

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนลูกผสม GIH และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH ในกุ้งกุลาดำ

Functional characterization of recombinant protein of Pem-GIH and its antibody in
Penaeus monodon

ดร.สุพัตรา ตริรัตน์ตระกูล (หัวหน้าโครงการ)

รศ. ดร. อภินันท์ อุดมกิจ (อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ)

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ มหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลงได้ ด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ซึ่งประกอบไปด้วย รศ.ดร. อภินันท์ อุดมกิจ ศ. ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม และทีมอาจารย์และนักวิจัย กลุ่มวิจัยชีววิทยาโมเลกุลของกุ้ง สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในงานวิจัย ดร. พงโสภี อัดศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและสอนในการเตรียมเซลล์ปฐมภูมิจากรังไข่กุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ คุณสมใจ วงศ์ตรีภพ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี) และคุณบรรจง นิสภาวนิชย์ (บรรจงฟาร์ม จ. ฉะเชิงเทรา) เอื้อเฟื้อตัวอย่างกุ้งในการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คณะกรรมการจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

สุพัตรา ตีร์ตันตระกูล

Abstract

Project Code : TRG5380002

Project Title : Functional characterization of recombinant protein of Pem-GIH and its antibody
in *Penaeus monodon*

Investigator : Miss Supattra Treerattrakool

Institute of Molecular Biosciences

Mahidol University Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170

E-mail Address : tsupattra@gmail.com, supattra.tre@mahidol.ac.th

Project Period : 31 May 2010-31 May 2012

In crustacean, ovarian maturation process is controlled by an eyestalk neurohormone, gonad-inhibiting hormone (GIH). GIH is presumed to inhibit the synthesis or release/uptake of vitellogenin (Vg). Vg is a precursor of yolk protein or vitellin (Vt) that is a key protein in ovarian maturation process. Accordingly, shrimp breeding usually employs unilaterally eyestalk-ablation technique to reduce the amount of GIH and to induce ovarian maturation. Therefore, the detailed studies on GIH are important to help improve the reproduction of economically important species such as the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. This project is aimed to study biological function of GIH in inhibition of vitellogenin synthesis and to investigate the exploitation of GIH antibody to inhibit GIH activity by *in vitro* bioassay. Finally, the relationship of GIH on ovarian maturation stages of female *P. monodon* broodstock will be determined by using anti-Pem-GIH antibody.

The recombinant protein of GIH of *P. monodon* (rPem-GIH) was successfully expressed in yeast *Pichia pastoris* expression system under the control of an alcohol oxidase promoter. The amount of total proteins secreted into the induction medium from the optimal expression conditions of rPem-GIH was approximately 0.5-1 mg/l. The rPem-GIH was successfully purified by one-step of reversed-phased chromatography with Sep-Pak cartridges (C₁₈). Biological activity of rPem-GIH was determined in primary ovary cell culture derived from previtellogenic *P. monodon* broodstock. The purified rPem-GIH significantly reduced vitellogenin mRNA level about 39% when compared with the non-treated group, which is similar to the effect of partially purified eyestalk extract. Our result demonstrated that rPem-GIH expressed in *P. pastoris* had biological activity to inhibit vitellogenin synthesis in primary cell culture of ovary from *P.*

monodon, and thus suggested that the rPem-GIH possesses gonad inhibiting activity as crude eyestalk extract.

Additionally, the polyclonal antiserum against rPem-GIH (called anti-Pem-GIH antibody) showed specificity to react with GIH from the partially purified eyestalk extract and did not cross react with structurally-related proteins such as rPem-CHH1 and rPem-MIH1. The anti-Pem-GIH antibody at dilution 1:500 was able to neutralize the activity of 28.75 nM rPem-GIH to about 31.2% by *in vitro* assay in primary cell culture of ovary, thus implying that anti-Pem-GIH antibody may be used as an alternative approach for induction ovarian maturation in female broodstock of *P. monodon*. Moreover, the anti-Pem-GIH antibody was used to study the localization of GIH by the immunohistochemistry (IHC) technique in this study. The GIH signal was observed only at the sinus gland (storage site) in the optic lobe of female broodstock of *P. monodon* at various stages of ovarian development. Further determination of the level of GIH in both the eyestalk and the hemolymph of *P. monodon* female broodstock at various stages of ovarian development will help in understanding the relationship between GIH and ovarian maturation. The knowledge from this study should lead to more thoroughly understanding of reproduction mechanism in *P. monodon* that may be applied to induce ovarian maturation without eyestalk ablation in the future.

Keywords : Black tiger shrimp, vitellogenin, Primary ovary cell culture

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5380002

ชื่อโครงการ: การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนลูกผสม GIH และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH ในกิ้งกูดดำ

ชื่อนักวิจัย: นางสาวสุพัตรา ตริรัตน์ตระกูล

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ต. ศาลายา อ.พุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

E-mail Address : tsupattra@gmail.com, supattra.tre@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 31 พฤษภาคม 2553 - 31 พฤษภาคม 2555

กระบวนการพัฒนารังไข่ของสัตว์จำพวกครัสเตเชียควบคุมด้วยฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ (Gonad-inhibiting hormone; GIH) ที่อยู่บริเวณก้านตา GIH เกี่ยวข้องในกระบวนการควบคุมระบบสืบพันธุ์ โดยทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างโปรตีนไวเทลโลจีนิ (Vg) ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้นขององค์ประกอบหลักในเซลล์ไข่ การตัดตาเพื่อกำจัด GIH จึงถูกนำมาใช้เพื่อเร่งการพัฒนาของรังไข่ แม้ว่าเทคนิคการตัดก้านตานี้จะส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพของไข่น้อยลงและแม่พันธุ์กึ่งอ่อนแอในเวลาต่อมาก็ตาม ดังนั้นการศึกษาองค์ความรู้ของ GIH จึงมีความสำคัญที่จะช่วยในการกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ของสัตว์เศรษฐกิจเช่นกิ้งกูดดำให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหน้าที่ของ GIH โดยอาศัยโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จากยีสต์มาทำการทดสอบหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของไวเทลโลจีนิในระดับ mRNA ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ และทำการศึกษาค้นคว้าเบื้องต้นเกี่ยวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH แล้วนำแอนติบอดีต่อ GIH ไปทดสอบผลในการกระตุ้นการแสดงออกของไวเทลโลจีนิในระดับ mRNA ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ นอกจากนั้นจะใช้แอนติบอดีต่อ GIH ในการตรวจสอบตำแหน่งของฮอร์โมน GIH จากเนื้อเยื่อที่มีการสร้าง GIH ในกิ้งกูดดำแม่พันธุ์ที่มีระยะการพัฒนารังไข่ต่างๆ โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กึ่งในช่วงระยะต่างๆ

ในการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนลูกผสม GIH ในกิ้งกูดดำ ได้ผลิตโปรตีนลูกผสมของ GIH ของกิ้งกูดดำ (rPem-GIH) ในยีสต์ *P. pastoris* (*Pichia* expression system) ซึ่งเป็นระบบที่เหมาะสมในการผลิตฮอร์โมนลูกผสมของ eukaryotes โปรตีนลูกผสมของ GIH ที่ผลิตได้จะมีการม้วนพับที่ถูกต้องและอยู่ในรูปที่สามารถทำหน้าที่ได้ ที่มีขนาดประมาณ 9 kDa โดยมีการแสดงออกได้ดีที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 3% (v/v) เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยสามารถผลิตโปรตีนที่หลั่งออกนอกยีสต์เซลล์ได้ในปริมาณ 0.5-1 มิลลิกรัม จากเซลล์เจ้าบ้านที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จากนั้นจึงทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยหลักการ Reverse-phase chromatography โดยวิธี Solid Phase

Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่มี packing เป็น C₁₈ จากนั้นนำโปรตีนลูกผสมของ GIH บริสุทธิ์ไปทำการตรวจสอบหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนิน (Vg) ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ของ กุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ พบว่า โปรตีนลูกผสมของ GIH บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 57.5 nM สามารถลดระดับการ แสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ได้อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ประมาณ 38.6% เมื่อ เทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ GIH ที่ได้จากการ สกัดจากก้านตา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนลูกผสม GIH ที่ได้จากการแสดงออกจากยีสต์ *P. pastoris* สามารถยับยั้งการสร้าง Vg โปรตีนในเซลล์ปฐมภูมิจากรังไข่ ซึ่งบ่งชี้ว่าโปรตีนลูกผสม GIH มี หน้าที่เป็นฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนาของรังไข่เช่นเดียวกับสารสกัดที่ได้จากก้านตา ในการศึกษา ความสามารถของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH ได้เริ่ม จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH พบว่า แอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH มีความจำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม GIH และไม่สามารถจับกับโปรตีนลูกผสม CHH และ MIH ที่มีลักษณะ โครงสร้างคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีต่อ GIH มีความจำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ในก้าน ตากุ้งกุลาดำ การศึกษาเบื้องต้นพบว่าแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 สามารถจับอย่าง จำเพาะกับฮอร์โมน GIH ที่ความเข้มข้น 28.75 nM ส่งผลให้สามารถยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน ลูกผสม GIH ได้ประมาณ 31.2% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีแอนติบอดีต่อ GIH จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ แอนติบอดีต่อ GIH ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH และนำไปสู่การพัฒนารังไข่ในกุ้งกุลาดำแม่ พันธุ์ นอกจากนี้ได้ตรวจหา GIH ในเนื้อเยื่อก้านตาของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ ต่างๆโดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา และพบว่าสามารถตรวจพบตำแหน่งของ GIH บริเวณ sinus gland ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นแหล่งสะสมฮอร์โมน GIH

ในอนาคต จึงควรมีการศึกษาปริมาณฮอร์โมน GIH ในกระแสเลือดและที่สะสมที่บริเวณ sinus gland ใน optic lobe ในระยะต่างๆของการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ เพื่อที่จะเข้าใจ ความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมน GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ จะช่วยนำไปสู่ความเข้าใจ เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ และนำข้อมูลที่ได้ไปบูรณาการสู่การประยุกต์แอนติบอดีต่อ GIH ใน การกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยไม่ต้องตัดตากุ้ง

คำหลัก : กุ้งกุลาดำ, ไวเทลโลจีนิน, เซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. บทนำ	1
2. วิธีการทดลอง	4
3. ผลการทดลอง	7
4. สรุปผลและบทวิจารณ์	18
5. เอกสารอ้างอิง	21
6. output จากโครงการวิจัย	24

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

กุ้งกุลาดำยังคงเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศในอันดับต้นๆ แม้ว่าในปัจจุบันสัดส่วนการผลิตกุ้งขาวที่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าจะเพิ่มขึ้นและทดแทนการผลิตกุ้งกุลาดำ แต่กุ้งกุลาดำยังเป็นที่ต้องการในตลาดระดับพรีเมียม ดังนั้นจึงมีการส่งเสริมองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับกุ้งกุลาดำ ควบคู่กับการพัฒนาการเพาะเลี้ยง โดยอาศัยเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพเข้ามาแก้ไขปัญหาคriticalต่างๆที่เกิดขึ้นกับอุตสาหกรรมกุ้งในประเทศไทย เพื่อลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต อย่างไรก็ตามข้อจำกัดที่สำคัญประการหนึ่งสำหรับการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ พ่อแม่พันธุ์ ที่ประเทศไทยยังไม่มีสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ที่สามารถใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรมการผลิตลูกกุ้งเช่นเดียวกับกุ้งขาว จึงยังมีการใช้แม่พันธุ์กุลาดำมาจากธรรมชาติ หรือจากการเลี้ยงในบ่อดิน และในอุตสาหกรรมผลิตลูกกุ้งทั้งกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว ยังคงอาศัยวิธีตัดก้านตาในการเร่งการพัฒนารังไข่ร่วมด้วย เนื่องจากปมประสาทในบริเวณก้านตาเป็นแหล่งผลิต gonad-inhibiting hormone หรือฮอร์โมน GIH ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของไข่ นอกจากนี้ปมประสาทบริเวณก้านตายังผลิตฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการทางกายภาพของกุ้ง เทคนิคการเร่งการพัฒนารังไข่โดยการตัดก้านตา จึงทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของฮอร์โมน และเร่งให้มีการพัฒนารังไข่ตลอดเวลา ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพของไข่น้อยลงและแม่พันธุ์กุ้งอ่อนแอในเวลาต่อมา จึงไม่นิยมนำแม่พันธุ์กุ้งกลับมาใช้ในการวางไข่อีก ซึ่งเป็นการใช้ทรัพยากรกุ้งอย่างสิ้นเปลืองและไม่คุ้มค่า ส่งผลให้แม่พันธุ์กุ้งในธรรมชาติมีปริมาณลดลง รวมทั้งเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการเพาะแม่พันธุ์กุ้งโดยไม่จำเป็น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาฮอร์โมน GIH ของกุ้งกุลาดำโดยใช้ฮอร์โมนลูกผสม GIH จากยีสต์ และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ในการอธิบายถึงหน้าที่และความสัมพันธ์ของฮอร์โมน GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งในระยะต่างๆ จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นและนำไปสู่การบูรณาการ การประยุกต์ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ในการกระตุ้นให้กุ้งมีวางไข่ได้หลายครั้งตามที่ต้องการ โดยไม่ต้องตัดก้านตาแม่พันธุ์กุ้ง และเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการผลิตลูกกุ้งกุลาดำ โดยกระบวนการดังกล่าวอาจจะเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการวางไข่ในขนาด

