รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์หายีนจีโปรตีนรีเซปเตอร์ที่เป็นตัวรับตัวใหม่ของฮอร์โมนเอกไดสเตอร์รอยด์ในการควบคุมการลอกคราบของปูทะเล *Scylla olivacea*

Isolation and expression analysis of G-protein coupled receptor, a novel ecdysteroid receptor that plays an important role in molting of mud crab *Scylla olivacea*

โดย ดร.สิรินาถ เตชา

31 พฤษภาคม 2562

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code: TRG5980006

Project Title: การวิเคราะห์หายีนจีโปรตีนรีเซปเตอร์ที่เป็นตัวรับตัวใหม่ของฮอร์โมนเอกไดสเตอร์รอยด์ในการควบคุมการลอกคราบของปูทะเล *Scylla olivacea*

Investigator: ดร.สิรินาถ เตชา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

E-mail Address: sirinart.tec@biotec.or.th

Project Period: 2 ปี

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อค้นหาและศึกษาการทำงานของตัวรับฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone (20-HE) ที่เป็นตัวรับชนิดใหม่ในปูทะเลดำ (*Scylla olivacea*) โดยตัวรับนี้มีตำแหน่งอยู่บนผิวเซลล์ โดยคาดว่าจะทำหน้าที่กระตุ้นการตอบสนองของฮอร์โมน 20-HE แบบรวดเร็ว (rapid signaling pathway) ตัวรับฮอร์โมนชนิดใหม่ที่พบนี้เป็นโปรตีนในกลุ่ม G-protein couple receptor (GPCR) ที่มีส่วนปลายทางด้าน C-terminus ของ seven-transmembrane domain เกาะอยู่กับ G-protein complex เมื่อฮอร์โมน 20-HE เข้าเกาะกับปลายทางด้าน N-terminus ที่อยู่ภายนอกเซลล์สัญญาณจะถูกส่งผ่าน G-protein complex ที่จะทำการสื่อสารผ่านสารสื่อสัญญาณต่อไป การค้นหายีน *GPCR* ในปูทะเลดำ ดำเนินการโดยการสร้าง transcriptomes ของ Y-organs จากระยะปกติ (intermolt) และระยะที่มีการเตรียมการลอกคราบ (ทั้งตามธรรมชาติและบังคับ) แล้วทำการเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีไทด์ของยีน *GPCR* ที่พบในหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) เพื่อสร้างไพรเมอร์สำหรับค้นหายีน *GPCR* ใน cDNA ของ Y-organs ของปูทะเลดำ โดยสามารถค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full-length sequence) ได้สองชนิด คือ *GPCR1* และ *GPCR2* รวมทั้งยีน *G-protein alpha-o subunit* (*Gao*) และ ยีน *β-arrestin* ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการถ่ายทอดและควบคุมสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE เมื่อทำการวัดระดับการแสดงออกของยีน *GPCR1*, *GPCR2*, *G-proteins* และ *β-arrestin* จากเนื้อเยื่อต่างๆได้แก่ ต่อม Y-organs, สมอง, ปมประสาทใต้ท้อง (thoracic ganglia) และ ลำไส้ตอนท้าย (hind gut) ที่อยู่ในระยะ intermolt และ premolt พบว่า ต่อม Y-organs ในระยะ intermolt มีการแสดงออกของยีน *GPCR1*, *GPCR2*, *Gaq* และ *Gas* มากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการกระตุ้นต่อม Y-organs ด้วยการบ่มในฮอร์โมน 20-HE ที่ความเข้มข้นจำลองระยะ premolt พบว่า มีเพียงยีน *GPCR2* และ *Gao* เท่านั้นที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนโดยที่ ยีน *GPCR2* มีเพิ่มการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญหลังจากบ่ม 1 ชั่วโมงแล้วลดระดับกลับมาที่ระดับเริ่มต้น ในขณะที่ยีน *Gao* มีการลดระดับการแสดงออกหลังจากบ่มได้ 2 และ 6 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันฮอร์โมน 20-HE มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อสัญญาณที่ทราบกันดีว่าเกี่ยวข้องกับ rapid signaling pathway ในต่อม Y-organs ได้แก่ Ca^{2+}, cAMP และ cGMP โดยพบ 1) ระดับของ Ca^{2+} มีการ

เปลี่ยนแปลงที่ 30 วินาทีแรก 2) ระดับของ cAMP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 15 นาทีแล้วคงระดับจนถึง 1 ชั่วโมง 3) ระดับของ cGMP มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 15 นาทีแล้วลดระดับลงทันที นอกจากนี้ได้มีการยืนยันผลการตอบสนองของยีน *GPCR2* ต่อฮอร์โมน 20-HE ในระดับโปรตีนด้วยการทำ immunohistochemistry พบว่า โปรตีน GPCR2 พบอยู่บนผิวเซลล์ของต่อม Y-organs เป็นระดับพื้นฐาน (basal level) แล้วมีการเพิ่มระดับการแสดงออกหลังจากที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE ที่ 1 และ 6 ชั่วโมง จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ฮอร์โมน 20-HE สามารถกระตุ้นต่อม Y-organs ให้มีการถ่ายทอดสัญญาณแบบ rapid signaling pathway ผ่านสารสื่อสัญญาณได้แก่ Ca^{2+}, cAMP และ cGMP ในขณะที่โปรตีน GPCR2 ที่ค้นพบในปูทะเลดำมีการตอบสนองต่อฮอร์โมน 20-HE อย่างจำเพาะเจาะจง แต่อย่างไรก็ดีผลทดลองในโครงการนี้ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้อย่างแน่ชัดว่าโปรตีน GPCR2 ทำหน้าที่เป็นตัวรับของฮอร์โมน 20-HE ได้ ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันหน้าที่ของโปรตีน GPCR2 ดังกล่าวในระดับต่อไป

