



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 ปฏิภานนี้มีการใช้โปรแกรมซึ่งออกแบบโดยการใช้คอมพิวเตอร์ระบบ 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 หรือหอยร่อยรู (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)

นำหอยเป่าชื่อสลบด้วย $MgCl_2$ แล้วทำการผ่าตัดแยกปมประสาทซีรีบรอล (cerebral ganglia) และ มัดของเส้นประสาทที่อยู่บริเวณแกนของตำแหน่ง medulla โดยทอดตัวไปตามแนวยาวของปมประสาท cerebral ganglion ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ โดยที่ว่ปมประสาทชนิดนี้อยู่บริเวณส่วนหัวทางด้านหน้า และมีขนาดเล็กมาก

2.2 การศึกษาลักษณะเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) ในปมประสาท cerebral ganglion

เป็นการศึกษาทางด้านกายวิภาคของปมประสาท cerebral ganglion ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (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°C) | } จำนวน 40 รอบ |
| - 30 วินาที (94°C) | |
| - 30 วินาที (55°C) | |
| - 1 นาที (72°C) | |
| - 4 นาที (72°C) | |
| - 4°C | |

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 ถูกดำเนินการ โดยขบวนการแยกสารและวิเคราะห์สารด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 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 (stratogene) 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 แสดงผลทางปฏิบัติการติดสีน้ำตาลเข้มที่เป็นปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งของสารฮอโมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone) (รูปที่ 3 A , B)

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

เป็นการศึกษาทางด้านชีวเคมีและเซลล์วิทยาเพื่อศึกษาและวิเคราะห์กลุ่มฮอโมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ 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 รวมทั้งฮอโมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ (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 โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เชน (Polymerase chain reaction : PCR)

การทดลองได้ดำเนินการตามวัตถุประสงค์เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารพันธกรรม c DNA ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (growth hormone และ insulin-related hormone) โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เชนแบบย้อนกลับ (Reverse transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR) พร้อมทั้งดำเนินการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธกรรม DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เชน (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)

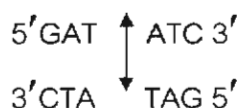
lane	Sample PCR-generated DNA fragments	reverse primer	forward primer	expected size of DNA fragment (basepairs)
2. 6	insulin-related hormone	INS R1	INS FO	380
3. 7	insulin-related hormone	INS R1	INS F1	230
4. 8	growth hormone	Growth R1	Growth F1	410
5. 9	growth hormone	Growth R1	Growth F2	440

