



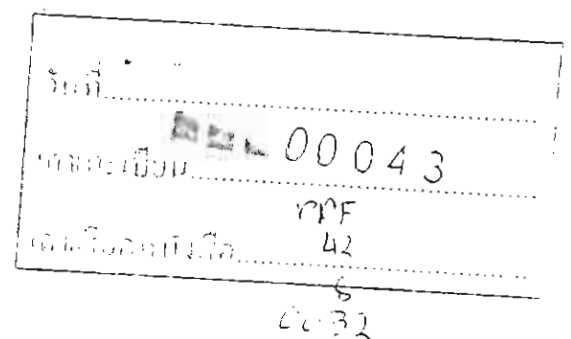
โครงการ การสังเคราะห์ และวิเคราะห์ cDNA ของฮอร์โมนที่ควบคุมการการวางไข่ใน
ปมประสาท ของหอยเป่าฮือพันธุ์พื้นเมือง, *Halotis asinina* Linnaeus

โดย ดร. อัมพร ทองภูเกียรติกุล และคณะ

เดือน กันยายน พ.ศ.2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์ และวิเคราะห์ cDNA ของฮอร์โมน ที่ควบคุมการการวางไข่ในปม
ประสาท ของหอยเป่าชื่อพันธุ์พื้นเมือง, *Halotis asinina* Linnaeus



คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.อัมพร ทองภูเกียรติกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. ศ. ดร. ประเสริฐ ไสยกุล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979 17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400
โทร 298-0455 โทรสาร 298-0476
home page : <http://www.tti.or.th>
E-mail : tti-info@tti.or.th



สรุปย่อ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์ของโครงการมีดังนี้

1. สังเคราะห์สารพันธุกรรม genomic DNA
2. การคัดแยกกลุ่มสารพันธุกรรมจากโคลน
3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่กำกับการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการวางไข่ของหอยเป่าฮื้อ *H.asinina*
4. การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการวางไข่ โดยการทำ immunoblotting
5. การศึกษาตำแหน่งของเซลล์ในปมประสาทที่สร้างฮอร์โมนวางไข่ด้วยวิธี immunocytochemistry

การดำเนินงานการวิจัย

1. การสกัด genomic DNA ของหอยเป่าฮื้อ
2. การทำ amplication genomic DNA โดยเทคนิค PCR
3. Gel Extraction
4. cloning gonomic DNA
5. Transformation โดยใช้ heat shock
6. ทำ sequencing
7. การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการวางไข่ โดยการทำ immunoblotting
8. การศึกษาตำแหน่งของเซลล์ในปมประสาทที่สร้างฮอร์โมนวางไข่ด้วยวิธี immunocytochemistry

ผลงานวิจัยที่ทำในรอบ 2 ปี

ผลงานวิจัยที่ทำในรอบปี ประกอบด้วย

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.1 การสังเคราะห์สารพันธุกรรม genomic DNA กับการสร้างฮอร์โมนไปควบคุมการวางไข่ของหอยเป่าฮื้อ *H.asinina* ที่กำกับการจากเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells) ใน ปมประสาทของหอยเป่าฮื้อ *H.asinina* โดยวิธี PCR
- 1.2 การคัดแยกกลุ่ม (Isolation and screening) สารพันธุกรรม จากโคลน (clones) ของ E.coli ที่ได้รับ DNA สังเคราะห์
- 1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่กำกับการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการ สร้างเซลล์สืบพันธุ์และการวางไข่ของหอยเป่าฮื้อ *H.asinina*
- 1.4 การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ที่เกี่ยวข้องกับการวางไข่โดยวิธี immunoblotting

2. การดำเนินงานการวิจัยตามวัตถุประสงค์ในรอบ 2 ปีที่ผ่านมา

- 2.1 การสกัด genomic DNA ของหอยเป่าฮื้อ โดยใช้สารละลาย CTAB เพื่อให้ได้

DNA

- 2.2 การทำ amplication genomic DNA โดยเทคนิค PCR โดยใช้ primers 4 ชนิดดังนี้

CDCH-2

5'- CAAACGA(A/C)TTTC(C/A)ATCAC(A/C)CCATGA(C/T)C-3'