Keywords: ปูทะเลดำนิ่ม การลอกคราบ ฮอร์โมน 20-HE ตัวรับฮอร์โมน G-protein coupled receptor

1. บทนำ

ปูทะเลดำ (*Scylla olivacea*) พบกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำกร่อย ป่าชายเลน และปากแม่น้ำที่มีน้ำทะเลท่วมถึง ตามชายฝั่งทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน เป็นปูที่นิยมนำมาเลี้ยงในฟาร์มเพื่อผลิตเป็นปูนิ่ม โดยแต่ละปีมูลค่าการส่งออกปูทะเลนิ่มมีมากว่า1,000 ล้านบาท (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2558)

ภาพที่ 1 ปูทะเลดำ *Scylla olivacea* (Keenan *et al*., 1998) (https://nt.gov.au/marine/recreational-fishing/types-of-fish/fish-species/mud-crab)

จากข้อมูลที่สืบค้นและสอบถามผู้ประกอบการ พบว่าการผลิตปูนิ่มมีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ การขาดแคลนลูกปูที่นำมาเลี้ยง และไม่สามารถควบคุมระยะเวลาที่ต้องใช้เลี้ยง รวมถึงปริมาณการผลิตในแต่ละวันได้ ทำให้ปริมาณการผลิตปูนิ่มมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค โดยเฉพาะปัญหาการลอกคราบที่ถือว่าเป็นคอคอดขวด ถ้าหากว่าสามารถกระตุ้นการลอกคราบในปูที่นำมาเลี้ยงให้ย่นระยะเวลาเลี้ยงสั้นลงและให้เกิดขึ้นอย่างพร้อมเพรียงกันได้ จะทำให้ผู้ประกอบการสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตอย่างมหาศาล

1.1 การลอกคราบ (molt) และระบบควบคุม

การลอกคราบเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและสำคัญอย่างยิ่งยวดของสัตว์ในไฟลัมอาร์โทรโพดา (Arthopoda) ซึ่งจะเป็นช่วงเวลาที่สัตว์สามารถเพิ่มขนาดและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ในหนึ่งวงจรการลอกคราบจะแบ่งเป็นสองช่วงคือ ช่วงปกติ (intermolt) กับช่วงเตรียมการลอกคราบ (premolt)

ในปูทะเลดำ (รวมถึงกลุ่ม Crustaceans อื่นๆ) กระบวนการลอกคราบจะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนสองชนิดได้แก่ฮอร์โมน 20-HE (ecdysteroids) และฮอร์โมนเปปไทด์ (neuropeptides) ที่มีชื่อว่า ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (molt-inhibiting hormone) โดยมีกลไกดังนี้ ฮอร์โมน 20-HE เป็นฮอร์โมนกระตุ้นการลอกคราบสร้างและปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดโดยต่อม Y-organs ซึ่งมีตัวรับที่ทราบกันดีว่าอยู่ภายในเซลล์ (nuclear receptor) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น transcription factor กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมการลอกคราบ เช่น เอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ผลิตฮอร์โมน 20-HE ในขณะที่ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบสร้างและ

ปล่อยจากต่อมภายในก้านตา เข้าสู่กระแสเลือดและออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมายคือต่อม Y-organs เพื่อยับยั้งการสร้างฮอร์โมน 20-HE ส่งผลทำให้ระดับของฮอร์โมน 20-HE อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งปูจะคงสภาวะอยู่ในช่วง intermolt แต่เมื่อใดก็ตามที่ระดับของฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบลดลง ต่อม Y-organs จะถูกปลดปล่อยจากสภาวะถูกยับยั้ง ทำให้มีการสร้างฮอร์โมน 20-HE ซึ่งจะกระตุ้นกลไกเข้าสู่ระยะเตรียมการลอกคราบ (premolt) และนำไปสู่การลอกคราบ ดังแสดงในภาพที่ 2