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

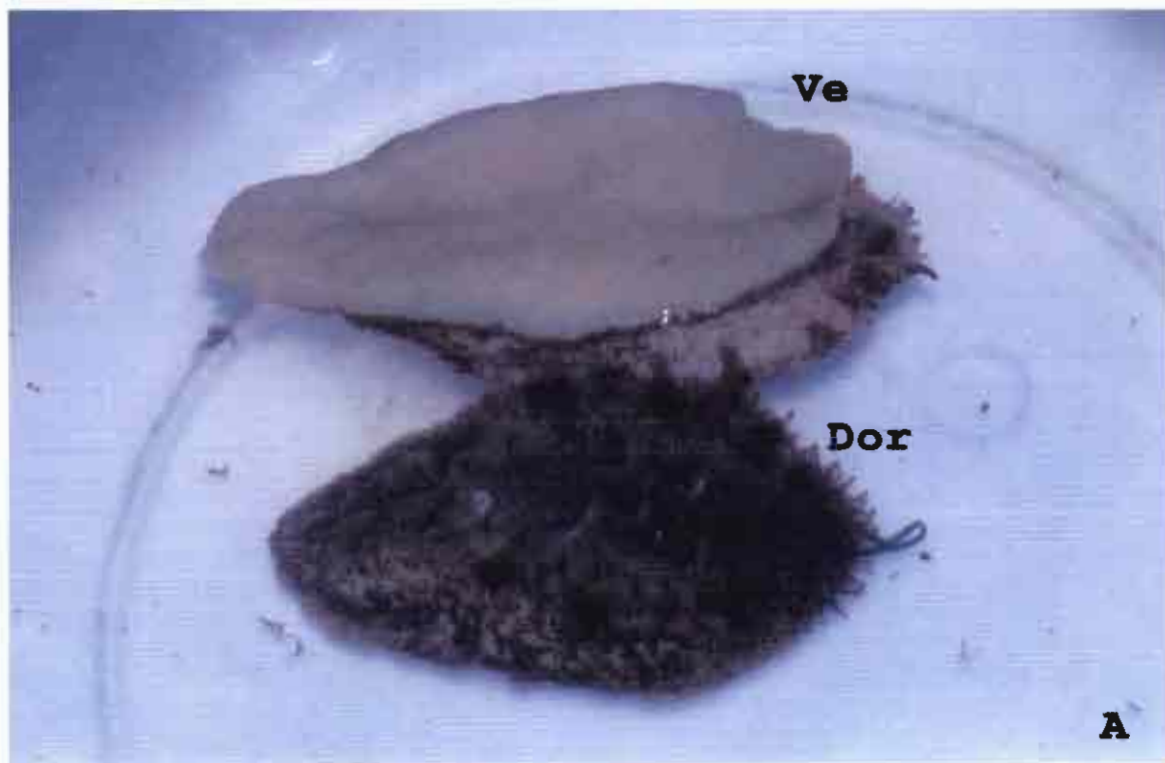
เมื่อทำการทดลองสกัด DNA สายผสมจากแบคทีเรีย (Mini-preparation of recombinant plasmid DNA) โดยนำ white colony ที่ได้โดยการใช้ forward และ reverse primers ชนิดต่างๆ กัน และนำ blue colonies ที่ได้จาก positive control ของ p-Bluescript plasmid แล้วนำ DNA สายผสมไปทดสอบโดยวิธี electrophoresis บน 1.5% agarose 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.)

