

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.2

รูปที่ 2.2-1 ภาพแสดงผล Dot blot assay แสดงปริมาณของ GABA ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยใช้วิธี immunoperoxidase นำสารสกัดจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่มีโปรตีนอยู่ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1 mg/ml หยดลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วย้อมด้วยโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อ BSA-GABA

Cg-Cerebral ganglion, Ep-Epipodium tentacle, Ey-Eye,

Go-Gonad, MB-Mouse brain, MBs-Mouse brain stem,

PPg-pleuropedal ganglion, Te-Cephalic tentacle

A) ย้อมด้วย Pre-immune serum

B) Non-absorbed polyclonal antibody against BSA-GABA

C) BSA-absorbed polyclonal antibody at a ratio of 1:10 (Serum:BSA).

D) GABA-absorbed polyclonal antibody at a ratio of 1:10 (Serum:GABA).

รูปที่ 2.2-2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงปมประสาท Cerebral ของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วย PoAb anti GABA และแสดงการเกาะติดระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีด้วยวิธี immunoperoxidase

A) Control section ของปมประสาท Cerebral ที่ย้อมด้วย preimmune serum ไม่มีการติดสีในบริเวณต่างของปมประสาท: D-dorsal, L-lateral, M-medial

B) Section ของปมประสาท Cerebral ที่ย้อมด้วย anti-GABA แสดงเซลล์ติดสีในชั้น cortex (ลูกศร)

C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของปมประสาท cerebral ที่ใช้เป็น negative control ซึ่งไม่ติดสี

D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของปมประสาท Cerebral แสดงการติดสีแดงที่เซลล์ในบริเวณ cortex

E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของภาพ B แสดงเซลล์ที่ย้อมติดสีซึ่งมีลักษณะของ neurosecretory cell type 2 (NS2)

รูปที่ 2.2-3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงปมประสาท Pleuropedal ของหอยเป่าฮือที่ย้อมด้วย PoAb anti GABA

- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของปมประสาท pleuropedal ที่ เป็น negative control ซึ่งไม่มีการติดสีในปมประสาท : D-dorsal, L-lateral, M-medial, V-ventral
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของปมประสาท pleuropedal แสดงเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณชั้น cortex
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของปมประสาท pleuropedal ที่ใช้เป็น negative control ซึ่งไม่ติดสี
- D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ section ข้างเคียงของ (C) แสดงเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่ในชั้น cortex บริเวณ ventral horn
- E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดง neurosecretory cell (NS) ที่ติดสีซึ่งมีลักษณะของ neurosecretory cell type 2 (NS₂)

รูปที่ 2.2-4

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงปมประสาท Visceral ของหอยเป่าฮื้อที่ย้อมด้วย PoAb anti GABA

- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control section ของปมประสาท visceral ซึ่งไม่มีการติดสีในบริเวณต่างๆ ของปมประสาท: D-dorsal, LL-left lateral, RL- right lateral, V-ventral
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของปมประสาท visceral ที่ เป็น section ข้างเคียงกับ (A) แสดงเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบด้านนอกด้าน lateral และ ventral
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของเนื้อเยื่อที่ใช้เป็น negative control ซึ่งไม่มีการติดสี
- D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบด้านนอกด้าน ventral
- E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงเซลล์ที่ติดสีซึ่งมีลักษณะของ neurosecretory cell type 2 (NS₂)

รูปที่ 2.2-5

ภาพวาด (A) ปมประสาท cerebral, (B) ปมประสาท pleuropedal และ (C) ปมประสาท visceral ของหอยเป่าฮื้อแสดงการกระจายของ GABA ในปมประสาททั้งสาม

- A) ภาพวาดปมประสาท cerebral แสดงเซลล์ที่มี GABA ซึ่งกระจายทั่วทั้งปมประสาทในบริเวณชั้น cortex
- B) ภาพวาดปมประสาท pleuropedal แสดงเซลล์ GABA ซึ่งกระจายทั่วทั้งปมประสาทในบริเวณชั้น cortex เช่นเดียวกับปมประสาท cerebral

C) ภาพวาดปมประสาท visceral แสดงเซลล์ GABA ซึ่งกระจายอยู่ในบริเวณด้าน left lateral และ ventro-medial

รูปที่ 2.2-6

Paraffin sections แสดงการย้อมด้วย PoAb anti GABA ในส่วนบน (top part) ของ cephalic tentacle

A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ในส่วนบนของ tentacle ซึ่งไม่มีการติดสี: Mu- muscle, Pa- papilla

B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ cephalic tentacle แสดงเซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณ epithelium ของ papillae

C) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ papillae แสดงเซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณ neuroepithelial cell (se); c-cilia

D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ papillae แสดงเซลล์ที่ติดสีใน cytoplasm ของ sensory cell (se) ที่ฐานของ papillae

E, F) ภาพกำลังขยายปานกลางและสูงของ semithin section ของ cephalic tentacle แสดง cilia (c), sensory cell (se), supporting cell (su)

รูปที่ 2.2-7

Paraffin sections แสดงการย้อมด้วย PoAb anti GABA ในส่วนกลาง (middle part) ของ cephalic tentacle

A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ในส่วนกลางของ tentacle ซึ่งไม่มีการติดสีในบริเวณต่างๆ : Pa- papilla

B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ cephalic tentacle เซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณ epithelium ของ papillae

C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณ tentacular nerve bundle (Teb)

D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณ papillae (ลูกศร)

E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงเซลล์ที่ติดสีแดงใน cytoplasm ของ neuroepithelial cells (se)

- รูปที่ 2.2-8** Paraffin sections แสดงการการย้อมด้วย PoAb anti GABA ในส่วนฐาน (basal part) ของ cephalic tentacle
- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ที่ส่วนฐานของ tentacle, Pa- papilla
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ cephalic tentacle แสดงเซลล์ที่ติดสีบริเวณ epithelium ของ papillae (ลูกศร)
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีบริเวณ tentacular nerve bundle (Teb)
- D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีบริเวณ epithelium ของ tentacle (ลูกศร)
- E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงการติดสีใน cytoplasm ของ neuroepithelial cells (se)
-
- รูปที่ 2.2-9** Paraffin sections แสดงการการย้อมด้วย PoAb anti GABA ที่ส่วนยอด (top part) ของ epipodial tentacle
- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ที่ส่วนยอดของ tentacle แสดง tall papilla (pa) และ epipodial nerve bundle (Epb)
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ epipodial tentacle แสดงเซลล์ที่ติดสีบริเวณ papillae (pa) และ nerve bundle (Epb)
- C, D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงการติดสีใน cytoplasm ของ neuroepithelial cells (se)
- E, F) ภาพกำลังขยายปานกลางและสูงของ semithin section แสดง sensory cells (se) ซึ่งมี apical cilia (c) และ supporting cells (su)
-
- รูปที่ 2.2-10** Paraffin sections แสดงการการย้อมด้วย PoAb anti GABA ในส่วนกลาง (middle part) ของ epipodial tentacle
- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ของ tentacle : Pa- papilla
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ epipodial tentacle แสดงเซลล์ที่ติดสีบริเวณ papillae (pa) และ nerve bundle (Epb)
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีบริเวณ tentacular nerve bundle (Epb)

D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีบริเวณ epithelium ของ tentacle (ลูกศร)

E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงการติดสีใน cytoplasm ของ neuroepithelial cells (se)

รูปที่ 2.2-11 Paraffin sections แสดงการย้อมด้วย PoAb anti GABA ที่ส่วนฐาน (basal part) ของ epipodial tentacle

A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ของ tentacle : Pa- papilla

B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ epipodial tentacle แสดงเซลล์ที่ติดสีใน epithelium (ลูกศร)

C, D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงเซลล์ที่ติดสีใน papillae (ลูกศร)

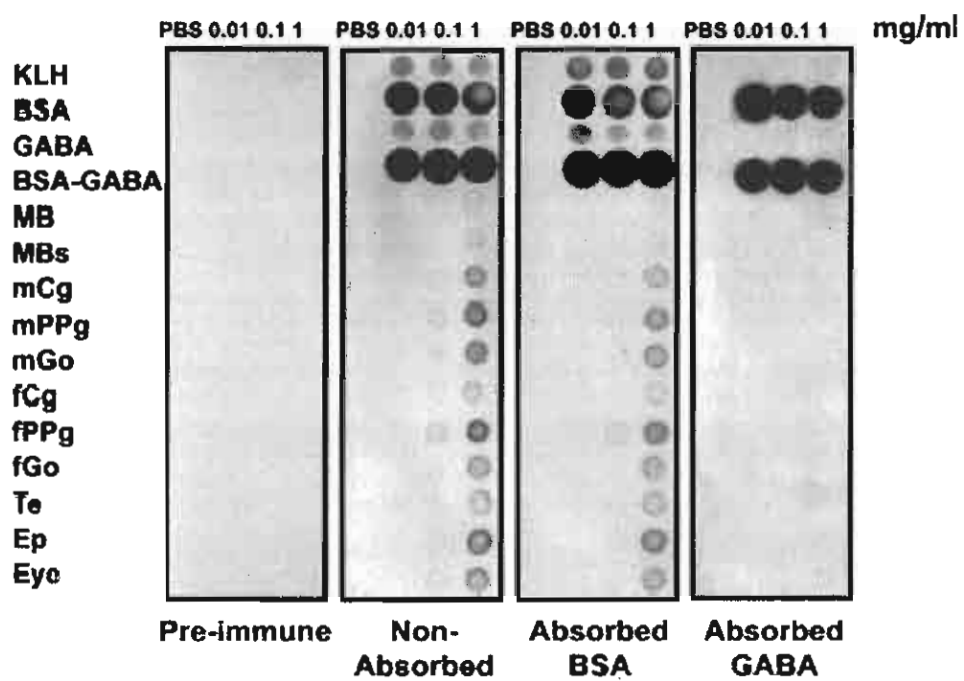
E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงเซลล์ที่ติดสีใน cytoplasm ของ sensory cells (se)

รูปที่ 2.2-12 Paraffin sections แสดงการย้อมด้วย PoAb anti GABA ในส่วน appendage tentacle

A, C) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำและปานกลางแสดง negative control sections ของ tentacle

B, D) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำและปานกลางของ sections ข้างเคียงของ A) และ C) ตามลำดับเซลล์ที่ติดสีใน epithelium (ลูกศร)

E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงเซลล์ที่ติดสีใน cytoplasm ของ sensory cells (se) ขณะที่ supporting cells (su) และ goblet cells (Gb) ไม่ติดสี