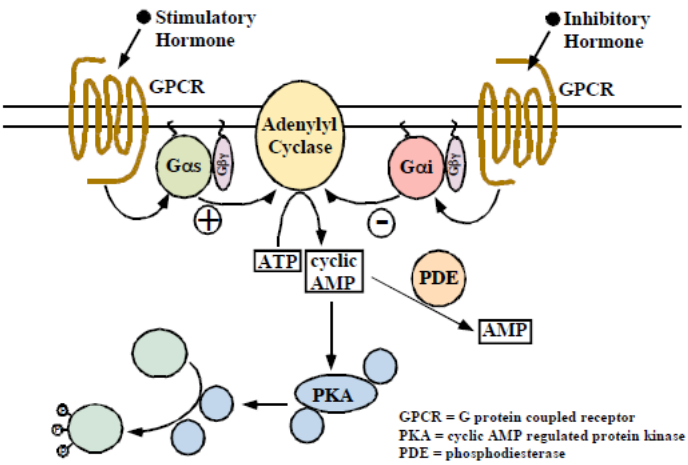
ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงกลไกการควบคุมการลอกคราบของระบบฮอร์โมนในปูทะเลดำ โดยฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบมีเนื้อเยื่อเป้าหมายอยู่ที่ต่อม Y-organs ซึ่งจะยับยั้งไม่ให้มีการสร้างฮอร์โมน 20-HE

จากกลไกการควบคุมการลอกคราบในภาพที่ 2 ทำให้มีการตั้งสมมติฐานว่า ต่อม Y-organs มีกลไกที่สามารถตรวจจับระดับและประมวณผลของการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนทั้งสองชนิด คือ เมื่อใดก็ตามที่ระดับของฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบลดต่ำลง ระดับฮอร์โมน 20-HEเพิ่มขึ้น (เล็กน้อย) สามารถกระตุ้นกลไก positive feedback ภายใน ทำให้ลดการตอบสนองต่อฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (irresponsive) ดังที่รายงานไว้ใน (Lee *et al*., 2007; McDonald *et al*., 2011; Nakatsuji and Sonobe, 2004; Nakatsuji *et al*., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ศึกษาการลอกคราบในหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) พบว่า ฮอร์โมน 20-HE มีตัวรับชนิดใหม่ (novel receptor) คือโปรตีน G-protein coupled receptor (GPCR) ที่อยู่บนผิวเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE และกระตุ้นการตอบสนองในวงจรที่รวดเร็วกว่าตัวรับที่เป็น classical nuclear receptor

จากรายงานผลการทดลองของ (Cai *et al*., 2014; Jing *et al*., 2015; Liu *et al*. 2014a; 2014b; Manaboon *et al.,* 2009; Ren *et al.,* 2014; Srivastava *et al.,* 2005; Wang *et al*., 2015) พบว่า โปรตีน GPCR ทำหน้าที่กระตุ้นการตอบสนองของฮอร์โมน 20-HE แบบรวดเร็ว (rapid-signaling pathway) โดยที่ปลาย C-terminus ของ โปรตีน GPCR เกาะอยู่กับ G-protein complex เมื่อฮอร์โมน 20-HE เข้าเกาะกับปลายทางด้าน N-terminus ที่อยู่ภายนอกเซลล์ โปรตีน GPCR สามารถส่งสัญญาณผ่าน G-protein complex ซึ่งจะทำการสื่อสารผ่านสารสื่อสัญญาณต่อไป

1.2 กลไกการถ่ายทอดสัญญาณของโปรตีน GPCR และ G-protein complex

เมื่อโปรตีน GPCR ได้รับสัญญาณของฮอร์โมนหรือลิแกนด์ (ligand) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง (conformational change) ส่งสัญญาณให้ trimeric G-proteins ที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วย Gα, Gβ, Gγ โดยที่ Gα และ Gγ มีส่วนที่เกาะกับ phospholipids ของเยื่อหุ้มเซลล์ ในสภาวะปกติ โปรตีน Gα จะเกาะอยู่กับ GDP เมื่อมีฮอร์โมนหรือลิแกนด์ที่เหมาะสมจะกระตุ้นโปรตีน GPCR ให้ทำหน้าที่เป็น guanine exchange factor (GEF) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้ โปรตีน Gα ปลดปล่อย GDP ออกไป ในขณะที่ภายในเซลล์มี GTP อยู่เป็นจำนวนมากจะเข้าแทนที่ GDP ในโปรตีน Gα การแทนที่ดังกล่าวนี้กระตุ้นโปรตีน Gα/β/γ complex ให้ทำงาน กระตุ้น/ควบคุมโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญภายในเซลล์ ได้แก่เอนไซม์ adenylate cyclase (AC) ที่จะเปลี่ยน ATP ให้เป็น cAMP ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ (second messenger) โดย cAMP สามารถกระตุ้น protein kinase A (PKA) ให้เกิดกระบวนการ Phosphorylation ในโปรตีนเป้าหมายต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3