CDCH-3

3'-CC(G/T)TTATC(C/A)(C/T)CAAGA(C/G)CGCTC-5'

AB₂

5' CGCGGAGGCCCTCTTGCC 3'

APLYM 1

5'MARRYYYAMRWARATGAAG 3'

จากการ amplification genomic DNA จะได้ genomic DNA ประกอบด้วย 150 bp

2.3 ตัด DNA fragment จาก agarose gel ด้วยมีดผ่าตัด เพื่อนำไปสกัด DNA และ

ทำให้ได้ DNA ที่บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick Gel Extraction ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.3.1 ชั่งน้ำหนัก DNA fragment แล้วใส่ Buffer QX1 ประมาณ 3 เท่า (100 มก ~100ไมโครกรัม)

2.3.2 ภายหลังจาก gel ละลายแล้ว เช็ดสีสารละลายต้องเป็นสีเหลือง แล้วเติม isopropanol ประมาณ 1 gel volume ในตัวอย่าง

2.3.3 ใส่ QIAquick spin column ใน tube ขนาด 2 มล.

2.3.4 ใส่สารละลายใน QIAquick column และ centrifuge นาน 1 นาที

2.3.5 เทสารละลายทิ้ง

2.3.6 เติม Buffer PE ปริมาณ 0.75 มล. ใน QIAquick column และ centrifuge นาน 1 นาที

2.3.7 เทสารละลายทิ้งและ centrifuge อีกครั้ง นาน 1 นาที

2.3.8 นำ QIAquick ใส่ใน microfuge tube

2.3.9 ใส่น้ำ 50 ไมโครลิตรบริเวณตรงกลางของ QIAquick column และ centrifuge นาน 1 นาที

2.3.10 Reamplification gel ที่ได้จาก extraction ใหม่ โดยใช้ primers CDCH-2 และ CDCH3

2.4 ทำการ clone genomic DNA ที่ได้จากการ amplified เข้าสู่ PCR 2.1 vector โดยใช้ TA Cloning Kit มีขั้นตอนดังนี้

2.4.1 Centrifuge PCR 2.1 1 vial

2.4.2 Ligation reaction (10 ไมโครลิตร)

Sterile Water

5 ไมโครลิตร

2.6 Selection single clone ที่มีสีขาวจาก plate ในข้อ 2.5

2.6 .1 PCR insert amplication of selected clone โดยใช้ primers ต่อไปนี้คือ

T₇

5' TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

M₃ (reverse)

5'CAG GAA ACA GCT ATG AC3'

2.7 ทำ Plasmid Mini Purification เพื่อเตรียม plasmid DNA ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.7.1 Resuspend bacteria pellet ใน Buffer P1 0.3 มล.

2.7.2 เติม buffer P1 250 ไมโครลิตร บั่นให้เข้ากัน

2.7.3 เติม buffer P2 250 ไมโครลิตร แล้วคว่ำและหงายหลอดเป็นจำนวน 5 ครั้ง

2.7.4 เติม buffer N3 350 ไมโครลิตร แล้วคว่ำและหงายหลอดเป็นจำนวน 5 ครั้ง

2.7.5 centrifuge นาน 10 นาที

2.7.6 นำ supernatant จาก ข้อ 2.7.5 มาใส่ QIA prep column

2.7.7 centrifuge นาน 1 นาที ทิ้งสารละลาย

2.7.8 เติม buffer PE 750 ไมโครลิตร แล้ว centrifuge นาน 1 นาที ทิ้งสารละลาย

2.7.9 centrifuge อีกครั้ง นาน 1 นาที ทิ้งสารละลาย

2.7.10 นำ QIA prep column ใส่ microfuge tube แล้วเติมน้ำ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำสารที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20°

2.8 การวิเคราะห์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการวางไข่โดยการทำ immunoblotting