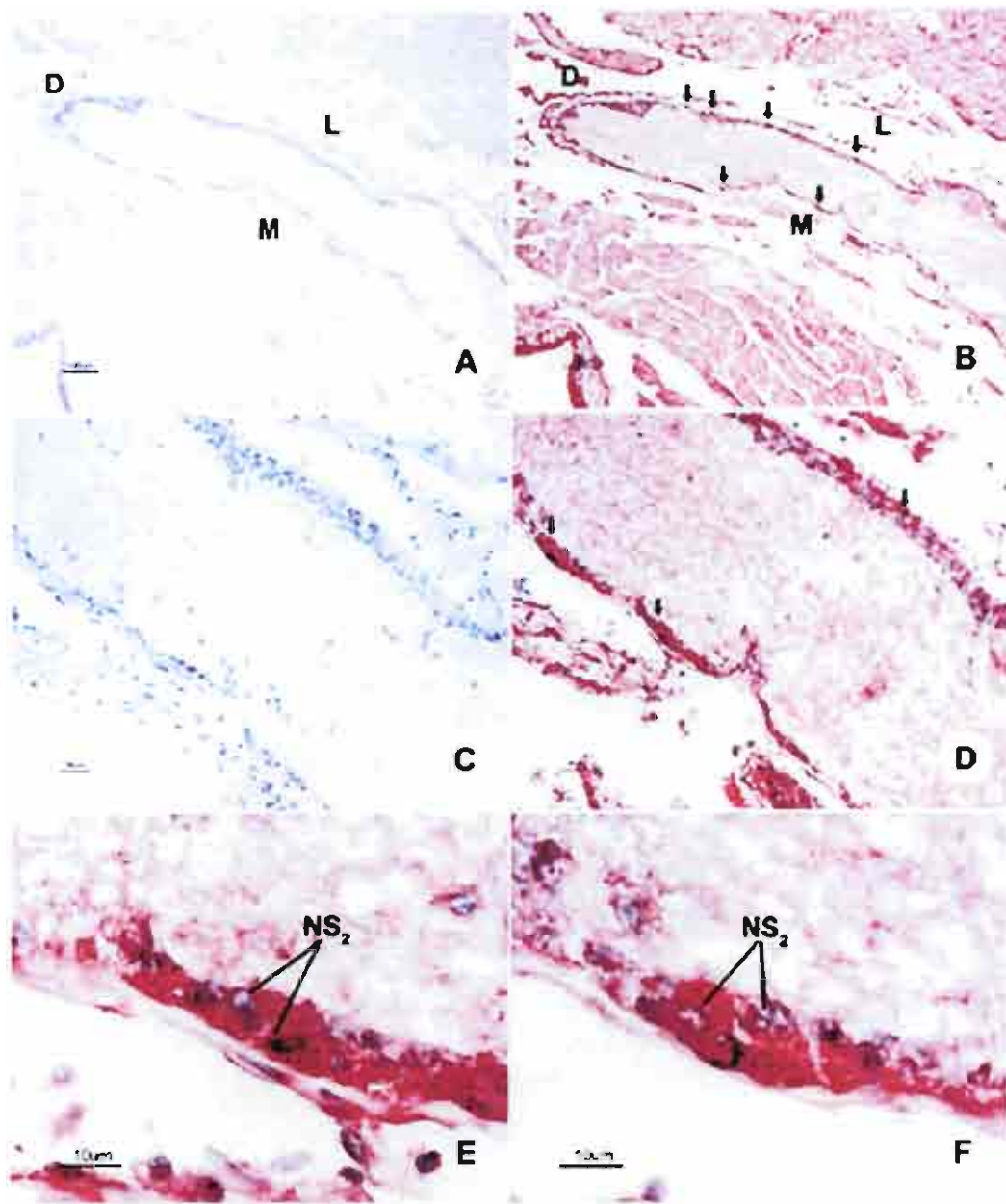


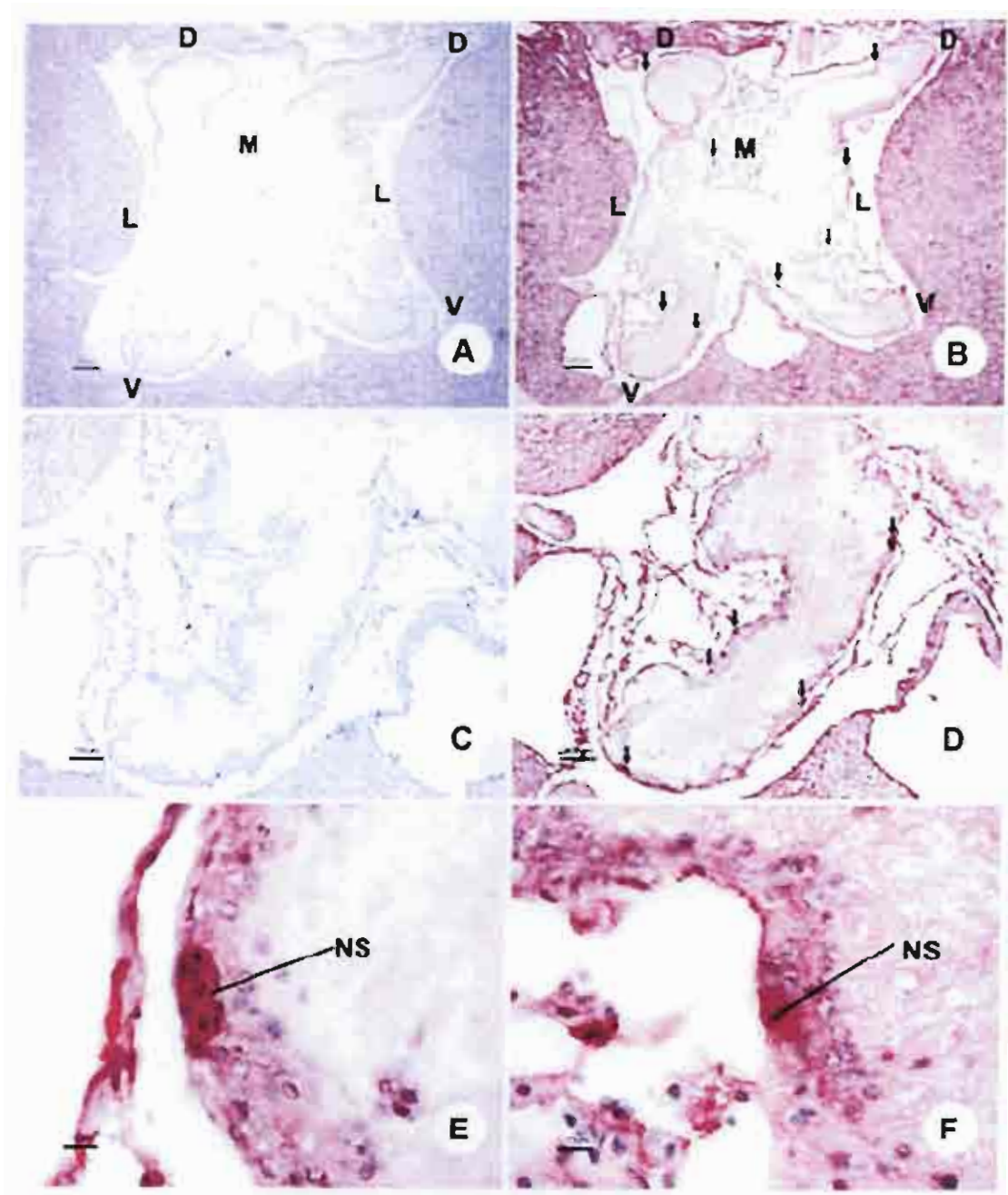
Abbreviation: + + + = ● ●

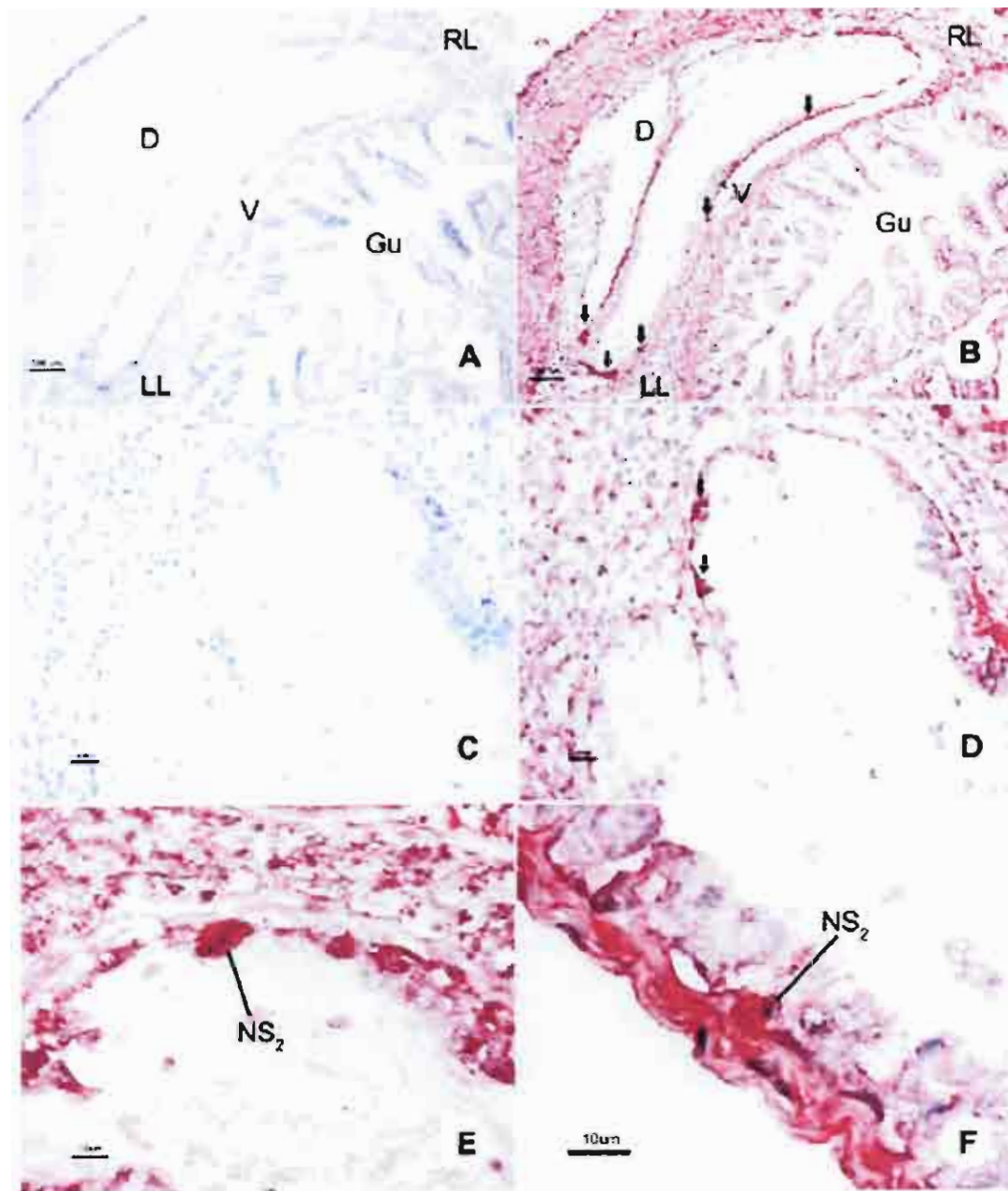
+ + = ●

+ = ●

- = ○

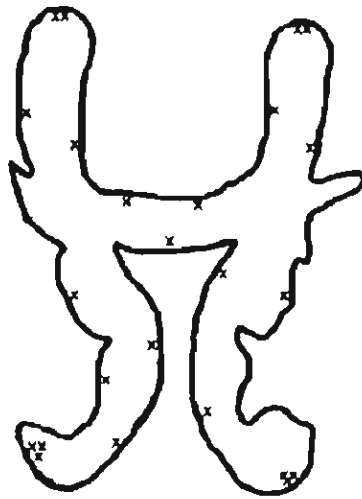








A

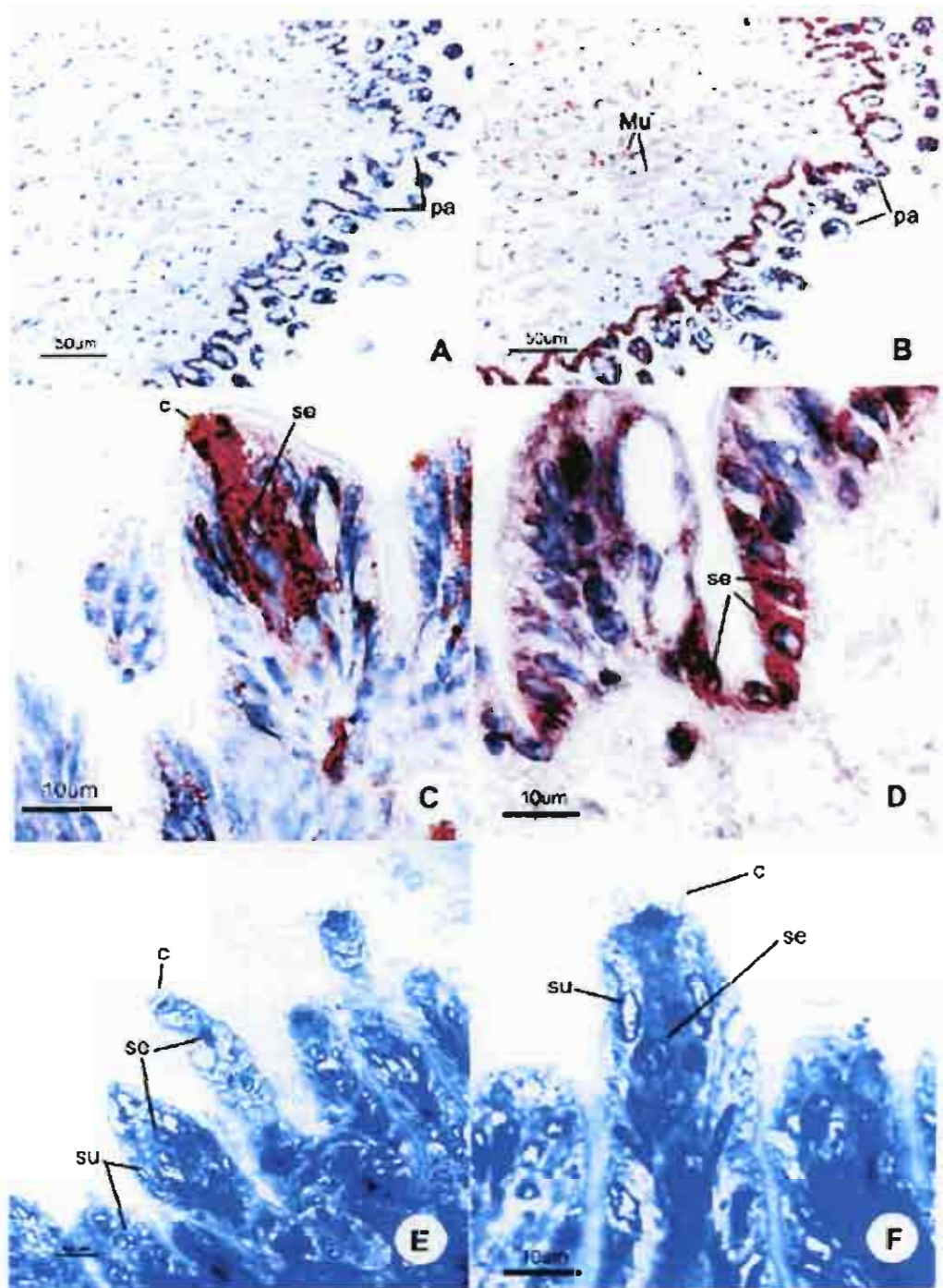


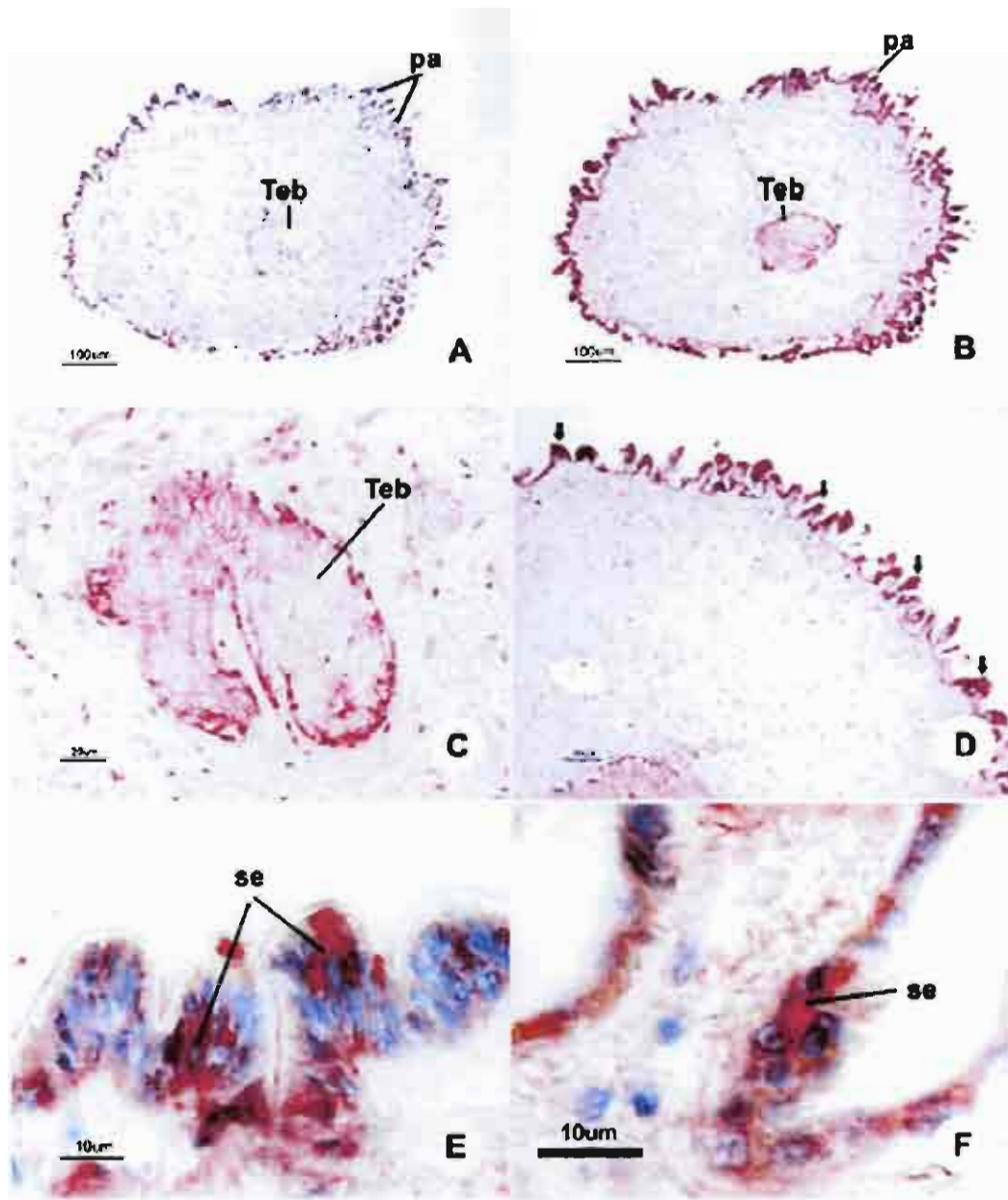
B

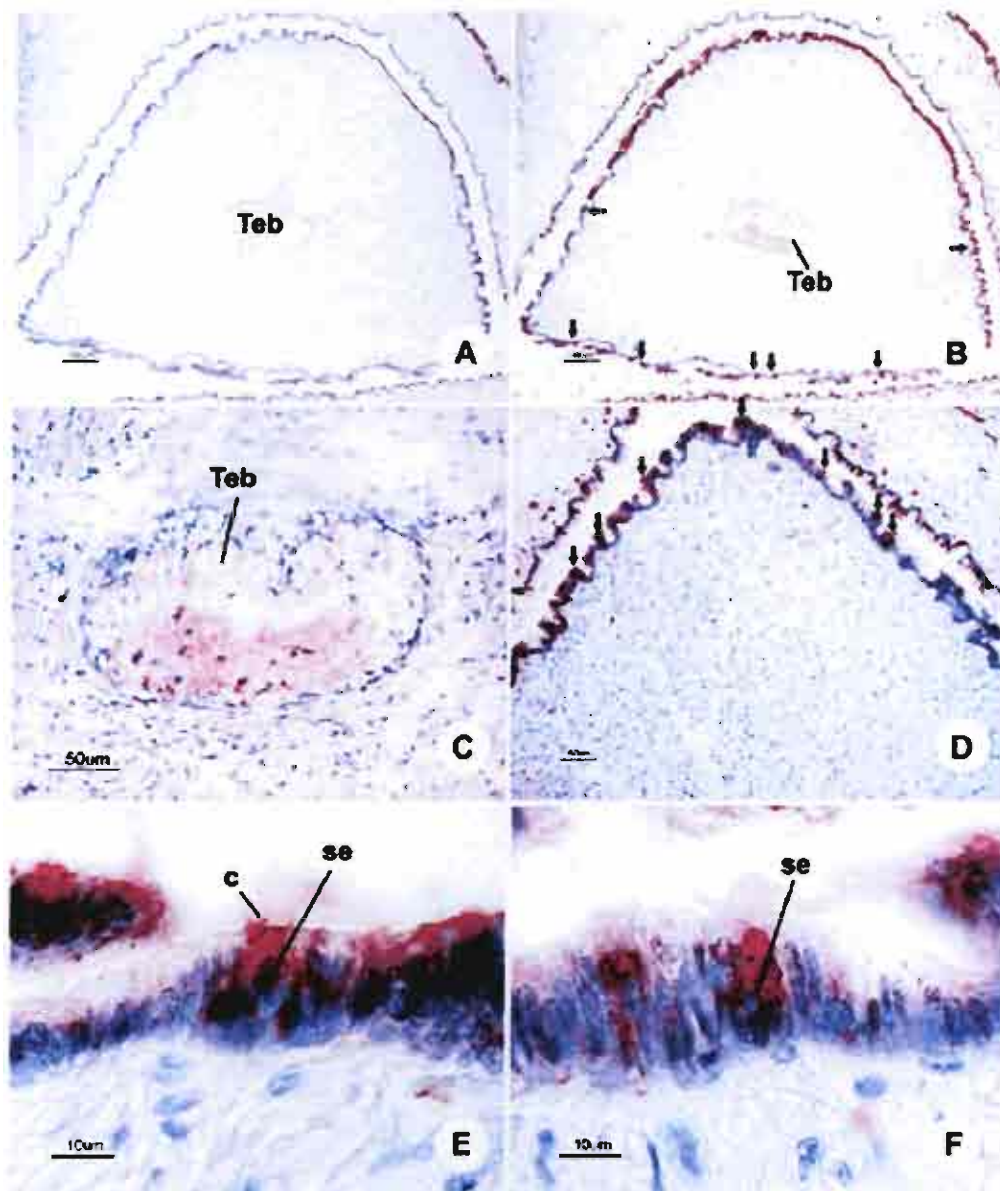
C

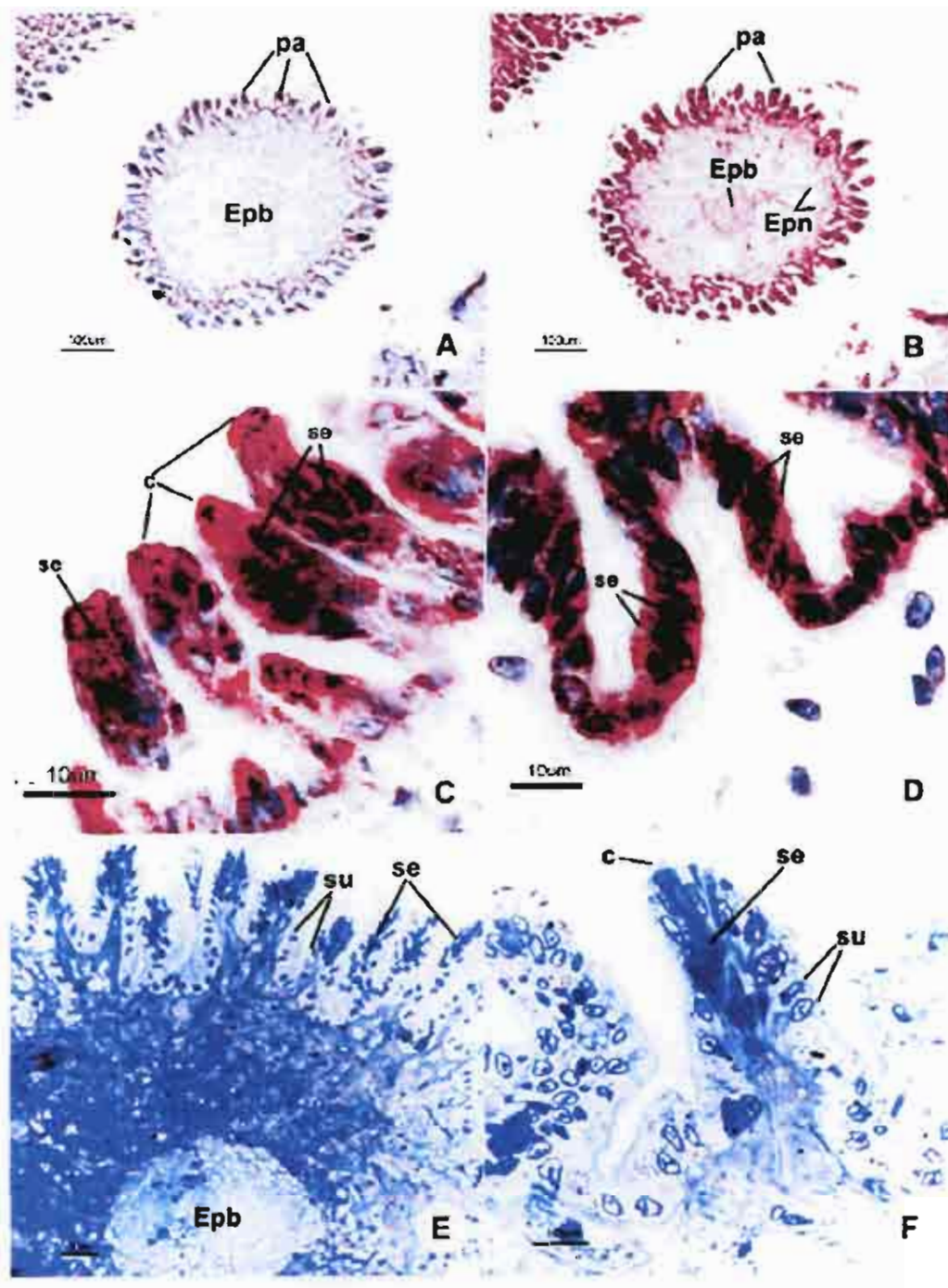


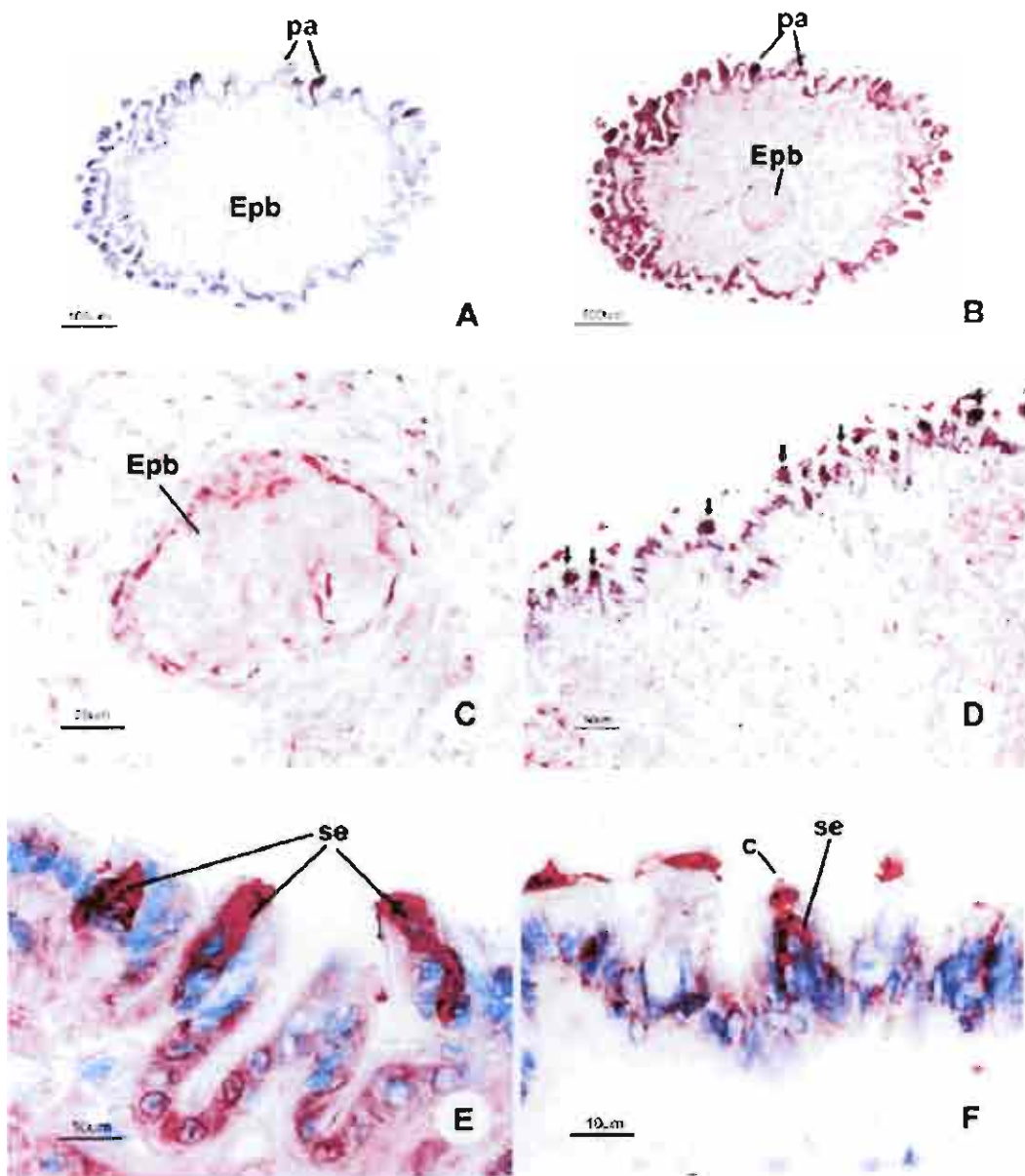
X = GABAergic neuron

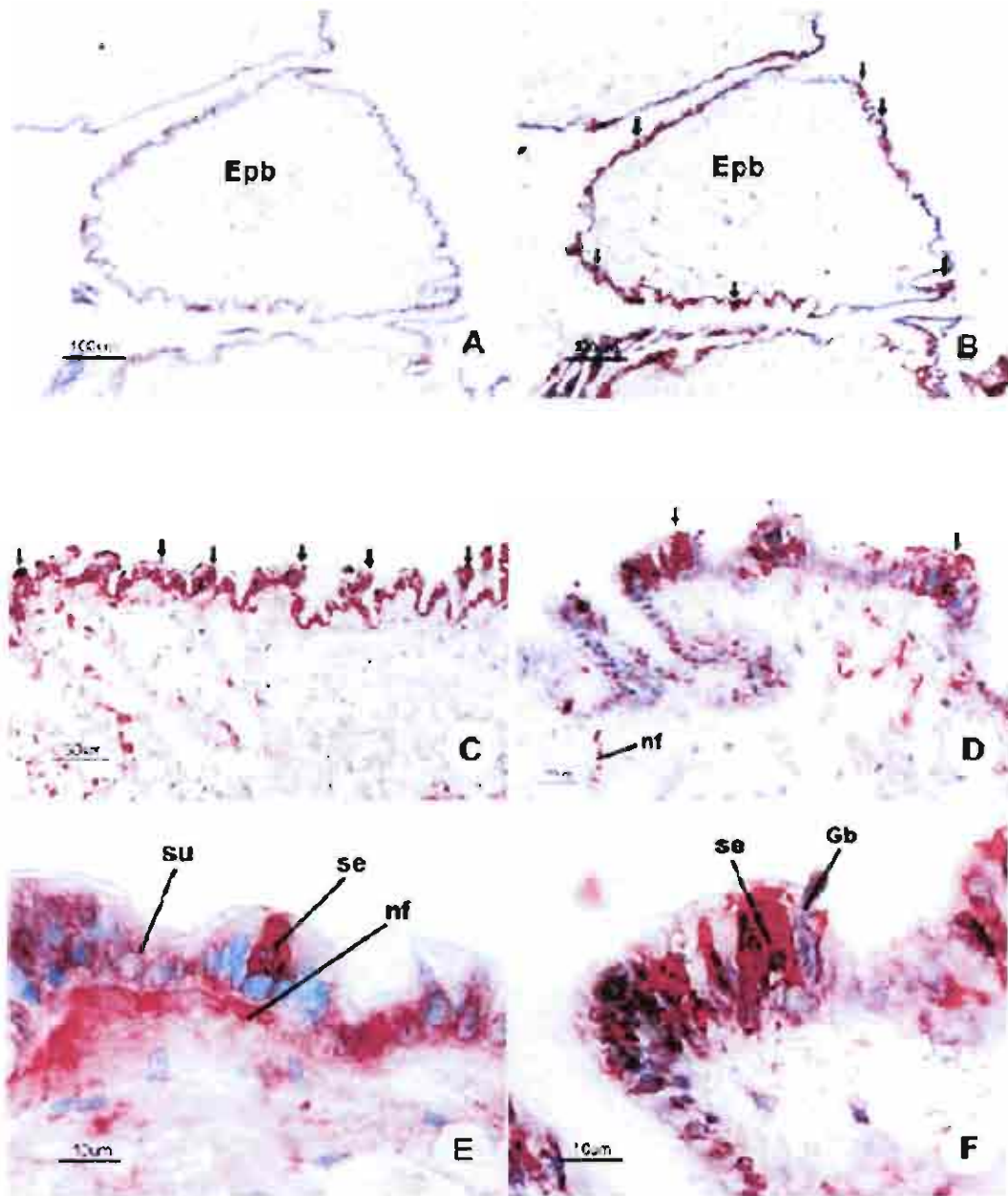


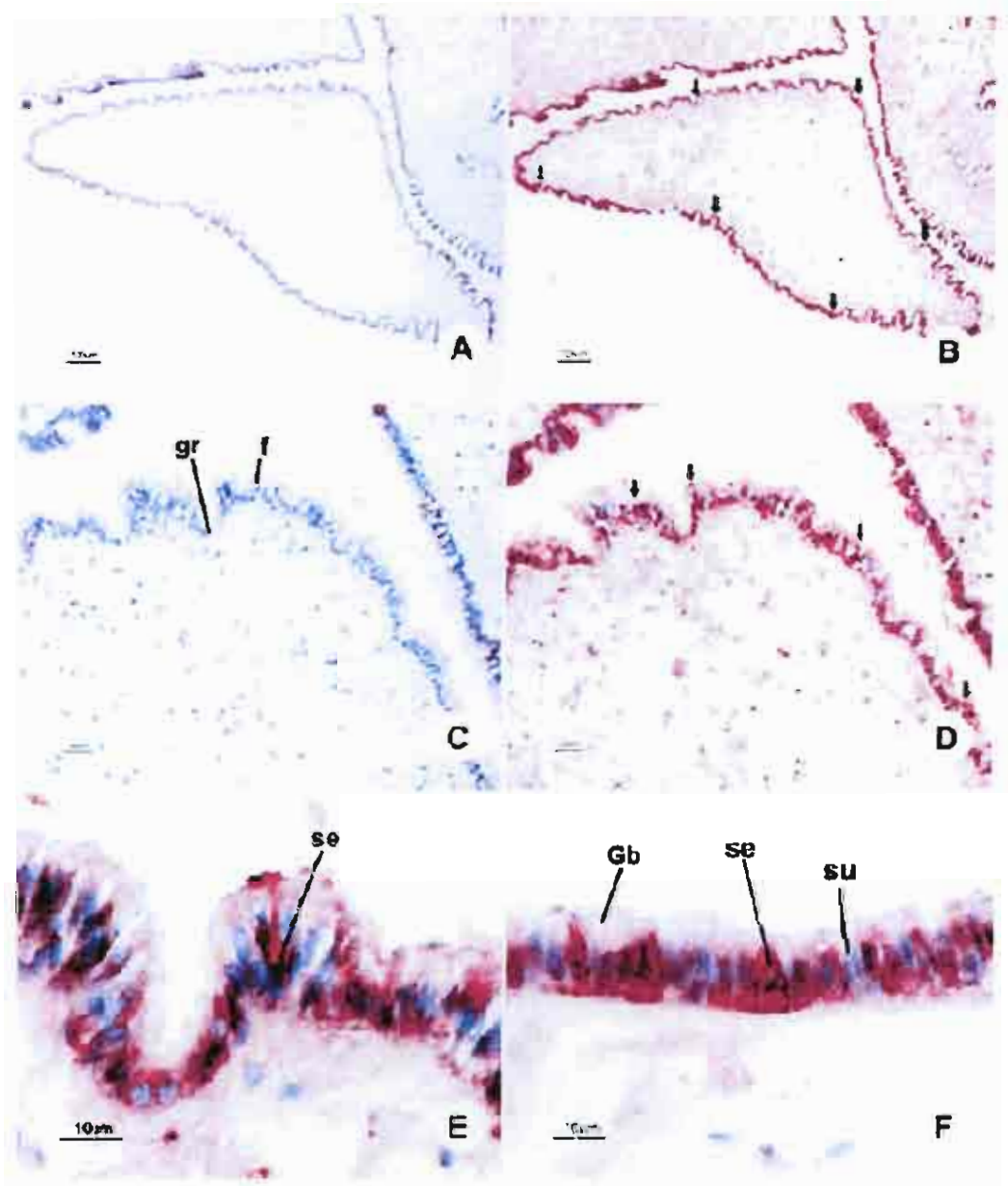












2.3. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท FMRFamide ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสพิเศษของหนวดในหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย

FMRF-like immunoreactivity

FMRFamide คือกรดอะมิโนเรียงต่อกัน 4 ตัวตามด้วยหมู่ amide คือ Phenylalanine-Metionine-Arginine-Phenylalanine-amide เชื่อว่าเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งซึ่งพบมากในเซลล์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จากการศึกษาพบว่าสารสื่อประสาทชนิดนี้เป็นสารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ(cardioexcitatory) และยังมีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อในระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือในช่วงการวางไข่และการหลั่งน้ำเชื้ออีกด้วย ดังนั้นเราจึงได้ศึกษาการกระจายตัวของเซลล์เหล่านี้ทั้งในระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือ และได้ข้อสรุปดังนี้ (รูปที่ 2.3-6) คือ

ระบบประสาท

เตรียมแอนติบอดีต่อ FMRFamide โดยการฉีดด้วย BSA-FMRFamide conjugate ซึ่งทำให้ได้โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อ BSA-FMRFamide แล้วนำแอนติบอดีดังกล่าวมา absorbed ด้วย BSA จนได้ anti-FMRFamide ที่จำเพาะเพื่อนำไปย้อมเนื้อเยื่อโดยวิธี immunoperoxidase (ใช้ AEC เป็น substrate)

ปมประสาท Cerebral

เมื่อย้อม sections ในปมประสาท Cerebral ด้วย anti-FMRFamide พบว่าเซลล์ในชั้น cortex แสดงผลบวกโดยการติดสีแดงกระจายอยู่ที่ บริเวณขอบบนและขอบล่างของชั้น cortex ซึ่งเซลล์ที่ติดสีสามารถแยกออกได้เป็น 3 ชนิดคือ NS₁, NS₂ และ NS₃ (รูปที่ 2.3-1, 2.3-2)

ปมประสาท Pleuropedal

ในปมประสาท pleuropedal ซึ่งมีรูปร่าง H shape พบเซลล์ที่ติดสีกระจายกระจายอยู่ที่ขอบในช่วงบนหนึ่งในสามของ dorsal horn และขอบบน body ของ ganglion เป็นจำนวนมากในขณะที่มีเซลล์ที่ติดสีจำนวนเล็กน้อยจากขอบด้าน ventral horn และขอบล่างของส่วน body นอกจากนี้ยังพบการติดสีในใยประสาทอีกด้วย เซลล์ประสาทที่ติดสีใน ganglion นี้ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิดเหมือนกับเซลล์ที่พบใน cerebral ganglion คือ NS₁, NS₂ และ NS₃ (รูปที่ 2.3-3, 2.3-4)

ปมประสาท Visceral

ในปมประสาท visceral เซลล์ที่ติดสีอยู่บริเวณด้านข้างทางซ้ายและด้านขวาค่อนไปทางด้านบนของปมประสาท (รูปที่ 2.3-5)

อวัยวะสืบพันธุ์

ในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือที่ย้อมแอนติบอดีต่อ FMRFamide พบว่าบริเวณที่ติดสีคือ แคปซูลของรังไข่ และ trabeculae (รูปที่ 2.3-7) โดยในอัตราตรวจพบโครงสร้างที่ติดสีจำนวนมากบริเวณรอบนอกของแคปซูลที่หุ้มอัตรา ในขณะที่ยังพบว่ามีโครงสร้างที่ติดสีน้อยบริเวณแคปซูลด้านใน นอกจากนี้ยังพบเซลล์ติดสีบริเวณถุงแคปซูลที่ยื่นเข้ามาข้างในที่เป็นส่วนของ trabeculae อีกด้วย (รูปที่ 2.3-8)

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.3

- รูปที่ 2.3-1** ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ของ cerebral ganglion ที่ย้อมด้วย pre-immune serum แทน anti FMRFamide ไม่พบการติดสีใน section, D-dorsal, V-ventral, M-medial, Cg-cerebral ganglion, Ja-jaw, Mu-muscle
- A) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ cerebral ganglion ที่ย้อมด้วย anti FMRFamide โดยใช้ DAB with NiCl_3 เป็น substrate แสดงการติดสีเป็นจุดสีดำบริเวณขอบของ cortex
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ cerebral ganglion ที่ย้อมด้วย anti FMRFamide โดยใช้ Novared substrate แสดงการติดสีทั้งสองแบบที่บริเวณขอบของ cortex
- รูปที่ 2.3-2** A) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ dorsal horn ของ cerebral ganglion แสดงการติดสีแดงบริเวณ cortex และ neurites ใน neuropil ซึ่งใช้ Nova red เป็น substrate
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของภาพ A แสดงการติดสีโดยใช้ DAB เป็น substrate
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของภาพ A แสดงการติดสีโดยใช้ Nova red เป็น substrate ซึ่งส่วนหนึ่งเป็น neurosecretory cells. NS_1 -neurosecretory cell type 1, NS_2 -neurosecretory cell type 2, NS_3 -neurosecretory cell type 3
- รูปที่ 2.3-3** A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำของ pleuropedal ganglion แสดงเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบด้านบนของ dorsal horn และใยประสาทที่ติดสีใน neuropil D-dorsal, V-ventral, M-medial, DH-dorsal horn, Bo-body, VH-ventral horn, St-statocyst
- B, D) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางซึ่งใช้ Nova red เป็น substrate แสดงเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบบนของ dorsal horn
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางซึ่งใช้ DAB เป็น substrate แสดงเซลล์ที่ติดสีอยู่ที่ขอบบนของ dorsal horn เช่นกัน
- E) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง control sections ของ pleuropedal ganglion ที่ย้อมด้วย pre-immune serum แทน primary antibody ไม่มีติดสีที่โครงสร้างใด ๆ

- รูปที่ 2.3-4 A) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงซึ่งใช้ DAB เป็น substrate แสดงเซลล์ที่ติดสีซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะ neurosecretory cell type 3 (NS₃)
 B-F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงซึ่งใช้ Nova red เป็น substrate แสดงการติดสีในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน NS₁, NS₂ และ NS₃
- รูปที่ 2.3-5 A) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางซึ่งใช้ DAB เป็น substrate แสดงเซลล์ที่ติดสีกระจายอยู่บริเวณขอบด้านซ้ายและขวาของ visceral ganglion (arrow), D-dorsal, V-ventral, L-lateral
 B) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางซึ่งใช้ Nova red เป็น substrate แสดงการกระจายของเซลล์ที่ติดสีในบริเวณเดียวกัน
 C) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดง FMRFamide immunoreactive cells
 D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการติดสีใน neurosecretory cell type 1 (NS₁)
 E) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการติดสีใน neurosecretory cell type 2 (NS₂)
 F) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง control sections ของ visceral ganglion ซึ่งไม่ติดสี
- รูปที่ 2.3-6 ภาพสรุปการกระจายตัวของ FMRFamide immunoreactive neurosecretory cell ในสาม ganglia ของ adult *H. asinina* (n=10). X-FMRF-amidergic neurons
 A) Cerebral ganglion: FMRF-amidergic neurons กระจายอยู่กันเป็นกลุ่ม ๆ บริเวณ dorsal และ ventral edge ของปมประสาทในขณะที่บริเวณ lateral edge และ the dorso-medial edge พบเพียงเล็กน้อย
 B) Pleuro-pedal ganglion: FMRF-amidergic neurons กระจายอยู่กันเป็นกลุ่ม ๆ บริเวณ cortex ของส่วนบนหนึ่งในสามของ dorsal horn และ dorsal edge ของตัว body ของปมประสาท ในขณะที่บริเวณ ventral horn และ ventral edge ของ ventral horn พบเพียงเล็กน้อย
 C) Visceral ganglion: FMRF-amidergic neurons กระจายอยู่กันเป็นกลุ่ม ๆ ที่บริเวณขอบด้านซ้ายและด้านขวา-ล่างของปมประสาท

- รูปที่ 2.3-7** A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำซึ่งใช้ Novared เป็น substrate แสดงการติดสีบริเวณ capsule และ trabeculae ของ ovary, Ocp-outer capsule, lcp-inner capsule, Tr-trabeculae.
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงการติดสีที่บริเวณ capsule และ trabeculae ของ ovary (arrow) แต่ไม่พบการติดสีที่บริเวณ oocyte. Oct-oocyte
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ B แสดงการติดสีบริเวณ outer capsule และ trabeculae ของ ovary (arrows)
- D, E) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงสุดแสดงการติดสีบริเวณ inner capsule และ trabeculae ของ ovary (arrows)
- F) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดง control sections ของ ovary ที่ย้อมด้วย pre-immune serum แทน anti FMRFamide ซึ่งไม่ติดสี

- รูปที่ 2.3-8** ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดง control sections ของ testis Ocp-outer capsule, lcp-inner capsule, Tr-trabeculae ซึ่งไม่ติดสี
- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำซึ่งใช้ Novared เป็น substrate แสดงการติดสีแดงบริเวณ capsule และ trabeculae ของ testis
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ (B) แสดงการติดสีบริเวณ outer capsule และ nerve processes ใน testis
- C) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ (B) แสดงการติดสีในบริเวณ inner capsule ของ nerve fibers ใน testis Hp-hepatopancreas
- D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงการติดสีในบริเวณ trabeculae ของ nerve fibers ใน testis

- รูปที่ 2.3-9** Horizontal paraffin sections แสดงการติดสีที่บ่งชี้ตำแหน่งของ FMRFamide ในหลายๆ organs ของ *H. asinina* โดยใช้ Nova red solution เป็น substrate
- A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดงการติดสีในหลายๆ organs ใกล้เคียงกับ visceral ganglion (Vg), i.e. intestine (Int), heart (H), and gill
- B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดงการติดสีในบริเวณ visceral ganglion, heart (box area 1), gill (box area 2) and intestine (box area 3)
- C, E, G) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงที่ย้อมด้วย pre-immune serum แทน primary antibody แสดง control sections ของ heart, gill, และ intestine

D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ box area 1 ใน รูป B แสดงการเกาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide บริเวณ nerve processes (arrows) ในกล้ามเนื้อของส่วนatrium, Mb-muscle band, Eaw-external auricular wall, Po-podocyte.

F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ box area 2 ใน B แสดงการเกาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide บริเวณ nerve processes (arrows) ใน core of gill. Gb-goblet cell, Cc-ciliated cell, Es-efferent sinus

H) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ box area 2 ในรูป B แสดงการเกาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide บริเวณ nerve varicosities (arrows) ในชั้นกล้ามเนื้อของ intestine, Gut, Mu-muscularis

รูปที่ 2.3-10 Paraffin sections แสดงการเกาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide ใน pedal muscle ของ adult *H. asinina*.

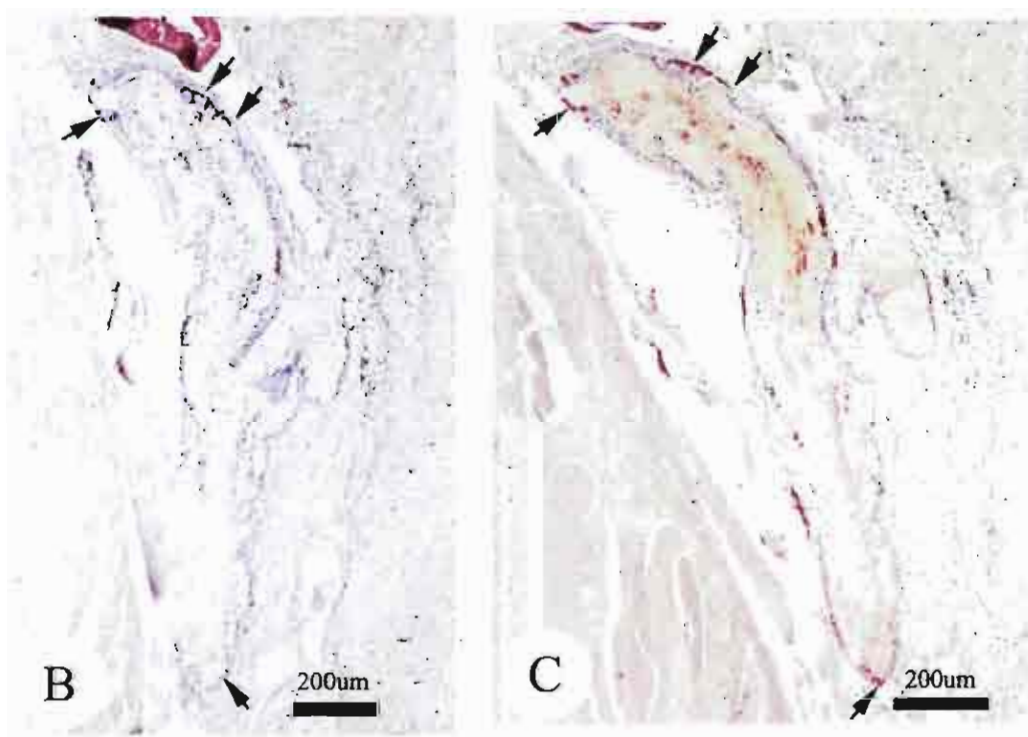
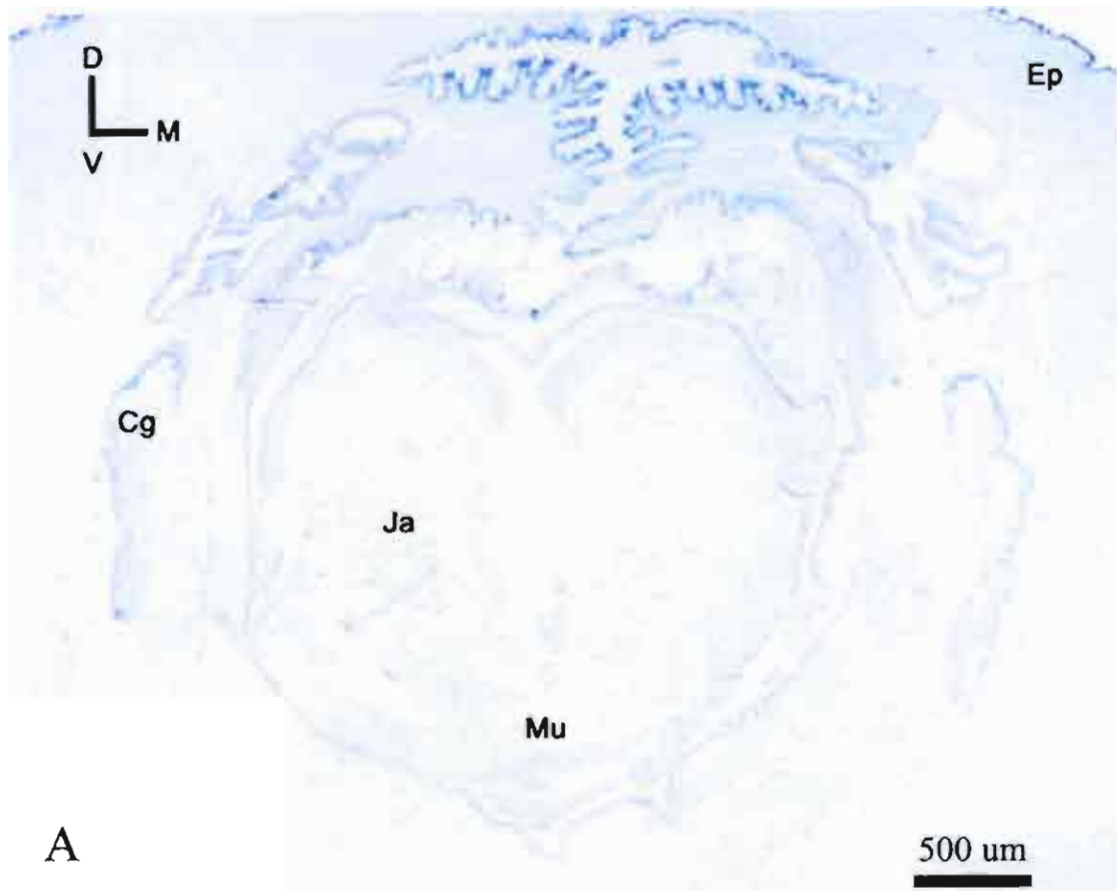
A) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดงการเกาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide ใน hemolymph ของ pedal muscle. He-hemolymph, Pg-pleuro-pedal ganglion, Pm-pedal muscle