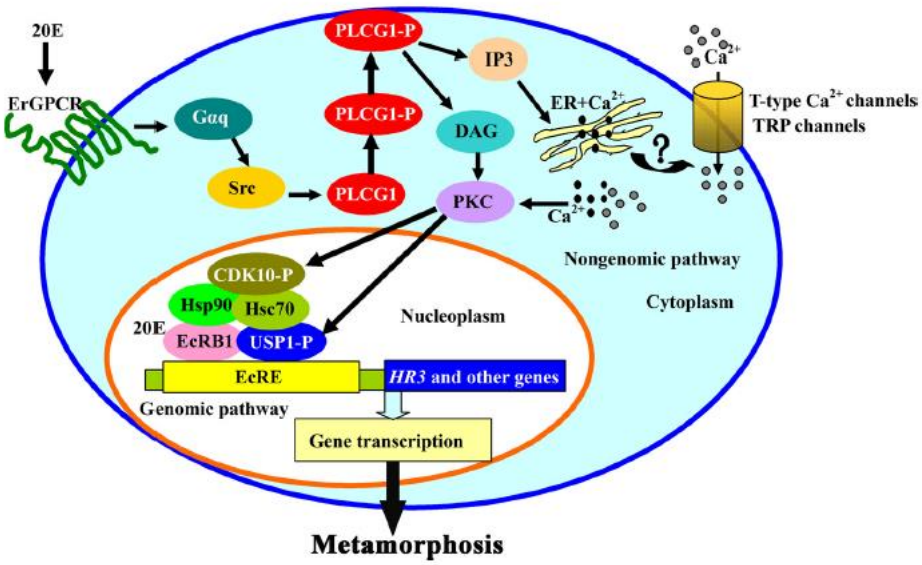
ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงกลไกการถ่ายทอดสัญญาณฮอร์โมนผ่านโปรตีน GPCR และ G-protein complex ผ่านสารสื่อสัญญาณ cAMP (Filtz, 2006)

โดยเฉพาะโปรตีน Gα ที่มี subunit อยู่ 4 ชนิด ได้แก่ 1) Gαs ซึ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น จะกระตุ้นให้ adenylyl cyclase ทำงาน ซึ่งจะเปลี่ยน ATP ให้เป็น cAMP 2) Gαi หรือ Gαo ซึ่งเมื่อ Gαi/Gαo อยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นจะยับยั้งไม่ให้ adenylyl cyclase ทำงาน 3) Gα12,13 และ 4) Gαq ซึ่งเมื่อ Gαq อยู่ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น จะกระตุ้นให้ Phospholipase C-β ทำงาน ซึ่งจะเปลี่ยน Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ให้เป็นสารสื่อสัญญาณสองตัวคือ inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) และ diacylglycerol (DAG) โดยที่ IP3 จะถูกปล่อยเข้าสู่ภายในเซลล์แล้วเข้าเกาะจับกับ ligand-gated Ca^{2+} channel ที่อยู่บน endoplasmic reticulum ทำให้ Ca^{2+} แพร่ออกมายัง cytosol ได้ซึ่งการกระตุ้นตัวรับ

ใดๆที่เชื่อมกับ Gαq จะทำให้ระดับของ Ca^{2+}ภายในเซลล์สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่ต้องใช้ Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ เช่น calmodulin สามารถทำงานได้ ในขณะที่ DAG ซึ่งจะยังคงอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์จะไปกระตุ้น protein kinase C (PKC) ที่จะกระตุ้นการทำงานของโปรตีนเป้าหมายด้วยกระบวนการ phosphorylation ต่อไป

1.3 วิถีสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE ผ่านตัวรับฮอร์โมนชนิดใหม่ (novel receptor pathway)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในแมลงได้แก่ หนอนไหม (*Bombyx mori*) แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*), หนอนเจาะสมอฝ้าย (*H. armigera*) พบว่าฮอร์โมน 20-HE สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ได้ภายในระยะเวลาเพียง 10 นาที (Srivastava *et al*., 2005) ในหนอนเจาะสมอฝ้ายพบว่า GPCR ทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE โดยทำให้ระดับของ Ca^{2+}, IP3, และ DAG ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น โปรตีนถูกกระตุ้นด้วยกระบวนการ phosphorylation และถูกเคลื่อนย้าย และยีนเป้าหมายหลายๆยีนถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออก (Liu *et al*., 2014a: Wang *et al*., 2014) ดังที่สรุปในภาพที่ 4