1.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาของรังไข่ในสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชียน ถูกควบคุมด้วย Gonad-inhibiting hormone (GIH) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) [1] ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่สร้างจากปมประสาทบริเวณก้านตาในส่วนที่เรียกว่า X-organ (XO) โดยจะส่งฮอร์โมนผ่านแอกซอน (Axon) ไปเก็บสะสมใน sinus gland (SG) และฮอร์โมนนี้จะถูกส่งไปยังอวัยวะเป้าหมายโดยผ่านแองเลือด (hemolymph sinuses) บริเวณข้างเคียงของ SG [2] ฮอร์โมน GIH จัดอยู่ในกลุ่มของฮอร์โมนที่มีชื่อว่า CHH family ซึ่งเป็นกลุ่มฮอร์โมนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการทางกายภาพของกุ้ง โดยมีฮอร์โมนที่สำคัญในกลุ่มอีกสองชนิด ได้แก่ Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) ทำหน้าที่หลักในการควบคุมระดับน้ำตาล [3] และ Molt-inhibiting hormone (MIH) ทำหน้าที่ยับยั้งการลอกคราบ [4] ฮอร์โมนทั้งสามชนิดใน CHH family นี้มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกัน และมีลักษณะ

สำคัญคือมีกรดอะมิโน cysteine ในตำแหน่งอนุรักษ์จำนวน 6 ตำแหน่ง [5] ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่ของฮอร์โมนในกลุ่มนี้จะเป็นการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของฮอร์โมน CHH และ MIH อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับฮอร์โมน GIH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการควบคุมการพัฒนาของรังไข่ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ได้มีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของฮอร์โมน GIH จาก SG ของlobster *Homarus americanus* [6] พบว่าฮอร์โมน GIH ที่สกัดจาก SG มีขนาด 7-8 kDa และเมื่อนำไปทดสอบหน้าที่พบว่า ฮอร์โมน GIH บริสุทธิ์ของ *H. americanus* ผลต่อการเจริญของ oocyte ของกุ้ง *Palaeomonetes Varians* และมีการศึกษาปริมาณของฮอร์โมน GIH ใน hemolymph ของ *H. americanus* ที่มีการเจริญของรังไข่ (vitellogenic stage) ในระยะต่างๆ พบว่า *H. americanus* มีฮอร์โมน GIH ในระดับสูงเมื่ออยู่ในระยะต้นของการเจริญของรังไข่ (ระยะ immature หรือ pre-vitellogenic) และจะมีระดับต่ำสุดเมื่อรังไข่เจริญเข้าสู่ระยะ vitellogenesis จากนั้นฮอร์โมน GIH จะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อรังไข่เจริญสูงสุด (mature) ก่อนที่จะมีการวางไข่ [7] ดังนั้นฮอร์โมน GIH จึงถูกสันนิษฐานว่ามีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเจริญของไข่ในระยะต้น

กระบวนการเจริญของรังไข่ที่เรียกว่า vitellogenesis เป็นกระบวนการสร้างโปรตีนไวเทลลิน (Vt) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ yolk ในไข่ที่มีการพัฒนา [8] โดยไวเทลลิน ถูกสร้างมาจากโปรตีนตั้งต้นคือ ไวเทลโลจีนิ (Vg) ซึ่งสร้างได้ทั้งจาก parenchymal cell ใน hepatopancreas และสร้างจาก follicle cell ในรังไข่เอง [9-10] โดยโปรตีนไวเทลโลจีนิ ที่สร้างจาก hepatopancreas จะถูกลำเลียงผ่าน hemolymph ไปยังรังไข่ [11] โดยอาศัย receptor ที่จำเพาะต่อโปรตีนไวเทลโลจีนิ [12-13] จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนไวเทลลิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของโปรตีนใน oocyte [14] ได้มีการศึกษาระดับของไวเทลโลจีนิใน hepatopancreas และในรังไข่ ระหว่างกระบวนการพัฒนาของรังไข่ของกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* พบว่ามีการเพิ่มของไวเทลโลจีนิในระดับ mRNA และมีการเพิ่มของโปรตีนไวเทลลิน เมื่อรังไข่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะที่สองและสาม [15-16] ซึ่งสัมพันธ์กับระดับของโปรตีนไวเทลโลจีนิใน hemolymph [17] ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับไวเทลโลจีนิในระดับ mRNA ในรังไข่ และระดับของโปรตีนไวเทลโลจีนิใน hemolymph ภายหลังจากการกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ด้วยวิธีตัดตาในกุ้ง [15, 18] ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลจีนิสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการพัฒนาของรังไข่ได้ จึงได้มีการตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับกลไกการทำงานของฮอร์โมน GIH ในการยับยั้งการเจริญของรังไข่ว่า ฮอร์โมน GIH อาจยับยั้งกระบวนการ vitellogenesis ที่สองขั้นตอนได้แก่ ยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนิจากรังไข่/hepatopancreas และการหลั่งของไวเทลโลจีนิ จาก hepatopancreas หรือยับยั้งการนำไวเทลโลจีนิเข้าสู่รังไข่ [19]

ได้มีการศึกษาหน้าที่ของฮอร์โมนลูกผสม GIH ของ *H. americanus* ที่ได้จากการแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ต่อการสร้างโปรตีนไวเทลโลจีนิ ในรังไข่ของกุ้ง *M. japonicus* พบว่าระดับ mRNA ของโปรตีนไวเทลโลจีนิ จากชิ้นส่วนรังไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโปรตีนลูกผสม GIH อยู่ด้วย ลดลงเมื่อเทียบกับ ระดับ mRNA ของโปรตีนไวเทลโลจีนิ จากชิ้นส่วนรังไข่ที่เลี้ยงในอาหารปกติที่ไม่มีโปรตีนลูกผสม GIH [20] ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ของฮอร์โมน GIH ในการยับยั้งการ

สร้างไวเทลอจีนิในระดับ mRNA ในรังไข่ และแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน GIH สามารถทำหน้าที่ในครัสเตเชียนคนละชนิดได้อีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฮอร์โมน GIH ที่สกัดได้จากก้านตาของ *Procambarus bouvieri* ซึ่งสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนไวเทลอจีนิ ในรังไข่ของกุ้ง *Penaeus vannamei* ได้ [21] และมีข้อมูลเกี่ยวกับ GIH ที่ได้จากการทำ cDNA cloning ใน *Nephrops norvegicus* [22] และในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* [23] แต่ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ที่แน่ชัดของฮอร์โมน GIH จากสิ่งมีชีวิตทั้งสองดังกล่าว ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ผู้วิจัยและคณะได้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของฮอร์โมน GIH [24] พบว่าฮอร์โมน GIH ที่โคลนได้จากก้านตาแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ มีหน้าที่เป็นฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนารังไข่ จากการทดสอบด้วยเทคโนโลยี RNA interference โดยการใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ที่จำเพาะต่อ GIH ในการยับยั้งการสร้าง GIH ในระดับ mRNA พบว่าเมื่อมีการยับยั้งการสร้าง GIH ในระดับ mRNA จะสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของไวเทลอจีนิในระดับ mRNA เพิ่มขึ้นในรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้ง อย่างไรก็ตาม แม้อาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อ GIH จะสามารถยับยั้งการสร้างฮอร์โมน GIH ในระดับ mRNA แล้วส่งผลให้มีการพัฒนารังไข่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำได้ [25] แต่อาจยังมีฮอร์โมน GIH สะสมอยู่ที่ sinus gland ในก้านตา และ/หรือฮอร์โมน GIH ที่ถูกปล่อยออกมาใน hemolymph ที่ยังสามารถยับยั้งการพัฒนารังไข่ในช่วงแรกได้อยู่ ส่งผลให้การพัฒนารังไข่ในกุ้งแม่พันธุ์ที่ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่เกิดขึ้นช้ากว่าในกุ้งแม่พันธุ์ที่ถูกกระตุ้นให้มีการพัฒนารังไข่โดยเทคนิคการตัดตาซึ่งเป็นการทำลายฮอร์โมนที่สร้างและสะสมอยู่ในก้านตาโดยตรง ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH ที่ระดับโปรตีนจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าจะใช้ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ในกุ้งได้ดี ตัวอย่างเช่นการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ไปยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH ดังที่มีรายงานว่าแอนติบอดีสามารถยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน CHH ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มเดียวกับ GIH ได้จริง [26-27] จากแนวคิดดังกล่าว จึงจำเป็นต้องศึกษาฮอร์โมน GIH ของกุ้งกุลาดำโดยใช้ฮอร์โมนลูกผสม GIH จากยีสต์ และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ในการอธิบายถึงหน้าที่และความสัมพันธ์ของฮอร์โมน GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งในระยะต่างๆ เพื่อจะนำความรู้ที่ได้นี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ในการกระตุ้นให้กุ้งมีวางไข่ได้หลายครั้งตามที่ต้องการ โดยไม่ต้องตัดก้านตาแม่พันธุ์ในอนาคต

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ผลิตฮอร์โมนลูกผสม GIH ของ *P. monodon* ที่ได้จากการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris*
2. ศึกษาหน้าที่ของฮอร์โมนลูกผสม GIH ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนไวเทลอจีนิ ในเซลล์ปฐมภูมิรังไข่ของกุ้ง *P. monodon*
3. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH โดยแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH ในเซลล์ปฐมภูมิรังไข่ของกุ้ง *P. monodon*
4. ศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมน GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งในช่วงระยะต่างๆ โดยแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH

2. วิธีการทดลอง

2.1 การผลิตโปรตีนลูกผสม GIH ในยีสต์ *Pichia pastoris* และแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมน

ลูกผสม GIH

นำพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้น cDNA ของ GIH จากกิ้งกูดดำ เชื่อมต่ออยู่ในเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออกในยีสต์ (pPICZ α A) [25] โดยให้อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ AOX1 (Alcohol Oxidase 1) ซึ่งจะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GIH จากโปรโมเตอร์ AOX1 ได้ด้วย methanol ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Dra*I และนำเข้าสู่เซลล์ของ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71 ด้วยวิธี electroporation [28] แล้วคัดเลือก *P. pastoris* ที่มีพลาสมิดลูกผสมด้วย Zeocin ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml และทำการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม GIH ในจีโนมของยีสต์ ด้วยวิธี colony PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1 ภายหลังจากการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว จะทำการแสดงออกโดยการเหนี่ยวนำด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 3 % เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม GIH และแยกบริสุทธิ์เบื้องต้น ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 40-50% และแยกบริสุทธิ์ด้วยหลักการ Reverse-phase chromatography โดยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่มี packing เป็น C₁₈ (Sep-pak[®] C₁₈ (SPE) classic; Waters, US) ที่มีปริมาณ Acetonitrile ตั้งแต่ 20-50 % (v/v) + 0.1 % (v/v) TFA แล้ววิเคราะห์ความบริสุทธิ์และปริมาณของโปรตีนลูกผสม GIH ด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

2.2 การเตรียมสารสกัดจากก้านตาของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำ

ทำการแยก Optic lobe จากก้านตาของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ 0-1 และนำเนื้อเยื่อที่ได้มาสกัดในสารละลาย 0.9 M NaCl ที่มี 50% (v/v) Acetonitrile จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ มาปั่นแยกสารสกัดออกจากเนื้อเยื่อ ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที และนำสารละลายที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน column Sep-pak[®] C₁₈ (SPE) (Waters, US) ที่มีปริมาณ Acetonitrile ตั้งแต่ 30-60 % (v/v) + 0.1 % (v/v) TFA ภายหลังจากกำจัดสารละลาย Acetonitrile โดยวิธีการระเหย จะนำสารสกัดที่ได้ไปละลายในอาหาร 2xL15 (2X Leibovitz's L-15 medium, 1% D-Glucose, 0.5% NaCl, 6.6 mg/ml Lactalbumin) ที่มี 15%(v/v) fetal bovine serum และ 15% (v/v) shrimp meat extract และมียาปฏิชีวนะ 200 IU/ml penicillin, 200 μ g/ml streptomycin, 40 μ g/ml gentamicin sulphate เพื่อทดสอบหน้าที่ของฮอร์โมน GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ต่อไป