2.8.1 ตัดปมประสาท cerebral ของหอยเป่าฮือเพศเมียตัวเต็มวัย จำนวน 2 ปม มาบดใน phosphate buffer 100 ไมโครลิตร นำไปปั่น 10,000 rpm นาน 1 นาที แล้วนำ supernatant ที่ได้ไป run discontinuous gel โดยใช้ 12.5% seperating gel และ 4% stacking gel ด้วย เครื่อง Mini-V 8 * 10 Vertical Electrophoresis System ของบริษัท GibcoBRL แล้วนำ gel ที่แยกโปรตีนแล้วไปย้อมด้วยสี Coomassie staining แล้วหา MW

10X ligation Buffer	1	ไมโครลิตร
pCR 2.1 vector	2	ไมโครลิตร
Fresh PCR product	1	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร

Incubate ligation reactions ที่ 14° อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

2.4.3 Centrifuge ligation reactions ใช้เวลาสั้นๆ แล้ววางบนน้ำแข็ง

2.5 Transformation โดยใช้วิธี heat shock ตามขั้นตอนดังนี้

2.5.1 Centrifuge vial ที่มี ligation reactions แล้ววางบนน้ำแข็ง

2.5.2 Thaw vial ที่มี INV α F⁺ competent cell วางบนน้ำแข็ง

2.5.3 เติม 0.5 M β ME ใน vial แล้วใช้ pipette tip คนเบาๆ

2.5.4 pipette ligation reactions ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ลงใน competent cells
แล้วใช้ pipette tip คนเบาๆ

2.5.5. Incubate vial บนน้ำแข็งนาน 30 นาที

2.5.6 Heat shock ที่ 42° ใน water bath ประมาณ 30 วินาที แล้วนำมาวางบน
น้ำแข็ง

2.5.7 เติม สารละลาย SOC 250 ไมโครลิตร

2.5.8 Shake vial ใน shaking incubator ในแนวนอนที่ 37° 225 rpm นาน 1
ชั่วโมง

2.5.9 Spread สารละลายจาก transformation vial 100 ไมโครลิตร บน LB agar
plate ที่มี X-Gal

2.5.10 นำ plate ไปไว้ใน incubator ที่ 37° นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำ plate ไปไว้ที่ 4
นาน 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสี

ของ polypeptide ที่แยกได้โดยเปรียบเทียบกับ SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range ของ บริษัท Bio-Rad

2.8.2 นำ gel ที่ได้ไปทำ blotting ด้วยเครื่อง Mini-V 8* 10 Vertical

Electrophoresis System โดย transfer polypeptide ที่ได้ไปยัง 0.45 μ m nitrocellulose ใช้เวลาประมาณ 60 นาที จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ที่ได้ไปทำขั้นตอน immunodetection ต่อไป

2.8.3 การทำ immunodetection นำแผ่น nitrocellulose ที่ได้จากข้อ 2.8.3 มาแช่ Tris buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำไป blocking ด้วย 4% Bovine serum albumin นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย Tris buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แช่ใน mouse anti-ELH antibodies นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย Tris buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แช่ใน alkaline phosphatase-goat anti-mouse IgG (H+L) นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย Tris buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วเติมสารละลาย 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate / Nitroblue tetrazodium salt substrate kit จนกระทั่งสังเกตเห็นสีสีม่วง

2.9 การศึกษาคำแหน่งของเซลล์ในปมประสาทที่สร้างฮอร์โมนวางไข่ด้วยวิธี immunocytochemistry

2.9.1 วิธีอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (Immunoperoxidase method)

นำสไลด์ที่วาง sections แล้วไปแช่ในสารละลาย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ภายหลังกนำมาเปลี่ยนใส่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%, 90%, 80% และ 70% ตามลำดับ ครั้งละ 5 นาที และแช่ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วย 0.1 M Tris buffer saline 3 ครั้ง และนำสไลด์ไปแช่สารละลาย 0.3% H_2O_2 นาน 15 นาที เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา endogenous peroxide แล้วล้างด้วย buffer ชนิดเดียวกัน 3 ครั้ง นำสไลด์ไปเติมสารละลาย blocking นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่มีความชื้น และใส่ primary antibodies *H. rubra* egg laying hormone (ความเข้มข้น 1:10000) นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วย Tris buffer 3 ครั้ง และใส่ biotinylated second antibodies นาน 30 นาที แล้วเติม streptavidin-peroxidase conjugate บนสไลด์นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างล้างสไลด์ด้วย Tris buffer 3 ครั้ง และเติม 0.1% diaminobenzine tetrahydrochloride (DAB) นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ล้างด้วยน้ำกลั่นและแช่ในแอลกอฮอล์ 100% นาน 2 นาที แช่ใน n-butyl alcohol 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที 10 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ แช่ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยด permount ปิดสไลด์ด้วย cover glass วางบน hot plate นาน 24 ชั่วโมง แล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