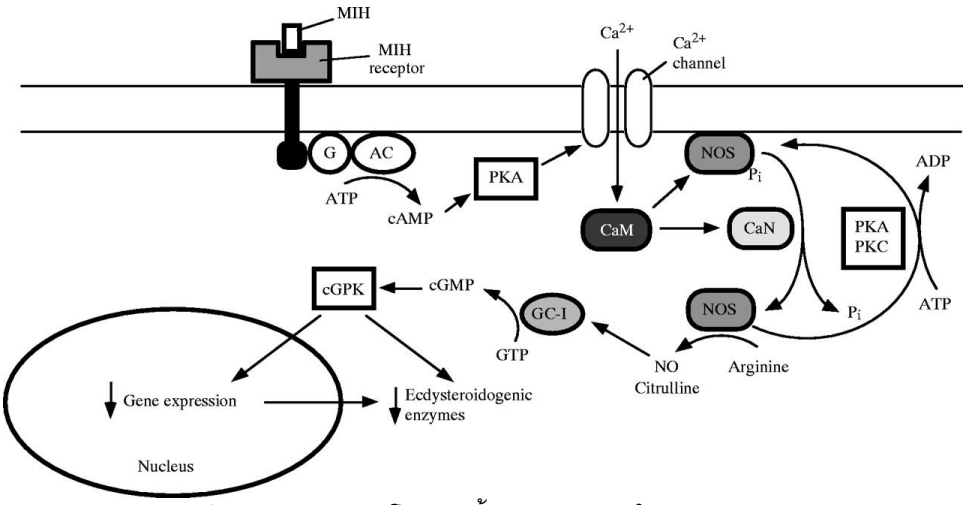


ภาพที่ 4 แผนภาพแสดงแนวคิดการถ่ายทอดสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE ทั้งแบบรวดเร็ว (nongenomic pathway) ที่เกิดขึ้นภายใน cytoplasm และ วงจรแบบ genomic pathway ซึ่งเกิดขึ้นภายใน nucleus (Liu *et al*., 2014a)

1.4 ระบบการสื่อสัญญาณในต่อม Y-organs

เนื่องจากต่อม Y-organs มีหน้าที่รับสัญญาณของฮอร์โมนทั้งสองชนิดที่ทำหน้าที่ตรงข้ามกันโดยที่ฮอร์โมน 20-HE สามารถสร้างสารสื่อสัญญาณผ่าน cAMP, Ca^{2+}, IP3, และ DAG ดังที่ได้กล่าวในข้างต้น ในทางตรงกันข้าม ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (ซึ่งยังไม่มีรายงานที่แน่

ชัดว่าเข้าเกาะจับกับตัวรับชนิดใด) สามารถสร้างสัญญาณผ่าน second messenger ได้แก่ cAMP, cGMP และ Ca^{2+}ดังแสดงไว้ในภาพที่ 5



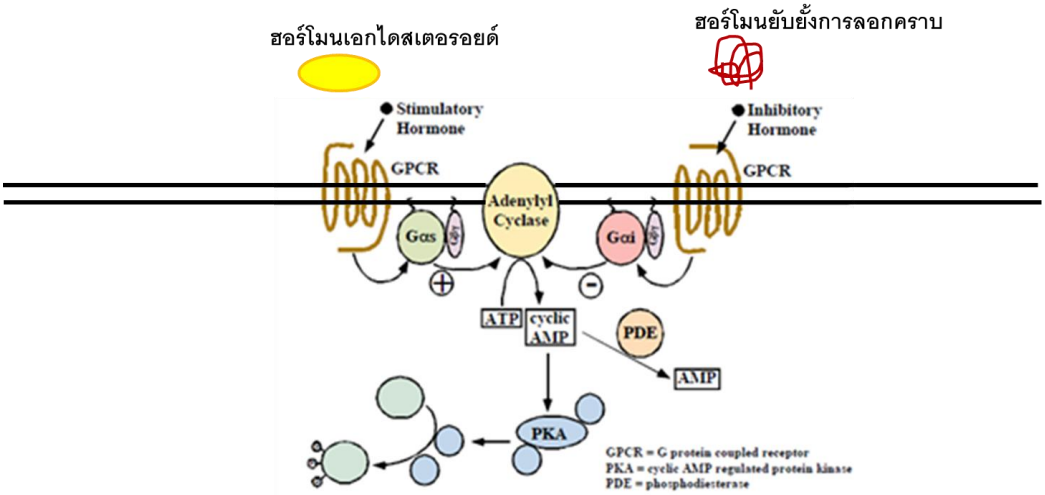
ภาพที่ 5 แผนภาพแสดงวิถีสัญญาณของฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบในต่อม Y-organs (Kim et al., 2004)

เมื่อฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ เกาะเข้ากับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ ซึ่งกลุ่มนักวิจัยที่นำโดย Dr. Douglas Watson (Zheng et al., 2006, 2008) ที่ทำในปูม้าอเมริกัน (*Callinectes sapidus*) เสนอว่าอาจจะเป็น receptor Guanylyl cyclase (rGC, Mw=143 kDa) ในขณะที่ Mabashi-Asazuma *et al*., 2005 ที่ทำการวิจัยในกุ้งคุรุมะ (*Marsupenaeus japonicus*) พบว่าฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ เกาะจับตัวรับ ได้โปรตีนเชิงซ้อนที่มีขนาด 70 kDa (MIH=~8 kDa) แต่ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ว่าเป็นโปรตีนชนิดใด ในเร็ว ๆนี้ Nagai *et al*., 2014 ได้ทำแยกตัวรับของโปรตีน Ion Transport protein (ITP, ซึ่งเป็นฮอร์โมนในตระกูลเดียวกับฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ) ในหนอนไหม *Bombyx mori* ซึ่งรายงานว่า GPCR เป็นตัวรับของฮอร์โมน ITP เมื่อพิจารณาเอกสารอ้างอิงเหล่านี้เข้าด้วยกัน ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบเข้าเกาะจับและส่งสัญญาณผ่านตัวรับชนิดใด