2.3 การทดสอบหน้าที่ของฮอร์โมนลูกผสม GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ เริ่มจากการแยกรังไข่จากแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ 1-2 และตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้มีความยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร มาล้างในอาหาร 2xL15 (2X Leibovitz's L-15 medium, 1% D-Glucose, 0.5% NaCl, 6.6 mg/ml Lactalbumin) ที่มียาปฏิชีวนะ 1,000 IU/ml penicillin, 1,000 μ g/ml streptomycin, 4 mg/ml gentamicin sulphate จำนวน 4 ครั้ง และล้างชิ้นเนื้อเยื่อในอาหาร 2xL15 (2X Leibovitz's L-15 medium, 1% D-Glucose,

0.5% NaCl, 6.6 mg/ml Lactalbumin) ที่มียาปฏิชีวนะ 2,000 IU/ml penicillin, 2,000 µg/ml streptomycin, 8 mg/ml gentamicin sulphate จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำขึ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวมาตัดด้วยกรรไกรให้มีขนาดเล็กที่สุด แล้วเติมอาหาร 2xL15 (2X Leibovitz's L-15 medium, 1% D-Glucose, 0.5% NaCl, 6.6 mg/ml Lactalbumin) ที่มี 15%(v/v) fetal bovine serum และ 15% (v/v) shrimp meat extract และมียาปฏิชีวนะ 200 IU/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin, 40 µg/ml gentamicin sulphate และย้าย cell suspension ไปในขวดที่มีแท่งแม่เหล็ก จากนั้นจึงกวน cell suspension เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากเนื้อเยื่อมากขึ้นที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาประมาณ 20-30 นาที และทิ้งให้มีการแยกชั้นระหว่างเนื้อเยื่อขนาดใหญ่เป็นเวลา 5 นาที จึงดูด cell suspension มาปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เหมาะสม จากการกายดูใต้กล้องจุลทรรศน์ และดูด cell suspension ปริมาตร 0.5 มิลลิตร ลงในภาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม และเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 วัน จึงทำการเติมโปรตีนลูกผสม GIH บริสุทธิ์ ในปริมาณต่างๆ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารสกัดจากก้านตาจากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ 0-1 จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) จากเซลล์ปฐมภูมิรังไข่ ด้วยสารสกัด Ribozol (AMRESCO, USA) และตรวจวัดระดับ mRNA ของไวเทลโลจีนิด้วยวิธี RT-PCR เปรียบเทียบกับเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากก้านตาของกุ้ง และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ เพื่อให้ทราบว่ายอร์โมนลูกผสม GIH สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไวเทลโลจีนิได้หรือไม่

2.4 การวิเคราะห์ระดับ mRNA ของไวเทลโลจีนิด้วยวิธี Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เพื่อที่จะทำการวิเคราะห์ระดับ mRNA ของไวเทลโลจีนิ (Vg) จากเซลล์ปฐมภูมิรังไข่ เริ่มจากสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ปฐมภูมิรังไข่ โดยใช้สัสด่วนสารสกัด Ribozol (AMRESCO, USA) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ต่อเซลล์ปฐมภูมิรังไข่ 1 หลุม แล้วสกัดตามวิธีดั่งเอกสารแนบของสารสกัด Ribozol (AMRESCO, USA) จากนั้นจึงสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ที่มี oligo(dT)₁₆ (ไพรเมอร์ PRT) ปริมาณ 500 นาโนโมลาร์ หลังจากนั้นนำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และนำมาวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จึงใส่สารเคมีที่ประกอบไปด้วย 1X ImProm-II™ buffer และ 3 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ และ 500 ไมโครโมลาร์ dATP, dCTP, dGTP, dTTP และ 200 units ของ ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA หลังจากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จากนั้น cDNA ของไวเทลโลจีนิถูกนำมาเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ Vg-F และ Vg-R ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 1X (NH₄)₂SO₄ buffer และ 1.5 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ และ 200 ไมโครโมลาร์ dATP, dCTP, dGTP, dTTP และ 1 units ของ Taq Polymerase (Fermentas, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ

94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ โดยปริมาณ cDNA ของไวเทลโลจีนิน จะถูก normalized โดยใช้ housekeeping gene ในที่นี้คือยีน Actin (ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ของ Actin ด้วยไพรเมอร์ Actin-F และ Actin-R โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 21 รอบ) ผลการทดลองจะแสดงเป็นการเปรียบเทียบระดับ expression ของยีน Vg ต่อ Actin

2.5 การใช้แอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

ก่อนที่จะนำแอนติบอดีต่อ GIH ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ จะต้องทำการทดสอบการจับกันของแอนติบอดีต่อ GIH กับโปรตีนลูกผสม GIH เพื่อที่จะหาปริมาณของแอนติบอดีที่พอเหมาะ โดยการทดลองในขั้นตอนนี้จะใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH ที่สร้างในกระต่ายซึ่งผลิตได้จากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย

2.5.1 ทดสอบการจับของแอนติบอดีกับโปรตีนลูกผสม GIH

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างโปรตีนลูกผสม GIH และแอนติบอดีที่จะทำให้แอนติบอดีจับกับโปรตีนลูกผสมได้ดีที่สุด โดยบ่มโปรตีนลูกผสม GIH ในปริมาณที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของไวเทลโลจีนินได้ดีที่สุดจากข้อ 2.3 กับแอนติบอดีที่เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ปั่นแยกโปรตีนลูกผสมที่จับกับแอนติบอดีและโปรตีนลูกผสมที่ไม่ถูกจับด้วยแอนติบอดี ที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งสองส่วนด้วย SDS-PAGE

2.5.2 ทดสอบผลของแอนติบอดีต่อ GIH ในการกระตุ้นการแสดงออกของไวเทลโล

จีนิในระดับ mRNA ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

บ่มโปรตีนลูกผสมกับแอนติบอดีในอัตราส่วนที่มีการจับดีที่สุดจากข้อ 2.5.1 หลังจากปั่นแยกโปรตีนลูกผสม GIH ที่จับกับแอนติบอดีออกไป แล้วนำโปรตีนลูกผสม GIH ที่เหลือมาเติมลงในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดระดับ mRNA ของไวเทลโลจีนินในเซลล์ปฐมภูมิ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ และอาหารที่มีโปรตีนลูกผสมที่ไม่ได้ผ่านการบ่มกับแอนติบอดี นอกจากนี้จะทำการทดสอบว่าแอนติบอดีต่อ GIH สามารถจับกับฮอร์โมน GIH ในก้านตากุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ (เตรียมตั้งขั้นตอนตามข้อที่ 2.2) และจะมีผลต่อการยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนินได้หรือไม่ โดยจะศึกษาในลักษณะเดียวกับโปรตีนลูกผสมคือ เปรียบเทียบระดับ mRNA ของไวเทลโลจีนินในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีสารสกัดจากก้านตาที่เหลือหลังจากบ่มกับแอนติบอดี กับระดับ mRNA ของไวเทลโลจีนินในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารปกติ และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากก้านตาที่ไม่ได้ผ่านการบ่มกับแอนติบอดีมาก่อน

2.6 ศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมน GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของกึ่งแม่พันธุ์ในระยะต่าง ๆ โดยแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH

ศึกษาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH จากเนื้อเยื่อที่มีการสร้างฮอร์โมน GIH ในกึ่งกุลาดำแม่พันธุ์ที่มีระยะการพัฒนารังไข่ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา โดยจะเตรียมชิ้นเนื้อจาก paraffin sections

2.6.1 เตรียมตัวอย่างทางอิมมูโนพยาธิวิทยา

ทำการรักษาสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ต้องการจะศึกษา (fixation and embedding) โดยการฉีดและแช่สารละลาย fixative (Davison solution) เพื่อให้สารละลาย fixative สามารถเข้าไปในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และ แช่เนื้อเยื่อในสารละลาย fixative ประมาณ 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ fix เนื้อเยื่อได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเนื้อเยื่อจะผ่านขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเครื่องอัตโนมัติโดยผ่านน้ำยาเคมีต่างๆ เช่น alcohol, xylene, paraffin และนำชิ้นเนื้อเยื่อนั้นมา embed ใน paraffin ซึ่งอุณหภูมิไม่ควรเกิน 56 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการตัด paraffin section ด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 5 ไมครอน จากนั้นทำการล้าง paraffin ที่ติดกับเนื้อเยื่อ (deparaffinization) และ rehydration เพื่อทำการย้อมในขั้นต่อไป

2.6.2 ตรวจหาแอนติเจนโดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา

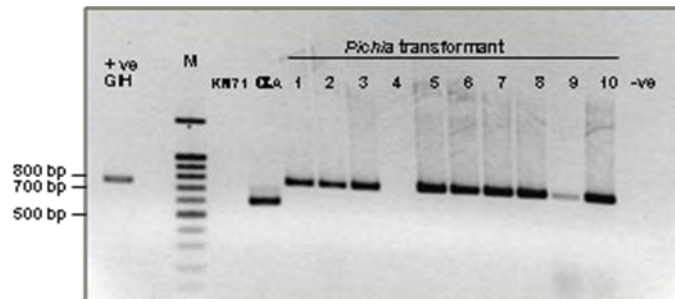
นำเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบมาป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะจากปฏิกิริยา hydrophobic bonding ระหว่าง immunoglobulin กับโปรตีนจากเนื้อเยื่อโดยใช้ 10% foetal Bovine serum จากนั้นจึงทำการเติมโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH ซึ่งใช้เป็น primary antibody และเติม secondary antibody (peroxidase-conjugated antibody) จากนั้นจึงเติม substrate (H_2O_2) และ chromagen (3, 3 diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาให้เกิดสีน้ำตาลในตำแหน่งที่มีการจับกันของฮอร์โมน GIH และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH

3. ผลการทดลอง

3.1 การผลิตโปรตีนลูกผสม GIH ในยีสต์ *Pichia pastoris*

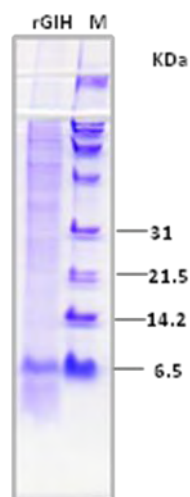
นำพลาสมิดลูกผสม GIH ที่เชื่อมต่อกับ mature GIH cDNA เข้ากับเวกเตอร์ pPICZαA เข้าสู่เซลล์ของยีสต์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ KM71 ด้วยวิธี electroporation โดยเซลล์เจ้าบ้าน *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71 สามารถแสดงออกของฮอร์โมนลูกผสม GIH ภายใต้ โปรโมเตอร์ AOX1 (Alcohol Oxidase 1) ด้วยสาร methanol และหลังฮอร์โมนลูกผสม GIH ออกจากเซลล์ยีสต์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงคัดเลือก *P. pastoris* ที่มีพลาสมิดลูกผสม GIH ด้วยยาปฏิชีวนะ Zeocin จากนั้นจึงทำการตรวจสอบ integration ของพลาสมิดลูกผสม GIH ใน genomic DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ด้วยวิธี colony PCR (รูปที่ 1) และ ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้จากการทำ Direct sequencing จากนั้นจึงทำการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GIH จากโปรโมเตอร์ AOX1 ด้วย methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและให้ปริมาณโปรตีนลูกผสม GIH ได้ดีที่สุด จากการทดสอบการแสดงออกของฮอร์โมนลูกผสม GIH ของกึ่งกุลาดำ (rPem-GIH) ในยีสต์ *P. pastoris* ในสภาวะต่างๆ พบว่าสามารถผลิตฮอร์โมนลูกผสมที่มีขนาดประมาณ 9 kDa

โดยมีการแสดงออกได้ดีที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 3% (v/v) เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตโปรตีนที่หลั่งออกนอกยีสต์เซลล์ได้ในปริมาณ 0.5-1 mg จากเซลล์เจ้าบ้านที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ทดสอบ integration ของพลาสมิดลูกผสม GIH ใน genomic DNA ของยีสต์ *P. pastoris* โดยวิธี Colony PCR

Agarose gel electrophoresis แสดง PCR product ที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1 ที่มีความยาวประมาณ 750 นิวคลีโอไทด์ ที่มีพลาสมิดลูกผสม GIH เป็น template (+ve) เปรียบเทียบกับ PCR product ที่ มีเฉพาะ genomic DNA ของยีสต์ *P. pastoris* เป็น template และ PCR product ที่มีความยาวประมาณ 570 นิวคลีโอไทด์ ที่มีพลาสมิด pPICZαA ใน genomic DNA ของยีสต์ *P. pastoris* เป็น template : M แสดงแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder; 1-10 แสดง PCR product ที่มีความยาวประมาณ 750 นิวคลีโอไทด์ ที่มีพลาสมิดลูกผสม GIH ใน genomic DNA ของยีสต์ *P. pastoris* เป็น template; -ve แสดง PCR product ของปฏิกิริยาที่ไม่ได้เติม DNA template