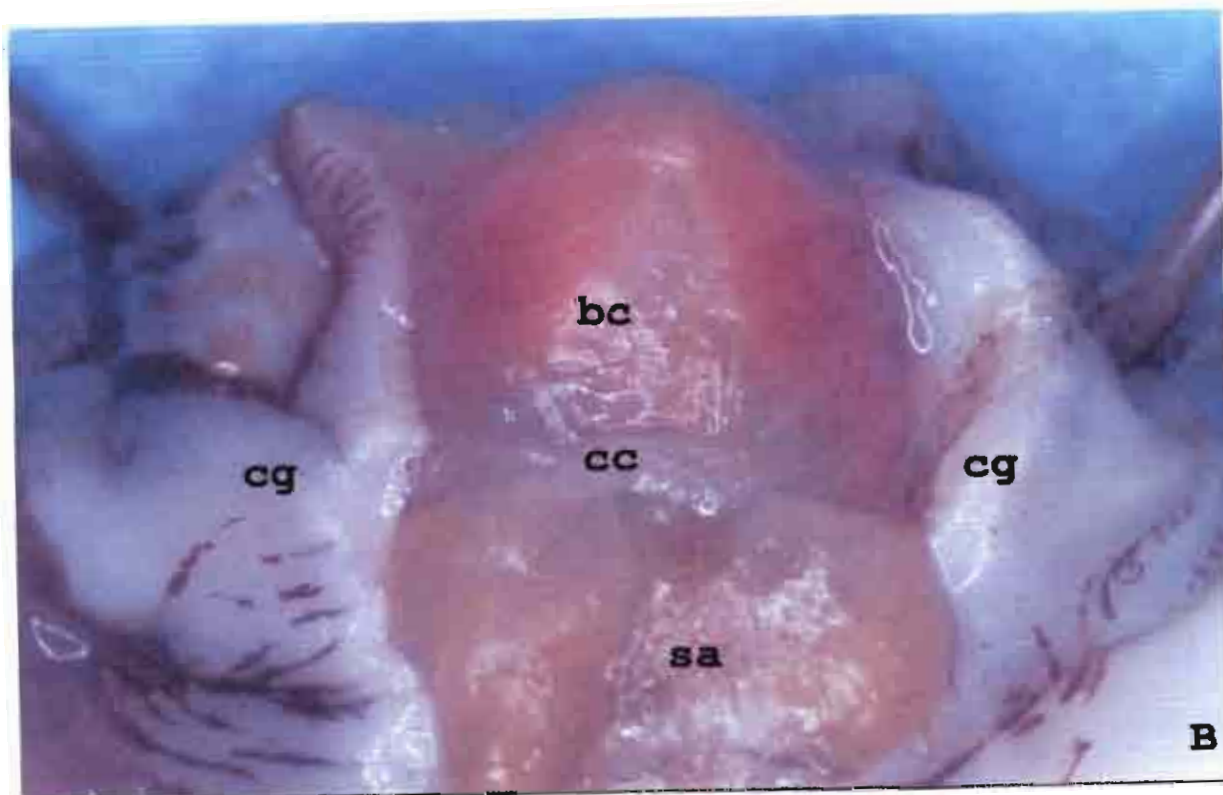
รูปที่ 1

- 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

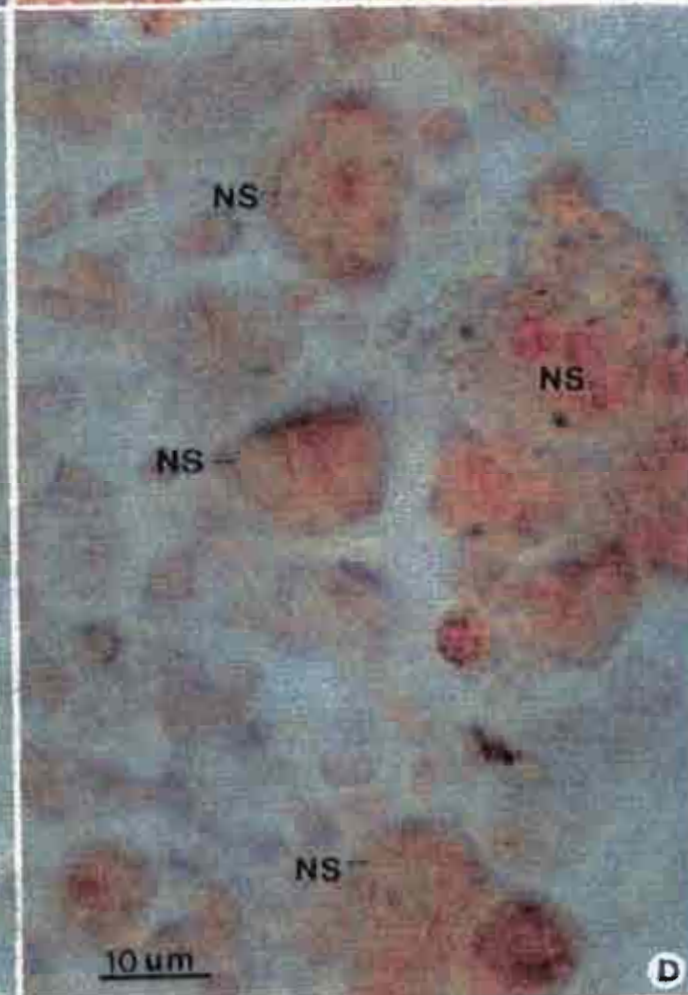
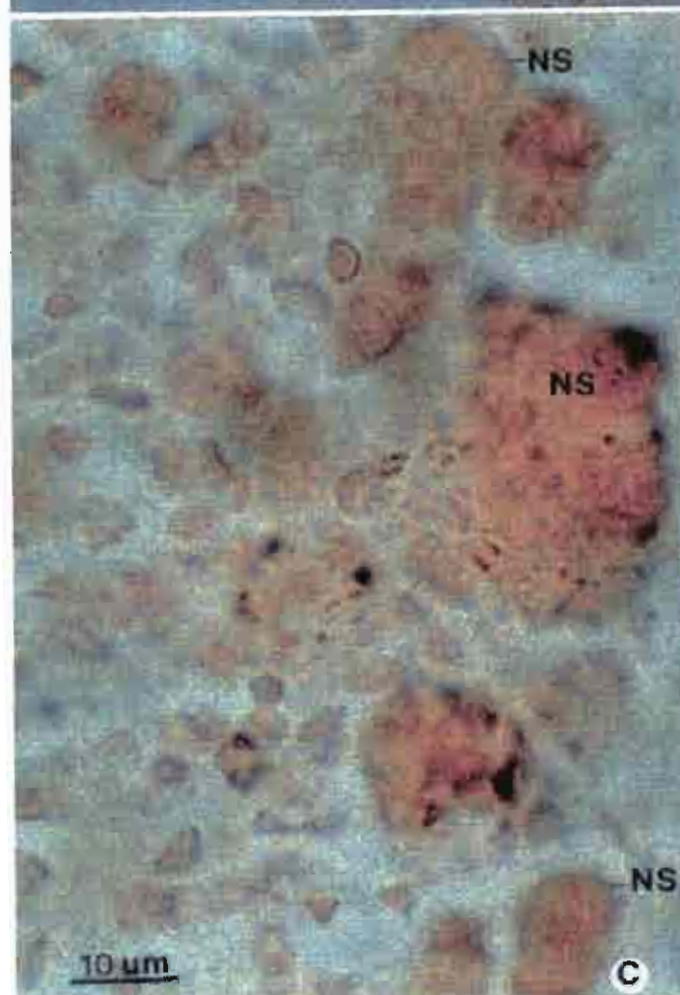
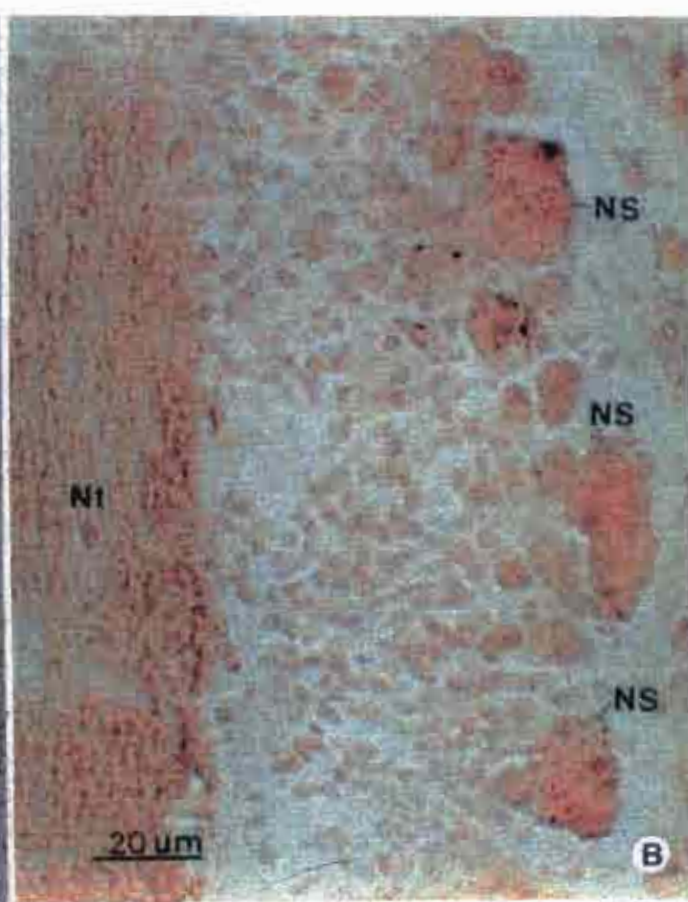