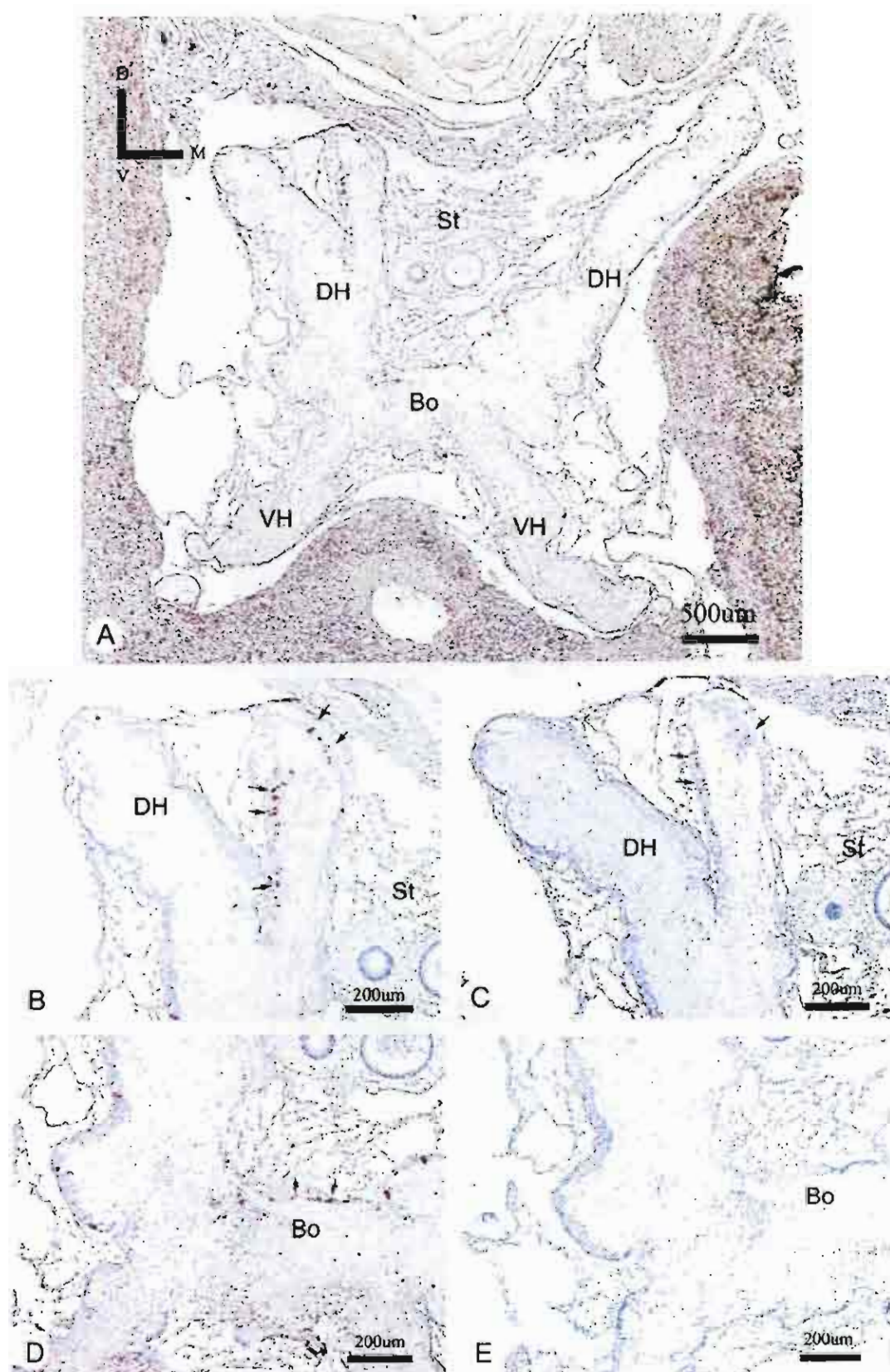
B) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ pedal muscle แสดงการเกาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide ใน endothelium ของ hemolymph (arrows)

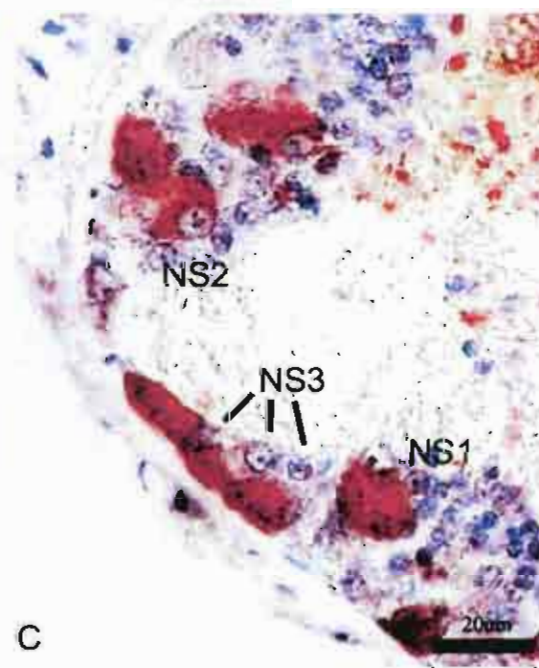
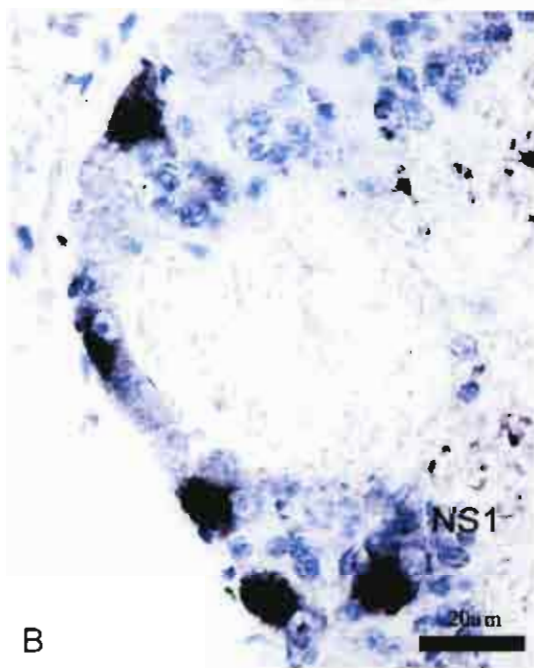
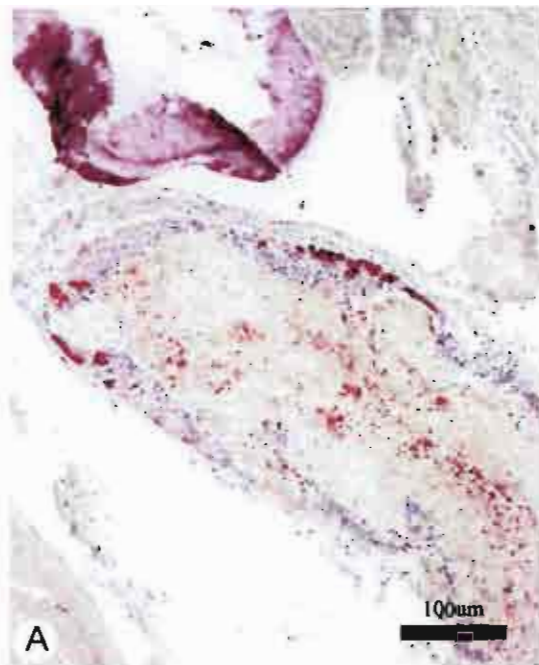
C) ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางแสดงการเกาะของแอนติบอดีต่อ FMRFamide บริเวณ blood sinus wall ของ pedal muscle (arrows), Bs-blood sinus

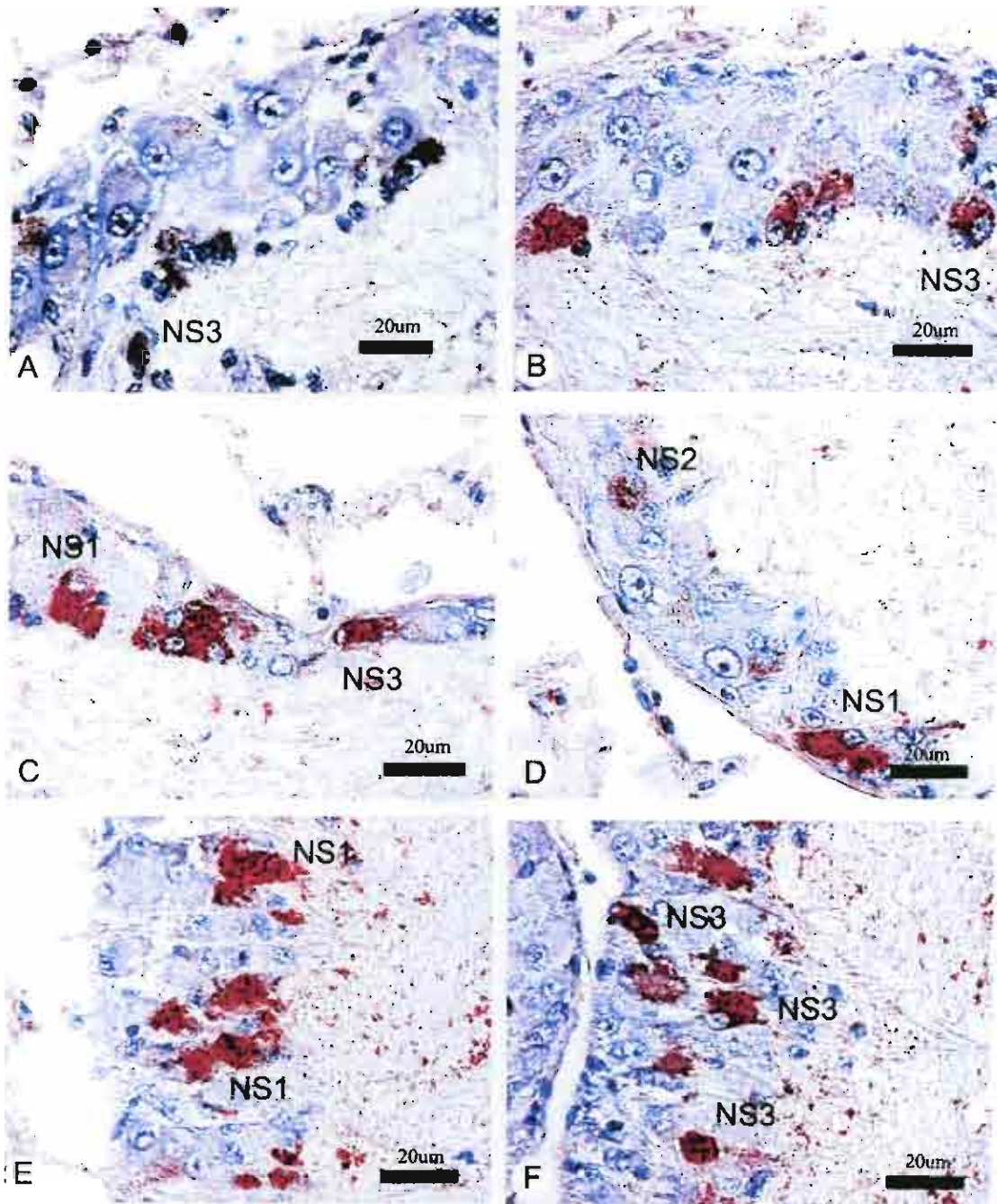
D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของ (C) Leu-leukocyte

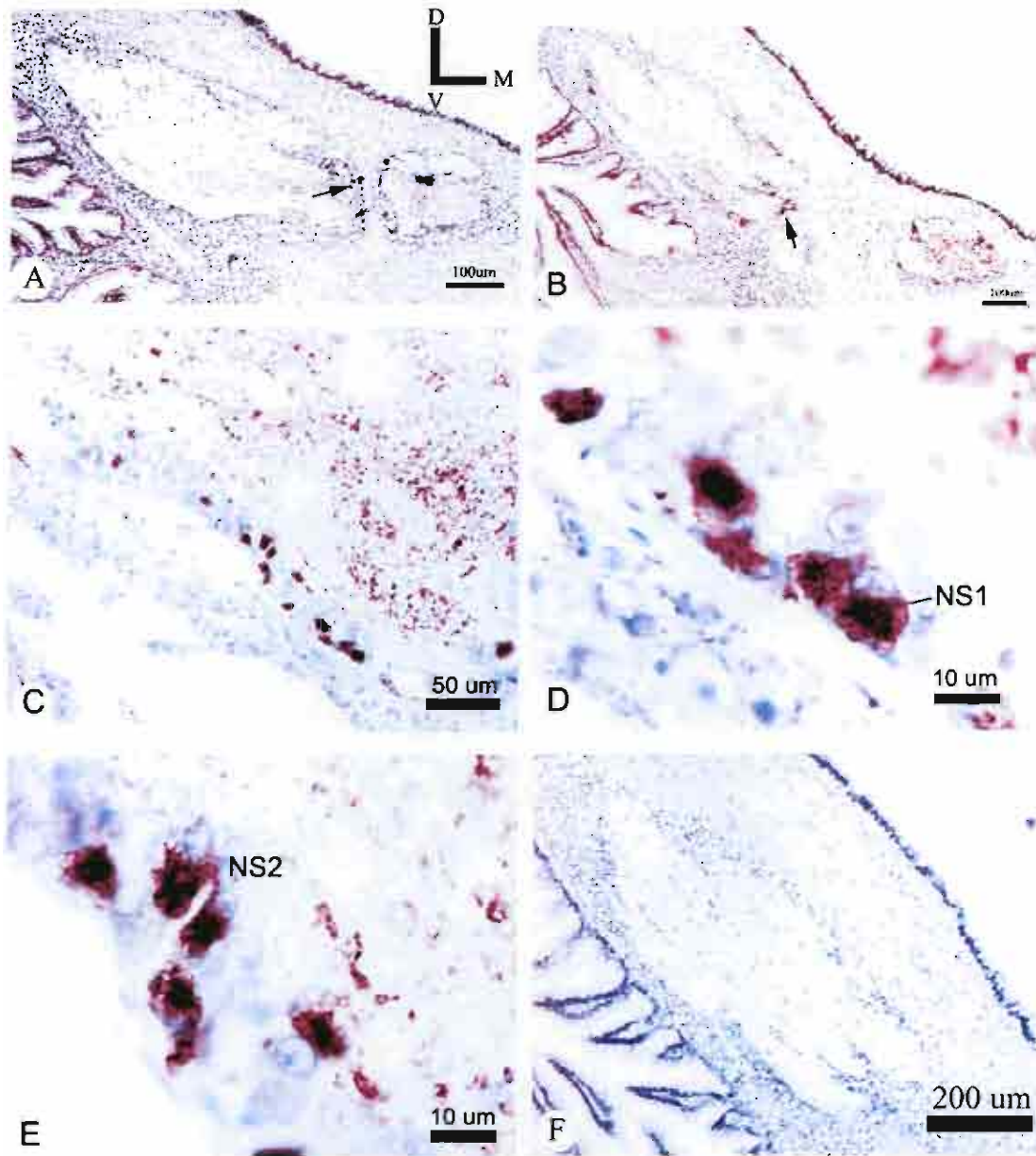
E, F) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดง control sections ที่ย้อมด้วย pre-immune serum แทน anti FMRFamide ใน hemolymph (E) และ blood sinus (F) ซึ่งไม่ติดสีแสดงการเกาะของแอนติบอดี





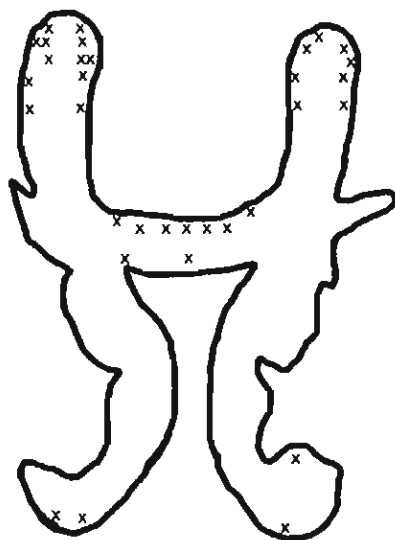








A

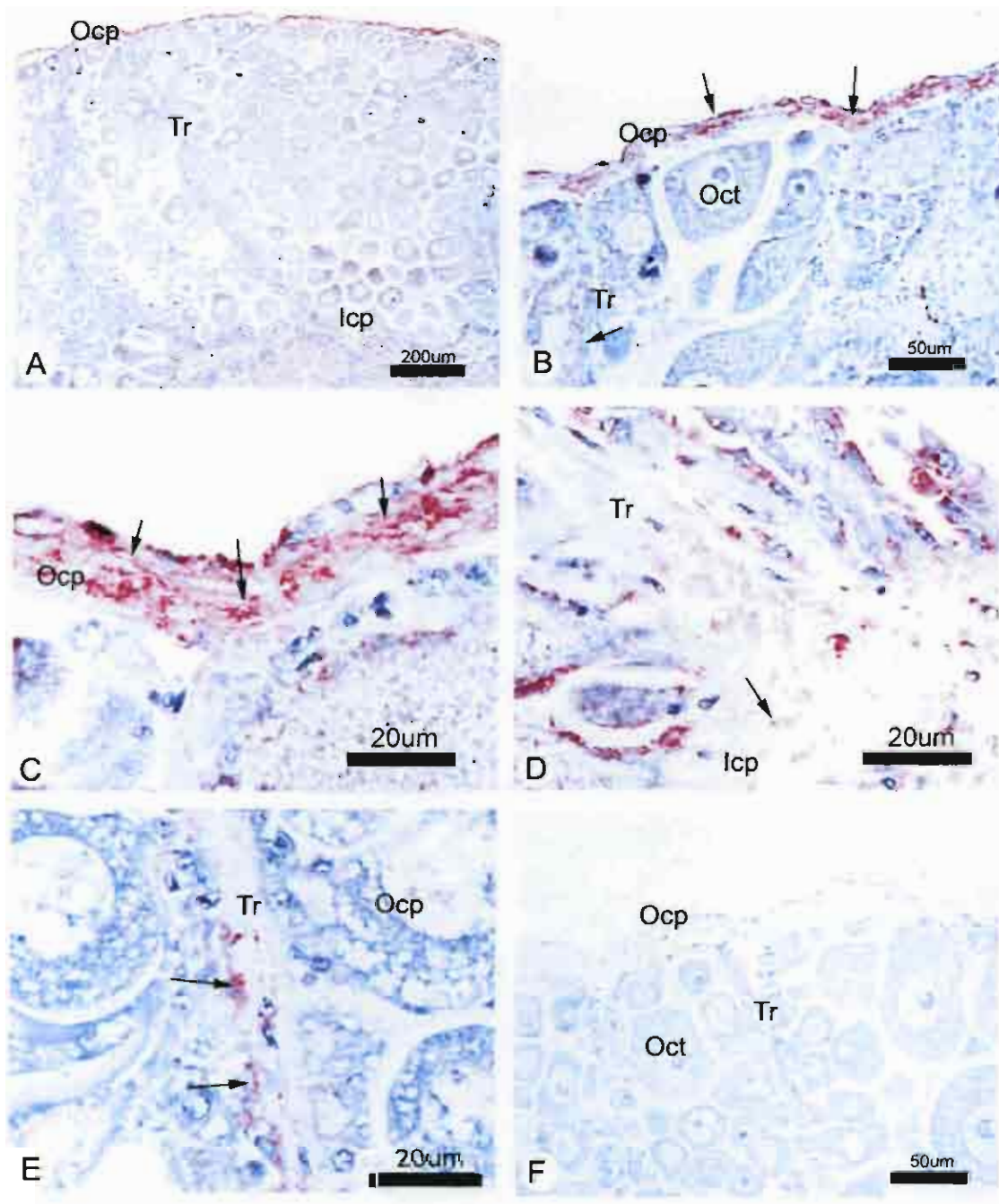


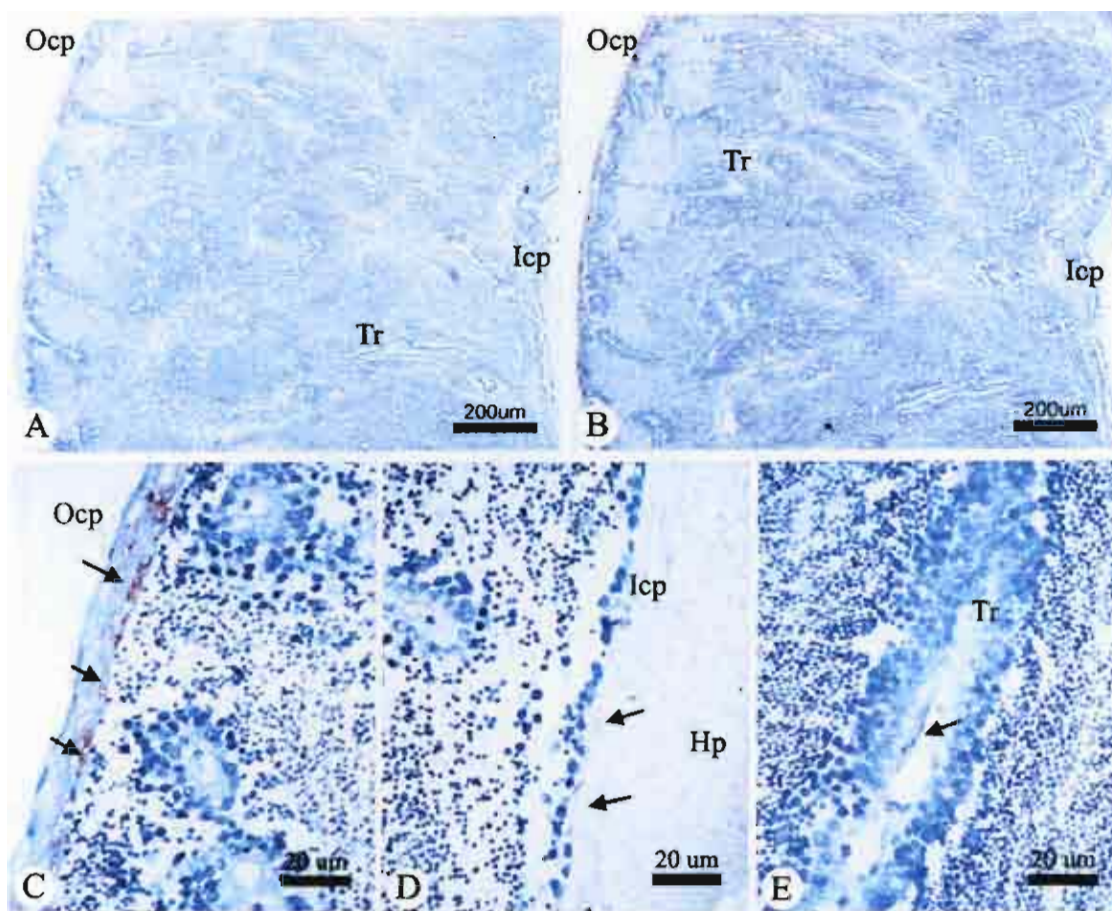
B

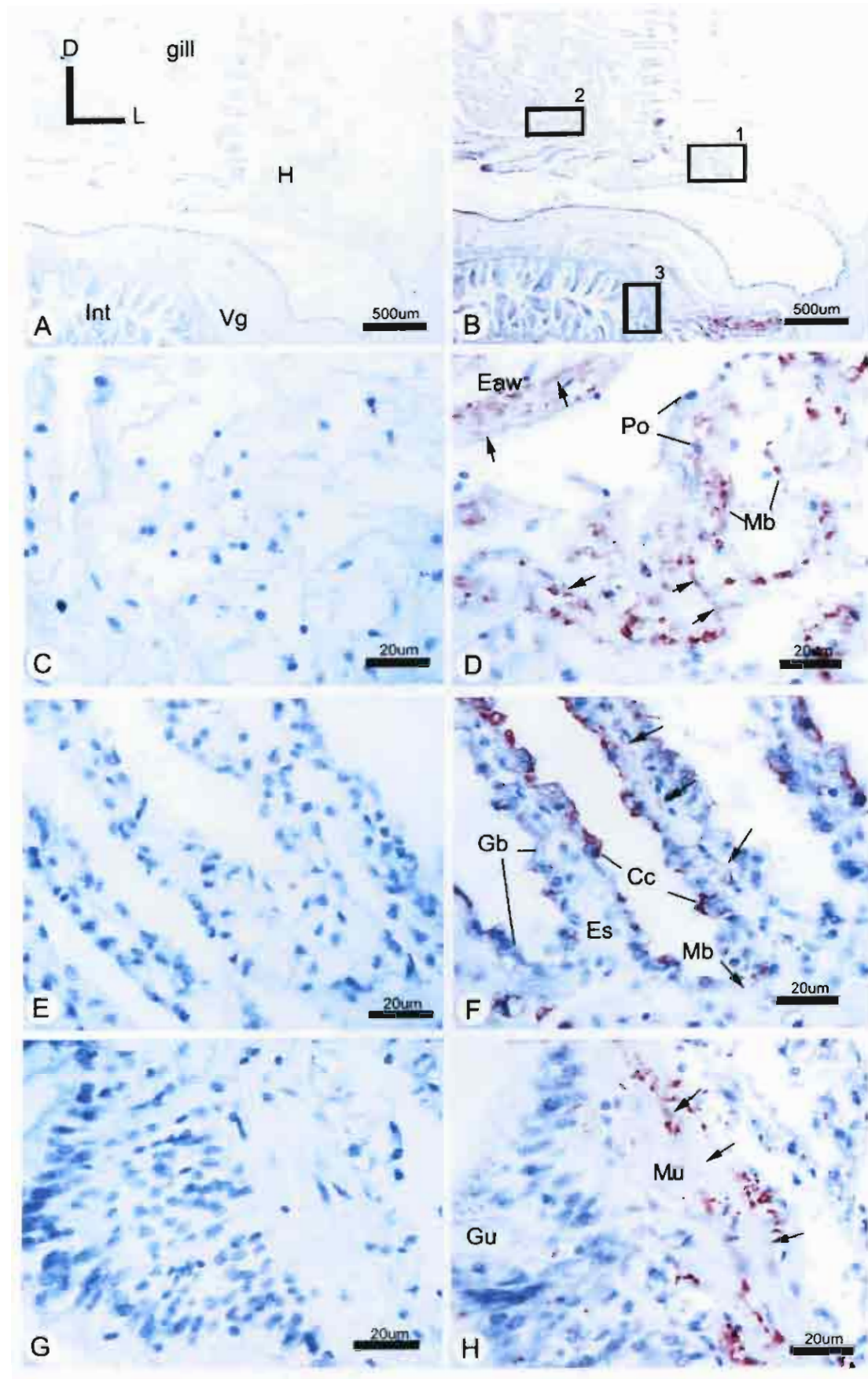


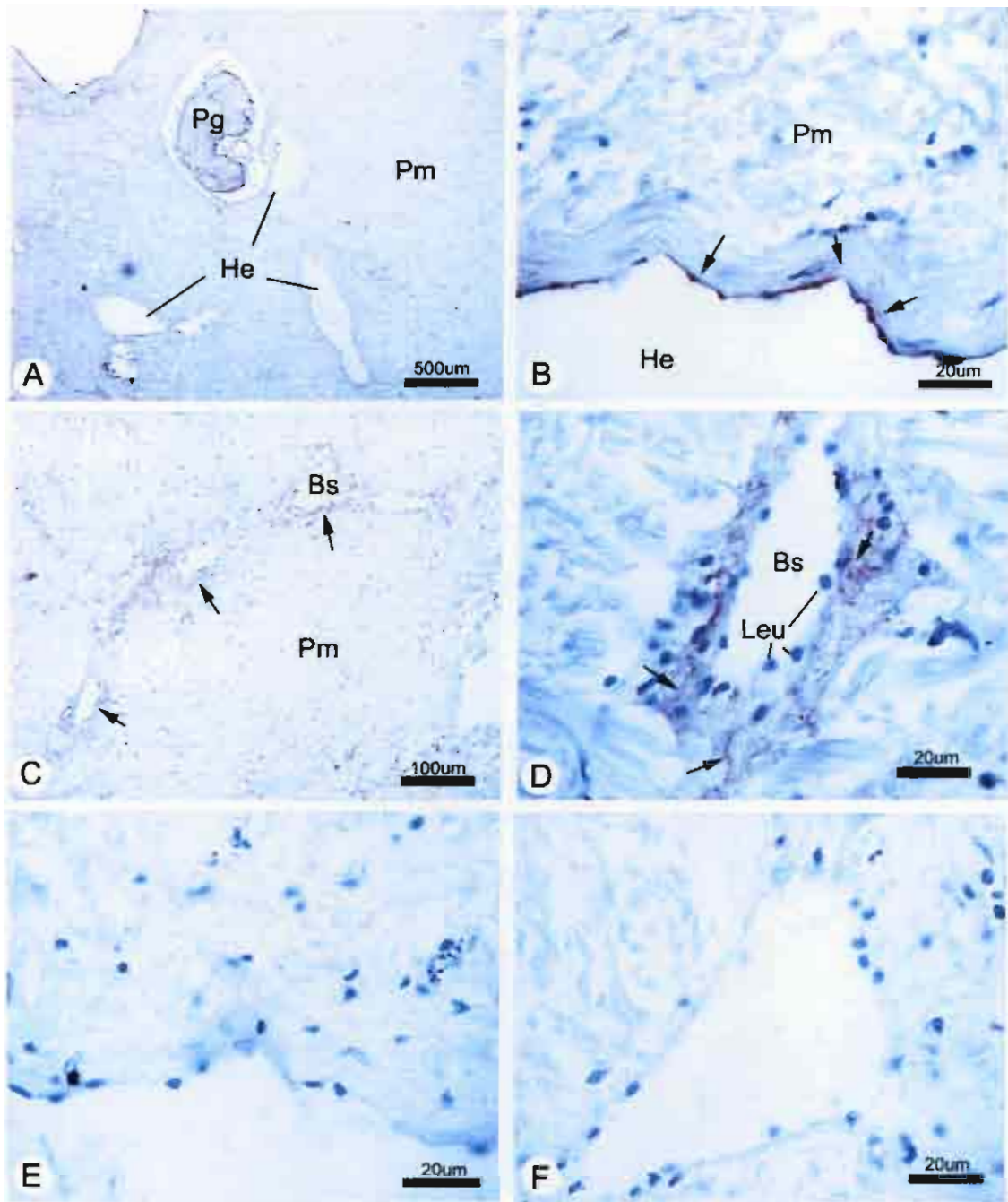
C

x=FMRF-amidergic neurons









2.4. การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone) ในปมประสาท ของหอยเป่าฮือ

2.4.1. การสังเคราะห์และการทำบริสุทธิ์ฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (abalone egg-laying hormone-aELH) ในหอยเป่าฮือ

การสังเคราะห์ aELH

การศึกษาเพื่อหาตำแหน่งการกระจายของ abalone egg-laying hormone (aELH) ในปมประสาทต่าง ๆ ของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย *H. asinina* ได้แก่ ปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral นั้น ในเบื้องต้นเราได้ผลิต polyclonal antibody ต่อ aELH ด้วย recombinant aELH protein ที่ได้มาจาก DNA ต้นแบบของหอยเป่าฮือ *H. rubra* (blacklip abalone) ซึ่งเป็นหอยเป่าฮือสายพันธุ์พื้นเมืองของประเทศออสเตรเลีย โดยพบว่าลำดับ DNA ของ aELH มีความเหมือน (homology) กับ caudodorsal cell hormone (CDCH) หรือ egg-laying hormone ในหอยทาก *Lymnaea stagnalis* ถึง 97% และเหมือนกับ egg-laying hormone (ELH) ในหอยทะเล *Aplysia californica* 56% (Wang L, Hanna PJ. Isolation, cloning, and expression of a DNA sequence encoding an egg-laying hormone of the blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) *J Shellfish Res* 1998;17:389-93) และคล้ายกับ aELH ของ *H. asinina* โดย clone ของ aELH ดังกล่าวได้จากการวิจัยร่วมกับ Assoc. Prof. Peter Hanna, Deakin University, Geelong, Australia ที่ปรึกษาของโครงการ

aELH gene ที่ได้จากหอยเป่าฮือ *H. rubra* 99% ถูกตัดต่อ (insert) เข้ากับ pGEX-2T plasmid vector (Pharmacia Biotech) ซึ่ง vector ดังกล่าวได้รับการออกแบบให้สามารถถูกเหนี่ยวนำ (inducible) เพื่อเกิด intracellular expression ของ genes หรือ gene fragments ที่ต่อติดกับ *Schistosoma japonicum* GST (molecular weight ประมาณ 29 kDa) ซึ่งรวมอยู่ใน pGEX-2T vector ทำให้สามารถเปลี่ยนลำดับ DNA ของ aELH ซึ่งมีความยาว 108 base pair ให้เป็นลำดับโปรตีนจำนวน 36 amino acid (molecular weight ประมาณ 3-4 kDa) โดยได้ fusion protein (GST-aELH) ขนาดใหญ่มีน้ำหนักประมาณ 33 kDa ซึ่งต่อไปจะเรียก fusion protein นี้ว่า GST-aELH เพื่อให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ที่สุดเราได้ทำบริสุทธิ์ (purify) โปรตีน GST-aELH ด้วยชุด Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) ท้ายสุดเราตรวจสอบการสังเคราะห์และการทำบริสุทธิ์นี้ด้วย 12.5% SDS-PAGE