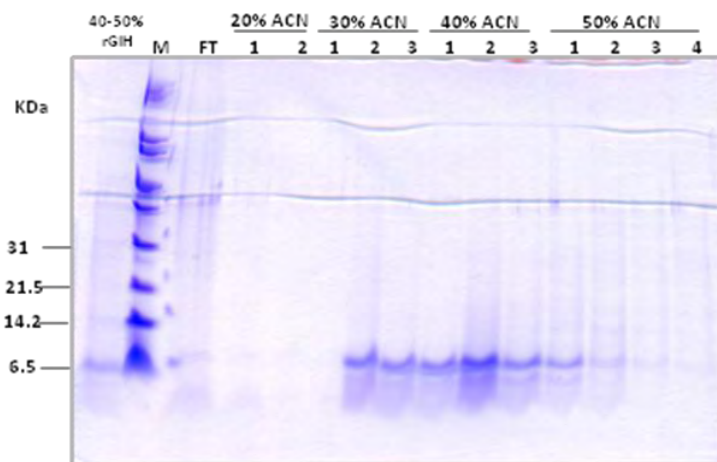


รูปที่ 2 การแสดงของฮอโมนลูกผสม GIH

SDS-PAGE แสดงโปรตีนลูกผสม GIH ที่หลั่งออกนอกเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* ปริมาณ 1 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อกระตุ้นด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 2% เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส; M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ขนาดต่างๆ

3.2 การแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนลูกผสม GIH

สามารถทำการแยกบริสุทธิ์เบื้องต้นและเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม GIH ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 40-50 % ของสารแอมโมเนียมซัลเฟต นั้นสามารถตกตะกอนโปรตีน จากนั้นจึงทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยหลักการ Reverse-phase chromatography โดยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่มี packing เป็น C₁₈ (Sep-pak® C₁₈ (SPE) classic; Waters, US) ที่มีปริมาณ Acetonitrile ตั้งแต่ 20-50 % (v/v) + 0.1 % (v/v) TFA แล้วทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และปริมาณของโปรตีนลูกผสม GIH ด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (รูปที่ 3)

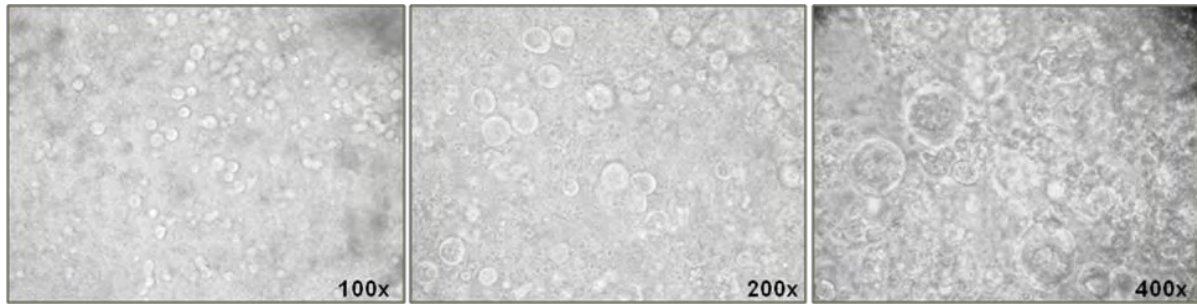


รูปที่ 3 การแยกบริสุทธิ์ของฮอร์โมนลูกผสม GIH

SDS-PAGE แสดงโปรตีนลูกผสม GIH ภายหลังจากการแยกบริสุทธิ์ โดยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่ความเข้มข้น 20-50% acetonitrile + 0.1% TFA โดยหมายเลข 1 2 และ 3 เป็นลำดับของ fraction (1 column volume/fraction); 40-50% rGIH แสดงโปรตีนลูกผสม GIH ภายหลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 40-50 %; M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ขนาดต่างๆ

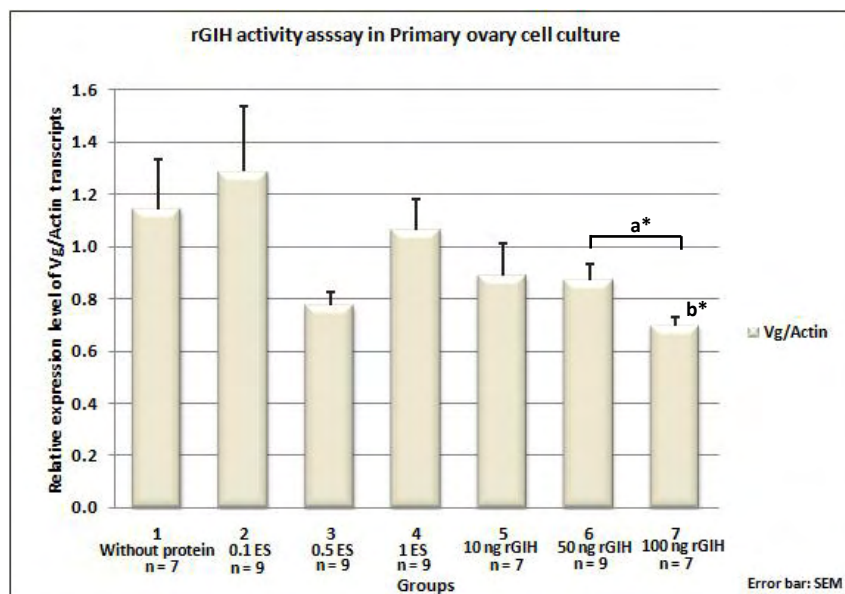
3.3 การทดสอบหน้าที่ของฮอร์โมนลูกผสม GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

เตรียมเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่บริเวณ anterior lobe และ lateral lobe จากแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ 1-2 เลี้ยงในอาหาร 2X L15 (2X Leibovitz's L-15, 1% D glucose, 0.5% NaCl and 6.66 mg/ml lactalbumin) ที่มีการเติมด้วย 15%(v/v) fetal bovine serum, 15% (v/v) shrimp meat extract ที่ใส่ antibiotic 200 IU penicillin, 200 µg/ml streptomycin และ 40 µg/ml gentamicin sulphate ภายหลังจากที่เซลล์ปฐมภูมิของรังไข่มีการยึดเกาะจานเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวน ประมาณ 2-3 วัน (รูปที่ 4) จึงเติมโปรตีนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัม และ เติมสารสกัดก้านตาของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ 1 เทียบเท่าเป็น 0.1, 0.5 และ 2 ก้านตา ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จึงสกัดแยก RNA จากเซลล์ปฐมภูมิ และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนVg ด้วยวิธี RT-PCR ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 4 เซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

เซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ จากแม่พันธุ์กึ่งกลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ 1-2 เลี้ยงในอาหาร 2X L15 ระยะเวลา 3 วัน (กำลังขยาย 100-400 เท่า); เซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม



รูปที่ 5 ผลกระทบของฮอร์โมนลูกผสม GIH ต่อการแสดงออกของไวเทลโลจีนิ (Vg) ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

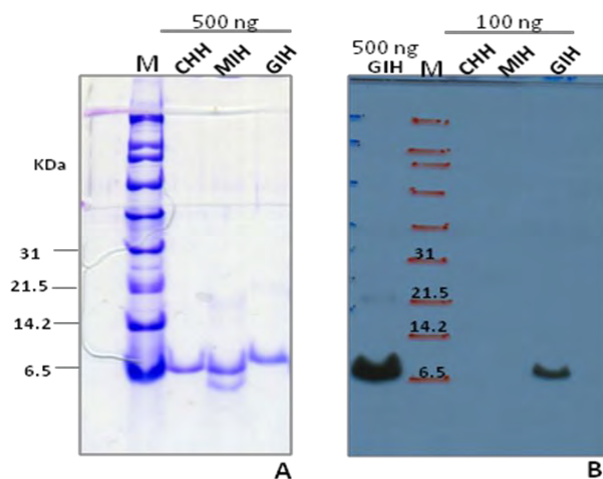
กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Vg ต่อ Actin (ค่าเฉลี่ยของระดับ transcript ของ Vg ต่อ Actin $\pm$ SEM) จากเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติ (n = 7-9) และเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ที่เติมสารสกัดก้านตาของแม่พันธุ์กึ่งกลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ 1 เทียบเท่าเป็น 0.1, 0.5 และ 1 ก้านตา (n = 9) และเติมโปรตีนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม (5.75 nM), 50 นาโนกรัม (28.75 nM) และ 100 นาโนกรัม (57.5 nM) นาโนกรัม (n = 7, 9 และ 7 ตามลำดับ); โดยมี Actin เป็น internal control; a* แสดงความแตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Independent T-test ที่ $p < 0.05$; b* แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่ม 7 เทียบกับกลุ่ม 1 เมื่อทดสอบด้วย Independent T-test ที่ $p < 0.05$

จากการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน Vg ในกลุ่มที่มีสารสกัดก้านตาของแม่พันธุ์กึ่งกลาดำ เทียบเท่าเป็น 0.5 และ 1 ก้านตา ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม และโปรตีนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัม (เทียบเท่ากับ 5.75, 28.75 และ 57.5 nM ตามลำดับ) สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่เช่นเดียวกับสารสกัดจากก้านตา และพบว่า สารสกัดก้านตาเทียบเท่าเป็น 0.5 ก้านตา และ โปรตีนลูกผสม GIH ที่ปริมาณ 100 นาโนกรัม กรัม (เทียบเท่ากับ 57.5 nM) สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน Vg ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดก้านตา และ โปรตีนลูกผสม GIH แล้วเมื่อนำ

ค่าการแสดงออกของยีน Vg ของกลุ่มที่มีโปรตีนลูกผสม GIH ที่ปริมาณ 100 นาโนกรัม เทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Independent T-test ($p < 0.05$) อีกด้วย นอกจากนี้พบว่า ค่าการแสดงออกของยีน Vg ของกลุ่มที่มีโปรตีนลูกผสม GIH ที่ปริมาณ 50 และ 100 นาโนกรัม นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \text{ value} < 0.05$ ดังนั้นโปรตีนลูกผสม GIH สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมนิยามของรังไข่ได้

3.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม GIH

ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ GIH กับโปรตีนลูกผสม GIH เปรียบเทียบกับโปรตีนลูกผสม CHH และ MIH ซึ่งโปรตีนทั้งสองมีลักษณะและโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมน GIH โดยวิธี Western blot จากการทดสอบ พบว่าแอนติบอดีต่อ GIH สามารถจับได้เฉพาะโปรตีนลูกผสม GIH และไม่สามารถจับกับโปรตีนลูกผสม CHH และ MIH (รูปที่ 6) จึงแสดงว่า แอนติบอดีต่อ GIH มีความจำเพาะต่อ GIH เท่านั้น



รูปที่ 6 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ GIH

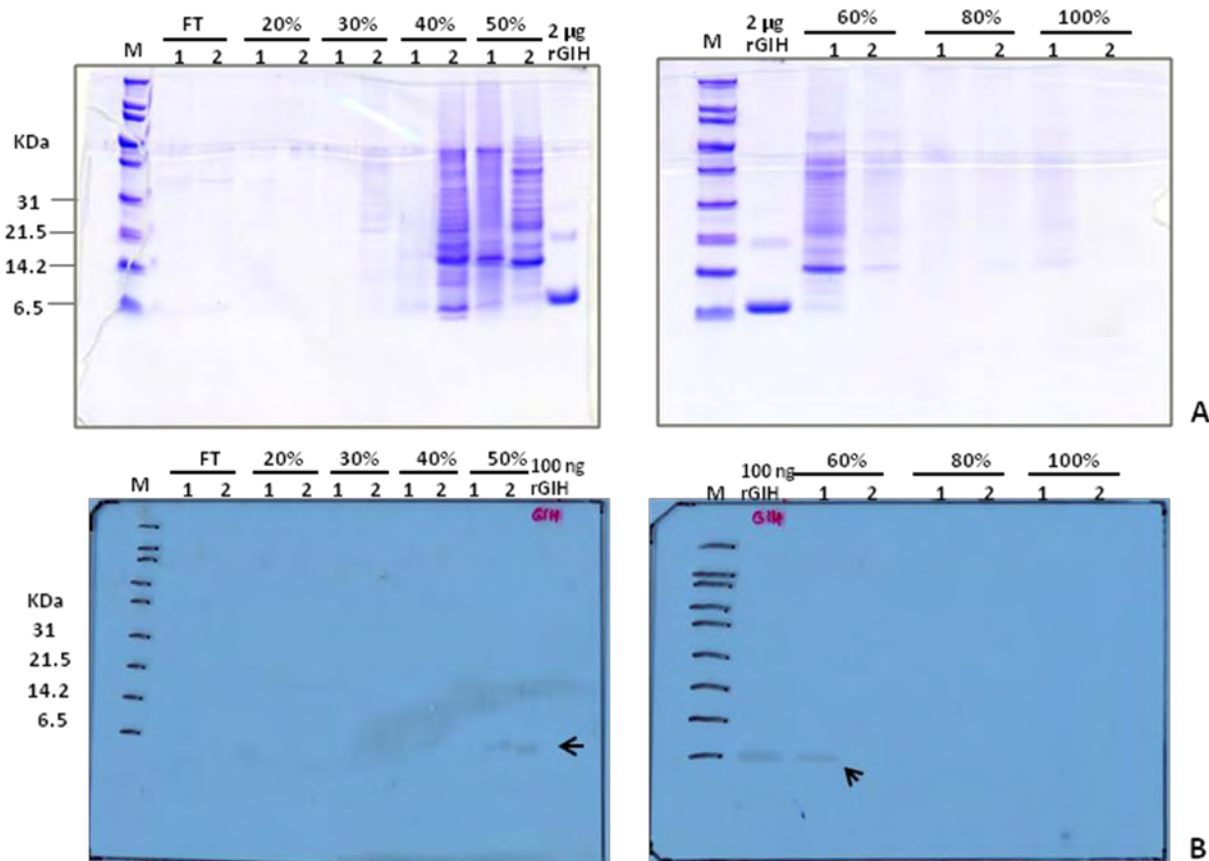
A : SDS-PAGE แสดงโปรตีนลูกผสม CHH MIH และ GIH ปริมาณ 500 นาโนกรัม