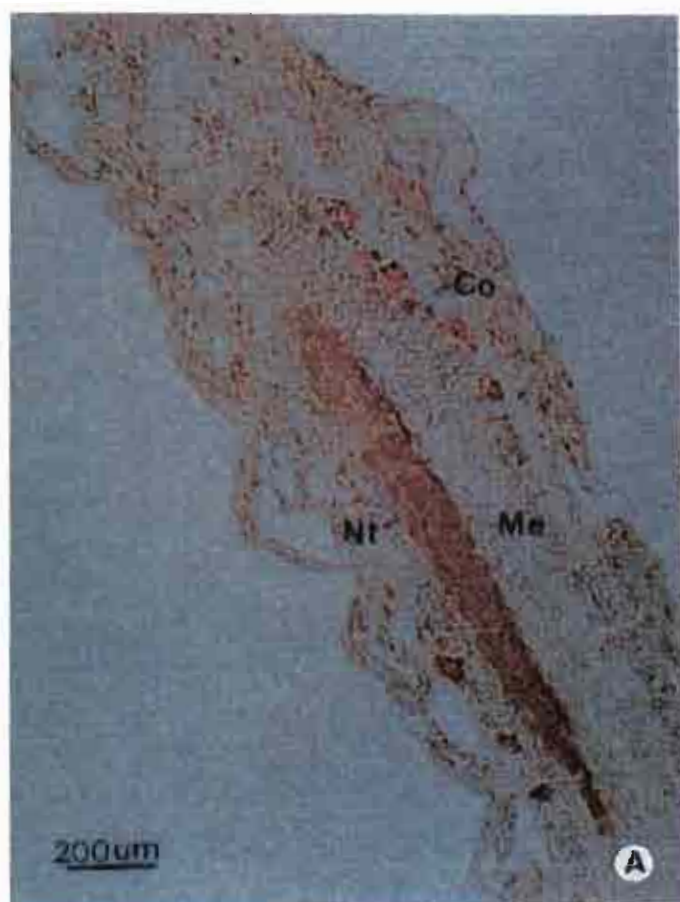
- A) หอยเป่าฮื้อในระดับกำลังขยายต่ำ เปลือกแข็งทางด้าน dorsal ถูกนำออก บริเวณที่ลูกศรชี้ แสดงตำแหน่งของปมประสาท cerebral ganglia (cg) ซึ่งวางตัวอยู่ภายใน
- B) หอยเป่าฮื้อในระดับกำลังขยายต่ำและสูงทางด้าน dorsal ที่เปลือกแข็งถูกนำออก แล้วถูกผ่าแสดงตำแหน่งและลักษณะของปมประสาท cerebral ganglia (cg) และ cerebral 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