ขั้นตอนการสังเคราะห์เริ่มด้วยการเพิ่มปริมาณของ pGEX-2T vector ที่มี aELH อยู่ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (strain XL1 Blue) เชื้อเซลล์เดี่ยว (single colony) ของเซลล์แบคทีเรียลงในน้ำเลี้ยงเซลล์ (LB-medium) ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (50 µg/ml) เป็นส่วนผสมอยู่ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ร่วมกับการเขย่าที่ 280 rpm เป็นเวลาประมาณ 16-20 ชั่วโมง โดยเซลล์แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นในสัดส่วนของเซลล์ตั้งต้นต่อน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้นใหม่ที่ 1:100 จากนั้นเขย่าเพื่อเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งวัดค่า O.D. ที่ 600 nm ได้ 0.6 แล้วจึงใส่ 0.1 mM IPTG (isopropyl β-D

thiogalactopyranoside) ซึ่งเป็นสาร expression inducer ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นเขย่าและเลี้ยงแบคทีเรียต่ออีกเป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียให้มากขึ้น แล้วจึงนำมาปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเซลล์ที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ละลาย pellets ที่ได้ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย PBS เย็นที่ 4 °C (50 μ l ของ ice-cold PBS ต่อ 1 ml ของ culture fluid) จากนั้นทำการแยกส่วนของ bacteria ออกจากกันด้วยการทำ mild sonication ที่อุณหภูมิ 4 °C ตามด้วยการใส่สาร Triton X-100 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% เพื่อช่วยในการทำละลาย (solubilization) ผนังเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 °C พร้อมกับเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ทั้งส่วนที่เป็นกากเซลล์และเก็บส่วนไล (bacterial lysate) ที่เป็นสารละลายไว้ เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ aELH

การทำบริสุทธิ์ (purification) จะเริ่มด้วยการเตรียม Glutathione Sepharose 4B ตามคำแนะนำในคู่มือการใช้ (Pharmacia Biotech) โดยย่อคือปั่นสารละลาย Glutathione Sepharose 4B ที่มีลักษณะเป็นน้ำสีขาวขุ่น (slurry) ที่ 2,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาทีให้ตกตะกอน จะพบส่วนที่มีลักษณะเป็นเม็ด beads เล็ก ๆ สีขาว ตกที่ก้นหลอด ค่อย ๆ เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง แล้วเติม PBS เย็น (4 °C) 10 ml ลงไปเพื่อล้าง เขย่าเบา ๆ แล้วแช่ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จึงปั่นให้ตกตะกอนซ้ำ แล้วเติม PBS เย็นลงไปในส่วน 1 ml ice-cold PBS ต่อ 1.33 ml Glutathione Sepharose 4B จากนั้นใส่ Glutathione Sepharose 4B ที่เตรียมไว้ลงใน bacterial lysate ที่ได้หลังจากการปั่นแยกเซลล์ข้างต้น เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง Glutathione ที่อยู่ใน Sepharose 4B beads จะเกาะติดกับส่วนที่เป็น GST-tagged ของ fusion protein ทำให้เราสามารถดึงส่วนที่เป็น GST-aELH ออกจากโปรตีนอื่น ๆ ใน bacterial lysate ได้ จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง เติมน้ำ PBS เย็นลงไปเพื่อล้าง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง ต่อมาใส่ elution buffer (10 mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) เพื่อแยกส่วนที่เชื่อมกันระหว่าง Glutathione กับ GST-aELH (โดยจะใช้ 1 ml elution buffer ต่อ 1 ml ของ Glutathione Sepharose 4B ใน ice-cold PBS) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นตกที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูเฉพาะสารละลายส่วนไลซึ่งมี GST-aELH fusion protein อยู่ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้ ทำการแยกและเก็บ GST-aELH ซ้ำด้วย elution buffer แต่เพิ่มเวลาเป็น 15, 30, 45, และ 60 นาที ตามลำดับ และท้ายสุดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง โดย GST-aELH ที่ถูกแยกออกมาแล้วถูกนำมาวัดหาค่าปริมาณโปรตีนที่ A_{280} ด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบผลด้วย 12.5% SDS-PAGE

นอกจากนี้เรายังได้ทำการสังเคราะห์และทำบริสุทธิ์ pGEX-2T plasmid vector ที่ไม่มี aELH gene บรรจุอยู่ (non-recombinant DNA vector) เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบและเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมด้วย โดยพบว่าเมื่อไม่มี aELH inserted gene อยู่ pGEX-2T vector จะ expressed เฉพาะ GST protein เท่านั้น (ไม่ได้แสดงผล)

ผลการสังเคราะห์และการทำบริสุทธิ์ของ aELH

เราใช้ 12.5% SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์และการทำบริสุทธิ์ GST-aELH fusion protein (รูปที่ 2.4-1A) โดยเมื่อวิเคราะห์แยกแถบโปรตีนที่ได้ภายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิด expression ในเซลล์แบคทีเรียด้วยสาร IPTG แล้ว พบว่ามีแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 33 kDa ติดสี Coomassie Blue เข้มอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 2.4-1A, lane 2) เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียก่อนการใส่สาร IPTG (รูปที่ 2.4-1A, lane1) ซึ่งแถบโปรตีนดังกล่าวน่าจะเป็น GST-aELH fusion protein โดยการคำนวณจากขนาด (molecular weight) ของ GST และ aELH เมื่อนำมารวมกัน และเมื่อตรวจสอบโปรตีนที่อยู่ในส่วนของ supernatant หลังจากที่ทำ sonicate เพื่อทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียแล้ว พบว่าแถบโปรตีนส่วนใหญ่หายไป แต่แถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 33 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของ GST-aELH fusion protein ยังคงอยู่และติดสี Coomassie Blue ค่อนข้างเข้มเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนอื่นๆ ใน bacterial lysate (รูปที่ 2.4-1A, lane 3) หลังจากที่เราใส่ Glutathione Sepharose 4B เพื่อให้จับกับ GST-tagged aELH แล้วล้างออกด้วย PBS เย็น พบว่าแถบโปรตีนต่าง ๆ ที่พบใน supernatant หายไป แสดงว่า Glutathione สามารถจับกับส่วนที่เป็น GST-tagged ของ fusion protein ได้เป็นอย่างดีจึงไม่หลงเหลือ fusion protein อยู่ในสารละลาย PBS ที่ได้หลังจากการล้างแล้ว (รูปที่ 2.4-1A, lane 4) ซึ่งรวมถึงการล้างใน ครั้งที่ 2 และ 3 ด้วย (ไม่ได้แสดงผล) และท้ายสุดเมื่อทำการแยก Glutathione Sepharose 4B กับส่วนที่เป็น GST-aELH fusion protein ออกด้วย elution buffer จะพบแถบโปรตีนเดี่ยวที่มีขนาดประมาณ 33 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของ GST-aELH fusion protein (รูปที่ 2.4-1A, lane 5, 6, 7)

ในการตรวจสอบผลการแยกโปรตีน GST-aELH ออกจาก Glutathione Sepharose 4B ที่เวลาต่าง ๆ กันโดยการวัดค่าปริมาณโปรตีนที่ A_{280} ด้วยเครื่อง spectrophotometer นั้น พบว่าโปรตีนที่ถูกแยกออกมา มีปริมาณน้อยลงตามจำนวนครั้งของ elution ที่มากขึ้น (ตารางที่ 2.4-1) โดยโปรตีนที่ถูกแยกออกมาในช่วง 10-30 นาที จะมีความเข้มข้นประมาณ 2-1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และจะมีปริมาณลดลงวัดได้ประมาณ 0.8-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ในช่วง 45-60 นาที และเหลือเพียงประมาณ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และไม่สามารถวัดค่าปริมาณโปรตีนได้หลังจากใส่ elution buffer ข้ามคืนแล้ว และเมื่อเราตรวจสอบผลการแยกโปรตีน GST-aELH ที่เวลาต่าง ๆ ด้วย 12.5% SDS-PAGE (รูปที่ 2.4-1B) พบว่าแถบโปรตีนของ GST-aELH จะมีขนาดประมาณ 33 kDa (รูปที่ 2.4-1B, lane 2-7) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ GST ที่ได้จากการกลั่นทอดลงควบคุมซึ่งมีขนาดประมาณ 29 kDa (รูปที่ 2.4-1B, lane 1) และในการเปรียบเทียบโปรตีน

GST-aELH ที่ถูกแยกออกมาในช่วงต่าง ๆ ด้วยปริมาตรสารละลายโปรตีนที่เท่ากันคือ 8 μ l พบว่าระดับความเข้มของการติดสี Coomassie Blue ของแถบโปรตีนจะลดลงภายหลังการแยก (elute) ที่เวลา 10 นาที (รูปที่ 2.4-1B, lane 2) 15 นาที (รูปที่ 2.4-1B, lane 3) 30 นาที (รูปที่ 2.4-1B, lane 4) 45 นาที (รูปที่ 2.4-1B, lane 5) 60 นาที (รูปที่ 2.4-1B, lane 6) และเมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนอย่างน้อย 12 ชั่วโมง (รูปที่ 2.4-1B, lane 7) ตามลำดับ ซึ่งตรงกับผลการวัดค่าปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง spectrophotometer จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าเราสามารถทำการแยก fusion protein เข้าได้หลายครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณของโปรตีนมากขึ้น ด้วยการเพิ่มเวลาที่ใช้ในการใส่ elution buffer แต่มีข้อจำกัดคือโปรตีนที่ได้อาจเสื่อมหรือเสียคุณภาพ (denatured หรือ degraded protein) หรือมีปริมาณน้อยลงจนไม่สามารถวัดค่าปริมาณโปรตีนได้

ตารางที่ 2.4-1 แสดงปริมาณความเข้มข้นของ GST-aELH fusion protein ที่ถูกแยกออกมาที่เวลาต่าง ๆ

No. of elution	Time (min)	O.D. (A_{280} nm)*	Protein yield (mg/ml)
1	10	0.023	2.3
2	15	0.019	1.9
3	30	0.014	1.4
4	45	0.008	0.8
5	60	0.004	0.4
6	overnight	0.001	0.1

*For the GST affinity tag; 1 unit of $A_{280} \cong 0.5$ mg/ml.

การผลิต polyclonal antibody ต่อ aELH

เราได้ผลิต polyclonal antibody ต่อ GST-aELH fusion protein โดยการนำโปรตีน GST-aELH ที่สังเคราะห์ได้ไปฉีดในหนูเมาส์ เพศเมีย สายพันธุ์ ICR อายุ 6 อาทิตย์ โดยก่อนเริ่มทำการทดลองเราได้เก็บตัวอย่างเลือด (preimmune serum) จากปลายหางของสัตว์ เพื่อใช้เป็นกลุ่มทดลองควบคุมในการศึกษา จากนั้นฉีดโปรตีนแอนติเจนคือ GST-aELH ปริมาณ 100 μ g ผสมกับ complete Freund's adjuvant (Sigma) เข้าที่ชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) และทำการฉีดกระตุ้น (boosting injection) อีก 2 ครั้ง ด้วยโปรตีน GST-aELH ในปริมาณ 100 μ g เท่าเดิมแต่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (Sigma) โดยระยะเวลาฉีดห่างกันประมาณ 3 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจสัตว์ (cardiac puncture) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ aELH

ตัวอย่างเลือด (antiserum) ที่เก็บได้ภายหลังจากการฉีดสัตว์ทดลองด้วยโปรตีนแอนติเจน GST-aELH ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า antiGST-aELH จะถูกนำมาวิเคราะห์ความจำเพาะ (specificity) ที่มีต่อโปรตีน aELH ก่อนนำไปใช้ศึกษาการกระจายของ aELH ในเนื้อเยื่อของหอยด้วยวิธี preabsorption, immunoblotting และ ELISA techniques ดังต่อไปนี้

Preabsorption และ immunoblotting

เนื่องจากโปรตีนแอนติเจนที่เราใช้ฉีดในสัตว์ทดลองประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ส่วนที่ต่อกัน คือ GST และ aELH ซึ่งแต่ละส่วนสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นได้ จึงจำเป็นต้องทดสอบความจำเพาะของ antiGST-aELH ที่มีต่อโปรตีน aELH ในขั้นแรกเราได้นำแถบโปรตีน GST ที่มีขนาดประมาณ 29 kDa กับแถบโปรตีน GST-aELH ที่มีขนาดประมาณ 33 kDa แยกใน 12.5% SDS-PAGE ในปริมาณ 2 μ g/lane และย้ายโปรตีนด้วยวิธี electrotransfer ลงบนแผ่น nitrocellulose (NC) แล้วนำแผ่น NC มาทำการย้อมด้วย primary antibody คือ antiGST-aELH ที่ dilution 1:20,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตามด้วย secondary antibody คือ HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Zymed) ที่ dilution 1:2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงใช้สารละลายที่มี substrates คือ DAB-NiCl₂ ตรวจสอบการจับของ antigen-antibody complex ในขั้นสุดท้าย

ในการย้อมแผ่น nitrocellulose ด้วย primary antibody (antiGST-aELH) เราทำการแยกย้อมเป็น 2 ถาดโดยถาดแรกเราใส่แถบโปรตีน GST (รูปที่ 2.4-2A-1, lane 1) กับแถบโปรตีน GST-aELH (รูปที่ 2.4-2A-1; lane 2) ไว้ด้วยกัน และถาดที่ 2 เราใส่เฉพาะแถบโปรตีน GST-aELH (รูปที่ 2.4-2A-1; lane 3) นำแถบโปรตีนทั้งสองถาดมาย้อมด้วย antiGST-aELH ที่ dilution 1:20,000 เท่ากัน พบว่ามีการจับกันอย่างจำเพาะของ antiGST-aELH ต่อแถบโปรตีนทั้งสอง โดยปรากฏเป็นแถบสีเทาดำที่แถบโปรตีน GST (รูปที่ 2.4-2A-1; lane 1) และเป็นแถบสีเทาดำเข้มที่แถบโปรตีน GST-aELH (รูปที่ 2.4-2A-1; lane 2, 3) จากนั้นเรานำ antiGST-aELH ที่ผ่านการย้อมแล้วดังกล่าวดูดกลืน (absorb) ด้วย GST มาทำการทดสอบซ้ำด้วยวิธีการเช่นเดิม ปรากฏว่าแถบสีเทาดำค่อนข้างเข้มยังคงปรากฏที่แถบโปรตีน GST-aELH (รูปที่ 2.4-2A-2; lane 6, 7) แต่สำหรับแถบโปรตีนที่ควรจะเป็น GST นั้นสีเทาได้จางลงอย่างมาก (รูปที่ 2.4-2A-2; lane 5) เมื่อเทียบกับแถบสีเทาที่ได้จากการย้อมแถบโปรตีน GST ครั้งแรก (รูปที่ 2.4-2A-1; lane 1) โดยแถบล่างกล่าวไม่ปรากฏเมื่อย้อมแถบโปรตีนด้วย preimmune serum (รูปที่ 2.4-2A-1; lane 4, รูปที่ 2.4-2A-2; lane 8)

จากการทดสอบดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า antiGST-aELH ที่ได้มีส่วนที่จับกับโปรตีน GST ร่วมอยู่ด้วย ซึ่งเมื่อเรานำ antiGST-aELH ดังกล่าวมาทดสอบความจำเพาะกับแถบโปรตีน GST จึงพบว่ามี การจับกันอย่างจำเพาะโดยปรากฏเป็นสีเทาดำที่แถบโปรตีนขนาด 29 kDa ด้วยเช่นเดียวกัน (รูปที่ 2.4-2A-1; lane 1) แต่เมื่อเราลด immunoreactivity ของส่วนที่สามารถจับกับโปรตีน GST ออกด้วยการ

preabsorption ด้วย GST พบว่าแถบสีเทาดำที่แถบโปรตีนขนาด 29 kDa จางลงหรือเกือบจะไม่ปรากฏ แถบสีเทาดังกล่าวให้เห็นเลย (รูปที่ 2.4-2A-2; lane 5) ในขณะที่ยังพบการจับกันอย่างจำเพาะที่แถบโปรตีน GST-aELH (รูปที่ 2.4-2A-2; lane 6, 7) ทั้งในภาวะที่ย้อมด้วย antiGST-aELH คู่กับแถบโปรตีน GST (รูปที่ 2.4-2A-2; lane 5, 6) และในภาวะที่ย้อมเฉพาะแถบโปรตีน GST-aELH ด้วย antiGST-aELH (รูปที่ 2.4-2A-2; lane 7) ซึ่งหมายความว่าเราสามารถกำจัด immunoreactivity ของแอนติบอดี (antiGST-aELH) ต่อ GST และคงเหลือไว้เฉพาะ immunoreactivity ที่จำเพาะต่อโปรตีน aELH

ด้วยวิธีการเดียวกันแต่เราใช้โปรตีนจาก bacterial lysate คือ โปรตีนที่ได้ภายหลังจากการเหนี่ยวนำ expression ของเซลล์แบคทีเรียด้วยสาร IPTG (รูปที่ 2.4-2B-1; lane 1) และโปรตีนที่อยู่ในส่วนของ supernatant หลังจากทำ sonication และปรากฏส่วนที่เป็นโปรตีน GST-aELH อยู่ด้วย (รูปที่ 2.4-2B-1; lane 2) รวมทั้งโปรตีน GST-aELH fusion protein (รูปที่ 2.4-2B-1; lane 3) นำโปรตีนทั้ง 3 ชนิดมาผ่าน 12.5% SDS-PAGE และย้ายลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วย้อมด้วยสี Ponceaus S ทำให้สามารถสังเกตแถบโปรตีนที่ผ่านการย้ายปรากฏเป็นแถบสีชมพู (รูปที่ 2.4-2B, panel 1) เมื่อนำมาทดสอบความจำเพาะของ preabsorbed antiGST-aELH ที่ dilution 1:20,000 (รูปที่ 2.4-2B, panel 2) พบว่ามีการจับกันอย่างจำเพาะของ antiGST-aELH โดยปรากฏเป็นสีเทาดำเข้มที่แถบโปรตีนขนาด 33 kDa ต่อโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียหลังจากการเหนี่ยวนำ expression ด้วย IPTG (รูปที่ 2.4-2B-2; lane 4) โปรตีนที่อยู่ในส่วนของ supernatant (รูปที่ 2.4-2B-2; lane 5) และแถบโปรตีน GST-aELH (รูปที่ 2.4-2B-2; lane 6) โดยไม่ปรากฏผลในลักษณะเดียวกันต่อโปรตีนทั้งสามส่วนเมื่อย้อมด้วย preimmune serum (รูปที่ 2.4-2B-3, lane 7, 8, 9) จากผลการทดลองนี้เราจึงสรุปได้ว่าเราสามารถทำ expression ของ aELH ใน bacterial system รวมทั้งขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ได้เป็นผลสำเร็จ

ELISA (Enzymed-linked immunosorbent assay)

เรายังได้ตรวจสอบความจำเพาะของ antiGST-aELH ต่อโปรตีน aELH โดยใช้ primary antibody 3 แบบคือ (1) non-absorbed antiGST-aELH (2) preabsorbed antiGST-aELH ด้วยโปรตีน GST โดย antiGST-aELH ถูกนำมาผสมกับโปรตีน GST (ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้คือ 1: 10, 1: 20 และ 1: 40 (antiGST-aELH: GST, v/v) ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำไปใช้เป็น primary antibody และ (3) preabsorbed antiGST-aELH ด้วย GST-aELH โดย antiGST-aELH ถูกนำมาผสมกับโปรตีน GST-aELH (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ในอัตราส่วน 1: 100 (antiGST-aELH: GST-aELH, v/v) ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำไปใช้เป็น primary antibody ต่อจากนั้นใช้เทคนิค ELISA เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี กล่าวโดยย่อคือทำการเคลือบหลุม 96 microtiter-well plates ด้วยโปรตีน 2 ชนิดได้แก่ GST-aELH (GE) และ GST ที่เข้มข้น 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นเคาะและล้าง plates ก่อนทำการห้าม non-specific binding ด้วย 0.25% BSA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วย primary antibody ที่เตรียมไว้ ณ dilution ต่าง ๆ กันได้แก่ 1:

1,000, 1: 10,000, 1: 100,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยการใส่ secondary antibody คือ HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (DAKO, Denmark) ที่ dilution 1: 2,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงใส่ O-phenylenediamine substrate solution (Sigma) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายตรวจสอบปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยเครื่องอ่านค่า ELISA reader

จากการทดลองพบว่า (รูปที่ 2.4-3 และตารางที่ 2.4-2) antiGST-aELH (primary antibody แบบที่ 1) จะให้ค่า O.D. สูงต่อโปรตีนแอนติเจนทั้ง 2 ชนิดคือ โปรตีน GST-aELH (รูปที่ 2.4-3, lane 4) และโปรตีน GST (รูปที่ 2.4-3, lane 5) แสดงว่า antiGST-aELH ที่ได้มีปฏิกิริยาต่อทั้งโปรตีน GST และโปรตีน aELH ในขณะเดียวกันเมื่อใช้ antiGST-aELH preabsorbed ด้วยโปรตีน GST (primary antibody แบบที่ 2) พบว่าได้ค่า O.D. ต่อโปรตีน GST-aELH สูง (รูปที่ 2.4-3, lane 6, 8, 10) แต่ค่า O.D. ต่อโปรตีน GST จะต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 2.4-3, lane 7, 9, 11) ซึ่งแสดงว่าเมื่อมีการลด immunoreactivity ของแอนติบอดีที่มีต่อโปรตีน GST แล้ว antiGST-aELH จะมีความจำเพาะต่อโปรตีน aELH สูง ในขณะที่เมื่อใช้ preabsorbed antiGST-aELH ด้วยโปรตีน GST-aELH (primary antibody แบบที่ 3) ใน competitive assay ค่า O.D. ที่ได้จะต่ำมาก (รูปที่ 2.4-3, lane 12) เช่นเดียวกับค่า O.D. ที่ได้ในกลุ่มทดลองควบคุมเมื่อใช้ preimmune serum แทนที่ primary antibody (รูปที่ 2.4-3, lane 2, 3) หรือค่า O.D. ที่ได้เมื่อเคลือบหลุม 96 microtiter-well plates ด้วย coating buffer แทนโปรตีนแอนติเจนและใช้ antiGST-aELH เป็น primary antibody แบบที่ 1 (รูปที่ 2.4-3, lane 1)

ตารางที่ 2.4-2 แสดงผลการทดสอบแอนติบอดีต่อโปรตีน GST-aELH และโปรตีน GST

PoAb dilution	1 buffer + NAbs	2 GE + NP	3 GST + NP	4 GE + NAbs	5 GST + NAbs	6 GE + Abs10	7 GST + Abs10	8 GE + Abs20	9 GST + Abs20	10 GE + Abs40	11 GST + Abs40	12 GE + Abs-E
1:1000	0.001	0.041	0.028	2.793	2.754	2.551	0.509	2.529	0.457	2.480	0.305	0.129
1:1000	0.003	0.021	0.152	2.746	2.701	2.611	0.480	2.575	0.487	2.624	0.285	0.084
1:10000	0.002	0.017	0.004	2.588	1.343	2.254	0.149	2.419	0.167	2.229	0.138	0.018
1:10000	-0.005	0.013	0.010	2.576	1.267	2.358	0.143	2.480	0.187	2.493	0.120	0.055
1:100000	-0.009	0.011	0.006	1.119	0.241	1.145	0.024	0.858	0.064	0.782	0.019	0.002
1:100000	-0.011	0.011	0.006	1.101	0.261	1.209	0.050	0.812	0.040	0.887	0.016	0.022

คำย่อ: GE = GST-aELH coated wells, GST = GST coated well, NS = preimmune serum, NAbs = non-absorbed antiGST-aELH antiserum, Abs10 = preabsorbed antiGST-aELH antiserum at 1:10 ratio, Abs20 = preabsorbed antiGST-aELH antiserum at 1:20 ratio, Abs40 = preabsorbed antiGST-aELH antiserum at 1:40 ratio, Abs-E = preabsorbed antiGST-aELH with GST-aELH at 1:100 ratio

โดยสรุปพบว่าการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ antiGST-aELH ที่มีต่อโปรตีน antigen คือ GST-aELH fusion protein ให้ผลค่อนข้างดีและมีความจำเพาะต่อ aELH ค่อนข้างสูง ซึ่งเราได้นำ preabsorbed antiGST-aELH ดังกล่าวไปตรวจการกระจายของ aELH ในเนื้อเยื่อของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ได้แก่ ปมประสาทต่าง ๆ และอวัยวะสืบพันธุ์

2.4.2. การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (abalone egg-laying hormone-aELH) ในอวัยวะสืบพันธุ์และในปมประสาทของหอยเป่าฮือ

เนื้อเยื่อสืบพันธุ์

เราได้นำ antiGST-aELH ที่ผลิตได้มาทำการศึกษาด้วยวิธี immunoperoxidase เพื่อดูการกระจายของ egg-laying hormone ในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์และในปมประสาท เราพบการกระจายตัวของ egg-laying hormone ในเนื้อเยื่อทั้งของรังไข่และอวัยวะของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยโดยบริเวณที่ติดสีเข้มมากคือ trabeculae ซึ่งมีลักษณะเป็นแผงประกอบไปด้วยหลอดเลือดฝอยเป็นแกนที่ถูกหุ้มด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบตัวอยู่ตามยาวและยื่นจากถุงหุ้มรังไข่เข้าไปยังถุงหุ้ม hepatopancreas นอกจากการกระจายโดยทั่วไปของ ELH ใน trabeculae และ capsule ของรังไข่ ในการศึกษาต่อมาเรายังพบว่าในรังไข่ยังมีการกระจายของ ELH ใน follicular cells และ granular cells ที่อยู่ใกล้กับเซลล์ไข่ระยะสุดท้ายที่พัฒนาเต็มที่แล้ว นอกจากนั้นแล้วตัวเซลล์ไข่เองก็มี ELH อยู่ในไซโตพลาสซึมด้วยซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า นอกจาก ELH จะกระตุ้นการตกไข่แล้วยังมีส่วนในการควบคุมการพัฒนาของเซลล์ไข่ด้วย (รูปที่ 2.4-4)

ในการรายงานครั้งนี้เราได้ศึกษาการกระจายตัวของ egg-laying hormone ในปมประสาทต่าง ๆ ของหอยเป่าฮือ ได้แก่ปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ที่ผ่านการตรึงเนื้อเยื่อด้วย Bouin's fixative และเก็บอยู่ใน paraffin block โดยใช้ polyclonal antibody คือ antiGST-aELH preabsorbed ด้วย protein GST ก่อนที่จะนำไปย้อมในเนื้อเยื่อ โดยย่อคือเราทำการผสม antiGST-aELH กับโปรตีน GST ให้อัตราส่วนเป็น 1:10 (antiGST-aELH: GST, v/v) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นเราจึงนำมาย้อมเนื้อเยื่อปมประสาทที่ตัดให้มีความหนาประมาณ 5 µm ด้วยวิธี immunoperoxidase โดยใช้ substrate คือ DAB-NiCl₂ ตรวจดูตำแหน่งของ antigen-antibody complex และใช้เนื้อเยื่อปมประสาทที่ย้อมด้วย preimmune serum แทนที่ preabsorbed antiGST-aELH เป็นกลุ่มควบคุม

ปมประสาท cerebral

ปมประสาท cerebral มีลักษณะเป็นรูปแท่งยาว มีอยู่ข้างละ 1 ปม ต่อโยงกันด้วย cerebral commissure ขอบนอก (cortex) ของปมประสาทประกอบด้วยเซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-NS) ส่วนที่เป็นเนื้อใน (medulla) ของปมประสาทประกอบด้วยใยเส้นประสาทสานกันอยู่ทั่วไปและกิ่งของประสาท (axon) ที่ยื่นออกไปเป็นจำนวนมาก จะ

พบเซลล์ประสาทที่ติดสีดำ (immunoreactive cells) อยู่ไม่มากนัก โดยส่วนมากจะพบที่บริเวณขอบด้านล่าง (ventral horn) ของปมประสาท และพบกระจายอยู่ไม่มากนักตามขอบด้านบน (dorsal horn) รวมทั้งขอบทางด้านนอก (lateral edge) และขอบทางด้านใน (medial edge) ของปมประสาท (รูปที่ 2.4-5) เซลล์ประสาทที่ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ที่พบมีลักษณะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิด โดยจำแนกตามขนาดของตัวเซลล์และตำแหน่งที่พบตามวิธีการจำแนกของ Upatham *et al*, 1998 โดยในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS1) ตัวเซลล์มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสค่อนข้างใส และมักเรียงตัวอยู่ด้านนอกสุดของชั้น cortex ติดกับ basement membrane ภายในเนื้อไซโตพลาสซึมจะเห็นลักษณะของเม็ด granules ซึ่งติดสีดำอย่างชัดเจน (รูปที่ 2.4-5E, F) ส่วนเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 2 (NS2) และชนิดที่ 3 (NS3) มีตัวเซลล์ขนาดเล็ก นิวเคลียสกลมและค่อนข้างทึบกว่าชนิดแรก ภายในเนื้อไซโตพลาสซึมติดสีดำและเห็นลักษณะของเม็ด granules อยู่ข้างในเช่นเดียวกัน (รูปที่ 2.4-6D) แต่มีจำนวนของเซลล์ประสาทซึ่งติดสีดำน้อยกว่าชนิดแรก จำนวนเซลล์ประสาทที่ติดสีดำจะลดลงไปเรื่อย ๆ จากบริเวณ ventral horn ไปจนถึงบริเวณที่เป็น cerebral commissure (รูปที่ 2.4-5F, G; 2.4-6A, C) ซึ่งโดยมากจะพบแต่เส้นใยประสาทที่ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ยิ่งตามความยาว (รูปที่ 2.4-5F, G, 2.4-6A-F) โดยเกือบจะไม่พบเซลล์ประสาทอยู่เลย และไม่พบการติดสีดำที่ตัวเซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อปมประสาทที่ย้อมด้วย preimmune serum ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2.4-5A)

ปมประสาท pleuropedal

ปมประสาท pleuropedal เป็นปมประสาทที่มีขนาดใหญ่ มีลักษณะคล้ายตัว H โดยมีขา (horn) อยู่ 4 ข้าง ประกอบด้วยขอบนอก (cortex) ซึ่งจะพบเซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-NS) ชนิดต่าง ๆ และส่วนที่เป็นเนื้อใน (medulla) พบใยเส้นประสาทสานกันอยู่ทั่วไป เราพบเซลล์ประสาทที่ติดสีดำ (immunoreactive cells) เป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วทั้งปมประสาททั้งในส่วนของ dorsal horn, ventral horn และ lateral horn รวมถึงส่วนที่เป็น body ของปมประสาท (รูปที่ 2.4-7B; 2.4-9B) โดยมีเซลล์ประสาทติดสีดำเข้มมากอยู่กันอย่างหนาแน่นเกือบตลอดความยาวของ ventral horn ทั้งสองข้างโดยเฉพาะในบริเวณที่อยู่ติดกับ basement membrane ของชั้น cortex ที่ขอบด้านนอก (lateral edge) (รูปที่ 2.4-8B-E) ส่วนเซลล์ประสาทติดสีดำที่พบบริเวณ body ของปมประสาท มักจะอยู่ทางขอบด้านบน (dorsal edge) (รูปที่ 2.4-7C; 2.4-8A) อีกทั้งยังพบกลุ่มของเซลล์ประสาทที่มีลักษณะของ endogenous peroxidase กระจายแทรกอยู่ในชั้น cortex ด้วย (รูปที่ 2.4-8E, F) เซลล์ประสาทที่ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ที่พบมีลักษณะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิดตามวิธีการจำแนกของ Upatham *et al*, 1998 โดยพบการติดสีดำของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS1) ซึ่งตัวเซลล์มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสกลมค่อนข้างใส มีนิวคลีโอลัสเห็นได้ชัด เห็นลักษณะของเม็ด granules ที่ติดสีดำอยู่ภายในเนื้อไซโตพลาสซึมชัดเจน (รูปที่ 2.4-7F, G; 2.4-8F) เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 2 (NS2) มีขนาดของตัวเซลล์เล็กกว่าชนิดแรก นิวเคลียสกลมแต่ที่ทึบกว่า ภายในไซโตพลา