2.9.2 วิธีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase method)

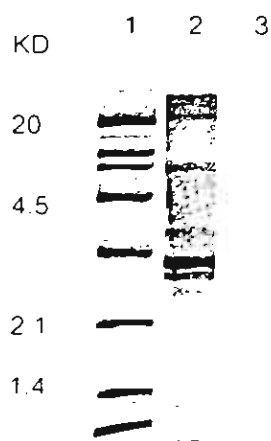
นำ frozen sections แล้วไปแช่ในสารละลาย phosphate buffer 3 ครั้ง และนำสไลด์ไปแช่สารละลาย 0.3% H_2O_2 นาน 15 นาที เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา endogenous peroxide แล้วล้างด้วย buffer ชนิดเดียวกัน 3 ครั้ง นำสไลด์ไปเติมสารละลาย blocking นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่มีความชื้น และใส่ primary antibodies *H.rubra* egg laying hormone (ความเข้มข้น 1:25,000) นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง และใส่ biotinylated second antibodies นาน 30 นาที แล้วเติม streptavidin-peroxidase conjugate บนสไลด์นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างสไลด์ด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง และเติม AEC chromogen นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ล้างด้วยน้ำกลั่น และหยด buffer glycerol ปิดสไลด์ด้วย cover glass นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3. ผลงานวิจัยที่ได้รับ

3.1 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ Egg laying hormone ของ *H.asinina* จะได้ทั้งหมด 108 bp มีลำดับดังนี้

```
ATCAA GGGGT NAGCG CTAGN ATAAG ANNAT GTTTA CCAAN AGGNN CNTGN  
TATAG GGCCN NGATA CCNNA ANTAN NGGCC NTTGT TTNNT GGNNN ATTNT  
CTATA ATT
```

3.2 จากการศึกษาด้วย SDS-PAGE และ Western Immunoblot พบว่า *H.rubra* egg laying hormone antibodies ทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีขนาด 18.5 KD



รูปที่ 1 แสดงการแยกโปรตีนของปมประสาทซีรีบรัลของหอยเป่าอี้อที่แยกด้วย SDS-PAGE

ย้อมด้วยสี Coomassie Blue และ การ incubated แผ่น nitrocellulose ด้วย *H.rubra* egg laying hormone antibodies lane 1 SDS-PAGE Molecular Weight Standards, lane 2 cerebral ganglia และ lane 3 ตำแหน่งที่ *H.rubra* egg laying hormone antibodies ทำปฏิกิริยากับโปรตีน

3.3 จากการศึกษาโดยวิธี immunoperoxidase และ alkaline phosphatase

จากการศึกษาด้วยวิธี immunoperoxidase โดยใช้ anti- α ELH นิวเคลียสของเซลล์ NS, ตัดสีน้ำตาลอ่อน granules ในไซโทพลาสซึม จะย้อมติดสีน้ำตาล ส่วน pigment granules ที่รอบนอกของปมประสาทติดสีน้ำตาลเข้ม และ connective tissue ที่ล้อมรอบปมประสาทย้อมติดสีน้ำตาล ดังภาพที่ 2

จากการศึกษาด้วยวิธี alkaline phosphatase โดยใช้ anti- α ELH นิวเคลียสของเซลล์ NS, ตัดสีชมพู และนิวคลีโอลัสติดสีน้ำตาลแดง granules ในไซโทพลาสซึม จะย้อมติดสีน้ำตาลแดง แต่ connective tissue ที่ล้อมรอบปมประสาทติดสีจาง ดังภาพที่ 3