เมื่อต่อม Y-organs ของปู *Cancer antennarius* และ *Menippe mercenaria* ได้รับสัญญาณของฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ จะส่งสัญญาณหลักเป็น cAMP ในขณะที่บางสปีชีส์ เช่น *Carcinus maenas* และ *Orconectes limosus* ส่งสัญญาณเป็น cGMP (Sedlmeier and Fenrich, 1993; Saïdi et al., 1994; Spaziani *et al*., 1999) ซึ่งการเพิ่มระดับของ cyclic nucleotides สามารถกระตุ้นโปรตีน PKA/PKC ต่อไป

จากรายงานดังกล่าวของ Saïdi *et al*. (1994) พบว่ามีผลการทดลองที่น่าสนใจ คือ สารสื่อสัญญาณ cAMP ในต่อม Y-organs มีการเปลี่ยนบทบาทตามระยะการลอกคราบ คือ เมื่ออยู่ในระยะปกติ (intermolt) การเพิ่มระดับของ cAMP จะยับยั้งการสร้างฮอร์โมน 20-HE ในทางตรงกันข้าม การเพิ่มระดับของ cAMP ในระยะเตรียมลอกคราบ (premolt) สามารถกระตุ้นการสร้างฮอร์โมน 20-HE ได้ ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานของโครงการวิจัยนี้ที่โปรตีน GPCR ทำ

หน้าที่เป็นตัวรับชนิดใหม่ซึ่งส่งสัญญาณแบบรวดเร็วและแทนที่สัญญาณของฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบผ่านการกระตุ้นโปรตีน GPCR ที่แตกต่างกัน ซึ่งจะกระตุ้น G-protein ที่เหมาะสมแล้วส่งสัญญาณให้มีการตอบสนองภายในเซลล์ของต่อม Y-organs ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แผนภาพแสดงแนวคิดการสื่อสารภายในต่อม Y-organs ผ่านการทำงานของโปรตีน GPCR หลังจากที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE

2. วัตถุประสงค์

จากสมมติฐานของโครงการวิจัยที่เสนอว่าโปรตีน GPCR อาจจะทำหน้าที่เป็นตัวรับชนิดรวดเร็วของฮอร์โมน 20-HE ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญต่อการควบคุมการลอกคราบในปูทะเลดำ *Scylla olivacea* ดังนั้น โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักดังนี้

1. ค้นหาและจำแนกโปรตีน GPCR และโปรตีน G-protein complex ในปูทะเลดำ
2. ศึกษาระบบการสื่อสัญญาณแบบรวดเร็วของฮอร์โมน 20-HE
3. ค้นหาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน GPCR ในต่อม Y-organs

3. วิธีทดลอง

3.1 ตัวอย่างสัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

ปูทะเลดำขนาด 80-100 กรัมจากทะเลจังหวัดระนอง ถูกนำมาเลี้ยงในบ่อคอนกรีตเพื่อปรับตัว 1 อาทิตย์โดยเลี้ยงให้อยู่ในระดับความเค็มที่ 25 ppt ให้อาหารทุกๆ สองวันด้วยปลา ในทุกๆอาทิตย์ระยะลอกคราบจะถูกตรวจสอบจากขาว่ายน้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้ระยะลอกคราบที่ต้องการแล้วจะดำเนินการเก็บตัวอย่างโดยนำปูไปสลบในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการดูดเลือด เก็บเนื้อเยื่อ ได้แก่ ก้านตา ต่อม Y-organs ตับ สมอง ปมประสาทใต้ท้อง (Thoracic ganglia) และลำไส้ส่วนปลาย (hind gut) แล้วเก็บในไนโตเจนเหลวก่อนที่จะย้ายไปเก็บในตู้ -80 องศา จนกว่าจะใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

นำปูทะเลดำจากจังหวัดตรังขนาด 80-100 กรัม ซึ่งอยู่ในระยะปกติ (intermolt) เก็บเอาต่อม Y-organs มาใช้ในการทดลองบ่มด้วยฮอร์โมน 20-HE (incubation study) นำปูที่เหลือมาเลี้ยงไว้ในตะกร้าเลี้ยงปูในบ่อพลาสติกขนาด 300 ลิตร ในความเค็มอยู่ที่ 25 ppt และให้อาหารด้วยหอยแมลงภู่แช่แข็งทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 1 อาทิตย์ ก่อนที่จะทำการแบ่งเป็นกลุ่มการทดลอง 3 กลุ่มได้แก่ 1) กลุ่มควบคุม (จำนวน 5 ตัว) 2) กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE (จำนวน 10 ตัว) และ 3) กลุ่มที่ตัดก้านตา (จำนวน 10 ตัว) เลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน โดยในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนจะทำการฉีดฮอร์โมนทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เพื่อให้ปูมีฮอร์โมน 20-HE เข้มข้นอยู่ที่ 100 นาโนกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตรเลือดปูทั้งหมด (ประมาณ 3 มิลลิลิตร) โดยความเข้มข้นนี้อ้างอิงจากรายงานผลในเอกสารสืบค้นที่พบในเลือดปู กุ้ง ในระยะแรกเริ่มเมื่อเข้าสู่ระยะเตรียมลอกคราบ เพื่อจำลองความเข้มข้นของฮอร์โมน 20-HE ชนิด 20-HE โดยฉีดฮอร์โมน 20-HE 300 นาโนกรัมใน 100 ไมโครลิตรของ crustacean normal saline (300 ng/100 µl) เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อเหมือนขั้นตอนข้างต้น