สซึมติดสีดำ (รูปที่ 2.4-7G, 2.4-8F) เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS3) มีขนาดของตัวเซลล์ค่อนข้างเล็ก นิวเคลียสกลมและมีก้อน heterochromatin มาก โดยทั่วไปจะพบอยู่ทางด้านใน (medulla) ของปมประสาท ภายในไฮโดรพลาสซึมติดสีดำเห็นได้ชัดเช่นเดียวกัน (รูปที่ 2.4-7D, E; 2.4-8F) นอกจากนี้ยังพบว่าภายในปมประสาทมีใยประสาท (neuropil) ที่ติดสีดำอยู่ด้วย โดยมีลักษณะเป็นปมเล็ก ๆ (varicosities) เรียงต่อกันออกไปเป็นทางยาว (รูปที่ 2.4-7D, F) ไม่พบการติดสีดำที่ตัวเซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อปมประสาทที่ย้อมด้วย preimmune serum ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2.4-7A)

ปมประสาท visceral

ปมประสาท visceral เป็นปมประสาทเดี่ยว มีลักษณะคล้ายดัมเบลล์ (dumb-bell shape) ขอบนอก (cortex) จะพบเซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-NS) ชนิดต่าง ๆ อยู่ค่อนข้างหนาแน่นเรียงกันอยู่ประมาณ 2-3 ชั้นบริเวณตรงกลางปมประสาท (mid portion) ทั้งขอบด้านบน (dorsal edge) และขอบด้านล่าง (ventral edge) แต่ทางด้านนอกของปมประสาท (lateral side) พบมีตัวเซลล์ประสาทร้อยกว่าโดยมีเซลล์เรียงอยู่แค่ 1 ชั้น ส่วนเนื้อใน (medulla) มีใยเส้นประสาทสานกันอยู่ทั่วไป (รูปที่ 2.4-9A, B) จำนวนของเซลล์ประสาททั้งหมดค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับปมประสาท cerebral และ pleuropedal เราพบเซลล์ประสาทที่ติดสีดำ (immunoreactive cells) กระจายอยู่ไม่มากนักโดยเฉพาะในบริเวณที่อยู่ติดกับ basement membrane ของชั้น cortex ทางด้านขอบนอก (lateral side) และขอบด้านล่าง (ventral edge) (รูปที่ 2.4-9B) แต่จะพบมากขึ้นทางขอบด้านบน (dorsal edge) (รูปที่ 2.4-9B, C, E; 2.4-10C) พบกลุ่มของเซลล์ประสาทที่มีลักษณะของ endogenous peroxidase กระจายแทรกอยู่ในชั้น cortex ด้วย (รูปที่ 2.4-9E) เซลล์ประสาทที่ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ มีลักษณะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน โดยพบการติดสีดำภายในเนื้อไฮโดรพลาสซึมของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS1) อย่างชัดเจน (รูปที่ 2.4-9D, F, G) ส่วนเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 2 (NS2) และชนิดที่ 3 (NS3) ซึ่งมีขนาดของตัวเซลล์เล็กกว่า จะพบการติดสีดำภายในไฮโดรพลาสซึมเช่นเดียวกัน โดยจะพบอยู่ทางด้านในของปมประสาท (รูปที่ 2.4-9C, E, F) นอกจากนี้ยังพบว่าภายใน neuropil ของปมประสาทมีใยประสาทที่ติดสีดำอยู่ด้วย (รูปที่ 2.4-9B, C, E) ไม่พบการติดสีดำที่ตัวเซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อปมประสาทที่ย้อมด้วย preimmune serum ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2.4-9A)

จากการย้อมเนื้อเยื่อด้วย preabsorbed antiGST-aELH ในปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ทำให้สรุปได้ว่ามีเซลล์ประสาทที่ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ อยู่ภายในปมประสาททั้งสามปม โดยเซลล์ประสาทดังกล่าวมีลักษณะของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปมประสาทพบว่าปมประสาท pleuropedal มีจำนวนของเซลล์ประสาทที่ติดสีดำมากที่สุด ซึ่งอาจหมายความว่าปมประสาท pleuropedal เป็นแหล่งสำคัญที่มีการผลิต egg-laying hormone โดยบริเวณที่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีดำจะมีมากที่ ventral horn ซึ่งจะมีเส้นประสาทแตกแขนง

ออกไปเลี้ยงกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle) กล้ามเนื้อยึดฝาเปลือก (adductor muscle) และอวัยวะที่อยู่ด้านบนต่อปมประสาท ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญต่อการแสดงพฤติกรรมการวางไข่ในหอย (egg-laying behavior) การพบว่าการติดสีดาบริเวณใยประสาทของปมประสาททั้งสาม น่าจะเกิดจากการที่ปมประสาทมีการผลิต egg-laying hormone และส่งออกไปตามเส้นใยประสาทเพื่อส่งต่อไปยังอวัยวะเป้าหมายในที่สุด ในขั้นต่อไปเราจะพยายามศึกษาการกระจายตัวของ egg-laying hormone ที่พบในแหล่งผลิตคือปมประสาททั้ง 3 ชนิดและที่อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (immunolectron microscopy)

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.4

รูปที่ 2.4-1 ภาพ 12.5% SDS-PAGE ของ (A) expression profile ของ GST-aELH แสดงตำแหน่งของแถบโปรตีนต่าง ๆ ซึ่งถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุล และย้อมด้วยสี Coomassie Blue และ (B) แสดงตำแหน่งของแถบโปรตีน GST-aELH fusion protein ที่ขนาดประมาณ 33 kDa ย้อมด้วยสี Coomassie blue

(A) แถบโปรตีนต่าง ๆ ของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มี pGEX-2T-aELH plasmid vector โดยก่อนใส่สาร IPTG จะยังไม่เห็นแถบโปรตีนที่ติดสี Coomassie Blue เข้มที่ขนาดประมาณ 33 kDa (lane 1, ลูกศรชี้); แต่ภายหลังการใส่ IPTG แล้วจะปรากฏแถบโปรตีนที่เข้มขึ้นอย่างชัดเจนที่ขนาดประมาณ 33 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของ GST-aELH fusion protein (lane 2, ลูกศรชี้); แถบโปรตีนต่าง ๆ ที่อยู่ในส่วนของ supernatant หลังจากการทำ sonicate พบว่าแถบโปรตีนส่วนใหญ่หายไป แต่แถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 33 kDa ยังคงอยู่และติดสีค่อนข้างเข้มเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนอื่นที่เหลืออยู่ (lane 3, ลูกศรชี้); แต่จะไม่พบแถบโปรตีน GST-aELH ในส่วนที่เป็น PBS washing fluid (lane 4, ลูกศรชี้); แสดงว่ามีการจับกันของ Glutathione Sepharose 4B กับส่วนที่เป็น GST-tagged ของ fusion protein แล้ว; lane 5-7 แสดงแถบโปรตีน GST-aELH fusion protein ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และแยกเอาส่วนที่เป็น Glutathione Sepharose 4B ออกแล้วด้วย elution buffer เป็นเวลา 15 นาที (lane 5); 30 นาที (lane 6); และ 45 นาที (lane 7); lane M: แสดงแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (board range molecular weight marker) ขนาด 200, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14 และ 6 kDa

(B) แสดงตำแหน่งของแถบโปรตีน GST-aELH ที่ขนาดประมาณ 33 kDa และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนภายหลังการใส่ elution buffer เข้าเป็นเวลานานต่าง ๆ กันคือ 10 นาที (lane 2); 15 นาที (lane 3); 30 นาที (lane 4); 45 นาที (lane 5); 60 นาที (lane 6); และทิ้งไว้ข้ามคืน (lane 7) เมื่อใส่ปริมาตรโปรตีนที่เท่ากัน จะสังเกตเห็นว่าความเข้มของแถบโปรตีน GST-aELH จะลดลงตามจำนวนครั้งที่ elute มากขึ้น; lane 1 แสดงแถบโปรตีน GST ที่ได้จากการสังเคราะห์และทำบริสุทธิ์ของ pGEX-2T non-inserted plasmid vector จะเห็นแถบโปรตีนเข้มที่ขนาดประมาณ 29 kDa (ลูกศรชี้); lane M: แสดงแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (board range molecular weight marker) ขนาด 200, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14 และ 6 kDa

รูปที่ 2.4-2

ภาพแสดงการทดสอบความจำเพาะของ antiGST-aELH ต่อ GST-aELH fusion protein ด้วยวิธี HRP-immunoblotting technique โดยใช้ DAB-NiCl₂ เป็นตัวขยายสัญญาณ

A) ภาพแสดง GST-aELH fusion protein และโปรตีน GST ที่ผ่านการฟิสิกส์ด้วย 12.5% SDS-PAGE และย้ายลงแผ่น nitrocellulose แล้ว

panel 1: แสดงผล immunoblotting ด้วย antiGST-aELH (nonabsorbed antiserum) พบการจับกันอย่างจำเพาะโดยปรากฏเป็นแถบสีเทาเข้มกับแถบโปรตีน GST-aELH (33 kDa) (lane 2, 3; ลูกศรชี้) แต่ปรากฏแถบสีเทาเข้มน้อยกว่ากับแถบโปรตีน GST (29 kDa) (lane 1; ลูกศรชี้) และไม่ปรากฏผลการย้อมในลักษณะเดียวกันเมื่อย้อมด้วย preimmune serum (lane 4; ลูกศรชี้)

panel 2: แสดงผล immunoblotting ด้วย antiGST-aELH ภายหลังการ preabsorption ด้วยแถบโปรตีน GST แล้ว โดยแทบไม่พบการจับของ antiGST-aELH กับแถบโปรตีน GST เลย (lane 5; ลูกศรชี้) แต่ยังคงพบการจับอย่างจำเพาะปรากฏเป็นแถบสีเทาเข้มกับแถบโปรตีน GST-aELH (lane 6, 7; ลูกศรชี้) โดยไม่ปรากฏผลการย้อมในลักษณะเดียวกันเมื่อย้อมด้วย preimmune serum (lane 8; ลูกศรชี้)

(B) ภาพแสดงความจำเพาะของ preabsorbed antiGST-aELH ต่อ GST-aELH fusion protein ใน bacterial lysate ที่ผ่าน 12.5% SDS-PAGE และย้ายลงแผ่น nitrocellulose แล้ว

panel 1: แสดงแถบโปรตีนที่ผ่านการย้ายลงบนแผ่น nitrocellulose และย้อมด้วยสี ponceus S ทำให้สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนที่ผ่านการย้ายปรากฏเป็นแถบสีชมพู โดย lane 1 แสดงแถบโปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้ภายหลังจากการใส่สาร IPTG แล้ว; lane 2 แสดงแถบโปรตีนที่อยู่ในส่วนของ supernatant หลังจากที่ทำ sonicate แล้ว; และ lane 3 แสดงแถบโปรตีน GST-aELH fusion protein ซึ่งมีขนาดประมาณ 33 kDa (ลูกศรชี้); lane M แสดงแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (board range molecular weight marker)

panel 2: แสดงผล immunoblotting ด้วย primary antibody คือ preabsorbed antiGST-aELH ที่ dilution 1:20,000 โดยพบการจับของ antiGST-aELH อย่างจำเพาะปรากฏเป็นแถบสีเทาเข้มกับแถบโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียที่ใส่สาร IPTG ที่ขนาดประมาณ 33 kDa (lane 4, ลูกศรชี้); และพบแถบสีเทาเข้มในลักษณะเดียวกันกับแถบโปรตีนขนาดประมาณ 33 kDa ที่อยู่ในส่วนของ supernatant (lane 5); และกับแถบโปรตีน GST-aELH fusion protein (lane 6)

panel 3: แสดงผล immunoblotting ด้วย preimmune serum เป็น negative control โดยไม่ปรากฏผลที่แถบโปรตีนทั้งสาม (lane 7, 8, 9, ลูกศรชี้)

รูปที่ 2.4-3 แสดงผล ELISA เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของ antiGST-aELH ที่ dilution ต่าง ๆ ก่อนและหลังการทำ preabsorption เมื่อเคลือบหลุม 96 microtiter-well plates ด้วย โปรตีน 2 ชนิดคือ GST-aELH (GE) และโปรตีน GST

- (A) กลุ่มทดลองควบคุม (lane 1) เมื่อไม่ใส่โปรตีนแอนติเจน (no Ag)
- (B) กลุ่มทดลองควบคุม (lane 2, 3) เมื่อใส่ preimmune serum (NS) แทนที่ primary antibody
- (C) แสดงผลการทดลอง (lane 4, 5) เมื่อใช้ primary antibody เป็น non-absorbed antiGST-aELH (Nabs)
- (D) แสดงผลการทดลอง (lane 6, 7) เมื่อใช้ primary antibody เป็น preabsorbed antiGST-aELH ด้วย GST (Abs10) ที่อัตราส่วน 1: 10 (antiGST-aELH: GST, v/v)
- (E) แสดงผลการทดลอง (lane 8, 9) เมื่อใช้ primary antibody เป็น preabsorbed antiGST-aELH ด้วย GST (Abs20) ที่อัตราส่วน 1: 20 (antiGST-aELH: GST, v/v)
- (F) แสดงผลการทดลอง (lane 10, 11) เมื่อใช้ primary antibody เป็น preabsorbed antiGST-aELH ด้วย GST (Abs40) ที่อัตราส่วน 1: 40 (antiGST-aELH: GST, v/v)
- (G) แสดงผลการทดลอง (lane 12) เมื่อใช้ primary antibody เป็น preabsorbed antiGST-aELH ด้วย GST-aELH fusion protein (Abs-E) ที่อัตราส่วน 1: 100 (antiGST-aELH: GST-aELH, v/v)

รูปที่ 2.4-4 paraffin sections ของรังไข่หอยเป่าสีด้วยวิธี HRP-immunoperoxidase และ counterstain ด้วยสี haematoxylin แสดงการกระจายของ aELH โดยใช้ preabsorbed antiGST-aELH เป็น probe และใช้ DAB เป็นตัวขยายสัญญาณ

- A) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงการย้อมติดที่ capsule ชั้นนอก (OC) ชั้นใน (IC) และเซลล์ใน trabeculae (Tr)
- B) ภาพกำลังขยายปานกลางของ negative control แสดงภาพเซลล์ในรังไข่ที่ย้อมไม่ติด aELH
- C) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงบริเวณการติด aELH ที่บริเวณ trabeculae (Tr) และเซลล์ในระยะที่ 5 (V)

D-F) ภาพกำลังขยายสูงของรังไข่ซึ่งพบเซลล์ที่ย้อมติด aELH คือ granulated cells (Gc) ใน inner capsule (IC), follicular cells (Fc) และภายในไฮโดพลาสซึมของเซลล์ไข่ ระยะที่ 5 (V)

HP= hepatopancreas

รูปที่ 2.4-5

paraffin sections ของปมประสาท cerebral ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยวิธี HRP-immunoperoxidase และ counterstain ด้วยสี haematoxylin แสดงการกระจายของ aELH โดยใช้ preabsorbed antiGST-aELH เป็น probe และใช้ DAB-NiCl₂ เป็นตัวขยายสัญญาณ

A, C) ภาพกำลังขยายต่ำแสดง negative control ของปมประสาทข้างขวา (in A) และข้างซ้าย (in C) เมื่อย้อมเนื้อเยื่อปมประสาทด้วย preimmune serum

B, D) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงบริเวณที่พบเซลล์ประสาทที่ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ในปมประสาทข้างขวา (in B, ลูกศรชี้) และข้างซ้าย (in C, ลูกศรชี้)

E, F, G) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงบริเวณ ventral horn ของปมประสาท (in E, F) และด้าน dorsal horn (in G) ส่วนที่ต่อไปยัง cerebral commissure (com) โดยลูกศรชี้บริเวณเซลล์ประสาทที่มีการติดสีดำของ DAB-NiCl₂

Lt = left cerebral ganglion, Rt = right cerebral ganglion, D = dorsal, V = ventral, M = medial, Co = cortex, Me = medulla, Ja = jaw

รูปที่ 2.4-6

A-C) ภาพกำลังขยายปานกลางของปมประสาท cerebral ข้างซ้าย แสดงการกระจายและลักษณะของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH บริเวณ ventral horn ซึ่งมักเรียงตัวเป็นแนวยาวอยู่ชิดกับ basement membrane ของ cortex สังเกตใยประสาท (neuropil) ที่ติดสีดำ (หัวลูกศรชี้) อยู่บริเวณตอนกลางตลอดความยาวของปมประสาท (A, B, C)

D-F) ภาพกำลังขยายสูงแสดงลักษณะของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS) ภายในไฮโดพลาสซึมของเซลล์ประสาทจะเห็นเม็ด granules ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ชัดเจน (E) ภาพกำลังขยายสูง (กรอบ 2, in B) และ E (กรอบ 1, in B) แสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่ 1 (NS1) ในบริเวณที่อยู่ชิดกับ basement membrane ของชั้น cortex ส่วนชนิดที่ 2 (NS2) และ 3 (NS3) จะพบอยู่ทางด้านในของปมประสาท (in D) หัวลูกศรชี้บริเวณใยประสาท (neuropil) ที่ติดสีดำโดยตลอดความยาวไปจนถึงบริเวณ cerebral commissure

LCG = left cerebral ganglion, Cp = capsule, NS = neurosecretory cells

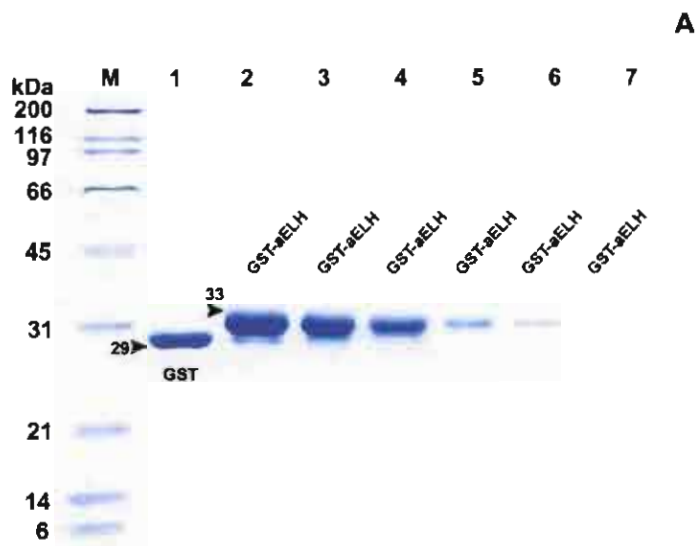
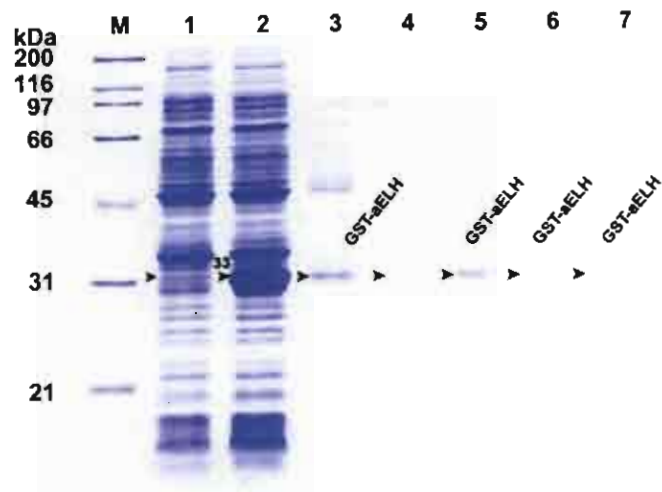
- รูปที่ 2.4-7** paraffin sections ของปมประสาท pleuropedal ของหอยเป่าอื้อตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยวิธี HRP-immunoperoxidase และ counterstain ด้วยสี haematoxylin แสดงการกระจายของ aELH โดยใช้ preabsorbed antiGST-aELH เป็น probe และใช้ DAB-NiCl₂ เป็นตัวขยายสัญญาณ
- A) ภาพกำลังขยายต่ำแสดง negative control เมื่อย้อมเนื้อเยื่อปมประสาทด้วย preimmune serum
- B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงการติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ของปมประสาทบริเวณ dorsal (DH), ventral (VH) และ lateral horns รวมไปถึงส่วนที่เป็น body (Bo) ด้วย (ลูกศรชี้)
- C-E) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงการกระจายของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH บริเวณ dorsal horn ข้างซ้าย (LDH) ซึ่งจะกระจายอยู่เป็นกลุ่มโดยเฉพาะตรง cortex บริเวณที่ติดกับ basement membrane (C) และภาพกำลังขยายสูง (in D, E) จากกรอบภาพใน C แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH โดยพบว่าเซลล์ประสาทที่ติดสีดำภายในไซโตพลาสซึมมีลักษณะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS3) สังเกตใยประสาทในส่วนของ medulla ที่ติดสีดำจะมีลักษณะเป็นปมเรียงตามแนวยาว (in D, F หัวลูกศรชี้)
- F, G) ภาพกำลังขยายปานกลาง (F) และภาพกำลังขยายสูง (G, จากกรอบภาพใน F) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH โดยพบว่าเซลล์ประสาทที่ติดสีดำภายในไซโตพลาสซึมมีลักษณะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 และ 2 (NS1, NS2)
- D = dorsal, V = ventral, M = medial, DH = dorsal horn, VH = ventral horn, Bo = body, Co = cortex, Me = medulla, NS = neurosecretory cells

- รูปที่ 2.4-8** A) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงการกระจายของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH บริเวณ body (Bo) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบบริเวณขอบบน (dorsal edge)
- B-F) ภาพกำลังขยายปานกลางบริเวณ ventral horn ข้างซ้าย (LVH in B, E) และข้างขวา (RVH in B, D) แสดงการกระจายและลักษณะของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH (ลูกศรชี้) และภาพกำลังขยายสูงบริเวณ ventral horn ข้างซ้าย (F, จากกรอบภาพใน E) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH มีลักษณะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิด (NS1, NS2, NS3) และยังพบกลุ่มของเซลล์ที่เกิด endogenous peroxidase ด้วย (in F, ลูกศรชี้)

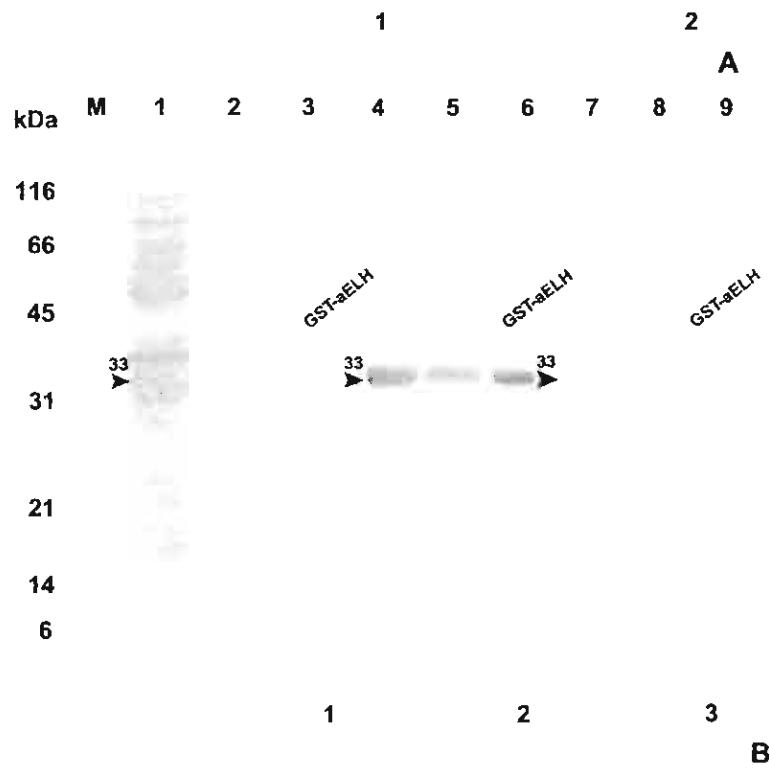
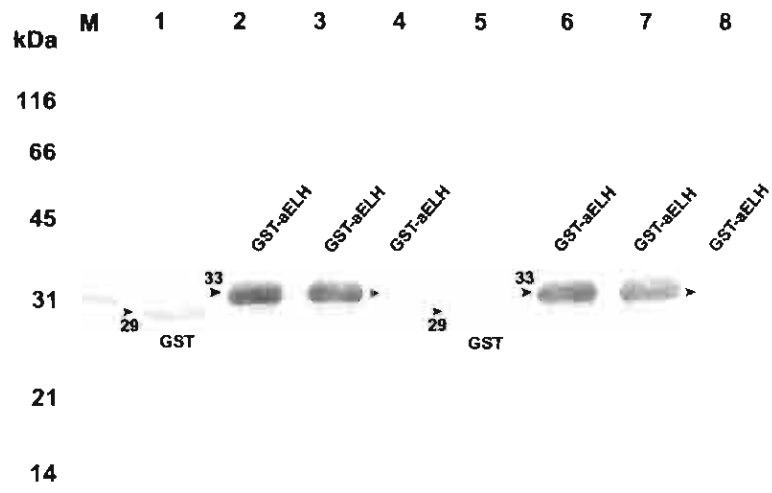
Bo = body, DH = dorsal horn, VH = ventral horn, LVH = left ventral horn, RVH = right ventral horn, Co = cortex, Me = medulla, NS = neurosecretory cells

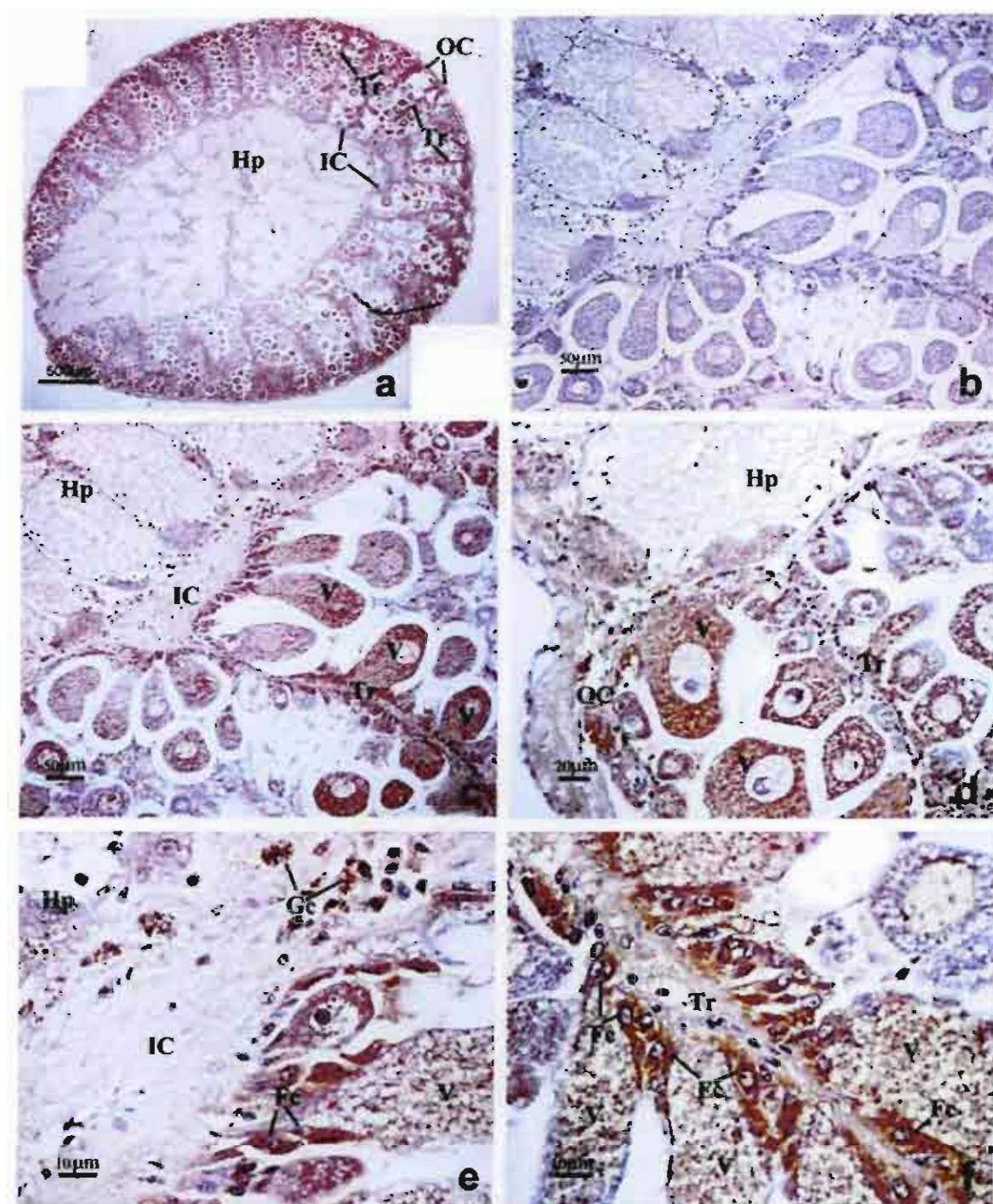
- รูปที่ 2.4-9** paraffin sections ของปมประสาท visceral ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัยที่ย้อมด้วยวิธี HRP-immunoperoxidase แสดงการกระจายของ aELH โดยใช้ preabsorbed antiGST-aELH เป็น probe และใช้ DAB-NiCl₂ เป็นตัวขยายสัญญาณ
- A) ภาพกำลังขยายต่ำแสดง Negative control เมื่อย้อมเนื้อเยื่อปมประสาทด้วย preimmune serum
- B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงการติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ตรงกลางปมประสาทบริเวณ ขอบด้านบน (dorsal edge) ขอบด้านล่าง (ventral edge) และทางด้านนอก (lateral side) (ลูกศรชี้)
- C, E) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงการกระจายของเซลล์ประสาทที่ติด antiGST-aELH บริเวณทางด้านนอก (in C) และขอบด้านบน (in E) สังเกตภายใน neuropil ของปมประสาทมีใยประสาทที่ติดสีดำอยู่ด้วย (B, C, E)
- D, F, G) ภาพกำลังขยายสูงแสดงลักษณะของเซลล์ประสาทที่ติดสีดำของ DAB-NiCl₂ ในไฮโดรเพลสซึม โดยพบว่าเซลล์ประสาทส่วนใหญ่เป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS1) ส่วนชนิดที่ 2 และ 3 (NS2, NS3) พบน้อยมาก
- D = dorsal, V = ventral, M = medial, Co = cortex, Me = medulla, NS = neurosecretory cells

