโครงการแลกเปลี่ยนนักศึกษาและบุคลากรไทยกับต่างประเทศ ทบวงมหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2541 โดยเดินทางไป Illinois State University (ISU) ประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี พ.ศ. 2541 ถึง ปี พ.ศ. 2542 และขอขยายเวลาเพื่อปรับเปลี่ยนแผนการทดลองสำหรับโครงการนี้ออกไปอีกเป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งก็ได้รับการอนุญาตจาก สกว ให้ขยายเวลาได้ตามคำขอ ดังนั้นเมื่อกลับมาทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการพบว่าประสบปัญหาบางประการ ปัญหาที่เกิดขึ้นพบว่าสารพันธุกรรมจากหอยเป่าสื่อที่เก็บรวบรวมไว้บางส่วนเกิดมีการเสื่อมสลาย (degradation) และส่งผลกระทบต่อผลการทดลองในระยะต่อไป จึงมีความจำเป็นอย่างสูงที่จะต้องย้อนกลับไปเริ่มต้นดำเนินการทดลองใหม่อีกครั้งหนึ่ง ดังที่แสดงในหัวข้อ II: ผลงานหรือกิจกรรมที่ทำได้จริง (ข้อ 1 - 6) ซึ่งการทดลองช่วงนี้ได้เคยทำและรายงานผลไปแล้วในรายงานสรุปความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 6 เดือน ครั้งที่ 2 พร้อมกันนี้ได้มีการดำเนินการวิจัยต่อเนื่องเพิ่มเติม ซึ่งก็ได้ทำการรายงานผลร่วมกันในรายงานโครงการวิจัยประจำปีที 2 ในครั้งนี้ จากเหตุผลที่กล่าวไปแล้ว ทำให้มีผลกระทบอย่างสูงในด้านเวลาของการทำงานวิจัยและทำให้การทำงานในกิจกรรมต่างๆ ล่าช้าไปจากแผนกิจกรรมที่วางไว้

4. ปัญหาด้านการจัดเตรียมห้องปฏิบัติการใหม่และครุภัณฑ์ใหม่

ผู้ทำการวิจัยมีโอกาสดำเนินงานงบประมาณจัดซื้อครุภัณฑ์ใหม่ประเภทชุดอิเล็กทรอนิกส์อย่างครบถ้วน พร้อมชุดถ่ายรูป จำนวน 1 ชุด จากงบประมาณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มศว ปี 2543 ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงได้ทำการขยับขยายและเลื่อนย้ายการทำงานวิจัยบางส่วนจาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มาทำที่ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มศว เพื่อที่จะได้ประหยัดเวลาในการเดินทางมีเวลาและโอกาสในการทำวิจัยมากขึ้น มีโอกาสที่จะพัฒนาและสร้างความก้าวหน้าของห้องปฏิบัติการทางวิจัยของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มศว แต่อย่างไรก็ตาม ผู้ทำการวิจัยประสบปัญหาเบื้องต้นเกี่ยวกับการจัดเตรียมห้องปฏิบัติการใหม่และครุภัณฑ์ใหม่บางประการ ซึ่งย่อมส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

ผู้ทำการวิจัย ชังคงขอเรียนให้ทาง สกว. ทราบว่า ผู้ทำการวิจัยตระหนักถึงภาระหน้าที่ผูกพันที่จะต้องรับผิดชอบและดำเนินงานวิจัยอย่างเต็มกำลังความรู้ความสามารถ เมื่อได้รับทุนส่งเสริมการวิจัยในครั้งนี้ พร้อมทั้งตระหนักดีว่าการได้รับทุนส่งเสริมนี้ มีคุณค่าความหมายและเป็นการให้โอกาสแก่นักวิจัยรุ่นใหม่ที่ยังขาดแคลนทั้งเงินทุนและประสบการณ์การเป็นผู้นำในงานวิจัย ทำให้มีโอกาสดำเนินงานวิจัยที่เป็นผู้บริหารงานวิจัยไปในขณะเดียวกัน แต่ทว่าปัญหาและปัจจัยอันเนื่องจากผลกระทบทางสังคมและเศรษฐกิจในปัจจุบัน ปัญหาการขาดแคลนด้านเงินทุนและครุภัณฑ์บางรายการและปัญหาด้านการบริหารเวลา ได้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการวางแผนงานวิจัย ไม่ว่าจะเป็นโดยทางตรงหรือทางอ้อม และส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อการดำเนินงานวิจัย แต่อย่างไรก็ตาม ผู้ทำการวิจัยยังมีความมุ่งมั่นที่จะดำเนินการวิจัยและพยายามแก้ไขปัญหาดังกล่าวต่อไป