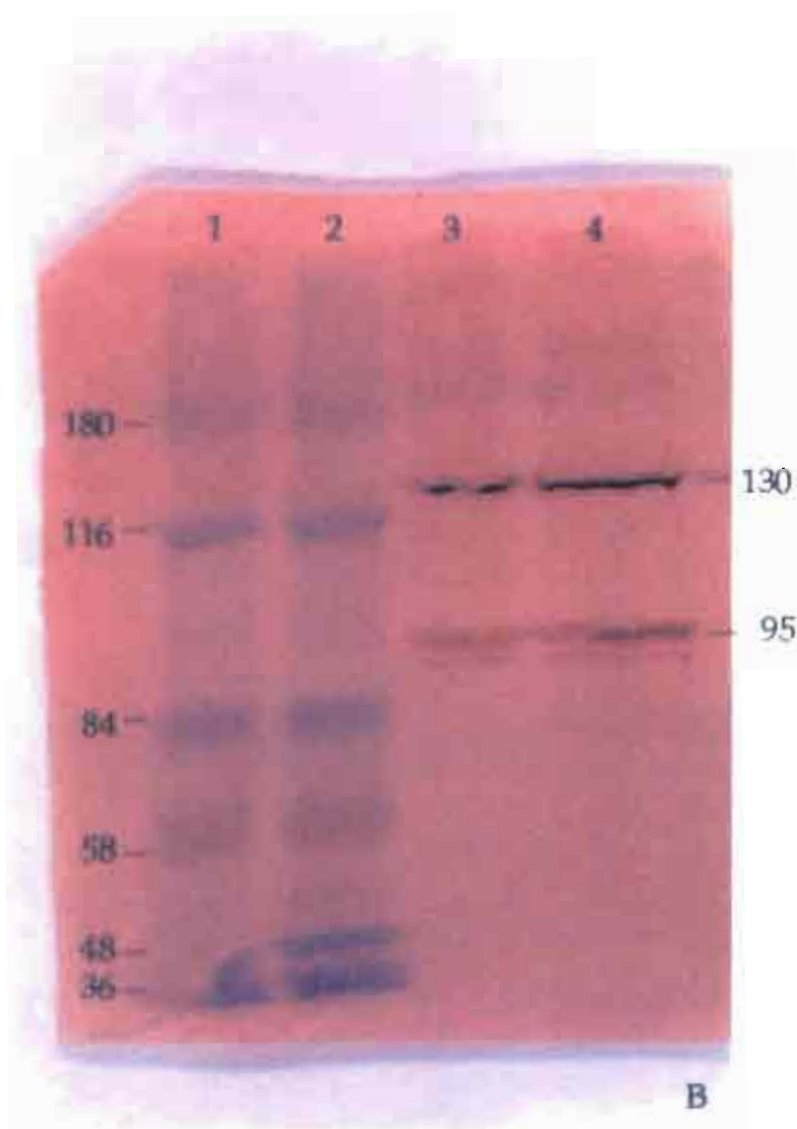
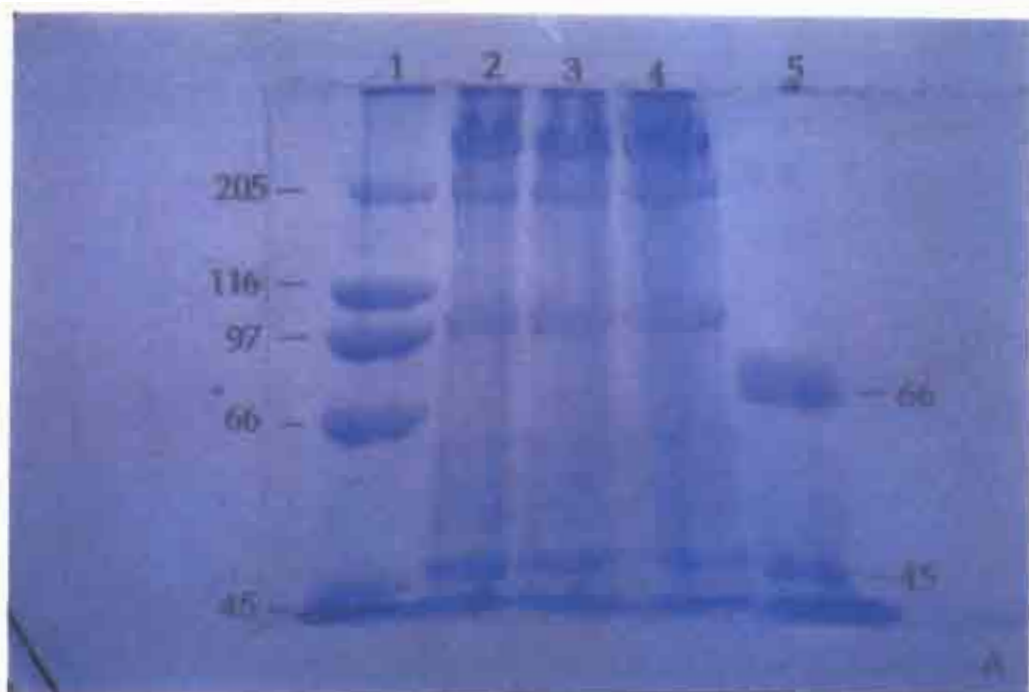
lane 2 - 4 : แถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ จาก cerebral ganglion โดยมีการใส่โปรตีนรวม 20 , 30 และ 40 μ l ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ติดสี coomassie blue เด่นชัดถูกแสดงด้วยลูกศร ประมาณ 8 แถบ