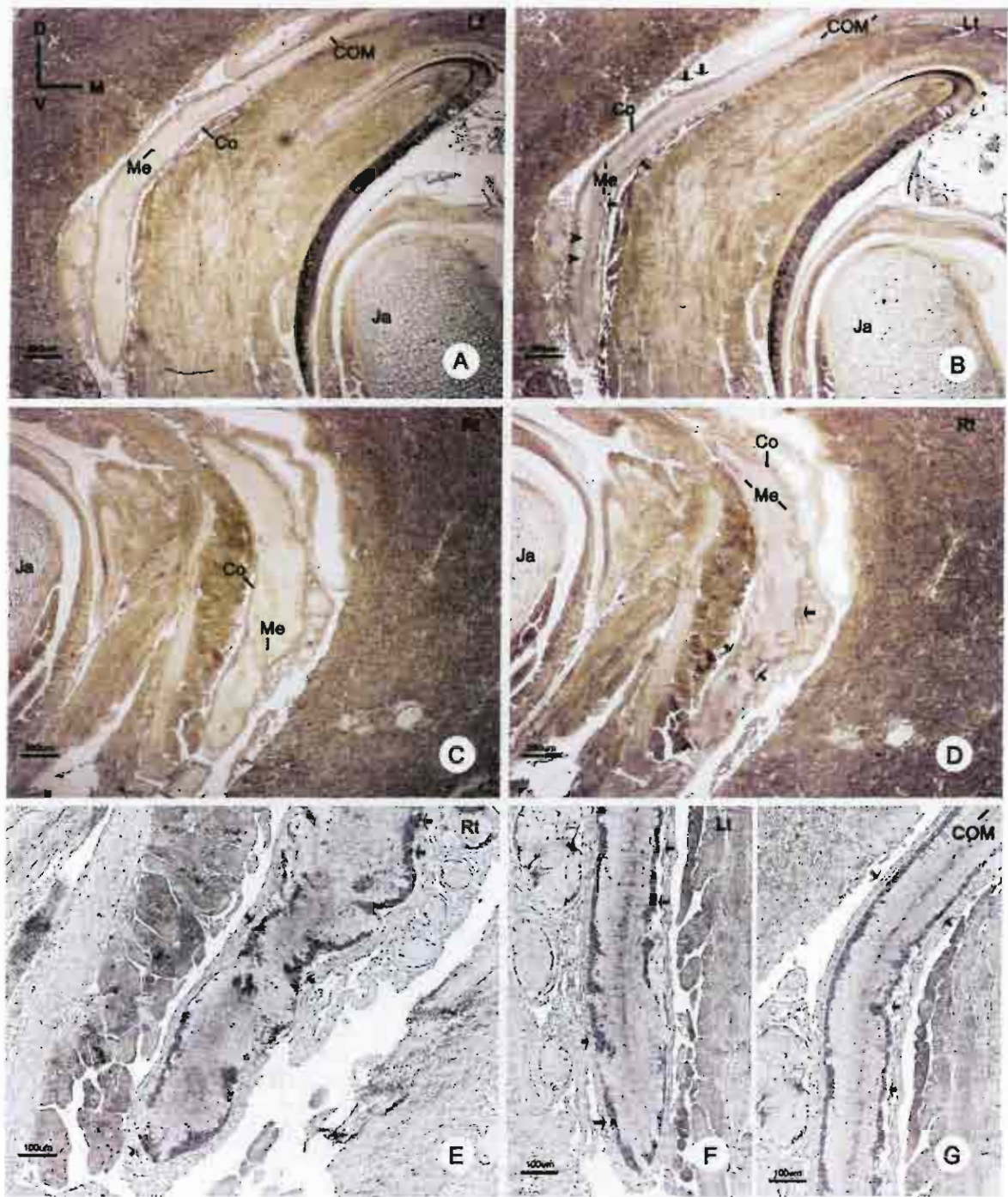
- รูปที่ 2.4-10** แผนภาพแสดงการกระจายตัวของ aELH ที่พบในปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัย
- A) ในปมประสาท cerebral จะพบบริเวณขอบด้านล่าง (ventral horn) ขอบด้านบน (dorsal horn) รวมทั้งขอบทางด้านนอก (lateral edge) และขอบทางด้านใน (medial edge) ของปมประสาท
- B) ในปมประสาท pleuropedal จะพบบริเวณ dorsal (DH), ventral (VH) และ lateral horns รวมไปถึงส่วนที่เป็น body (Bo) ของปมประสาทด้วย
- C) ในปมประสาท visceral จะพบบริเวณขอบด้านบน (dorsal edge) ขอบด้านล่าง (ventral edge) และทางด้านนอก (lateral side) ของปมประสาท

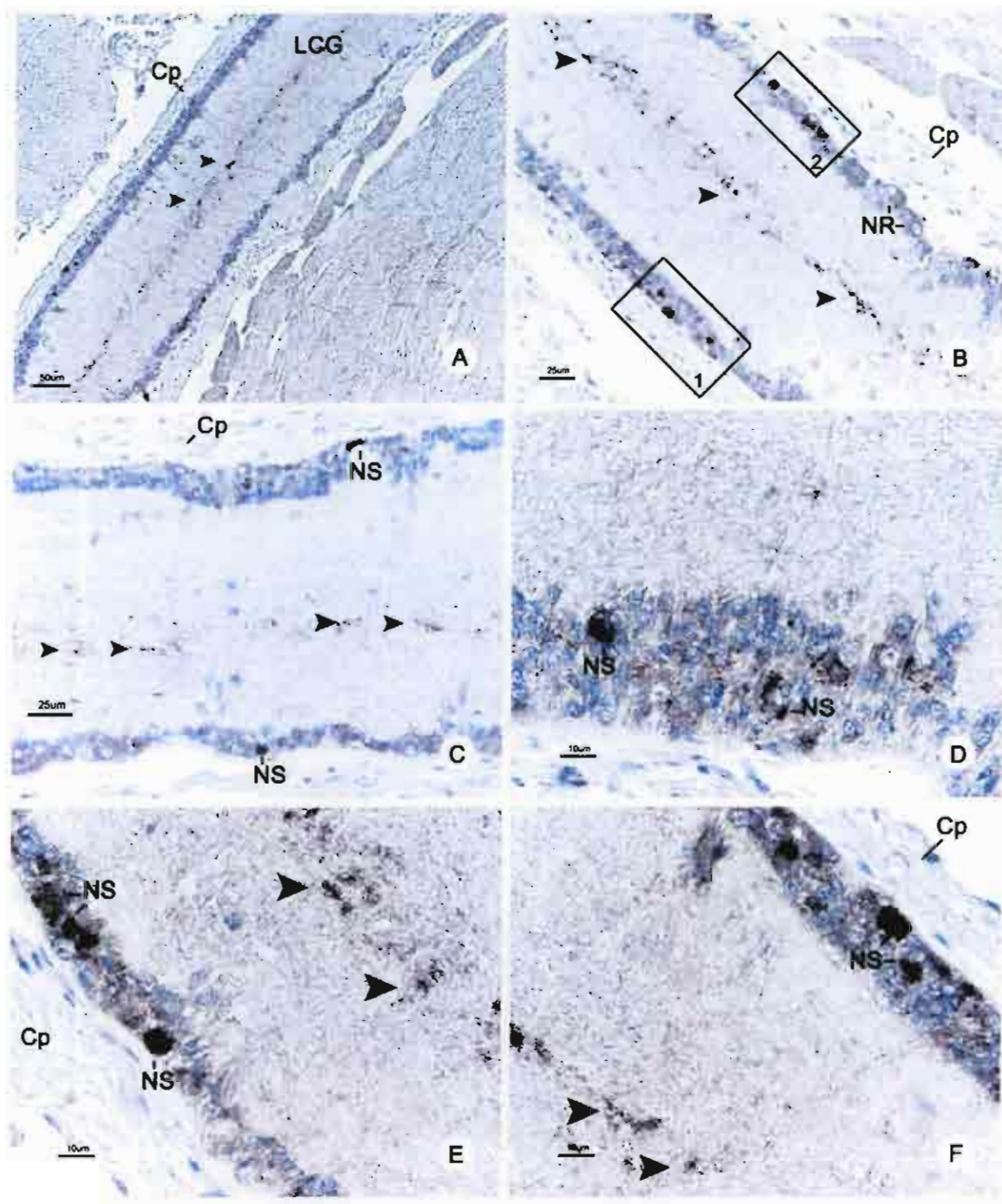


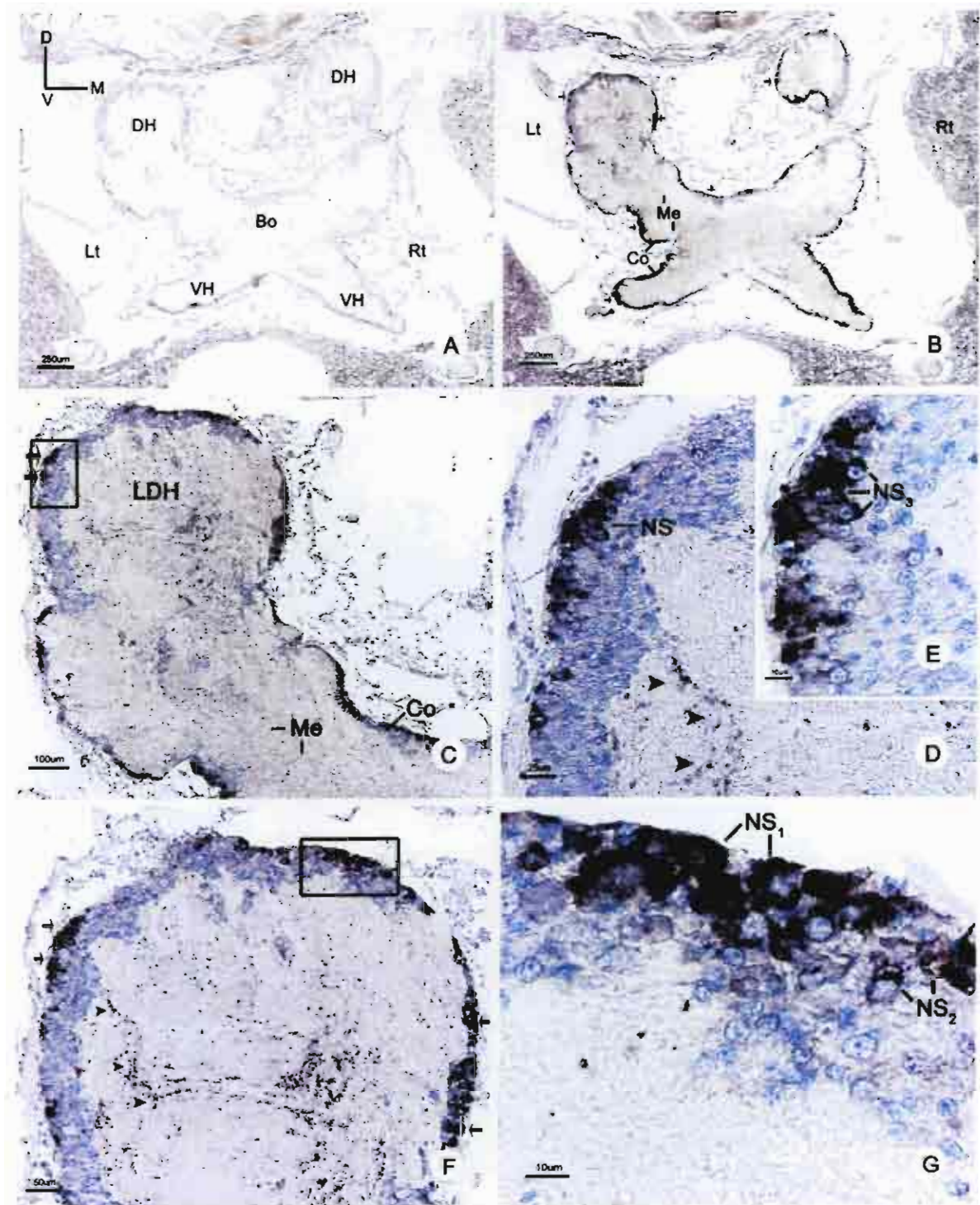
B

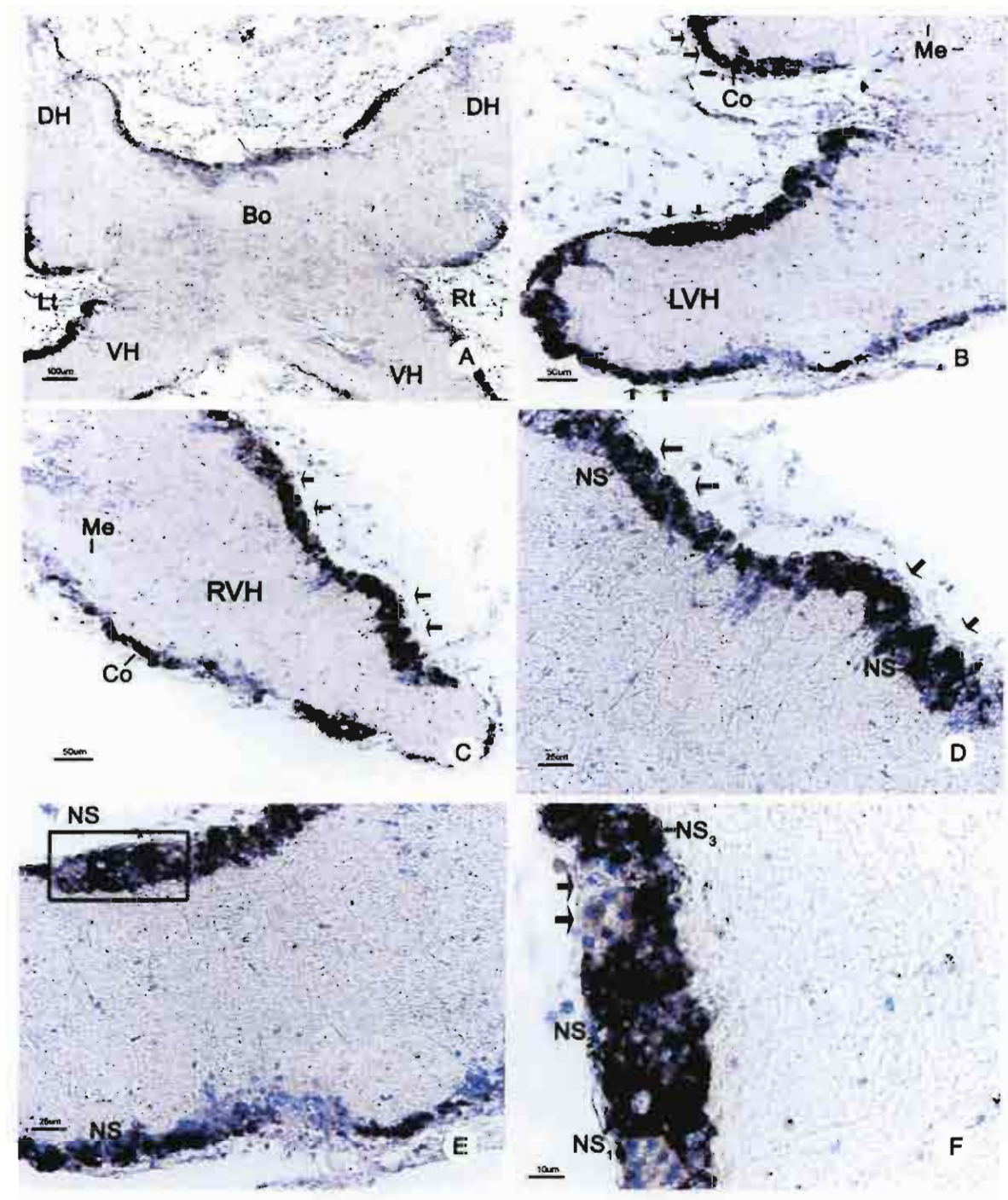


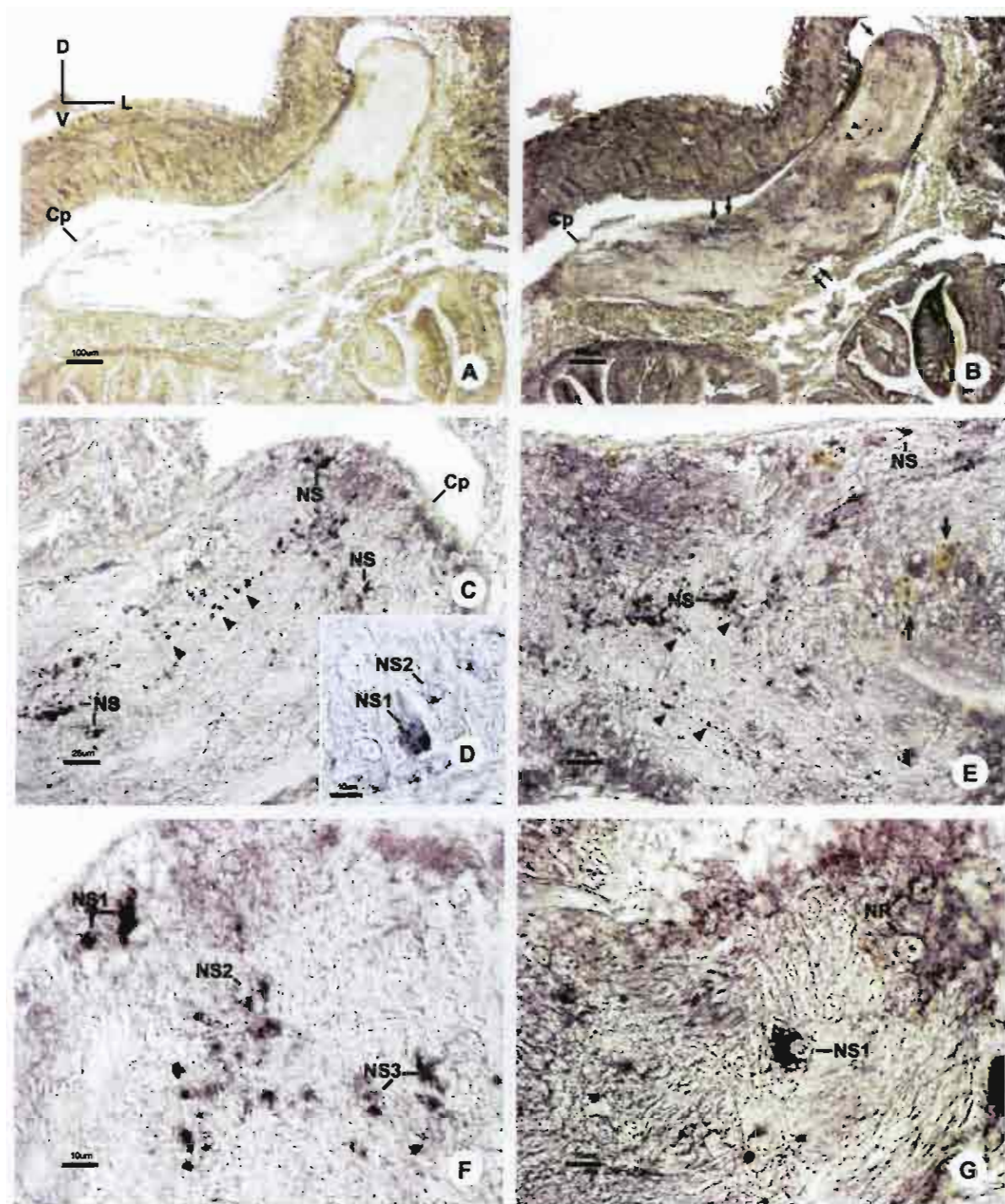










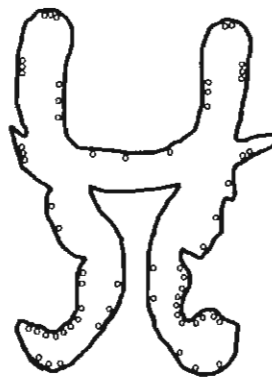


Cerebral



A

Pleuropedal



B

Visceral



C

O = aELH-containing neurosecretory cells

2.5. การทดสอบการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนประสาท Serotonin (5-HT), FMRFamide, Prostaglandin E (PG_E) และ egg-laying hormone (aELH) ต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และการกระตุ้นการเจริญเติบโตในหอยเป่าฮือ

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่กำลังพัฒนาเทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮือเชิงพาณิชย์ ซึ่งข้อจำกัดที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเพาะเลี้ยงคือ การผลิตลูกหอยให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร การศึกษาและงานวิจัยพื้นฐานที่จะช่วยในการเพิ่มผลผลิตลูกหอยส่วนหนึ่งคือ การกระตุ้นการออกไข่และ การปล่อยตัวอสุจิ การเพิ่มอัตราการลงเกาะ และ อัตราการอยู่รอดของตัวอ่อน การเร่งการเจริญเติบโตโดยใช้ฮอร์โมนเสริม

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบสารสื่อประสาทและฮอร์โมนประสาทที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และการกระตุ้นการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือซึ่งได้แก่ serotonin (5-HT), FMRF-amide, prostaglandin E (PG_E) และ Egg-laying hormone (ELH) ในครั้งนี้ได้ออกแบบการทดลองเป็นสองแบบ

2.5.1. การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วยประสาทฮอร์โมนและสารสื่อประสาท

การทดลองนี้เป็นการทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือที่ถูกเลี้ยงเพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ที่มีวัยวุฒิสืบพันธุ์เจริญเต็มที่ กระทำโดยการแบ่งกลุ่มหอยเป่าฮือออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม (กลุ่มที่1) และกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีจำนวนเพศผู้ และเมีย กลุ่มละ 5 ตัว ซึ่งจะถูกนำมาพักไว้ในถังเลี้ยง ในห้องที่มีการควบคุมสลับเวลาจากธรรมชาติกลางวันเป็นกลางคืน และเวลากลางคืนเป็นกลางวันก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 3 วัน โดยมีการควบคุมทั้งอุณหภูมิ และความเค็มของน้ำทะเล รวมถึงการให้อาหารอย่างเต็มที่อีกด้วย

การทดลองเริ่มขึ้นก่อนเวลาที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งมักเกิดขึ้นทุกวันขึ้น 15 ค่ำ และวันแรม 15 ค่ำ เป็นเวลา 5-7 วัน โดยกระบวนการทดลองเริ่มจาก ทำการแยกหอยทั้งเพศผู้ และเมียลงตู้กระจก ขนาด 16x20x20 (กว้างxยาวxสูง) โดยใส่หอย 1 ตัว ต่อ 1 ตู้ ในน้ำทะเล 5 ลิตร ที่ อุณหภูมิ ประมาณ $27^{\circ}C$ หลังจากการพักในถังน้ำเป็นเวลา 3 วัน จึงทำการฉีดสาร 5-HT ที่มีความเข้มข้นต่างกันสองความเข้มข้น ที่ละลายในสารละลาย Ringer's solution ลงไปตรงกลางกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป่าฮือ ในกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่ม โดยกลุ่มทดลองที่ 1 ใช้สารที่มีความเข้มข้น $10^{-3}M$ และกลุ่มทดลองที่สองใช้สารที่มีความเข้มข้น $10^{-4}M$ และฉีดสาร egg-laying hormone, FMRF-amide, และ prostaglandin E (PG_E) ที่ความเข้มข้น $10^{-3}M$ และ $10^{-6}M$ จำนวนตัวละ 400 μl ส่วนในกลุ่มควบคุม ทำการฉีดเฉพาะสาร Ringer's solution แทนการฉีดสารต่างๆ จากนั้นจึงทำการเฝ้าสังเกต บันทึกพฤติกรรม สังเกตคุณภาพของเซลล์ไข่ และอสุจิ รวมถึงปริมาณของเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ระยะเวลาในการเฝ้าสังเกตหลังการฉีดสาร 24 ชั่วโมง

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สีพันธุด้วยสารประสาทฮอโมน Serotonin (5HT)

หลังการกระตุ้นหอยเป้าฮือด้วยการฉีดฮอโมนประสาท 5-HT พบว่าหอยทั้งเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มทดลองทั้งสองมีปฏิกิริยาต่อสารทันที คือมีการบิดไปมาของกล้ามเนื้อเท้าเป็นเวลาประมาณ 5 นาทีในกลุ่มทดลองที่ฉีดสารที่ความเข้มข้น $10^{-4}M$ และประมาณ 10 นาทีในกลุ่มทดลองที่ฉีดสารที่ความเข้มข้น $10^{-3}M$ เมื่อเปรียบเทียบกับหอยกลุ่มควบคุมที่ไม่พบการบิดไปมาของกล้ามเนื้อเท้าเลยหลังการฉีดสาร หลังจากนั้นหอยในกลุ่มทดลองจะมีการเดินไปมารอบตู้กระจก สลับกับการหยุดนิ่งเป็นระยะๆ โดยพบพฤติกรรมเช่นนี้ในหอยกลุ่มทดลองที่ฉีดสารที่ความเข้มข้น $10^{-3}M$ เป็นเวลานานกว่าในหอยทดลองอีกกลุ่มหนึ่ง

ในเพศผู้พบว่าการปล่อยอสุจิของหอยกลุ่มทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย 5-HT ที่ความเข้มข้น $10^{-3}M$ จำนวน 2 ตัว จาก 5 ตัว ในเวลา 3-4 ชม. ส่วนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย 5-HT ที่ความเข้มข้น $10^{-4}M$ และกลุ่มควบคุมไม่พบว่าการปล่อยของอสุจิเลย ส่วนคุณภาพและจำนวนของเซลล์อสุจิที่ได้แสดงในตารางที่ 2.5-1

ตารางที่ 2.5-1 แสดงพฤติกรรม คุณภาพ และปริมาณของเซลล์อสุจิต่อการกระตุ้นด้วยสาร serotonin

ลำดับที่	พฤติกรรมการปล่อยเซลล์อสุจิ	คุณภาพเซลล์อสุจิ (การเคลื่อนไหว)	ปริมาณเซลล์อสุจิ (ตัว)
1	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
2	ปล่อยอสุจิภายใน 3 ชม. หลังฉีด	++++	$5,250 \times 10^6$
3	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
4	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
5	ปล่อยอสุจิภายใน 3.5 ชม. หลังฉีด	+++	$1,250 \times 10^6$

หมายเหตุ คุณภาพของเซลล์สีพันธุเพศผู้หรืออสุจิแบ่งออกเป็น 4 ระดับคือ

- | | | | |
|-----|-----------------------------|------|---|
| + | หมายถึง ไม่เคลื่อนไหว | ++ | หมายถึง เคลื่อนไหวอยู่กับที่ แต่ไม่เคลื่อนที่ไปมา |
| +++ | หมายถึง เคลื่อนที่ไปมาได้ดี | ++++ | หมายถึง เคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว ตลอดเวลา |

สำหรับในเพศเมียพบว่าการปล่อยเซลล์ไข่ในหอยกลุ่มทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร 5-HT ที่ความเข้มข้น $10^{-3}M$ จำนวน 2 ตัว จาก 5 ตัว โดยเริ่มปล่อยไข่หลังการฉีดสารประมาณ 5 ชม. ส่วนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร 5-HT ที่ความเข้มข้น $10^{-4}M$ และกลุ่มควบคุมไม่พบว่าการปล่อยของไข่เลย ส่วนคุณภาพและจำนวนของเซลล์ไข่ที่ได้แสดงในตารางที่ 2.5-2

ตารางที่ 2.5-2 แสดงพฤติกรรม คุณภาพ และปริมาณของเซลล์ไข่ต่อการกระตุ้นด้วยสาร serotonin

ลำดับที่	พฤติกรรมการปล่อยเซลล์ไข่	คุณภาพเซลล์ไข่ (ลักษณะภายนอก)	ปริมาณไข่ (เซลล์)
1	ไม่ปล่อยไข่	-	-
2	ปล่อยไข่หลังฉีดสาร 5 HT ประมาณ 5 ชม.	ขนาดเท่ากัน, กลม, มี jelly coat หุ้ม	6000000
3	ไม่ปล่อยไข่	-	-
4	ไม่ปล่อยไข่	-	-
5	ปล่อยไข่หลังฉีดสาร 5 HT ประมาณ 5 ชม.	ขนาดเท่ากัน, กลม, มี jelly coat หุ้ม	100000

จากผลเบื้องต้นดังกล่าวสรุปได้ว่าสารสื่อประสาทฮอโมน 5-HT น่าจะมีอิทธิพลไปกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเซลล์ไข่ และสเปิร์ม ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมคือที่ $10^{-3}M$ โดยพบว่าสาร 5-HT นี้ อาจให้ผลในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเพศผู้ได้เร็วกว่าในเพศเมีย เนื่องจากในหอยเพศผู้สามารถถูกกระตุ้นได้ภายใน 3-4 ชม. หลังการฉีดสาร ซึ่งต่างกับในหอยเพศเมียที่ถูกกระตุ้นได้หลังการฉีดประมาณ 5-20 ชม.

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วยสารประสาทฮอโมน FMRFamide

หลังจากการฉีด FMRFamide ที่ความเข้มข้น $10^{-6}M$ หอยเป่าอ้อแสดงพฤติกรรมหลักคือการเดินไปมารอบๆภาชนะประมาณ 5 นาทีจากนั้นจึงหยุดและเคลื่อนไหวช้าๆสลับกับการหยุดนิ่ง ผลการทดลองปรากฏว่า หอยเป่าอ้อเพศผู้สามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาทั้งหมด 3 ตัวในจำนวนหอย 5 ตัว แต่ในเพศเมียไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เลย ส่วนที่ความเข้มข้น $10^{-3}M$ ของ FMRFamide หอยเป่าอ้อเพศผู้สามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา 1 ตัว จาก 5 ตัว ช่วงของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นระหว่าง 2 ถึง 4 ชั่วโมง หลังการฉีดสาร ในขณะที่หอยเป่าอ้อกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยสารที่ใช้เป็น buffer และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดด้วยสาร ไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เลย ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.5-3 และ 2.5-4

ตารางที่ 2.5-3 แสดงการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าอ้อหลังจากได้รับการฉีดด้วยสารประสาทฮอโมน FMRFamide ที่ความเข้มข้น $10^{-6}M$

ลำดับที่	พฤติกรรมการปล่อยเซลล์สุจิ	คุณภาพเซลล์สุจิ (การเคลื่อนไหว)	ปริมาณเซลล์สุจิ (ตัว)
1	ปล่อยสุจิภายใน 2 ชม.หลังฉีด	++++	จำนวนมากกว่าจะนับได้
2	ไม่ปล่อยสุจิ	-	-
3	ไม่ปล่อยสุจิ	-	-
4	ปล่อยสุจิภายใน 2 ชม.หลังฉีด	++++	จำนวนมากกว่าจะนับได้
5	ปล่อยสุจิภายใน 4 ชม.หลังฉีด	++	จำนวนมากกว่าจะนับได้

ตารางที่ 2.5-4 แสดงการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อหลังจากได้รับการฉีดด้วยสาร
ประสาท FMRFamide ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M

ลำดับที่	พฤติกรรมการปล่อยเซลล์สุจิ	คุณภาพเซลล์สเปิร์ม (การเคลื่อนไหว)	ปริมาณเซลล์สเปิร์ม (ตัว)
1	ไม่ปล่อยสุจิ	-	-
2	ไม่ปล่อยสุจิ	-	-
3	ปล่อยสุจิภายใน 4 ชม. หลังฉีด	++	จำนวนมากกว่าจะนับได้
4	ไม่ปล่อยสุจิ	-	-
5	ไม่ปล่อยสุจิ	-	-

หมายเหตุ: คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือสุจิแบ่งออกเป็น 4 ระดับคือ

- + หมายถึง ไม่เคลื่อนไหว
- ++ หมายถึง เคลื่อนไหวอยู่กับที่ แต่ไม่เคลื่อนที่ไปมา
- +++ หมายถึง เคลื่อนที่ไปมาได้ดี
- ++++ หมายถึง เคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว ตลอดเวลา

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วยฮอร์โมน Prostaglandin

หลังจากที่หอยเป่าฮื้อได้รับสารประสาท Prostaglandin ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M พบว่าหอยเป่าฮื้อมี
หยุดนิ่งหลังการฉีดสารประมาณ 5-10 นาทีจากนั้นจึงเดินไปมารอบๆภาชนะสลับการหยุดนิ่งตามปกติ ผล
การทดลองปรากฏว่า หอยเป่าฮื้อเพศผู้สามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาทั้งหมด 2 ตัวในจำนวนหอย 5
ตัว แต่ในเพศเมียไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เลย และไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในทั้งหอยเพศผู้และเพศ
เมียที่ความเข้มข้น 10^{-6} M ในขณะที่หอยเป่าฮื้อกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยสารที่ใช้เป็น buffer และกลุ่มควบคุม
ที่ไม่ได้รับการฉีดสารไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2.5-5

ตารางที่ 2.5-5 แสดงการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อหลังจากได้รับการฉีดด้วยสาร
 ปรอสตาโกลิน Prostaglandin ที่ความเข้มข้น 10^{-3} M

ลำดับที่	พฤติกรรมกรรมการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์	คุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ (การเคลื่อนไหว)	ปริมาณเซลล์สืบพันธุ์ (ตัว)
1	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
2	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
3	ปล่อยอสุจิภายใน 2 ชม.หลังฉีด	++	จำนวนมากกว่าจะนับได้
4	ปล่อยอสุจิภายใน 1 ชม.หลังฉีด	++++	จำนวนมากกว่าจะนับได้
5	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-

หมายเหตุ คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรืออสุจิแบ่งออกเป็น 4 ระดับคือ

- + หมายถึง ไม่เคลื่อนไหว ++ หมายถึง เคลื่อนไหวอยู่กับที่ แต่ไม่เคลื่อนที่ไปมา
 +++ หมายถึง เคลื่อนที่ไปมาได้ดี ++++ หมายถึง เคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว ตลอดเวลา