3.2 การทดลองบ่มต่อม Y-organ ด้วยฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone (20-HE)

นำต่อม Y-organs ที่ได้จากปูในระยะปกติมาบ่มพักตัวในสารละลาย crustacean normal saline เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจะทำการแยกเอาต่อม Y-organ แต่ละต่อม

ไปบ่มในสารละลาย crustacean normal saline ที่มีฮอร์โมน 20-HE เข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลตร (100 ng/1 ml เลือด) ในปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุมใน 96-well plate โดยจะแบ่งการทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างที่ 0, 10 วินาที, 30 วินาที, 1 นาที, 2 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองต่อม Y-organ จะถูกเก็บในไนโตเจนเหลวทันที ก่อนที่จะย้ายไปเก็บในตู้ -80 องศา จนกว่าจะใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3 การสกัดอาร์เอนเอ (total RNA) จากเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อที่เก็บจากตัวอย่างปูข้างต้นจะนำมาบดใน Tri reagent (Labconsulting, Austria) จำนวน 200 ul ด้วย hand-held homogenizer แล้วเติม Tri reagent ให้ครบ 500-1000 ul (ตามขนาดเนื้อเยื่อ) แล้วเติมคลอโรฟอร์ม (Choroform) ที่แช่เย็นจำนวน 1:5 ของปริมาตร Tri reagent ที่ใช้ แล้วปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกที่ 10,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 20 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วย้ายสารละลายชั้นบนใส่ลงในหลอดใหม่ เติม Isopropanol ที่แช่เย็นในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นตกที่ 10,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 15 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายออกให้หมดแล้วทำการล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol ในน้ำที่ประกอบด้วย 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) แล้วปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกที่ 10,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 15 นาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายออกให้หมดให้เหลือเพียงตะกอน แล้วทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที แล้วทำการละลายตะกอนด้วยน้ำที่มี DEPC ก่อนจะนำไปวัดปริมาณอาร์เอนเอทั้งหมด (total RNA) ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific)

3.4 การสร้าง transcriptomes ของต่อม Y-organs

นำต่อม Y-organ จำนวนประมาณ 6-10 ต่อม จากปู 4 ระยะ ได้แก่ ปูในระยะลอกคราบปกติ (intermolt), ปูที่อยู่ในระยะเตรียมลอกคราบ (premolt), ปูที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE และปูที่ถูกตัดก้านตา มาสกัดดีเอนเอตามขั้นตอน 3.3 แล้ววัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพอาร์เอนเอทั้งหมด (Total RNA) ที่ได้ ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000c Spectrophotometer ก่อนที่จะส่งไปทำการสร้าง Transcriptome โดยบริษัท BGI (ประเทศจีน) เนื่องจากในปัจจุบันฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของปูทะเลดำยังไม่มี จึงต้องใช้ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของปูขน (*Eriocheir sinensis*) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมที่พบในสารระบบ (database) และมีพันธุกรรมใกล้เคียงที่สุดกับปูทะเลดำ มาใช้ในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (reference mapping)

รายละเอียดคร่าว ๆของการเตรียมอาร์เอนเอมีดังนี้ RNA ทั้งหมดที่ได้รับจะถูกย่อยเอาดีเอนเอที่ปะปนมาด้วย DNase I แล้วทำการแยกเอาเฉพาะ mRNA โดยใช้ Oligo (dT) การสร้างสายแรกของ cDNA ถูกสังเคราะห์โดยใช้ hexamer-primer แบบสุ่ม จากนั้นดีเอนเอสายที่สอง

ถูกสังเคราะห์โดยการเพิ่มเติมส่วนผสมอันได้แก่ บัฟเฟอร์, dNTPs, RNase H และ DNA polymerase I สายดีเอนเอที่สังเคราะห์ได้จะถูกแยกด้วยลูกปัดแม่เหล็ก (magnetic bead) แล้วทำการเติมอะแด็ปเตอร์ก่อนที่จะนำไปเพิ่มจำนวนด้วยการทำ PCR ในการสร้างห้องสมุด (library) ของทั้งสี่กลุ่มตัวอย่าง คุณภาพและปริมาณของสายดีเอนเอที่สังเคราะห์ได้จะถูกตรวจสอบและตรวจวัดด้วย Agilent 2100 Bioanaylzer และ ABI StepOnePlus Real-Time PCR System ก่อนที่จะถูกนำไปอ่านลำดับด้วยเครื่อง Illumina HiSeqTM 2000

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ (Bioinformatics Pipeline)