B : फिल्म X-ray ภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยมีโปรตีนลูกผสม CHH MIH และ GIH ปริมาณ 100 นาโนกรัม และโปรตีนลูกผสม GIH ปริมาณ 500 นาโนกรัม; แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:10,000

M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ขนาดต่างๆ

3.5 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH จากสารสกัดก้านตา

ทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ GIH กับฮอร์โมน GIH จากสารสกัดก้านตากุ้งกุลาดำ โดยวิธี Western blot ก่อนที่จะนำแอนติบอดีต่อ GIH ไปทดสอบในขั้นต่อไป ในการทดสอบนี้ได้ใช้ optic lobe จากก้านตากุ้งกุลาดำอายุประมาณ 4 เดือน จำนวน 10 ก้านตา มาทำการสกัดตั้งขั้นตอนที่ 2.2 จากการทดสอบ พบว่าแอนติบอดีต่อ GIH สามารถจับได้เฉพาะกับโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนลูกผสม GIH (รูปที่ 7) จึงแสดงว่า แอนติบอดีต่อ GIH มีความจำเพาะต่อ ฮอร์โมน GIH เท่านั้น



รูปที่ 7 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ GIH

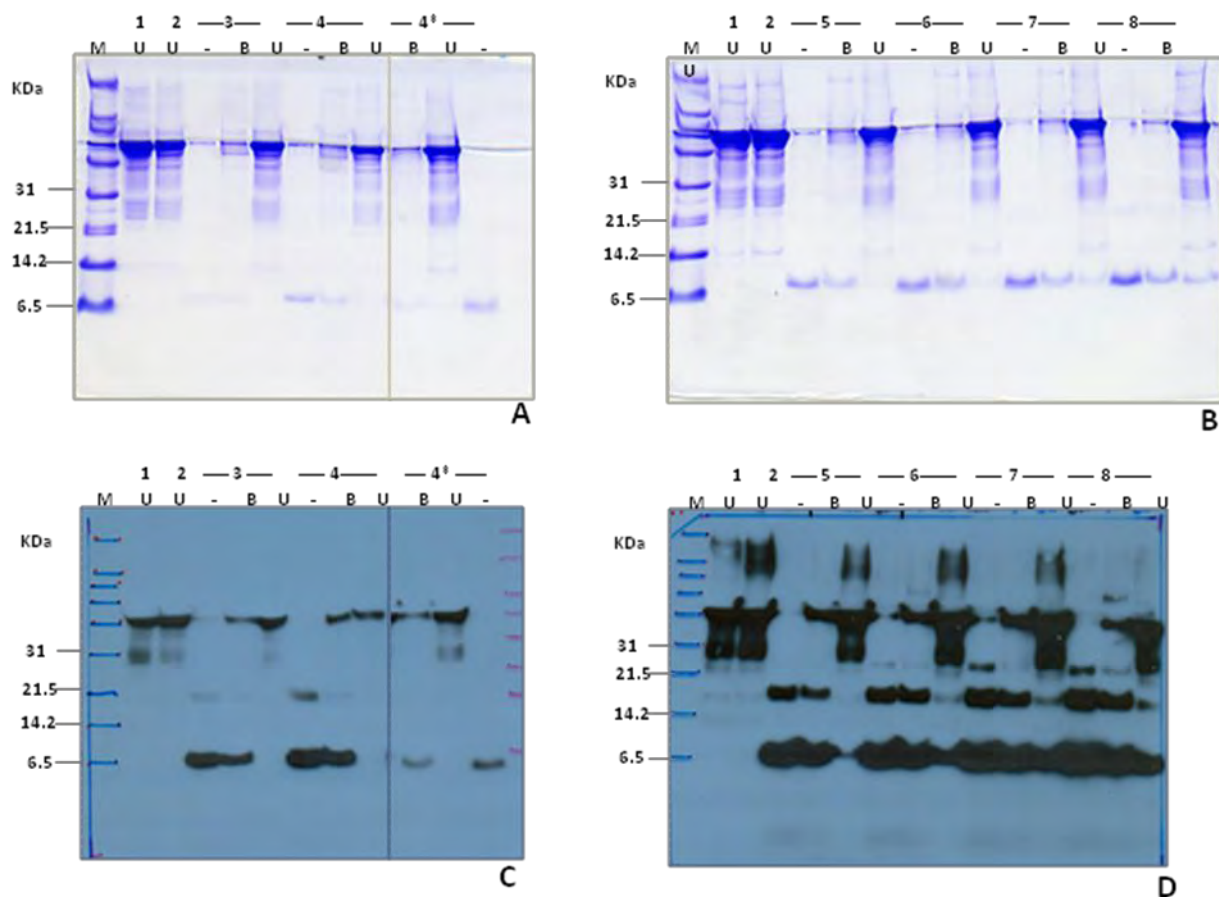
A : SDS-PAGE แสดงโปรตีนสารสกัดก้านตาเทียบเท่า 10 ก้านตากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน ภายหลังจากการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่ความเข้มข้น 20-100% acetonitrile + 0.1% TFA โดยหมายเลข 1 และ 2 เป็นลำดับของ fraction (1 column volume/fraction); โปรตีนลูกผสม GIH ปริมาณ 2 ไมโครกรัม

B : फिल्म X-ray ภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยมีโปรตีนสารสกัดก้านตาเทียบเท่า 10 ก้านตากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน ภายหลังจากการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี Solid Phase Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่ความเข้มข้น 20-100% acetonitrile + 0.1% TFA โดยหมายเลข 1 และ 2 เป็นลำดับของ fraction (1 column volume/fraction); โปรตีนลูกผสม GIH ปริมาณ 100 นาโนกรัม; แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:10,000

M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ขนาดต่างๆ

3.6 การทดสอบการจับของแอนติบอดีกับโปรตีนลูกผสม GIH

บ่มโปรตีนลูกผสม GIH ปริมาณต่างๆ (50, 100, 200, 300, 400 และ 500 นาโนกรัม) กับแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ปั่นแยกโปรตีนลูกผสมที่จับกับแอนติบอดี (B-Bound) และโปรตีนลูกผสมที่ไม่ถูกจับด้วยแอนติบอดี (U-Unbound) แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งสองส่วนด้วย SDS-PAGE และ Western blot ดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่า แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 สามารถจับโปรตีนลูกผสม ปริมาณ 50 -100 นาโนกรัม ในส่วน Bound และไม่สามารถตรวจพบโปรตีนลูกผสมในส่วน Unbound ขณะที่สามารถตรวจพบโปรตีนลูกผสม GIH ในส่วน Unbound ของโปรตีนลูกผสม GIH ที่ปริมาณต่างๆ (200, 300, 400 และ 500 นาโนกรัม)



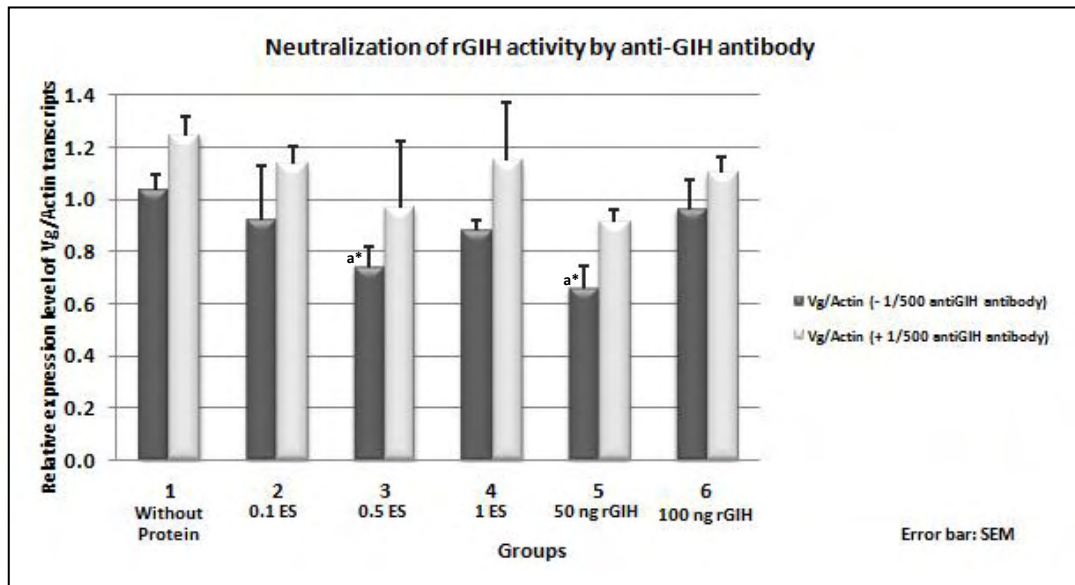
รูปที่ 8 ทดสอบจับของแอนติบอดีกับโปรตีนลูกผสม GIH

A-B แสดงการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE; **C-D** ภาพ X-ray หลังจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:10,000; M แสดงโปรตีนมาตรฐานที่ขนาดต่างๆ; - แสดงถึงโปรตีนลูกผสม GIH ที่ปริมาณต่างๆที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดีต่อ GIH ความเข้มข้น 1:500; B= Bound fraction แสดงถึงโปรตีนลูกผสม GIH ที่จับกับแอนติบอดี; U = Unbound fraction แสดงถึงโปรตีนลูกผสมที่ไม่ถูกจับด้วยแอนติบอดี

1: Pre-immune serum ความเข้มข้น 1:500; 2: แอนติบอดีต่อ GIH ความเข้มข้น 1:500; 3-8: โปรตีนลูกผสม GIH จาก *E. coli* ปริมาณ 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 นาโนกรัม ตามลำดับ; 4*: โปรตีนลูกผสม GIH บริสุทธิ์จาก *P. pastoris* ปริมาณ 100 นาโนกรัม

3.7 ทดสอบผลของแอนติบอดีต่อ GIH ในการกระตุ้นการแสดงออกของไวเทลโลจีนินในระดับ mRNA ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

นำแอนติบอดีต่อ GIH ความเข้มข้น 1:500 ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ โดยนำสารสกัดจากก้านตา และฮอร์โมนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปทำการจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารส่วนที่ไม่มีการจับกันระหว่างฮอร์โมน GIH และแอนติบอดีต่อ GIH มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ เทียบกับ ฮอร์โมนลูกผสม GIH และสารสกัดจากก้านตา จากการทดลอง (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ผลกระทบของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH ต่อการแสดงออกของไวเทลโลจีนิ (vg) ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่

กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Vg ต่อ Actin (ค่าเฉลี่ยของระดับ transcript ของ Vg ต่อ Actin $\pm$ SEM) จากเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติ ที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 ($n = 3$) และเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ที่เติมโปรตีนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 นาโนกรัม ที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 ($n = 3$) และ เติมนสารสกัดก้านตาของแม่พันธุ์งูกุลดำที่มีการพัฒนาไข่ในระยะ 1 เทียบเท่าเป็น 0.1, 0.5 และ 1 ก้านตา ที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 ($n = 3$); โดยมี Actin เป็น internal control; ^{a*} แสดงความแตกต่างทางสถิติเทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติ ที่ไม่มีแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 เมื่อทำการทดสอบด้วย Independent T-test ที่ $p < 0.05$

พบว่า การแสดงออกของยีน Vg ในกลุ่มที่มีสารสกัดก้านตาของแม่พันธุ์งูกุลดำ เทียบเท่าเป็น 0.5 และ 1 ก้านตา ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม แล้วยังพบว่า กลุ่มที่มีสารสกัดก้านตาเทียบเท่าเป็น 0.5 ก้านตา นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Independent T-test ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่า กลุ่มสารสกัดก้านตาที่มีการแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH มีการแสดงออกของ Vg เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ที่มีเฉพาะสารสกัดก้านตาของแม่พันธุ์งูกุลดำที่ความเข้มข้นต่างๆ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Independent T-test ($p > 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Vg ในกลุ่มโปรตีนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า โปรตีนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม (เทียบกับ 28.75 nM) สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ได้ดีที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Independent T-test ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และโปรตีนลูกผสม GIH ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 นาโนกรัม (เทียบกับ 28.75 และ 57.5 nM ตามลำดับ) ที่มีการแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ เทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ที่มีฮอร์โมนลูกผสม GIH เพียงอย่างเดียว แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Independent T-test ($p > 0.05$) ซึ่งให้ผล เช่นเดียวกับสารสกัดจาก