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วย Egg-laying hormone

การฉีดกระตุ้นหอยเป่าฮื้อให้ egg-laying hormone ที่ระดับสองความเข้มข้นคือ $10 \mu\text{g}$ และ $100 \mu\text{g}$ หลังการฉีดกระตุ้นหอยเป่าฮื้อด้วย egg-laying hormone ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g}$ พบว่าหอยเป่าฮื้อเพศผู้ไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เลย แต่พบการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเพศเมียทั้งหมด 2 ตัวในจำนวนหอย 5 ตัว และหอยเป่าฮื้อที่ถูกฉีดด้วย egg-laying hormone ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g}$ พบว่าในเพศผู้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ 1 ตัวในจำนวนหอย 5 ตัว และในหอยเพศเมียพบว่ามีมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จำนวน 3 ตัวในจำนวนหอย 5 ตัว ในขณะที่หอยเป่าฮื้อกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยสารที่ใช้เป็น buffer มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในตัวผู้จำนวน 1 ตัว ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 2.5-6

ตารางที่ 2.5-6 แสดงการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อเพศผู้หลังจากได้รับการฉีดด้วย
 Egg-laying hormone ที่ระดับ $100 \mu\text{g}$ ต่อหอยหนึ่งตัว

ลำดับที่	พฤติกรรมกรรมการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์	คุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ (การเคลื่อนไหว)	ปริมาณเซลล์อสุจิ (ตัว)
1	ปล่อยอสุจิ	+++	85×10^5
2	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
3	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
4	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-
5	ไม่ปล่อยอสุจิ	-	-

2.5.2. อิทธิพลของฮอร์โมนต่อการเจริญเติบโต

การทดลองนี้เป็นการทดสอบอิทธิพลของสารสื่อประสาทและฮอร์โมน serotonin, FMRF-amide, ELH และ Prostaglandin E (PG_E) ในการกระตุ้นพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยช่วงอายุ 4 เดือน ทำการทดลองการฉีดสารประสาทฮอร์โมนต่างๆ ตามที่ระบุ ให้กับสัตว์ทดลองอายุ 4 เดือน บริเวณกล้ามเนื้อที่เป็นส่วนเท้า (foot sole) โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่ง เป็นกลุ่มควบคุม ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 150 ตัว อายุ 4 เดือน ฉีดด้วยสารตัวทำละลายที่ไม่มีฮอร์โมน (injection vehicle) ในปริมาณ 1 $\mu\text{l/g}$ body weight หลังจากฉีดจนครบ 150 ตัวแล้วก็ทำการเคลื่อนย้ายสัตว์ทดลองไปไว้ในบ่อเพาะเลี้ยง ส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มทดสอบ โดยแบ่งสัตว์ทดลองในกลุ่มที่สองออกเป็น 6 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มประกอบด้วยสัตว์ทดลอง 150 ตัว โดยกลุ่มย่อยที่หนึ่งฉีดด้วยสารสื่อประสาท serotonin, กลุ่มย่อยที่สองฉีดด้วยสารสื่อประสาท FMRF-amide, กลุ่มย่อยที่สามฉีดด้วยฮอร์โมน Prostaglandin E ในปริมาตรสารละลาย 20 ng/g body mass กลุ่มย่อยที่สี่ฉีดด้วย ELH ในปริมาตรสารละลาย 1 $\mu\text{l/g}$ body mass จากนั้นจึงทำการเคลื่อนย้ายสัตว์ทดลองลงไปในบ่อเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับกลุ่มที่หนึ่ง(กลุ่มควบคุม) และมีการฉีดซ้ำทุก ๆ 7 วันคือในวันที่ 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 ของการทดลอง จากนั้นในทุก ๆ 14 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 13, 27, 41, 55, 69, 83, 96 จะทำการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวเปลือกหอยเพื่อประเมินการเจริญเติบโตเทียบกับกลุ่มควบคุมผลการทดลอง (รูปที่ 2.5-1, 2.5-2)

จากแผนภูมิแสดงผลการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวเปลือกของหอยเป่าฮื้อทุก 2 สัปดาห์ ผลการทดลองปรากฏว่าการกระตุ้นการเจริญเติบโตโดยการใช้สาร FMRF-amide ฉีดที่ความเข้มข้น 200 ng สามารถกระตุ้นให้หอยเป่าฮื้อมีน้ำหนักและความยาวเพิ่มขึ้นมากที่สุดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอื่น ๆ ลำดับรองลงมาคือ FMRFamide ที่ความเข้มข้น 20 ng, PGE 200 ng, 5HT 20 ng, ELH 200 ng, 5HT 200 ng, PGE 20 ng, ELH 20 ng และ control ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่า FMRF-amide มีผลกระตุ้นให้หอยเป่าฮื้อตัวอ่อนมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปรกติเมื่อเปรียบเทียบกับ control จากผลการทดลองดังกล่าวอาจนำประโยชน์จากการทดลองนี้มาใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อในอนาคต

ตารางที่ 2.5-7 แสดงการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อเพศเมียหลังจากได้รับการฉีดด้วยสารประสาทฮอร์โมน Egg-laying hormone ที่ความเข้มข้น 10 µg

ลำดับที่	พฤติกรรมการปล่อยเซลล์ไข่	คุณภาพเซลล์ไข่ (ลักษณะภายนอก)	ปริมาณเซลล์ไข่ (เซลล์/มิลลิลิตร)
1	ไม่ปล่อยไข่	-	-
2	ปล่อยไข่หลังฉีดสารนานกว่า 5 ชม.	กลมดี มี jelly coat	65,000
3	ปล่อยไข่หลังฉีดสารนานกว่า 5 ชม.	กลมดี มี jelly coat	10,000
4	ไม่ปล่อยไข่	-	-
5	ไม่ปล่อยไข่	-	-

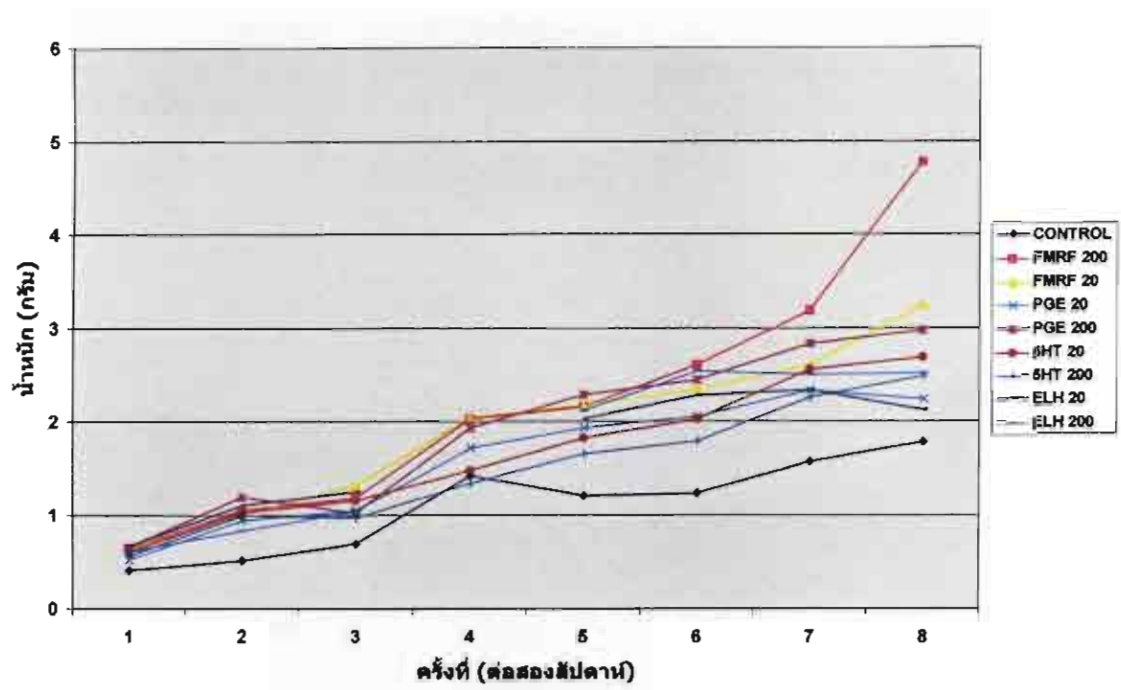
ตารางที่ 2.5-8 แสดงการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อเพศเมียหลังจากได้รับการฉีดด้วยสารประสาทฮอร์โมน Egg-laying hormone ที่ความเข้มข้น 100 µg

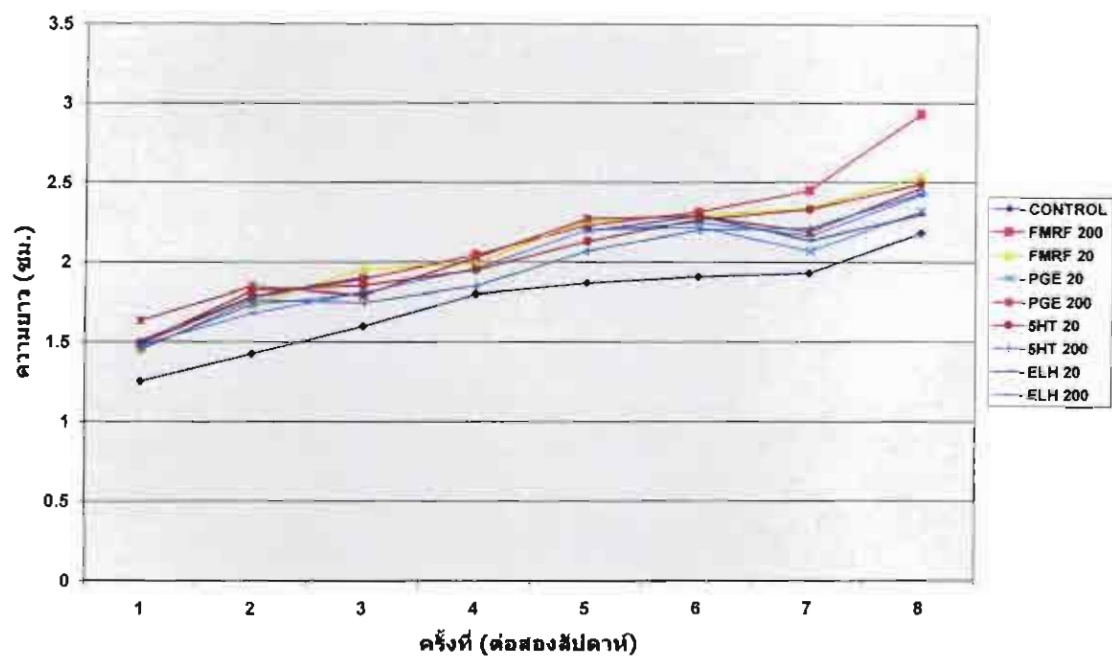
ลำดับที่	พฤติกรรมการปล่อยเซลล์ไข่	คุณภาพเซลล์ไข่ (ลักษณะภายนอก)	ปริมาณเซลล์ไข่ (เซลล์/มิลลิลิตร)
1	พบการปล่อยของไข่หลังฉีดสารนานกว่า 5 ชม.	กลมดี มี jelly coat	9
2	ไม่พบการปล่อยของไข่	-	-
3	พบการปล่อยของไข่หลังฉีดสารนานกว่า 5 ชม.	กลมดี มี jelly coat	17
4	ไม่พบการปล่อยของไข่	-	-
5	พบการปล่อยของไข่หลังฉีดสารนานกว่า 5 ชม.	กลมดี มี jelly coat	16

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.5

รูปที่ 2.5-1 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักของหอยที่ถูกฉีดกระตุ้นจากสารแต่ละชนิด

รูปที่ 2.5-2 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวเปลือกหอยที่ถูกฉีดกระตุ้นจากสารแต่ละชนิด





2.6. การศึกษาโครงสร้างและโปรตีนส่วนประกอบในเซลล์อสุจิ เซลล์ไข่ และการศึกษากระบวนการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่ของหอยเป่าฮื้อ

2.6.1. ลักษณะโครงสร้างเซลล์อสุจิที่พัฒนาเต็มที่และโปรตีนจากชั้นเยื่อหุ้มผิวเซลล์ของอสุจิ

การศึกษาลักษณะเซลล์อสุจิของหอยเป่าฮื้อที่ถูกปล่อยออกมา (Released mature sperm) ด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา (Light microscopy) และจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy)

เก็บเซลล์อสุจิจากตัวอย่างน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อเพศผู้ที่ถูกปล่อยในน้ำทะเลจากอ่างเพาะพันธุ์ นำมาปั่นและล้างด้วยน้ำทะเลซ้ำอีกแล้วนำเซลล์อสุจิที่ได้หยดลงบนแผ่นสไลด์และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เซลล์อสุจิบางส่วนถูกตรึงด้วยสารละลาย 3% glutaraldehyde เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบธรรมดาและแบบส่องกราด จากผลการศึกษาพบว่า เซลล์อสุจิที่ถูกปล่อยออกมาจากหอยเป่าฮื้อประกอบด้วยส่วนหัวที่มีนิวเคลียสซึ่งมีลักษณะคล้ายรูปโคน (cone shape) ขนาด $1.5 \times 3.0 \mu\text{m}$ และมี acrosome ขนาดใหญ่รูปร่างคล้ายถ้วย (cup shape) คลุมอยู่ทางด้านหน้า (รูปที่ 2.6-1) ส่วนต้นของหางอสุจิมีก้อน mitochondria รูปร่างกลมขนาดใหญ่วางเรียงโอบล้อมโคนหางอยู่ 5 ก้อน ส่วนหางมีลักษณะเรียวยาวประมาณ $40 \mu\text{m}$ ซึ่งช่วยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในน้ำทะเล

การศึกษาโปรตีนจากชั้นผิวเซลล์อสุจิของหอยเป่าฮื้อ

การแยก peripheral, plasma membrane และ cytosolic proteins จากเซลล์อสุจิ

นำเซลล์อสุจิที่เก็บมาได้จากน้ำทะเลหลังการปล่อยเชื้อจากหอยเพศผู้มาปั่นและล้างด้วยน้ำทะเล แล้ว incubate ในสารละลาย 1 M NaCl ประมาณ 30 นาทีเพื่อแยกเอาโปรตีนที่ประกอบอยู่กับผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (peripheral membrane proteins) ออกซึ่งจะละลายอยู่ในส่วน supernatant ภายหลังจากการปั่นที่ $600 \times g$ ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำเซลล์อสุจิที่อยู่ในส่วน pellet มาล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M PBS และ incubate ต่อในสารละลาย 1% Triton X-114 ประมาณ 1 ชั่วโมง นำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่นแยกที่ $8,000 \times g$ และดูดส่วนของ supernatant มาหยอดลงบนชั้นของสารละลาย sucrose cushion (6% sucrose and 0.06% Triton X-114) นำไปปั่นที่ $500 \times g$ ประมาณ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายที่ได้ภายหลังจากการปั่นถูกแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างมีลักษณะขาวขุ่น (detergent phase) ประกอบด้วยโปรตีนจาก plasma membrane (integral membrane proteins) ของเซลล์อสุจิที่ละลายอยู่ใน Triton X-114 ส่วนชั้นบนจะมีลักษณะใส (aqueous phase) ประกอบด้วย cytosolic proteins และ acrosomal contents ละลายปนกันอยู่ในชั้นกลาง ส่วนชั้นบนสุดจะเป็นเพียงสารละลาย sucrose เท่านั้น ดูดเก็บโปรตีนจากชั้นล่างและชั้นกลางเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อทำการศึกษาส่วนประกอบของโปรตีนต่อไป

การแยกโปรตีนจากชั้นเยื่อหุ้มผิวเซลล์ (plasma membrane proteins) ของตัวอสุจิ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

โปรตีนที่สกัดแยกจากชั้นผิวเซลล์อสุจิคือจากส่วน peripheral, plasma membrane และ cytosolic proteins จะถูกนำมาผสมกับ sample buffer ที่ปริมาณโปรตีนสกัด 10 μ g แล้วแยกโปรตีนตามขนาดโดยใช้ 10% SDS-PAGE (รูปที่ 2.6-2) ผลการศึกษาพบว่า peripheral proteins จากเซลล์อสุจิประกอบด้วยแถบโปรตีนเด่นๆ หลายขนาดตั้งแต่ 42, 50, 60 และ 200 kD โดยที่แถบขนาด 42 kD ค่อนข้างเข้ม เมื่อศึกษา plasma membrane proteins จากเซลล์อสุจิพบว่าประกอบด้วยแถบโปรตีนที่เด่นขนาด 35, 50 และ 60 kD โดยมีแถบขนาด 50 kD ค่อนข้างเข้ม นอกจากนี้ยังมีโปรตีนขนาดใหญ่ส่วนหนึ่งที่เหลือค้างอยู่ที่ขอบบนของชั้น stacking gel ซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 200 kD ขึ้นไป ในขณะที่ cytosolic proteins ประกอบด้วยแถบโปรตีนหลายขนาด โดยมีแถบเข้มที่ขนาด 42, 45 และ 50 kD

การศึกษาโครมาตินจากนิวเคลียสของเซลล์อสุจิของหอยเป่าฮื้อ

จากการศึกษาโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์อสุจิที่พัฒนาเต็มที่ในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM พบว่ามันประกอบด้วยเส้นใยโครมาตินขนาดประมาณ 60 นาโนเมตรอัดตัวกันอยู่แน่นมากภายในนิวเคลียส เราได้ทำการศึกษาการเรียงตัวของใยโครมาตินจากนิวเคลียสของเซลล์อสุจิโดยทำการคลี่ใยโครมาตินเหล่านี้ออกจากกันโดยวิธี Decondensation แล้วศึกษาต่อยังจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM กล่าวคือเซลล์อสุจิได้ถูกแยกเอาเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) ออกด้วยสารละลาย 1% TritonX-100 ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำนิวเคลียสของเซลล์อสุจิที่แยกได้ไปแช่ในน้ำกลั่น (deionized distilled water) ในสัดส่วน 1:20 โดยปริมาตร ที่เวลา 1 นาที, 3 นาที, 5 นาที และ 10 นาทีตามลำดับ หลังจากนั้นปั่นสารละลายที่ 5,000xg ที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 20 นาทีแล้วดูดเก็บตัวอย่างใยโครมาตินที่คลี่แล้วในสารละลายที่เวลาต่าง ๆ จากกันหลอดทดลองมาศึกษาโดยหยดลงบนแผ่นตาข่ายทองแดง (copper grid) ที่เคลือบด้วยพลาสติก Polyvinyl formal (Formvar) หลังจากย้อมด้วย 1% uranyl acetate, pH 7.4 ประมาณ 30 วินาทีและล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงสังเกตลักษณะการคลี่ใยโครมาตินดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM (รูปที่ 2.6-3) ภายหลังจากแช่ในน้ำกลั่นที่เวลาประมาณ 3 นาทีแรกส่วนหัวของเซลล์อสุจิจะเริ่มมีการบวมขึ้นเล็กน้อยและจะแตกออกในที่สุดที่เวลาประมาณ 5 นาทีพบว่าใยโครมาตินจากหัวของเซลล์อสุจิหอยเป่าฮื้อเริ่มมีการคลี่ออกอย่างชัดเจนสาเหตุมาจากแรงดันออสโมติกที่ดูดน้ำจากภายนอกเข้ามาสู่ในเซลล์ ใยโครมาตินที่คลี่ออกมาจะมีลักษณะเป็นเส้นใยต่อกันเป็นสายที่มีขนาดยาวและหักไปมาคล้ายเส้นเชือกและขมวดเป็นปมเป็นระยะ ๆ จากผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าใยโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์อสุจิจากหอยเป่าฮื้อมีลักษณะเป็นเส้นยาวหักไปมาที่ต่อเนื่องกันโดยมีขนาดประมาณ 30 นาโนเมตร มีปมขนาด 60 นาโนเมตรขนาดใหญ่

ประมาณ 60 นาโนเมตรขนาดอยู่เป็นระยะ ๆ และใยโครมาตินเหล่านี้ขัดตัวแน่นในนิวเคลียสของเซลล์
อสุจิปกติ

2.6.2. การศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ไข่และโปรตีนจากชั้นเยื่อหุ้มไข่ (jelly coat และ vitelline envelope)

การศึกษาลักษณะของเซลล์ไข่ (Mature eggs) ของหอยเป่าฮื้อที่ถูกปล่อยออกมาด้วย
จุลทรรศน์ธรรมดา (Light microscope) และจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron
microscopes)

เก็บไข่ที่ใช้ศึกษาจากน้ำทะเลในอ่างเพาะเลี้ยงหลังการปล่อยไข่ (spawning) โดยหอยเป่าฮื้อเพศ
เมีย ไข่ที่ถูกปล่อยออกมามีลักษณะเป็นเม็ดค่อนข้างกลมสีเขียวเข้มมีขนาดเล็กมากเมื่อมองด้วยตาเปล่า
เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (รูปที่ 2.6-4) พบว่าไข่ของหอยเป่าฮื้อมีเยื่อปกคลุมอยู่ 2 ชั้นคือ
ชั้นนอกถูกคลุมโดย jelly coat มีลักษณะสีขาวขุ่นและทึบแสงเล็กน้อย ถัดจากชั้นนี้เข้าไปเป็นชั้นของ
vitelline envelope ซึ่งมีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ สีดำคลุมอยู่รอบเซลล์ไข่ที่มีสีเขียวเข้ม นำไข่ที่เก็บได้ไปตรึง
ด้วยสารละลาย 3% glutaraldehyde และเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง
กราดและแบบส่องผ่าน

ผลจากจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่าไข่บางส่วนที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง
สำหรับศึกษาไม่พบชั้น jelly coat เนื่องจากชั้นนี้อาจหลุดออกไปแล้วในขั้นตอนการดึงน้ำออก
(Dehydration) โดยแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นไข่ที่พบยังมีขนาดเล็กกว่าที่พบในจุลทรรศน์ธรรมดาเพราะ
การดึงน้ำออกรวมทั้งขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างแห้งโดยวิธี critical point drying ทำให้ชั้นเยื่อหุ้มไข่ยุบตัว
ติดกับเซลล์ไข่โดยไม่มีชั้น perivitelline space คงอยู่ (รูปที่ 2.6-5A) ชั้น jelly coat ของไข่ที่สังเกตได้จาก
จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดประกอบด้วยเส้นใยขนาดใหญ่สานกันอยู่อย่างหนาแน่นและไม่เป็น
ระเบียบ (รูปที่ 2.6-5B-D) ได้ชั้นนี้จะเป็นชั้น vitelline envelope ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นเยื่อหุ้มหนาชัดเจน
(รูปที่ 2.6-5E-F) ที่มีรูขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปบนเยื่อหุ้มนี้ซึ่งอาจจะเป็นช่องทางที่เซลล์อสุจิเกาะในช่วง
เริ่มต้นของการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่

นอกจากนี้เราได้ศึกษาเซลล์ไข่ด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เมื่อส่องดู semithin
section ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาพบว่า เซลล์ไข่ที่พัฒนาเต็มที่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ
180-200 μm มีชั้น jelly coat และ vitelline envelope คลุมอยู่ด้านนอกตามลำดับ (รูปที่ 2.6-6) ระหว่าง
เซลล์ไข่กับชั้น vitelline envelope มีช่องว่าง perivitelline space อยู่โดยรอบซึ่งภายในมีสารทึบแสง
บางอย่างสะสมอยู่ด้วย (รูปที่ 2.6-6) ภายในเซลล์ไข่ประกอบด้วย yolk granules และ lipid droplets
จำนวนมากกระจายอยู่ใน cytoplasm ในขณะที่ไม่พบขอบเขตของเยื่อหุ้มนิวเคลียสได้เนื่องจากเซลล์ไข่
ส่วนใหญ่ที่ถูกปล่อยออกมาน่าจะเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) จนทำให้นิวเคลียสขยาย
ใหญ่มาก และมีการพัฒนาอยู่ในระยะ metaphase ของ meiosis I จากผลสังเกต thin section ด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเส้นใยที่ประกอบเป็นชั้น jelly coat อัดตัวกันอยู่หนาแน่นบริเวณรอบชั้น vitelline envelope โดยมีปริมาณลดลงเมื่อห่างออกไปจากหัวเซลล์ไข่ (รูปที่ 2.6-7) vitelline envelope มีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มหนา 2 ชั้น ชั้นนอกมีเส้นใยของ jelly coat ติดอยู่และกระจายออกไปจากไข่โดยรอบในขณะที่เยื่อหุ้มชั้นในมีขอบเขตแยกจากเยื่อหุ้มเซลล์ไข่อย่างชัดเจนโดยมีช่องว่าง perivitelline space อยู่ระหว่างกลาง เซลล์ไข่ประกอบไปด้วย yolk granules, mitochondria และ lipid droplets กระจายอยู่ทั่วไป โดยที่พบ yolk granules กับ lipid droplets มากที่กลางเซลล์และพบ mitochondria ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณขอบเซลล์ นอกจากนี้ยังพบไมโครวิลโลสยื่นออกไปจากเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ บางส่วนลอยอยู่ใน perivitelline space และบางส่วนประกบติดกับชั้นในของ vitelline envelope

การศึกษาโปรตีนจากชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ไข่

การแยกชั้น jelly coat และ vitelline envelope จากไข่

เก็บตัวอย่างไข่ของหอยเป่าซึ่งถูกปล่อยออกมาสู่ทะเล แล้วนำไข่ไปละลายไว้ในหลอดทดลองสักพักไข่จะตกลงมากองรวมกันที่ก้นหลอดเนื่องจากน้ำหนักของไข่ จากนั้นหยดสารละลาย HCl ลงไปเพื่อปรับ pH ของน้ำทะเลให้เป็น 5.0 เขย่าเบา ๆ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีเพื่อให้ชั้น jelly coat ถูกละลายออกมา หลังจากนั้นหยดสารละลาย Tris (pH 8.0) ลงไปเพื่อปรับ pH ของน้ำทะเลให้เป็น 7.0 ทิ้งให้ไข่นอนที่ก้นหลอด แล้วจึงดูดเก็บเฉพาะส่วนของน้ำทะเลที่อยู่เหนือไข่ทั้งหมดออกมาศึกษาโปรตีนของชั้น jelly coat ต่อไปโดยเก็บไว้ที่ -20°C ส่วนไข่ที่เหลือจากการแยกชั้น jelly ออกไปแล้ว เมื่อตรวจดูโดยจุลทรรศน์ธรรมดาพบว่าคงเหลือเพียงชั้น vitelline envelope หุ้มเซลล์ไข่อยู่โดยรอบเท่านั้น ไข่เหล่านี้ถูกนำไปบด (homogenization) ในสารละลาย incubation medium (ซึ่งประกอบด้วยเกลือของ 454 mM NaCl, 9.7 mM KCl, 24.9 mM MgCl_2 , 27.1 mM MgSO_4 , 4.4 mM NaHCO_3 , 10 mM Tris base, 10 mM EGTA pH 7.0) ปั่นที่ 150xg แยกเอา pellet ออกมาบดแล้วปั่นซ้ำอีกครั้ง จนในที่สุดได้ pellet ที่เห็นแยกกันเป็น 2 ชั้น ชั้นบนมีสีขาวครีมซึ่งเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาพบว่าประกอบด้วย vitelline envelope ล้วน ๆ ส่วนชั้นล่างมีสีเขียวเข้มถึงดำซึ่งเป็นส่วนของ yolk matrix ที่แตกแล้ว จากนั้นดูดเก็บเอาชั้นบนออกมาแล้วล้างด้วยสารละลายชนิดเดียวกันหลาย ๆ รอบจนกระทั่ง ได้ pellet เป็นสีขาวใสซึ่งเป็นส่วน crude vitelline envelope proteins ซึ่งถูกนำมาเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อศึกษาส่วนประกอบของโปรตีนต่อไป

ลักษณะโครงสร้าง (Ultrastructure) ของ Jelly coat

Jelly coat จากเซลล์ไข่ที่แยกได้ถูกนำมาศึกษาลักษณะละเอียดของโครงสร้าง (Ultrastructure) ด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM โดยหยด Jelly coat ที่สกัดได้ลงบนแผ่นตาข่ายทองแดงที่เคลือบด้วยพลาสติก Formvar หลังจากนั้นย้อมด้วย 1% uranyl acetate, pH 7.4 ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงสังเกตด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM พบว่าโครงสร้างของ Egg jelly จากเซลล์ไข่มีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดสม่ำเสมอมีขนาดอยู่ 2 ระดับคือเส้นใยขนาดใหญ่ประมาณ 40-50 นาโนเมตรที่ไขว้กันไปมา (Cross-link)

ซึ่งกระจายอยู่จำนวนมาก และเส้นใยขนาดเล็กประมาณ 15 นาโนเมตรซึ่งมีอยู่จำนวนน้อยกว่า เมื่อศึกษาโครงสร้างของชั้น Jelly coat จากเซลล์ไข่ระยะกำลังพัฒนาภายในรังไข่ (รูปที่ 2.6-8A-B) เปรียบเทียบกับของเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์และปล่อยออกมาแล้ว (รูปที่ 2.6-8C-F) พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ในเซลล์ไข่ระยะสมบูรณ์พบว่าเส้นใยของ Egg jelly กระจายออกมาตั้งแต่บริเวณขอบของชั้น Vitelline envelope โดยมีความหนาแน่นของเส้นใยมากที่บริเวณติดกับ Vitelline envelope และความหนาแน่นจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อห่างจาก Vitelline envelope ออกมา จึงเป็นไปได้ว่าชั้น Vitelline envelope อาจเกิดมาจากการอัดตัวกันแน่นของเส้นใยชนิดเดียวกับที่พบในชั้น Jelly coat ของเซลล์ไข่ระยะพัฒนาภายในรังไข่ แต่ vitelline envelope จะปรากฏชัดมากในเซลล์ไข่ที่ปล่อยออกมาสู่น้ำทะเล โดยอาจเกิดจากการดูดน้ำเข้าสู่ Jelly coat ทำให้เกิดเป็นช่อง Perivitelline space แยกระหว่างชั้น Vitelline envelope กับเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ชัดเจนขึ้น (รูปที่ 2.6-8C) เส้นใยที่อยู่ถัดจากชั้น Vitelline envelope ออกไป ซึ่งเป็นส่วนของชั้น Jelly coat ก็กระจายออกของโดยมีบางส่วนที่อยู่บริเวณรอบนอกของชั้นนี้หลุดออกไปในน้ำทะเลด้วยซึ่งสังเกตได้จากความหนาและขอบเขตที่ไม่สม่ำเสมอของชั้น Jelly coat ในเซลล์ไข่ที่ปล่อยออกมาในน้ำทะเลแล้วที่เวลาประมาณ 30 นาทีเทียบกับเซลล์ไข่ที่เพิ่งปล่อยออกมา ลักษณะเช่นนี้อาจมีความสำคัญในช่วงกระบวนการเกิดปฏิสนธิในหอยชนิดนี้ซึ่งทำให้เซลล์สุจิสามารถว่ายผ่านชั้น Jelly coat ของเซลล์ไข่ได้ง่ายและเร็วเพื่อผ่านไปยังชั้น Vitelline envelope

การแยกโปรตีนในชั้นเยื่อหุ้มไข่โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำโปรตีนที่สกัดได้จากชั้น jelly coat และ vitelline envelope มาผสมกับ sample buffer ที่ปริมาณโปรตีนสกัด 15 μ g แล้วทำการแยกโปรตีนตามขนาดและประจุใน 10% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie Blue (รูปที่ 2.6-9) ผลการศึกษาพบว่าชั้น jelly coat ของไข่ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 ตัวที่มีขนาด 107 และ 178 kD นอกจากนั้นยังมีโปรตีนขนาดใหญ่ส่วนหนึ่งที่เหลือค้างอยู่ที่ขอบบนของชั้น stacking gel เมื่อศึกษาโดยการย้อมสวอนคาร์โบไฮเดรตที่อาจมีอยู่ในโปรตีนด้วยสี Periodic acid-Schiff (PAS) พบว่าโปรตีนขนาด 107 kD ติดสี PAS เข้มชัดเจน ในขณะที่โปรตีนตัวอื่นไม่ติดสีเลย ดังนั้นโปรตีนตัวดังกล่าวจึงน่าจะเป็นไกลโคโปรตีนที่สำคัญของชั้น Jelly coat