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

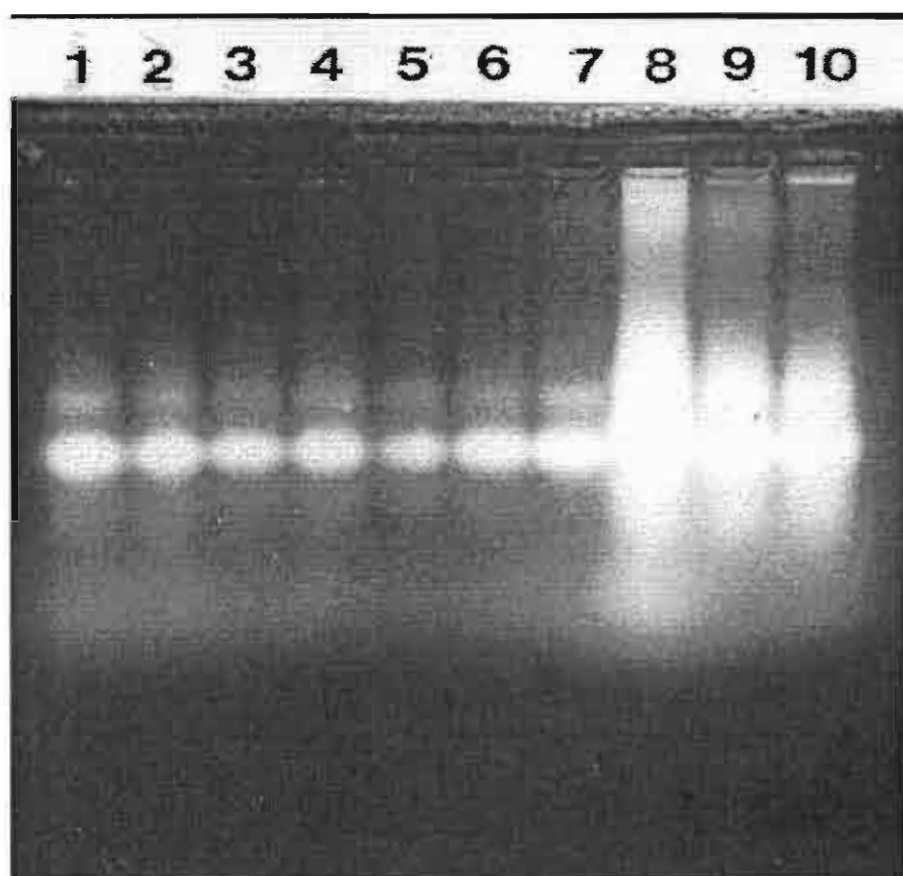
lanes 3 และ 4 : แถบโปรตีนที่สกัดจาก cerebral ganglion ของหอยเป่าฮื้อ และทำปฏิกิริยา immunoblotting โดยใส่สารโปรตีน เป็น จำนวน 30 และ 40 μ l ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ควรจะเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮื้อ แสดงโดยแถบโปรตีนที่ย้อมติดสีน้ำตาลเข้มตรงกับระดับน้ำหนักโมเลกุล 130 และ 95 kD ตามลำดับ