ก้านตา ดังนั้นแอนติบอดีต่อ GIH สามารถจับอย่างจำเพาะกับฮอร์โมน GIH ส่งผลให้สามารถยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนลูกผสม GIH และ ฮอร์โมน GIH จากสารสกัดจากก้านตากุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะที่ 1 ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ได้

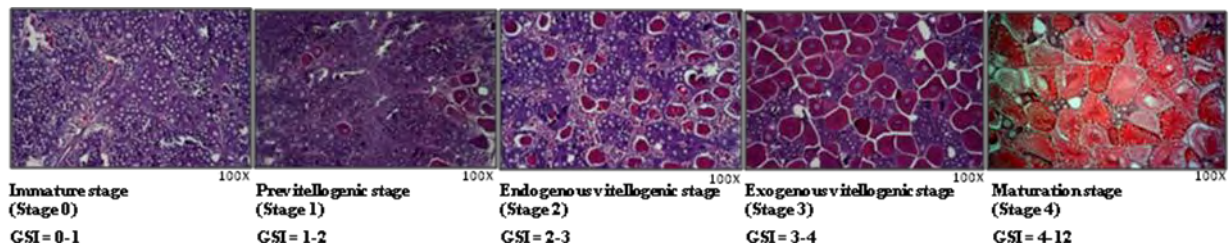
3.8 ศึกษาความสัมพันธ์ของฮอร์โมน GIH ต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งแม่พันธุ์ในระยะต่าง ๆ โดยแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเลี้ยงที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะต่าง ๆ โดยธรรมชาติจากทางศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง เพื่อศึกษาตรวจหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยการศึกษาวิจัยนี้ได้จำแนกระยะต่าง ๆ ในการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำดังนี้

3.8.1 การจำแนกระยะต่าง ๆ ในการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

ในการศึกษาวิจัยนี้จะการจำแนกระยะต่าง ๆ ในการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยการแบ่งตามลักษณะภายนอก ค่า GSI (Gonadosomatic index) และ histology สามารถแบ่งได้ 5 ระยะ (รูปที่ 10) ดังนี้

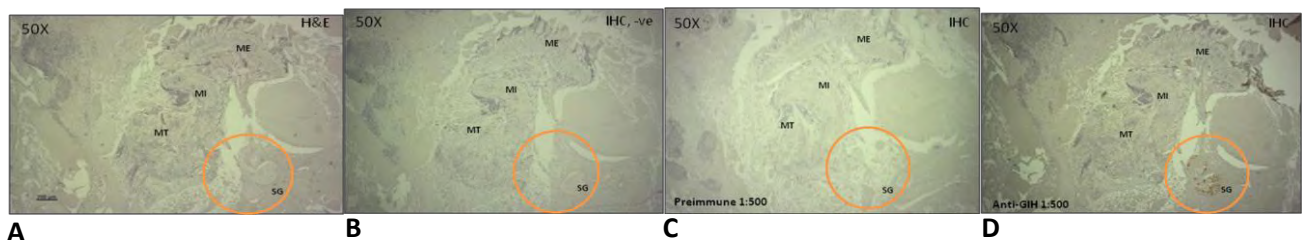
1. ระยะ Immature (Stage 0; GSI = 0-1) รังไข่มีลักษณะใสและมีขนาดเล็ก และพบว่ามีเซลล์ oocyte ขนาดเล็ก และมี nucleus ขนาดใหญ่
2. ระยะ Previtellogenic (Stage 1; GSI = 1-2) รังไข่มีสีขาวขุ่นจนถึงขาวอมสีเหลืองและมีขนาดเล็ก และพบว่ามีเซลล์ oocyte ขนาดเล็กประมาณ 60 ไมครอน โดยเซลล์ oocyte จะมี nucleus ขนาดใหญ่และ cytoplasm เริ่มขยายขนาดใหญ่ขึ้น และย้อมติดสีม่วงของ Hematoxylin
3. ระยะ Endogenous vitellogenic (Stage 2; GSI = 2-3) รังไข่มีสีเหลืองจนถึงสีเหลืองอมเขียวและมีขนาดใหญ่ขึ้น และภายในรังไข่จะพบเซลล์ oocyte ขนาดประมาณ 60-100 ไมครอนสัดส่วนมากขึ้น โดยเซลล์ oocyte เหล่านี้จะมี cytoplasm ขยายขนาดใหญ่ขึ้นกว่าระยะ Previtellogenic และย้อมติดสีแดงของ eosin มากขึ้น โดยที่ยังคงเห็น nucleus ได้ชัดเจน
4. ระยะ Exogenous vitellogenic (Stage 3; GSI = 3-4) รังไข่มีสีเขียวอ่อนและมีขนาดใหญ่ขึ้น และภายในรังไข่จะพบเซลล์ oocyte ขนาดประมาณ 250 ไมครอนสัดส่วนมากขึ้น โดยเซลล์ oocyte เหล่านี้จะมี cytoplasm ขยายขนาดใหญ่ขึ้นกว่าระยะ Endogenous vitellogenic และเริ่มพบ droplet ของ lipid อยู่ภายใน cytoplasm นอกจากนี้ยังพบว่า nucleus มีขนาดเล็กลง
5. ระยะ Maturation (Stage 4; GSI = 4-12) รังไข่มีสีเขียวเข้มถึงสีเขียวมืดและมีขนาดใหญ่ขึ้น และภายในรังไข่จะพบเซลล์ oocyte ขนาดประมาณ 340 ไมครอนสัดส่วนมากขึ้น โดยเซลล์ oocyte เหล่านี้จะมี cytoplasm ขยายขนาดใหญ่ขึ้นกว่าระยะ Exogenous vitellogenic และเริ่มพบ cortical rod อยู่รอบๆ cytoplasm นอกจากนี้ยังพบว่า nucleus มีขนาดเล็กลงมากโดยเห็นเป็นจุด หรือไม่สามารคมองเห็นได้



รูปที่ 10 การพัฒนารังไข่ในระยะต่าง ๆ ของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำ

3.8.2 ศึกษาหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่มี การพัฒนารังไข่ในระยะต่าง ๆ โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา

จากการศึกษาตัวอย่างของ optic lobe ของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะ Endogenous vitellogenic (รูปที่ 11) เพื่อตรวจหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe โดยอาศัย เทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยานั้น จะใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1: 500 พบว่า สามารถตรวจพบตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำเฉพาะบริเวณ sinus gland ซึ่งเป็นแหล่งสะสมฮอร์โมน GIH แต่ยังไม่สามารถใช้เทคนิคนี้ตรวจหา ตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ในบริเวณ Medulla terminalis (MT) ซึ่งเป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมน GIH ได้ โดยเปรียบเทียบบริเวณ เดียวกันของเนื้อเยื่อจากตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH (IHC, -ve) และ ตัวอย่างที่ใส่ serum ของกระต่ายก่อนการกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อ GIH (Preimmune) ที่ความเข้มข้น 1: 500 ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม จึงกล่าวได้ว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH นั้นมีความจำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ใน optic lobe

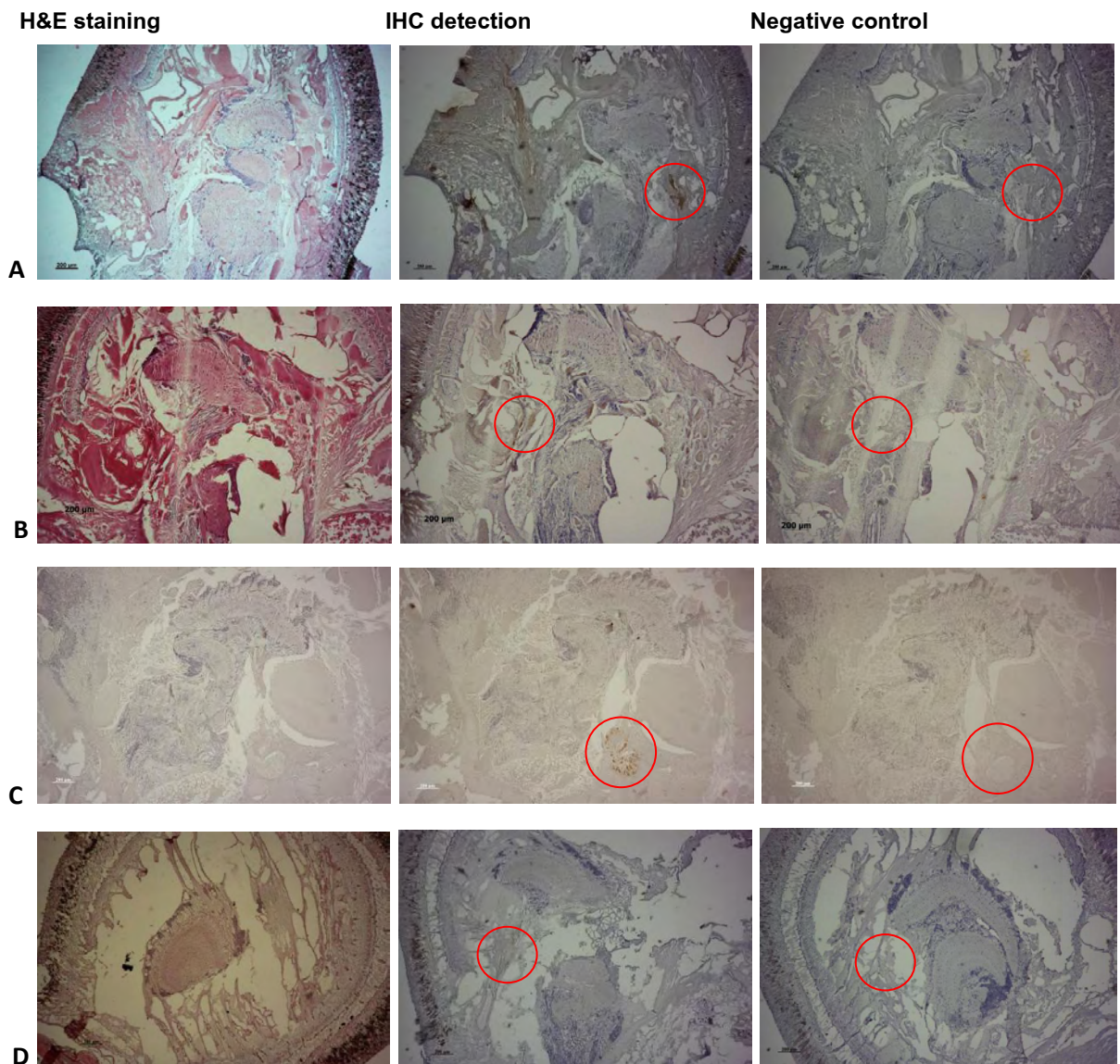


รูปที่ 11 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำในระยะ Endogenous vitellogenic โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH

A แสดงเนื้อเยื่อของ optic lobe ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ eosin; **B-D** แสดงเนื้อเยื่อของ optic lobe ที่ตรวจหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH โดย **B** แสดงเนื้อเยื่อจากตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH (IHC, -ve); **C** แสดงเนื้อเยื่อจากตัวอย่างที่ใส่ serum ของกระต่ายก่อนการกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อ GIH (Preimmune) ที่ความเข้มข้น 1: 500 โดยทั้งสองกลุ่มใช้เป็นตัวควบคุม และ **D** แสดงเนื้อเยื่อของ optic lobe ที่โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1: 500

(MT ย่อมาจาก Medulla terminalis; MI ย่อมาจาก Medulla interna; ME ย่อมาจาก Medulla externa และ SG ย่อมาจาก Sinus gland)

จากนั้นจึงทำการการตรวจหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กิ้งกูดที่มีการพัฒนาไข่ในระยะต่างๆ โดยวิธีข้างต้น พบว่าสามารถตรวจพบตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กิ้งกูดเฉพาะบริเวณ sinus gland ของแม่พันธุ์กิ้งกูดที่มีการพัฒนาไข่ในระยะ Immature stage, previtellogenic stage, endogenous vitellogenic stage, exogenous vitellogenic stage แสดงดังรูปที่ 12 แต่จากการศึกษาตัวอย่าง optic lobe ของแม่พันธุ์กิ้งกูด



รูปที่ 12 แสดงการตรวจหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กิ้งกูดที่มีการพัฒนาไข่ในระยะต่างๆ โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH

A-D แสดงเนื้อเยื่อของ optic lobe ของแม่พันธุ์กิ้งกูดระยะ Immature stage, previtellogenic stage, endogenous vitellogenic stage, exogenous vitellogenic stage ตามลำดับ