พบว่าส่วนของโปรตีนสกัดจาก crude vitelline envelope ประกอบด้วยโปรตีนหลายขนาดโดยมีโปรตีนขนาดใหญ่ปะปนอยู่ด้วย และเมื่อย้อมด้วยสี PAS แล้วพบว่ามีแถบติดสีเข้มที่โปรตีนขนาด 107 kD และส่วนที่ค้างที่ขอบบนของชั้น stacking gel เช่นเดียวกันกับที่พบใน jelly coat ซึ่งแสดงว่าโปรตีนขนาดดังกล่าวน่าจะเป็นส่วนประกอบหลักและมีบทบาทในการสร้างชั้น jelly coat และ vitelline envelope ของไข่ อย่างไรก็ตามการติดสี PAS ใน vitelline envelope ยังพบได้ในกลุ่มแถบโปรตีนอื่นซึ่งมีขนาด 40-60 kD ด้วย โดยจะติดสีไม่เข้มมากนัก

การศึกษาไกลโคโปรตีนจากชั้นหุ้มเซลล์ไข่ของหอยเป่าฮือ

ชนิดของไกลโคโปรตีนและการติดเลคติน

จากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ของหอยเป่าฮือมีสองชั้นคือชั้น Jelly coat และชั้น Vitelline envelope แต่ละชั้นประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่มี molecular weight (MW) ตั้งแต่ 100,000 ดาลตันขึ้นไป และติดสีย้อมไกลโคโปรตีนโดยเฉพาะที่แถบ 107 และ 178 กิโลดาลตัน จากการย้อม Semithin sections ของเซลล์ไข่ระยะกำลังพัฒนาภายในรังไข่ (developing oocytes) ด้วยสี Periodic acid-Schiff (PAS) พบว่ามีสีติดเข้มชัดเจนที่ชั้น Jelly coat ของเซลล์ไข่ระยะ 4 และ 5 (รูปที่ 2.6-10A-D) ผลการย้อม PAS ในเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ (spawned eggs) ที่ถูกปล่อยออกจากตัวหอยแล้วพบว่ามีย้อมติดที่ชั้น Jelly coat เช่นเดียวกันแต่ส่วนที่ติดเข้มมากที่สุดคือชั้น Vitelline envelope (รูปที่ 2.6-10E-F) ซึ่งแสดงว่าชั้น Jelly coat และโดยเฉพาะชั้น Vitelline envelope ของไข่ที่ถูกปล่อยออกมามีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอยู่สูงมาก

นอกจากนั้นเรายังได้ทำการสกัดโปรตีนออกมาจากชั้น Jelly coat และ Vitelline envelope ของไข่ แล้วแยกด้วย 10% SDS-PAGE และทำการถ่ายข้าม (Blotting) ไปบนแผ่น Nitrocellulose membrane จากนั้นใช้เลคตินจับกับโปรตีนที่แยกได้จากทั้งสองชั้น เพื่อศึกษากลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนแต่ละชนิดซึ่งกระทำโดยการนำแผ่น Nitrocellulose membrane ที่มีโปรตีนที่แยกแล้วแช่ใน blocking solution (5% skimmed milk ใน 0.1M phosphate buffer saline (PBS)) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเลคตินความเข้มข้น 2 µg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เลคตินที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ Wheat germ agglutinin (WGA), Peanut agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin 1(RCA1), *Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA1), และ *Lens culinaris* agglutinin (LCA) เลคตินดังกล่าวติดกับไบโอติน (Biotinylated lectins) หลังจากล้างด้วย 0.1M PBS แล้วจึงย้อมหาตำแหน่งของเลคตินที่ติดกับแถบของไกลโคโปรตีนแต่ละชนิดด้วยการแช่แผ่น Nitrocellulose ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี HRP-conjugated streptavidin เป็นเวลา 30 นาที หลังจากล้างแล้วจึงแช่ในสารละลายที่มี substrates คือ DAB-NiCl₂ จากนั้นตรวจความจำเพาะของเลคตินที่ลงเกาะกับแถบโปรตีนแต่ละชนิดได้โดยสังเกตแถบติดสีดำที่ซ้อนกับแถบโปรตีน ผลการทดลอง (รูปที่ 2.6-11) พบว่าโปรตีนสกัดจากชั้น Jelly coat ย้อมติดสีเข้มมากกับเลคติน UEA1 และ LCA ซึ่งจับอย่างจำเพาะกับหมู่น้ำตาล Fucose โดย UEA1 ติดกับโปรตีนหลายแถบที่ MW ตั้งแต่ 30 ถึง 200 กิโลดาลตัน ส่วน LCA ติดเข้มมากที่แถบโปรตีนขนาด 42 และ 50 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังมีการย้อมติดเลคติน PNA ที่ติดแถบโปรตีน 42 และ 50 กิโลดาลตันและ RCA ติดแถบโปรตีนที่ 65 กิโลดาลตัน ซึ่งเลคตินเหล่านี้จับอย่างจำเพาะกับหมู่น้ำตาล Galactose และ N-acetylgalactosamine อย่างไรก็ตามโปรตีนจากชั้น Jelly coat นี้ย้อมไม่ติด WGA ซึ่งจับกับหมู่น้ำตาล N-acetylglucosamine ส่วนโปรตีนสกัดจากชั้น Vitelline envelope สามารถย้อมติดเข้มมากทั้งเลคติน UEA1 (ติดแถบโปรตีนตั้งแต่ 30 ถึง 200 กิโลดาลตัน), LCA

(ติดแถบโปรตีน 42, 50, 65, 107 และ 178 กิโลดาลตัน), PNA (ติดแถบโปรตีน 42, 50, 65, 107 และ 178 กิโลดาลตัน) และ RCA1 (ติดแถบโปรตีน 65 กิโลดาลตัน) ในขณะที่ย้อมติด WGA น้อยมากโดยจะปรากฏเฉพาะที่แถบโปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตัน จึงสรุปได้ว่าโปรตีนจากชั้น Jelly coat ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนซึ่งมีกลุ่มของน้ำตาลหลักคือ Fucose และ Galactose เช่นเดียวกันกับโปรตีนจากชั้น Vitelline envelope โดยมีกลุ่มของ Glucose เป็นน้ำตาลหลักประกอบอยู่ด้วย

การย้อมเลคตินโดยตรงบน Semithin sections ของเซลล์ไข่ระยะพัฒนา (developing oocytes) ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence พบว่าเลคตินที่ย้อมติดโดยแสดงการเรืองแสงเข้มที่สุดคือ UEA1 และ LCA ในขณะที่ตัวอื่นติดน้อยหรือไม่ติดเลย (รูปที่ 2.6-12) โดยบริเวณที่ย้อมติดเลคตินทั้งสองชนิดที่มีความเข้มที่สุดคือที่ขอบชั้นในสุดติดกับชั้น Jelly coat ของเซลล์ในระยะที่ 4 และ 5 ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการพัฒนาของเซลล์ไข่ บริเวณนี้น่าจะเป็นชั้นของ Vitelline envelope ของเซลล์ไข่ระยะดังกล่าวซึ่งขณะที่อยู่ภายในรังไข่ยังแยกกับชั้น Jelly coat ไม่ชัดเจนนัก นอกจากนี้ยังมีการย้อมติดเลคตินทั้งสองชนิดเพียงเล็กน้อยที่ชั้น Jelly coat ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทั้ง Jelly coat และ Vitelline envelope ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนหลายชนิด ส่วนใหญ่มีน้ำตาลประเภท Fucose และ Galactose เป็นส่วนประกอบหลักโดยมีปริมาณของโปรตีนที่มีน้ำตาลดังกล่าวอยู่เข้มข้นที่สุดในชั้น Vitelline envelope

การสังเคราะห์ไกลโคโปรตีนที่ระดับเซลล์

หลังจากแยกโปรตีนจากชั้น Jelly coat และ Vitelline envelope ของไข่ได้แล้วส่วนหนึ่ง เราได้นำมาฉีดกระตุ้นในหนูเมาส์ เพื่อผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี เพื่อนำมาย้อมแสดงตำแหน่งการกระจายของโมเลกุลเหล่านี้ที่ประกอบเป็นชั้น Jelly coat และชั้น Vitelline envelope ในเซลล์ไข่ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence ผลปรากฏว่าแอนติบอดีต่อโปรตีนจากชั้น Jelly coat สามารถย้อมติดบริเวณชั้น Jelly coat ของเซลล์ไข่ระยะ 4 และระยะ 5 อย่างชัดเจน ซึ่งปรากฏเป็นชั้น ๆ รวมถึงชั้นในสุดซึ่งเป็นชั้น Vitelline envelope ด้วย (รูปที่ 2.6-13A-B) ในขณะที่เซลล์ไข่อ่อนกว่านี้ยังไม่ติด เมื่อย้อมรังไข่ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนจากชั้น Vitelline envelope พบว่าสามารถย้อมติดที่ชั้น Vitelline envelope ชัดเจนที่สุดและชั้นถัดออกมาทั้งหมดซึ่งเป็นชั้น Jelly coat ของเซลล์ไข่อายุระยะที่ 4 และระยะที่ 5 ด้วย (รูปที่ 2.6-13C-D) ในขณะที่ระยะอื่นยังไม่ติด ในส่วนที่ย้อมติดด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนจากชั้น Vitelline envelope นี้มีลักษณะคล้ายกับที่ติดจากแอนติบอดีต่อโปรตีนจากชั้น Jelly coat และยังมีการเรืองแสงปานกลางในทั้งชั้นของ Jelly coat ด้วย ผลการทดลองดังกล่าวคล้ายคลึงกับผลเมื่อย้อมแอนติบอดีทั้งสองตัวในเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ (Mature eggs) โดยแอนติบอดีต่อ Jelly proteins จะเรืองแสงเข้มที่ชั้น Jelly ของไข่และเรืองแสงปานกลางที่ชั้น Vitelline envelope (รูปที่ 2.6-13G) ในขณะที่แอนติบอดีต่อ Vitelline envelope proteins ติดเข้มที่ชั้น Vitelline และติดปานกลางที่ชั้น Jelly (รูปที่ 2.6-13H-I) จึงเป็นไปได้ว่าทั้งชั้น Jelly coat และ Vitelline envelope ของไข่น้อยเป่าฮื้อน่าจะมีส่วนประกอบของโปรตีนที่คล้ายคลึงกันและอาจถูกสร้างออกมาเซลล์ไข่ในระยะที่ 4 และ 5

ผลที่ได้จากการย้อมเซลล์ไข่ด้วยแอนติบอดีดังกล่าวข้างต้นมีความสอดคล้องกับผลการย้อมโปรตีนสกัดจากทั้งสองชั้นด้วยแอนติบอดีด้วยวิธี Immunoblotting ผลปรากฏว่าแอนติบอดีต่อโปรตีนของ Egg jelly ย้อมติดแถบโปรตีนสกัดจากชั้น Jelly coat และ Vitelline envelope ในขณะที่แอนติบอดีต่อโปรตีน Vitelline envelope ก็ย้อมติดแถบโปรตีนสกัดจากทั้งสองชั้นเช่นกัน (รูปที่ 2.6-14) อย่างไรก็ตามตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ติดสีเข้มภายหลังการย้อมด้วยแอนติบอดีทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันอยู่บ้าง กล่าวคือแอนติบอดีต่อ Jelly coat สามารถย้อมติดแถบโปรตีนสกัดจากทั้งสองชั้นโดยเฉพาะที่แถบโปรตีน MW 107 กิโลดาลตันโดยแถบโปรตีนนี้จากชั้น Jelly coat จะติดสีเข้มมากกว่าแถบโปรตีนชนิดเดียวกันจากชั้น Vitelline envelope ในขณะที่แอนติบอดีต่อโปรตีน Vitelline envelope สามารถย้อมติดจำนวนแถบโปรตีนสกัดจากทั้งสองชั้นได้มากกว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน Jelly coat โดยเฉพาะกลุ่มโปรตีนที่มี MW ตั้งแต่ 40 ถึง 107 กิโลดาลตัน โดยการติดสีที่แถบโปรตีนดังกล่าวจากชั้น Vitelline envelope มีความเข้มมากกว่าแถบโปรตีนชนิดเดียวกันจากชั้น Jelly coat จึงสรุปได้ว่าโปรตีนที่ประกอบเป็นชั้น Jelly coat และ Vitelline envelope มีความคล้ายคลึงกัน แต่มีอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยที่ในชั้น Jelly coat มีปริมาณโปรตีนขนาดใหญ่โดยเฉพาะขนาด 107 กิโลดาลตันอยู่มากและมีโปรตีนขนาดเล็กกว่า 100 กิโลดาลตันอยู่เพียงเล็กน้อย ส่วนในชั้น Vitelline envelope โปรตีนส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่าคือตั้งแต่ 40 ถึง 107 กิโลดาลตัน ในขณะที่โปรตีนขนาดใหญ่ 107 และ 178 กิโลดาลตันมีอยู่น้อยกว่า

2.6.3. การศึกษากระบวนการการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สุจิกับเซลล์ไข่ในหอยเป่าฮือ

การศึกษาระยะเวลาในช่วงการเกิดปฏิสนธิแบบ *in vitro* fertilization

ในการทดลองนี้ได้นำไข่ที่ปล่อยออกจากตัวหอยลงสู่ น้ำทะเลใหม่ ๆ มาแบ่งใส่ถาดหลุมพลาสติก (16-plastic well plate) แต่ละหลุมมีไข่ประมาณ 10^3 เซลล์ จากนั้นนำเซลล์สุจิที่ปล่อยออกมาใหม่ ๆ และนับจำนวนโดยประมาณแล้วนำมาหยดลงให้ผสมกับไข่ที่อยู่ในหลุมดังกล่าวพร้อมทั้งเขย่าถาดเบา ๆ ตลอดเวลา ณ อุณหภูมิห้อง ($27-30^{\circ}\text{C}$) จำนวนสุจิที่หยดลงไปต่อ 1 หลุมประมาณ 10^5 เซลล์ จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์ไข่ในแต่ละช่วงเวลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและบันทึกผลเป็นค่าเวลาโดยเฉลี่ย จากผลการทดลองพบว่า first polar body หลุดออกจากเซลล์ไข่มาอยู่ในชั้น perivitelline space เมื่อนาทีที่ 8 ถึง 9 หลังเซลล์ไข่ผสมกับสุจิ (รูปที่ 2.6-15) จากนั้นที่เวลาประมาณ 10 นาทีเกิด second polar body ตามมาทันทีโดยหลุดออกมาจากเซลล์ไข่ที่ตำแหน่งเดียวกัน ในขณะที่ first polar body ก็ยังปรากฏอยู่ จนกระทั่งประมาณนาทีที่ 20 จึงเริ่มสังเกตเห็นการแบ่งตัวของไข่เป็นสองเซลล์ในระยะ cleavage ซึ่ง polar body ทั้งสองหายไปในระยะนี้ จากนั้นเซลล์ไข่จะแบ่งตัวต่อไปจนเกิดโพรงกลางเซลล์ซึ่งพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastulation และ gastrulation ใน 20-25 นาที เป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วง 1-4 นาทีแรกของการผสมนั้นไข่จำนวนหนึ่งมีการหนาตัวของชั้น jelly coat ซึ่งเป็นชั้นหุ้มนอกสุดของไข่ โดยมีลักษณะขุ่นและทึบแสงเมื่อเทียบกับไข่ปกติก่อนรับการผสมซึ่งชั้นนี้ลักษณะโปร่งใส การ

เปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะปรากฏอยู่ชั่วคราวจนกระทั่งเกิด polar bodies เมื่อมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นชั้นที่บแสงนี้จะหายไปเหลือเพียงขอบเขตของ vitelline envelope เท่านั้นที่ปรากฏชัดเจน จากผลการทดลองจึงคาดว่า การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวน่าจะเป็นกลไกป้องกันการเกิดปฏิสนธิซ้อน (Polyspermy block) ของไข่ ในช่วงที่เซลล์อสุจิเคลื่อนตัวเข้ามาผสมกับไข่ นอกจากนี้ลักษณะของเซลล์ไข่ภายหลังการผสมกับอสุจิแล้วยังมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเซลล์ไข่ก่อนรับการผสมด้วยดังแสดงผลในตารางที่ 2.6-1

ตารางที่ 2.6-1 ผลการเปลี่ยนแปลงขนาดของไข่และช่วงเวลาพัฒนาชั้นต่าง ๆ ภายหลังการผสมระหว่างเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่ของหอยเป่าอี้อแบบ *in vitro* fertilization

Stage	Size	time
Unfertilized eggs	180 μm	0 min
1 st polar body	185 μm	8-9 min
2 nd polar body	185 μm	10 min
First cleavage	220 μm	15-20 min
Second cleavage	195 μm	35-40 min
Morula	200 μm	45-55 min
Blastulation	192 μm	75-85 min
Gastrulation	192 μm	85-90 min
Trochophore larvae	210 μm	90-250 min
Early veliger	225 μm	5-24 hours
Late veliger	228 μm	28-40 hours
Early creeping larvae	230 μm	48-72 hours
Creeping larvae	300 μm	3 rd - 6 th days
Juvenile	2 mm	Over 30 th day
Adult	1-2 inch	7 th - 8 th month

(หมายเหตุ: น้ำทะเลที่ใช้ (UV-irradiated filter seawater) มีอุณหภูมิประมาณ 29°C ความเค็มของเกลือประมาณ 22.5-27.5 ppt จำนวนเซลล์อสุจิที่ใช้คือ 10^5 เซลล์ จำนวนเซลล์ไข่ที่ใช้คือ 10^3 เซลล์)

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิสนธิแบบ *in vitro* fertilization

ในการทดลองนี้ได้นำไข่ที่ปล่อยออกจากตัวหอยลงสู่น้ำทะเลใหม่ ๆ มาแบ่งใส่ภาดหลุมพลาสติก (16-plastic well plate) แต่ละหลุมให้มีไข่ประมาณ 10^3 เซลล์ จากนั้นนำเซลล์อสุจิที่ปล่อยออกมาใหม่ ๆ และนับจำนวนโดยประมาณแล้วมาหยดลงให้ผสมกับไข่ที่อยู่ในหลุมดังกล่าวพร้อมนับเวลาที่เซลล์ไข่เกิดการปฏิสนธิโดยสังเกตจากการเริ่มเกิดขึ้นของ first polar body ของเซลล์ไข่ไปจนกระทั่งเกิด second polar body และแบ่งตัวระยะ cleavage ในที่สุด การทดลองได้ทำโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิต่าง ๆ กันมาผสมกับไข่ และมีเซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมเป็นตัวแปรควบคุมในการทดลองด้วย นำผลที่ได้มาหา

ค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดปฏิสนธิแบบ *in vitro* fertilization นอกจากนี้ยังหาเปอร์เซ็นต์ของไข่เสียที่เกิดขึ้นด้วย จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์อสุจิที่เหมาะสมสำหรับการผสมกับไข่จำนวน 10^3 เซลล์ซึ่งทำให้ได้อัตราการปฏิสนธิสูงสุดคือ ประมาณ 10^5 เซลล์หรือประมาณ 100 เท่าของเซลล์ไข่โดยที่จำนวนอสุจิดังกล่าวให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิสนธิสูงสุด (ตารางที่ 2.6-2, รูปที่ 2.6-16) ถึงแม้ว่าที่จำนวนเซลล์อสุจิ 10^6 เซลล์จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิสนธิค่อนข้างสูงเช่นกันแต่เมื่อดูจากเปอร์เซ็นต์การเกิดไข่เสียแล้วพบว่ามีความสูงมาก สาเหตุอาจมาจากปริมาณอสุจิที่มากเกินไปอาจทำให้มีเอนไซม์จากถุงอะโครโซม (Acrosome) ออกมาทำลายชั้น vitelline envelope ของไข่มากเกินไปอีกทั้งกลไกการป้องกันไข่จากการเข้าผสมของอสุจินหลายตัว (Polyspermy) อาจมีน้อยลงหรือไม่มีเลยจึงเป็นเหตุให้มีไข่เสียมากซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองเมื่อใช้ปริมาณอสุจิ 10^5 เซลล์เข้าผสมกับไข่ 10^3 พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดไข่เสียน้อยที่สุด จึงสรุปได้ว่าปริมาณเซลล์อสุจิในหอยเป่าอื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผสมกับเซลล์ไข่ควรจะมีความมากกว่าเซลล์ไข่ประมาณ 100 เท่าหรือในอัตราส่วนของจำนวนไข่ต่ออสุจิประมาณ 1 ต่อ 100

ตารางที่ 2.6-2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิสนธิของไข่และการเกิดไข่เสียระหว่างการผสมของเซลล์ไข่กับเซลล์อสุจิที่เวลาและปริมาณเซลล์อสุจิต่าง ๆ กัน

จำนวนอสุจิ (เซลล์)	ระยะเวลาหลังการผสมเซลล์อสุจิกับเซลล์ไข่ 1,000 ใบ					
	8 นาที		15 นาที		20 นาที	
	%ปฏิสนธิ	%ไข่เสีย	%ปฏิสนธิ	%ไข่เสีย	%ปฏิสนธิ	%ไข่เสีย
1×10^3	3.5	2.67	4.83	8.33	5.0	7.17
1×10^4	11.67	5.17	22.67	8.0	24.83	8.83
1×10^5	35.33	4.17	74.17	3.83	75.83	6.67
1×10^6	67.83	25.87	69.5	22.17	68.17	22.67

คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.6

- รูปที่ 2.6-1** A, B) ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงเซลล์สุจิของหอยเป่าฮื้อ
C, D) ภาพ Scanning electron micrograph แสดงเซลล์สุจิของหอยเป่าฮื้อ ส่วนหัวประกอบด้วยนิวเคลียสซึ่งถูกคลุมทางด้านหน้าด้วย acrosome และมี mitochondria 5 ก้อนโอบล้อมรอบโคนหาง Ac = acrosome, Mi = mitochondria, Nu = nucleus, Sz = spermatozoa, T = tail
- รูปที่ 2.6-2** แสดงโปรตีนสกัดจากชั้นผิวเซลล์สุจิของหอยเป่าฮื้อเมื่อแยกโดย 10% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue
Lane 1: Proteins marking for molecular weights
Lane 2: Sperm peripheral proteins
Lane 3: Sperm plasma membrane proteins
Lane 4: Sperm cytosolic proteins
- รูปที่ 2.6-3** ภาพ TEM แสดงหัวเซลล์สุจิของหอยเป่าฮื้อหลังทำการคลี่โครมาติน (Chromatin decondensation) ในน้ำที่เวลา 3 นาที (ภาพ A) และ 5 นาที (ภาพ B-D) ตามลำดับ ที่เวลา 3 นาทีหัวเซลล์สุจิ (Mature spermatozoa; Sp) มีการบวมและเริ่มแตกออกทำให้มีโครมาตินปรากฏชัดขึ้นภายในนิวเคลียส (ลูกศร) และที่เวลา 5 นาทีโครมาตินคลี่ออกมาอย่างสมบูรณ์ซึ่งปรากฏเป็นเส้นใยขนาด 30 นาโนเมตรที่ขดตัวกระจายอยู่ทั่วไป (หัวลูกศร)
- รูปที่ 2.6-4** ภาพจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงเซลล์ไข่ของหอยเป่าฮื้อระยะสมบูรณ์ (Mature eggs)
A, B) ลักษณะของไข่ที่ถูกปล่อย (spawned eggs) ออกมาสู่ น้ำทะเล มีชั้น jelly coat (JC) คลุมด้านนอก ถัดเข้าไปเป็นชั้น vitelline envelope (VE) หุ้มอยู่รอบเซลล์ไข่
C, D) ลักษณะของไข่ภายหลังการแยกชั้น jelly coat ออกไปด้วยการใช้ 1N HCl คงเหลือเพียงชั้น vitelline envelope (VE) ที่ห่อหุ้มไข่
E, F) ลักษณะของไข่ซึ่งแยกชั้น vitelline envelope ออกไปแล้วโดยวิธี homogenization

- รูปที่ 2.6-5** ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไข่หอยเป่าอื้อซึ่งแสดงลักษณะผิวที่ประกอบด้วยชั้น jelly coat (Jc) คลุมอยู่นอกสุด ถัดเข้าไปเป็นชั้น vitelline envelope (VE) หุ้มอยู่รอบเซลล์ไข่
- A, B) ภาพกำลังขยายต่ำ แสดงให้เห็นลักษณะของชั้น Jelly coat ที่ปกคลุมด้านนอกสุดของไข่
- C, D) ลักษณะของชั้น jelly coat (EJ) ด้านนอกสุดของไข่มีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดใหญ่สานกันเป็นร่างแหซึ่งซ้อนทับกันอยู่
- E, F) ลักษณะชั้น vitelline envelope (VE) ที่ถูกแยกออกมาจากไข่ซึ่งจะเห็นเป็นแผ่นหนาที่ประกอบด้วยรูเล็ก ๆ ขนาดสม่ำเสมอกระจายทั่วทั้งแผ่น VE
- รูปที่ 2.6-6** ภาพของ Semithin sections แสดงลักษณะของไข่หอยเป่าอื้อ
- A, B) ลักษณะของไข่ที่มีชั้น jelly coat (Jc) และ vitelline envelope (VE) คลุมอยู่รอบเซลล์ไข่ (egg; E) ได้ชั้น vitelline envelope มี perivitelline space (P) ภายในมีสารใสๆ ในไซโตพลาสซึม (Cyt) ของเซลล์ไข่มี yolk granules (G) และ lipid droplets (L) จำนวนมากกระจายอยู่
- C, D) ลักษณะของไข่ซึ่งแยกชั้น jelly coat ออกไปแล้ว โดยยังมีชั้น vitelline envelope (VE) หุ้มตัวไข่ (E) อยู่โดยรอบ G = yolk granules, L = lipid droplets, Cyt = egg cytoplasm
- รูปที่ 2.6-7** ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไข่หอยเป่าอื้อ
- A) แสดงลักษณะชั้น jelly coat (EJ) ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยสม่ำเสมอขนาดประมาณ 40-50 นาโนเมตร สานเป็นร่างแหกระจายออกจากแนวของ vitelline envelope (VE)
- B) ลักษณะของเซลล์ไข่ (หัวลูกศร) ที่มี microvilli ยื่นออกมาสู่ชั้น perivitelline space โดยบางส่วนที่ยื่นออกมาสัมผัสหรือติดกับชั้น vitelline envelope (VE). G = yolk granule, Mi = mitochondria
- C) ชั้น vitelline envelope (EJ) ของไข่มีความหนาประมาณ 220 นาโนเมตร ประกอบด้วยสองชั้น ชั้นนอกติดกับเส้นใยของ jelly coat (EJ) ด้านในมีบางส่วนที่สัมผัสกับสารที่หลุดออกมาจากเซลล์ไข่
- D) Yolk granule (G) ที่กระจายอยู่ในเซลล์ไข่
- E, F) Lipid droplet (L) ที่โปร่งแสงอิเล็กตรอนอยู่ปะปนกับ Yolk granule (G) และ mitochondria (Mi; ภาพ F)

- รูปที่ 2.6-8** ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงลักษณะ Jelly coat จากไข่ของหอยเป่าฮื้อ
- A) แสดงลักษณะชั้น Jelly coat (JC) จากเซลล์ไข่ระยะพัฒนา (Developing oocytes) ภายในรังไข่ของหอยเป่าฮื้อ
- B) ภาพกำลังขยายสูงแสดงลักษณะ Jelly coat จากเซลล์ไข่ระยะพัฒนาประกอบด้วยเส้นใย 2 ระดับคือ เส้นใยขนาดประมาณ 40-50 นาโนเมตร (หัวลูกศร) ซึ่งไขว้กันอยู่อย่างสม่ำเสมอ และเส้นใยขนาด 15 นาโนเมตรที่มีอยู่น้อยกว่า
- C) ลักษณะเส้นใยจากชั้น Jelly coat ของเซลล์ไข่ระยะสมบูรณ์ (Mature eggs)
- D) ภาพจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงลักษณะชั้น Jelly coat ที่ถูกละลายออกมาจากไข่ด้วย 0.1N HCl บางส่วนยังไม่มีแยกออกจากกันอย่างชัดเจน
- E, F) ลักษณะเส้นใยจากชั้น Jelly coat ของเซลล์ไข่ระยะสมบูรณ์ที่กำลังขยายสูงมีขนาดเส้นใยประมาณ 40-50 นาโนเมตรไขว้กันอยู่
- G = granule, L = lipid droplet, VE = Vitelline envelope
- รูปที่ 2.6-9** แสดงโปรตีนสกัดจากชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ของหอยเป่าฮื้อเมื่อแยกโดย 10% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue (A) และ PAS (B) โดยโปรตีนแถบ 107 kDa ติดสี PAS อย่างชัดเจน
- Lane 1: Proteins marking for molecular weights
- Lane 2, 4: Jelly coat proteins
- Lane 3, 5: Vitelline envelope proteins
- รูปที่ 2.6-10** ภาพ Semithin sections แสดงเซลล์ไข่ระยะพัฒนา (Oocyte) ภายในรังไข่ของหอยเป่าฮื้อซึ่งย้อมด้วย PAS-Methylene blue ในเซลล์ไข่ระยะที่ 3 (Oc_3) ซึ่งไม่มีชั้น Jelly coat อยู่ย้อมไม่ติดสี PAS (ภาพ A) ในขณะที่เซลล์ไข่ระยะที่ 4 (Oc_4) และ 5 (Oc_5) ย้อมติดสี PAS อย่างชัดเจนที่ชั้น Jelly coat (JC; ภาพ B-D) ในเซลล์ไข่ระยะสมบูรณ์ย้อมติดสี PAS ที่ชั้น Vitelline envelope (VE) ซึ่งปรากฏเข้มกว่าชั้น Jelly coat
- รูปที่ 2.6-11** ภาพ Western blotting ของโปรตีนสกัดจากชั้น Jelly coat (EJ; ภาพ A) และจาก Vitelline envelope (VE; ภาพ B) บน Nitrocellulose membrane ย้อมด้วยเลคตินชนิดต่างๆ คือ Wheat germ agglutinin (WGA), Peanut agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin 1 (RCA I), *Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA I), และ *Lens culinaris* agglutinin (LCA) เมื่อเปรียบเทียบกับ Control membrane

- รูปที่ 2.6-12 ภาพ Immunofluorescence แสดงเซลล์ไข่ระยะพัฒนาภายในรังไข่หอยเป่าอื้อซึ่งถูกย้อมด้วยเลคตินชนิด *Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA I; ภาพ B-C) และ *Lens culinaris* agglutinin (LCA; ภาพ D) เมื่อเปรียบเทียบกับภาพ Control Section (ภาพ A) Oc₅ = Stage 5 oocyte, Oc₃ = Stage 3 oocyte, JC = Jelly coat, VE = Vitelline envelope, Cp = Capsule
- รูปที่ 2.6-13 ภาพ Immunofluorescence แสดงเซลล์ไข่ระยะสุดท้าย (Stage 5 oocytes; Oc₅) ที่อยู่ในรังไข่หอยเป่าอื้อ (ภาพ A-E) ซึ่งถูกย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ Jelly coat (anti-EJ; ภาพ A-B) และแอนติบอดีต่อ Vitelline envelope (anti-VE; ภาพ D-E) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับภาพ Control Section (ภาพ C) ภาพเซลล์ไข่ระยะสมบูรณ์ (Mature eggs; Egg) ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ Jelly Coat (anti-EJ; ภาพ G) และต่อ Vitelline envelope (anti-VE; ภาพ H-I) เมื่อเปรียบเทียบกับภาพ Control eggs (ภาพ F) JC = Egg jelly coat, VE = Egg vitelline envelope
- รูปที่ 2.6-14 ภาพ Western blotting ของโปรตีนสกัดจากชั้น Jelly coat (EJ) และ Vitelline envelope (VE) บน Nitrocellulose membrane ซึ่งย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ Jelly coat (anti-EJ) และต่อ Vitelline envelope (anti-VE) ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ Control membrane
- รูปที่ 2.6-15 แสดงการเกิด First (ซ้าย) และ Second polar body (ขวา) ของเซลล์ไข่หลังการผสมกับเซลล์อสุจิ
- รูปที่ 2.6-16 แสดงการเกิดปฏิสนธิและไข่เสียในหอยเป่าอื้อเมื่อใช้ไข่จำนวน 10^3 ใบ ผสมกับเซลล์อสุจิที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จุดที่การปฏิสนธิสังเกตได้จากการเกิด polar bodies จนกระทั่งเซลล์ไข่เริ่มมีการแบ่งตัวในระยะ cleavage โดยยังคงสภาพของเซลล์ไข่พร้อมทั้ง vitelline envelope ที่เวลา 8 นาที 15 นาที และ 20 นาทีหลังการปฏิสนธิ