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

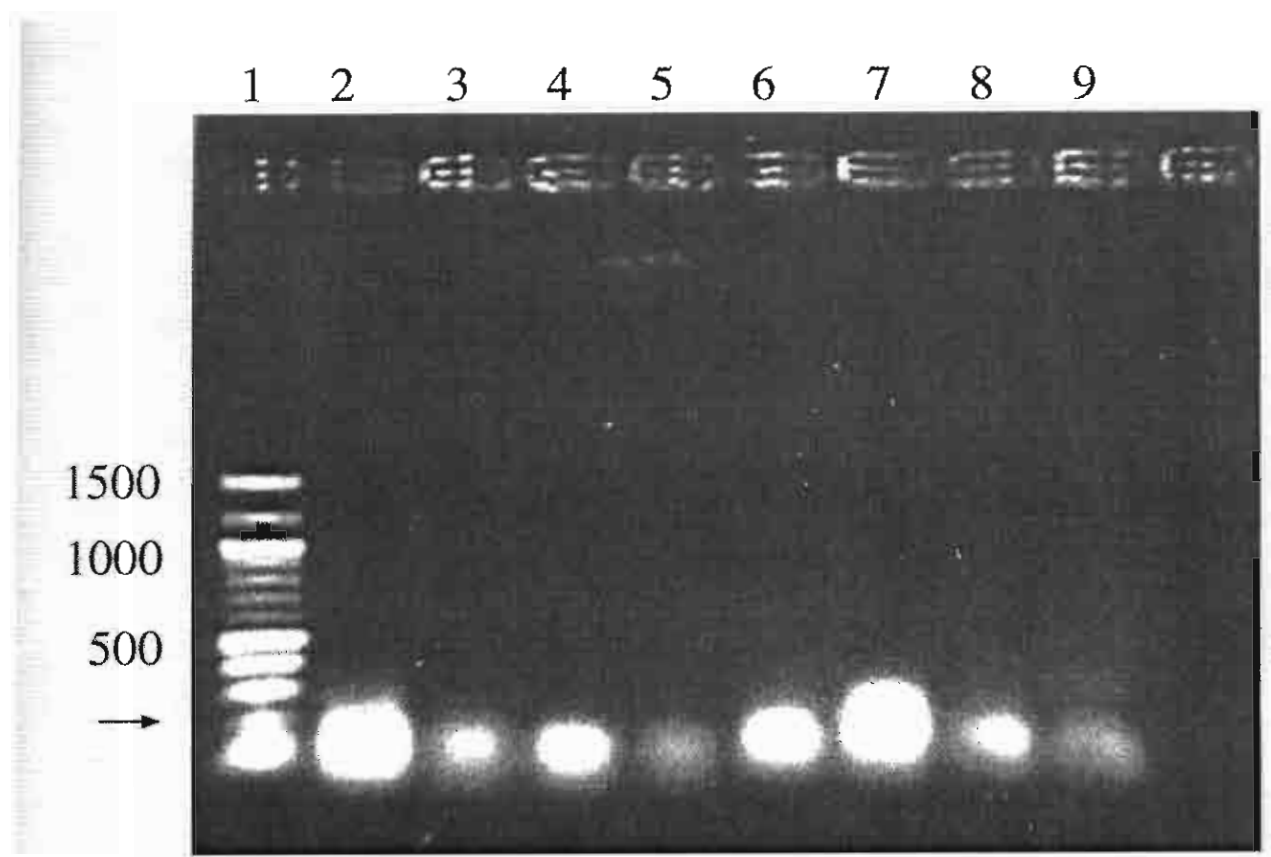
- lanes 1-7 : RNA โดยรวมของ r RNA, t RNA, และ m RNA (มีความสำคัญต่อกระบวนการ RT-PCR และ PCR) ต่อไป ซึ่ง RNA เหล่านี้สกัดมาจากบริเวณส่วน cerebral ganglia ครั้งที่ 1
- lane 8 RNA โดยรวม ซึ่ง RNA เหล่านี้สกัดมาจากพยาธิใบไม้ในตับทั้งตัว (*Fasciola gigantica*) นำมาเป็น RNA เปรียบเทียบ
- lanes 9-10 : RNA โดยรวมของ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