H&E staining แสดงเนื้อเยื่อของ optic lobe ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ eosin, IHC detection แสดงเนื้อเยื่อของ optic lobe ที่โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1: 500, Negative control แสดงเนื้อเยื่อจากตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH (IHC, -ve)

กลาดำแต่ละระยะของการพัฒนารังไข่ ที่มีจำนวนมากขึ้น ($n = 3-5$) พบว่าไม่สามารถเชื่อมความสัมพันธ์ของปริมาณฮอร์โมน GIH (โดยดูจากความเข้มของสีน้ำตาลที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา ในตำแหน่งที่มีการจับกันของฮอร์โมน GIH และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GIH) กับระยะต่างๆของการพัฒนารังไข่ได้ อาจเนื่องจากเทคนิคนี้สามารถตรวจพบ ปริมาณฮอร์โมน GIH เฉพาะบริเวณ sinus gland ซึ่งเป็นแหล่งสะสม แต่ยังไม่สามารถตรวจหา ตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ในบริเวณ Medulla terminalis (MT) ซึ่งเป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมน GIH ได้

4. สรุปผลและบทวิจารณ์

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักคือ ศึกษาหน้าที่ของโปรตีนลูกผสม GIH ในกิ้งกูดดำ จึงผลิตโปรตีนลูกผสมของฮอร์โมน GIH ของกิ้งกูดดำ (rPem-GIH) ในยีสต์ *P. pastoris* (*Pichia* expression system) เนื่องจากเป็นระบบที่เหมาะสมในการผลิตฮอร์โมนลูกผสมของ eukaryotes โดยโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จะมีการม้วนพับที่ถูกต้องและอยู่ในรูปที่สามารถทำหน้าที่ได้ เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า rPem-GIH ที่ผลิตได้จาก *E. coli* จะอยู่ในสภาพที่ไม่ละลายในน้ำ (Inclusion bodies) ในปริมาณ 12 มิลลิกรัม จากเซลล์เจ้าบ้านที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร [25] แม้ว่า rPem-GIH ที่ผลิตได้จาก *E. coli* จะมีปริมาณมากกว่า แต่โครงสร้างโปรตีนที่ได้นั้นไม่ถูกต้อง ต้องทำการละลายโปรตีนด้วยสารละลายต่างๆ และพบว่า rPem-GIH นั้นจะมีโครงสร้างทั้งที่ถูกต้องและไม่ถูกต้อง ทำให้ส่งผลถึงการศึกษาน้ำที่ของฮอร์โมนลูกผสมดังกล่าว ประกอบกับมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า มีการศึกษาน้ำที่ของโปรตีนลูกผสมของฮอร์โมนในกลุ่ม CHH family ของกิ้งกูดดำ จากยีสต์ *P. pastoris* เช่นกัน โดยพบว่าฮอร์โมน CHH [29] และ ฮอร์โมน MIH [30] ของกิ้งกูดดำที่ผลิตได้จากยีสต์ *P. pastoris* นั้นสามารถทำหน้าที่ในการควบคุมระดับน้ำตาลและยับยั้งการลอกคราบได้ตามลำดับ การผลิต rPem-GIH ในยีสต์ *P. pastoris* ในการศึกษาวิจัยนี้ พบว่าฮอร์โมนลูกผสมที่ได้มีขนาดประมาณ 9 kDa โดยมีการแสดงออกได้ดีที่สุดเมื่อกระตุ้นด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 3% (v/v) เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตโปรตีนที่หลั่งออกนอกยีสต์เซลล์ได้ในปริมาณ 0.5-1 มิลลิกรัม จากเซลล์เจ้าบ้านที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร เนื่องจาก rPem-GIH ที่ผลิตได้จากยีสต์ *P. pastoris* มีปริมาณน้อยและมีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นจากเซลล์ยีสต์จำนวนมาก จึงเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน rPem-GIH และทำการแยกบริสุทธิ์เบื้องต้น ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 40-50 % จากนั้นจึงทำการแยกบริสุทธิ์ของโปรตีน rPem-GIH เพื่อให้ได้ rPem-GIH บริสุทธิ์ เพื่อจะนำไปศึกษาน้ำที่ต่อไป จากการศึกษาแยกบริสุทธิ์นั้นได้อาศัยหลักการ อาทิเช่น การแยกบริสุทธิ์โดยแยกตามขนาดของโปรตีน (Size exclusion chromatography) โดยนำโปรตีนผ่านคอลัมน์ Superdex 75 พบว่า โปรตีน rPem-GIH นั้นได้ติดมากับโปรตีนที่มีโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ และวิธีดังกล่าวนี้ทำให้ได้โปรตีนที่มีความเจือจางมาก จึงได้ลองเปลี่ยนมาทำการแยกบริสุทธิ์ ด้วยหลักการ Ion exchange chromatography ทั้งคอลัมน์ที่เป็นประจุบวก (MonoS column) และประจุลบ (Resource Q column) พบว่าไม่สามารถแยกโปรตีน rPem-GIH จากโปรตีนอื่นจากเซลล์ยีสต์ได้ จึงได้ลองใช้หลักการ Reverse Phase chromatography ผ่านคอลัมน์ C_{18} ซึ่งหลักการนี้ ได้มีรายงานว่าสามารถใช้หลักการดังกล่าวใน

การแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนลูกผสมของ CHH [29] แต่เนื่องจากขณะที่ทำการวิจัย พบว่าเครื่องแยกบริสุทธิ์ (HPLC) บางส่วนไม่สามารถทำงานได้ จึงทำให้เกิดปัญหาในการแยกบริสุทธิ์ด้วยหลักการ Reverse Phase chromatography และไม่สามารถหาเครื่องแยกบริสุทธิ์ที่สามารถใช้ได้กับ คอลัมน์ C₁₈ (Phenomenex Jupiter C₁₈ column; Phenomenex, 5 µ particle, 300°A pore size, 250 x 4.6 mm.) ที่สามารถแยกบริสุทธิ์ฮอร์โมนลูกผสมในกลุ่ม CHH family ทดแทนได้ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงปรับเปลี่ยนการแยกบริสุทธิ์โดยใช้วิธี Solid Phase Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่มี packing เป็น C₁₈ ซึ่งยังคงเป็นหลักการ Reverse Phase chromatography จากการศึกษาวิจัย พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมของฮอร์โมน GIH ที่ความเข้มข้น 30-50% acetonitrile + 0.1% TFA (รูปที่ 3) ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้นอกจากจะสามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีน rPem-GIH จากโปรตีนอื่นจากเซลล์ยีสต์ได้ ยังมีข้อดีคือประหยัดเวลาและสารเคมี แล้วยังสะดวกเมื่อเทียบกับการใช้เครื่องแยกบริสุทธิ์ (HPLC)

นอกจากนั้นแล้วคณะผู้วิจัยได้ทำการเตรียมตัวอย่าง สารสกัดจากก้านตาและทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้วิธีเดียวกันกับการแยกบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมของฮอร์โมน GIH เพื่อนำสารสกัดมาใช้เป็นกลุ่มควบคุม (Positive control) ในการตรวจสอบหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนิน (Vg) ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ของกิ้งกูด้าแม่พันธุ์ จากขั้นตอนการทดสอบวิธีเตรียมสารสกัดจากก้านตา โดยใช้กิ้งกูด้าอายุ 4 เดือน (รูปที่ 7) พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถแยกบริสุทธิ์บางส่วนของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของก้านตา และเพิ่มสัดส่วนให้มีปริมาณฮอร์โมน GIH สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสัดส่วนของโปรตีนทั้งหมดของ optic lobe ซึ่งคาดว่าจะเป็นรายงานแรกที่สามารถตรวจพบฮอร์โมน GIH จากก้านตาด้วยลำดับขั้นตอนที่ไม่ยากใช้จำนวนตัวอย่างน้อย และสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Immunodetection ด้วย Western blot analysis จากนั้นจึงได้ทำการเตรียมตัวอย่างจากสารสกัดจากก้านตาแม่พันธุ์กิ้งกูด้าที่มีระยะการพัฒนารังไข่ ระยะที่ 1 เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (Positive control) ในการตรวจสอบหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนิน (Vg) ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ของกิ้งกูด้าแม่พันธุ์ต่อไป

เมื่อทำการทดสอบหน้าที่ของโปรตีนลูกผสมของฮอร์โมน GIH บริสุทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไวเทลโลจีนิน (Vg) ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ของกิ้งกูด้าแม่พันธุ์ (รูปที่ 5) พบว่าโปรตีนลูกผสม rPem-GIH ที่ปริมาณ 28.75 nM และ 57.5 nM สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ได้ประมาณ 23.71% และ 38.6% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ปกติที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้เปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ในการศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน Vg ในรังไข่ของกิ้ง *M. japonicus* จากฮอร์โมนลูกผสม GIH ของ *H. americanus* [20] ซึ่งทำการแสดงออกของโปรตีน rHoa-VIH ในแบคทีเรีย *E. coli* และนำโปรตีนที่ผลิตได้ไปทำปฏิกิริยา amidation ที่ปลายด้าน C terminal ของโปรตีน เพื่อให้มีโครงสร้างที่คล้ายกับฮอร์โมน CHH family type I ที่คาดว่าจำเป็นต่อ biological activity พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน Vg จากชิ้นส่วนรังไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโปรตีนลูกผสม GIH ปริมาณ 40 nM และ 400 nM ลดลงเมื่อเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน Vg จากชิ้นส่วนรังไข่ที่เลี้ยงในอาหารปกติที่ไม่มีโปรตีนลูกผสม GIH ประมาณ 20.9% และ 49.1% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เพอร์เซ็นต์การลดของระดับการแสดงออกของยีน Vg ที่ใกล้เคียงกัน

นั้น จะใช้ปริมาณโปรตีนลูกผสม rHoa-VIH บริสุทธิ์ เป็นสองเท่าของโปรตีนลูกผสม rPem-GIH บริสุทธิ์ การศึกษาวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสมของฮอร์โมน GIH ที่ได้จากการแสดงออกในยีสต์และทำแยกบริสุทธิ์โดยใช้วิธี Solid Phase Extraction (SPE) แบบ Reverse phase ที่มี packing เป็น C₁₈ สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ของกิ้งกูดแม่พันธุ์ได้เช่นเดียวกับฮอร์โมน GIH ที่ได้จากสารสกัดจากก้านตา นอกจากนี้ พบว่าโปรตีนลูกผสมที่ได้จากการแสดงออกในยีสต์และผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีข้างต้น นั้นมีโครงสร้างที่มีการม้วนพับที่ถูกต้อง และอยู่ในรูปที่สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน Vg ได้ดีกว่าโปรตีนลูกผสมที่ได้จากการแสดงออกในแบคทีเรีย เมื่อเทียบกับปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ของกิ้งกูดแม่พันธุ์ในศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ต่างๆในรังไข่ของกิ้งกูดแม่พันธุ์ได้

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าเบื้องต้นเกี่ยวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ของกิ้งกูดแม่พันธุ์ (แอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH สำหรับการศึกษาวิจัย คือโพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH ที่ผลิตได้จากกระต่าย) ในแง่ ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ GIH พบว่า แอนติบอดีต่อ GIH มีความจำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม GIH เท่านั้น และไม่สามารถจับกับโปรตีนลูกผสม CHH และ MIH ที่มีโปรตีนโครงสร้างคล้ายคลึงกันได้ (รูปที่ 6) และพบว่าแอนติบอดีต่อ GIH มีความจำเพาะต่อฮอร์โมน GIH ในก้านตากิ้งกูดแม่พันธุ์ (รูปที่ 7 และ 11) จึงได้นำแอนติบอดีต่อ GIH ไปสู่การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH โดยแอนติบอดีต่อฮอร์โมน GIH ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่ (รูปที่ 9) พบว่าแอนติบอดีต่อ GIH ที่ความเข้มข้น 1:500 สามารถจับอย่างจำเพาะกับฮอร์โมน GIH และฮอร์โมน GIH จากสารสกัดก้านตาของแม่พันธุ์กิ้งกูดแม่พันธุ์ ส่งผลให้สามารถยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH โดยมีระดับการแสดงออกของยีน Vg ในเซลล์ปฐมภูมิของรังไข่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีแอนติบอดีต่อ GIH จึงอาจกล่าวได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อ GIH ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH และนำไปสู่การพัฒนารังไข่ในกิ้งกูดแม่พันธุ์ เนื่องจากในการศึกษาวิจัยนี้ได้ใช้โพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH ที่ผลิตในกระต่าย จึงควรจะทำการทดสอบซ้ำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH แทนโพลิโคลนอลแอนติบอดี และเมื่อได้ผลการทดลองที่มีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ชัดเจน ก็จะนำไปสู่การฉีดโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH เข้าไปในตัวกิ้งกูดแม่พันธุ์ เพื่อไปยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH ในกระสเลือกและที่สะสมที่บริเวณ Sinus gland ใน Optic lobe แล้วส่งผลให้มีกระตุ้นการพัฒนารังไข่โดยไม่ตัดตา ซึ่งจะสามารถช่วยเสริมผลจากการใช้อาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน GIH (GIH-dsRNA) ในการยับยั้งการสร้างฮอร์โมน GIH ที่บริเวณ Medulla terminalis (MT) ใน Optic lobe ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของกิ้งกูดแม่พันธุ์โดยไม่ตัดตา [31] โดยคาดว่าจะการฉีดโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ GIH เข้าไปในตัวกิ้งกูดแม่พันธุ์ เพื่อไปยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH นั้นจะสามารถเป็นไปได้จริง เนื่องจากทางคณะผู้วิจัยได้รายงานไปก่อนหน้านี้ ในกรณีการฉีดโพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ CHH1 เข้าไปในตัวกิ้งกูดแม่พันธุ์ เพื่อไปยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน CHH [27] อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้แอนติบอดีต่อ GIH เพื่อการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของกิ้งกูดแม่พันธุ์ จำเป็นต้องมีการศึกษาปริมาณฮอร์โมน GIH ในกระสเลือกและที่สะสมที่

บริเวณ Sinus gland ใน Optic lobe ใน ระยะต่างๆของการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์เสียก่อน เพื่อที่จะสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นของปริมาณแอนติบอดีต่อ GIH ที่จะฉีดเข้าไปในตัวกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ได้อย่างเหมาะสม แต่เนื่องจากขณะนี้ยังมีข้อจำกัดในวิธีการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนจากเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ ในการศึกษาวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงทำได้เพียงทดสอบวิธีการตรวจหาฮอร์โมน GIH โดยเทคนิคอิมมูโนฟลูออโรกราฟี จากเนื้อเยื่อก้านตาของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีการพัฒนารังไข่ในระยะต่างๆ เท่านั้น และพบว่าสามารถตรวจพบตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ใน optic lobe ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ตัวอย่างในบริเวณ sinus gland ซึ่งเป็นแหล่งสะสมฮอร์โมน GIH แต่ยังไม่สามารถตรวจหาตำแหน่งของฮอร์โมน GIH ในบริเวณ Medulla terminalis (MT) ซึ่งเป็นแหล่งที่สร้างฮอร์โมน GIH ได้จาก condition นี้ จึงอาจจะต้องมีการปรับปรุงขั้นตอนเพื่อเพิ่ม signal เช่น การใช้ secondary antibody ที่มีการติดสลากระดิวฟลูออเรสเซนต์ต่อไป จากผลการศึกษา(รูปที่ 12) พบว่า ยังไม่สามารถเชื่อมความสัมพันธ์ของปริมาณฮอร์โมน GIH ที่สะสมในบริเวณ sinus gland (โดยวิเคราะห์จากความเข้มของ signal ที่ตรวจพบ) กับการพัฒนารังไข่ในระยะต่างๆของกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์นั้น อาจจะกล่าวได้ว่า ปริมาณฮอร์โมน GIH ในกระแสเลือดน่าจะเป็นตัวหลักสำคัญที่จะไปยับยั้งการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำแม่พันธุ์ ซึ่งคงต้องหาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน อาจจะด้วยวิธีเทคนิค ELISA หรือ LC-MS ต่อไป เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปบูรณาการสู่การประยุกต์ใช้ต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

1. Huberman, A., Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture, 2000. **191**: p. 191-208.
2. Fingerman, M., Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. Physiol Zool, 1997. **70**(3): p. 257-69.
3. Chang, E.S., Crustacean hyperglycemic hormone family: Old paradigms and new perspectives. Amer Zool, 2001. **41**: p. 380-388.
4. Mattson, M.P. and E. Spaziani, Characterization of molt-inhibiting hormone (MIH) action on crustacean Y-organ segments and dispersed cells in culture and a bioassay for MIH activity. J Exp Zool, 1985. **236**(1): p. 93-101.
5. Keller, R., Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. Experientia, 1992. **48**(5): p. 439-48.
6. Soye, D., J.E. VanDeijnen, and M. Martin, Rapid Communication. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*, Journal of Experimental Zoology, 1987. **244**(3): p. 479 - 484.
7. de Kleijn, D.P., et al., Expression of the crustacean hyperglycaemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. J Endocrinol, 1998. **156**(2): p. 291-8.

8. Tsukimura, B., Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *Amer Zool*, 2001. **41**: p. 465-476.
9. Tsang, W.S., et al., Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas. *Gene*, 2003. **303**: p. 99-109.
10. Tsutsui, N., et al., Molecular Characterization of a cDNA Encoding Vitellogenin and Its Expression in the Hepatopancreas and Ovary during Vitellogenesis in the Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. *Zoolog Sci*, 2000. **17**(5): p. 651-60.
11. Quackenbush, L.S., Yolk Synthesis in the Marine Shrimp, *Penaeus vannamei*. *American Zoologist* 2001. **41**(3): p. 458-464.
12. Tiu, S.H.K., J. Benzie, and S.-M. Chan, From Hepatopancreas to Ovary: Molecular Characterization of a Shrimp Vitellogenin Receptor Involved in the Processing of Vitellogenin. *Biol Reprod*, 2008. **79**(1): p. 66-74.
13. Warriar S and Subramoniam T., Receptor mediated yolk protein uptake in the crab *Scylla serrata*: crustacean vitellogenin receptor recognizes related mammalian serum lipoproteins. *Molecular Reproduction and Development*, 2002. **61**(4): p. 536-548.
14. Avarre, J.C., et al., Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNAs. *Biol Reprod*, 2003. **69**(1): p. 355-64.
15. Okumura, T., et al., Expression of vitellogenin and cortical rod proteins during induced ovarian development by eyestalk ablation in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2006. **143**(2): p. 246-53.
16. Tsutsui, N., et al., The dynamics of vitellogenin gene expression differs between intact and eyestalk ablated kuruma prawn *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. *Fisheries Science*, 2005. **71** (2): p. 249 - 256.
17. Jasmani, S., et al., Hemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science*, 2000. **66**: p. 535-539.
18. Okumura, T., Effects of bilateral and unilateral eyestalk ablation on vitellogenin synthesis in immature female kuruma prawns, *Marsupenaeus japonicus*. *Zoolog Sci*, 2007. **24**(3): p. 233-40.
19. de Kleijn, D.P.V., et al., Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Letters*, 1994. **353**(3): p. 255-258.

20. Ohira, T., et al., Production and characterization of recombinant vitellogenesis-inhibiting hormone from the American lobster *Homarus americanus*. *Peptides*, 2006. **27**(6): p. 1251-8.
21. Aguilar, M., et al., Identification, purification, and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comparative Biochemistry and Physiology-part B:Biochemistry& Molecular Biology*, 1992. **102**: p. 491-498.
22. Edomi, P., et al., Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization. *Gene*, 2002. **284**(1-2): p. 93-102.
23. Yang, W.J. and K.R. Rao, Cloning of precursors for two MIH/VIH-related peptides in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **289**(2): p. 407-13.
24. Treerattrakool, S., et al., Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. *Febs J*, 2008. **275**(5): p. 970-80.
25. Treerattrakool, S., Molecular and functional characterization of gonad-inhibiting hormone (GIH) from the shrimp *Penaeus monodon*, in *Molecular genetics -genetic engineering*. 2008, Mahidol University.
26. Giulianini, P.G., et al., An antibody to recombinant crustacean hyperglycaemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan Crustacea. *Cell Tissue Res*, 2002. **307**(2): p. 243-54.
27. Treerattrakool, S., Udomkit A., and Panyim S., Anti-CHH antibody causes impaired hyperglycemia in *Penaeus monodon*. *J Biochem Mol Biol*, 2006. **39**(4): p. 371-6.
28. Wu, S. and G.J. Letchworth, High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 2004. **36**(1): p. 152-4.
29. Treerattrakool, S., et al., Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*. *Mar Biotechnol (NY)*, 2003. **5**(4): p. 373-9.
30. Yodmuang, S., et al., Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004. **312**(1): p. 101-114.

31. Treerattrakool, S., Panyim S., and Udomkit A., Induction of Ovarian Maturation and Spawning in *Penaeus monodon* Broodstock by Double-Stranded RNA. Mar Biotechnol (NY), 2010.

6. output จากโครงการวิจัย

สิ่งตีพิมพ์

อยู่ในระหว่างเตรียม manuscript เรื่อง Expression of recombinant Gonad-inhibiting hormone (rGIH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris* and its function in primary ovary cell culture เพื่อส่งวารสาร Peptides

การเสนอผลงานทางวิชาการ

เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในการประชุม The 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology Systems Biotechnology (TSB 2011) ระหว่างวันที่ 1-2 กุมภาพันธ์ 2555 ณ โรงแรมอิมพีเรียล คีนพาร์ค กรุงเทพมหานคร

1. Expression of recombinant Gonad-inhibiting hormone (rGIH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris* and its function in primary ovary cell culture

Supattra Treerattrakool, Chanikarn Boonchuoy, Sakol Panyim and Apinunt Udomkit

2. Expression profile of Gonad-inhibiting hormone (GIH) and vitellogenin (Vg), during ovarian maturation of female giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*

Sitichai Urtgam, **Supattra Treerattrakool**, Sakol PanYim and Apinunt Udomkit

ได้รับรางวัล Poster Award Winner (สาขา Agricultural Biotechnology and Agroindustry)

ภาคผนวก

Expression of recombinant Gonad-inhibiting hormone (rGIH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris* and its function in primary ovary cell culture

Supattra Treerattrakool^{a*}, Chanikarn Boonchuoy^a, Sakol Panyim^{a,b} and Apinunt Udomkit^a.

^aInstitute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Phathom 73170, Thailand.

^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand.

Gonad-inhibiting hormone (GIH), a neuropeptide from eyestalk ganglia, regulated ovarian development in female crustacean by inhibiting the vitellogenin synthesis. The cDNA cloning of GIH of *Penaeus monodon* and its biological function by RNA interference technique have been previously reported. In this study, the recombinant protein of GIH of *P. monodon* (rPem-GIH) was successfully expressed in yeast *Pichia pastoris* expression system under the control of an alcohol oxidase promoter. The rPem-GIH was purified by reversed-phased chromatography with Sep-Pak cartridges (C₁₈). Biological activity of rPem-GIH was determined in primary ovary cell culture derived from previtellogenic *P. monodon* broodstock. Similar to the purified eyestalk extract, the purified rPem-GIH was able to reduce vitellogenin mRNA level in primary ovary cell culture. Our result demonstrated that rPem-GIH expressed in *P. pastoris* had biological activity to inhibit vitellogenin synthesis in the ovary from *P. monodon*.

Keywords: Black tiger shrimp, GIH, primary ovary cell culture.

Selected References:

1. Treerattrakool S., Panyim S., Chan S-M., Withyachumnarnkul B. and Udomkit A. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. *FEBS J.* 2008; 275 (5), 970-980

Expression profile of gonad-inhibiting hormone (GIH) and vitellogenin (Vg), during ovarian maturation of female giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*.

Sitichai Urtgam, Supattra Treerattrakool, Sakol Panyim and Apinunt Udomkit

Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Gonad-inhibiting hormone (GIH) is an important eyestalk hormone that is known to regulate vitellogenesis process in crustacean. Vitellogenesis is an essential step in ovarian maturation by which vitellogenin (Vg) is synthesized and modified into vitellin or yolk protein and accumulated in developing oocyte. This study is aimed to determine the involvement of Gonad-inhibiting hormone (GIH) and vitellogenin (Vg) in ovarian maturation in the black tiger shrimp *P. monodon*. The eyestalk's ganglia, ovary and hepatopancreas were collected from shrimp at different ovarian developmental stages. RNA was extracted from each sample and used for first strand cDNA synthesis. Real-time quantitative PCR was used to determine the expression level of GIH mRNA in the eyestalk and Vg mRNA in ovary and hepatopancreas. The determination of GIH expression by real-time PCR showed that GIH mRNA was expressed at low levels in previtellogenic stage and gradually increased until exogenous-vitellogenic stage before decreasing at maturation stage of the ovary. Vg mRNA expressed at higher level in the ovary than in the hepatopancreas. However, Vg expression in both tissues showed similar pattern with an increase from endogenous-vitellogenic stage through maturation stage. In order to understand the relationship between GIH and Vg in ovarian maturation, GIH protein in the eyestalk and hemolymph as well as Vg in the ovary and hemolymph will be determined by ELISA technique at each stage of ovarian maturation. The information obtained from this study would be useful for future reproductive manipulation of *P. monodon* broodstock.

Keywords: GIH, vitellogenin, *P. monodon*, ovarian maturation, eyestalk

Selected References:

1. Use J. Endocrinol.
2. Treerattrakool, S., et al., Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. Federation of European Biochemical Societies. 2008;275:970-980.