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผลิตโดย Illumina HiSeqTM 2000 จะถูกเรียกว่าการอ่านแบบดิบ (raw read) จะถูกตรวจสอบคุณภาพว่าจำเป็นต้องมีขั้นตอนการอ่านข้อมูลใหม่หรือไม่ raw read ที่ได้ประกอบด้วย ลำดับของอะแดปเตอร์ ลำดับเบสที่ไม่รู้จักจำนวนมากๆ และลำดับเบสที่มีคุณภาพต่ำ เช่นมีลำดับเบสที่ไม่รู้จักที่มีมากกว่า 10% และการอ่านคุณภาพต่ำจะถูกกรอง ข้อมูลที่กรองเรียบร้อยแล้วจะถูกจัดเก็บในรูปแบบ FASTQ ก่อนที่จะนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพันธุกรรมอ้างอิง ซึ่งได้แก่ปู *Eriocheir sinensis* (http://gigadb.org/dataset/100186)

โปรแกรม Bowtie2 ถูกใช้เพื่อทำแผนที่การอ่านที่ในฐานข้อมูลของยีนอ้างอิง ในขณะที่โปรแกรม HISAT ใช้ในการเพื่อทำแผนที่การอ่านกับฐานข้อมูลพันธุกรรมอ้างอิงซึ่งจะมีการควบคุมคุณภาพของการจัดตำแหน่ง เพื่อตรวจสอบว่าจำเป็นต้องมีการจัดเรียงใหม่หรือไม่ ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการคำนวณการกระจายของการอ่านในยีนอ้างอิงและอัตราส่วนการทำแผนที่ หากผลการจัดตำแหน่งผ่าน QC การวิเคราะห์ลำดับต่อๆไปรวมถึงการแสดงออกของยีนและการวิเคราะห์เชิงลึกตามการแสดงออกของยีน จะถูกประมวลผล

ปริมาณยีนถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธี RSEM ที่ปริมาณและคำนวณความอุดมสมบูรณ์สูงสุด (**Maximum likelihood**) โดยใช้อัลกอริทึม Expectation Maximization (EM) สำหรับแบบจำลองทางสถิติ วิธีการ **FPKM** ถูกนำมาใช้ในการคำนวณระดับการแสดงออกในขณะที่กำจัดอิทธิพลของความยาวของยีนที่แตกต่างกันและความคลาดเคลื่อนลำดับที่มีต่อการคำนวณการแสดงออกของยีน ดังนั้นการแสดงออกของยีนที่คำนวณได้สามารถนำมาใช้โดยตรงเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในกลุ่มตัวอย่าง

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์เชิงลึกโดยอาศัยยีนที่แสดงความแตกต่าง (Differentially expressed gene: **DEGs**) รวมถึงการวิเคราะห์ Gene Ontology (GO), การวิเคราะห์ KEGG pathway และการวิเคราะห์กลุ่ม (Cluster) ประการแรก DEG ได้รับการคัดเลือกด้วยวิธีการกระจายแบบ Possion และแก้ไข p-value ของ DEG ดังกล่าวโดยใช้วิธี Bonferroni

3.6 การสร้าง complementary DNA (cDNA) ของเนื้อเยื่อที่สนใจ

RNA ทั้งหมดที่สกัดมาจาก intermolt และ premolt YO, สมอง, ปมประสาททรวงอก และ hind gut รวมทั้งตัวอย่าง Y-organs ที่ได้จากการบ่มด้วยฮอร์โมน 20-HE ด้วย TRI Reagent® ดังอธิบายในขั้นตอน 3.3 โดย RNA ทั้งหมดที่สกัดได้ถูกวัดโดยใช้เครื่อง NanoDrop Spectrophotometer แล้วนำ หนึ่งไมโครแกรม (1 µg) ของ RNA ที่ได้มาทำลายดีเอนเอที่ปะปนมาด้วย DNase I ก่อนที่จะถูกนำไปสร้างสาย complementary DNA (cDNA) โดยใช้ Improm-IITM Reverse Tran-scription System (Promega)

3.7 การสร้าง 5’ และ 3’ rapid amplification of cDNA ends (RACE) cDNA

นำต่อม Y-organ ที่ได้จากปูในระยะเตรียมลอกคราบจำนวณ 10 ต่อมมาสกัดเอาอาร์เอนเอทั้งหมด (ดังรายละเอียดในหัวข้อ 3.3) ทำการแยกเอาเฉพาะ mRNA โดยใช้ชุดสกัด Illustra QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (GE healthcare Life Science) โดยดำเนินตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในคู่มือ mRNA ที่แยกได้ (ประมาณ 1 เปอร์เซนต์ของ RNA ตั้งต้น) จะถูกนำไปเตรียมสร้าง 5’RACE และ 3’RACE cDNA โดยใช้ชุดเตรียมสำเร็จ SMARTer® RACE 5’/3’ Kit (Takara Bio USA, Inc)

3.8 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูลอิเลคทรอนิกส์และTranscriptomes

เนื่องจากในปัจจุบันข้อมูลพันธุกรรมของปูทะเลดำยังไม่พบในฐานข้อมูล การค้นหา house-keeping genes ได้แก่ *40S rRNA* และ *EIF5A*, และยีนของ G-protein ได้แก่ *Gαq*, *Gαs*, และ*Gαo* และยีน *β-arrestin* ในปูทะเลดำจึงจำเป็นต้องดำเนินการโดยการใช้วิธี Reverse translation โดยทำการสืบค้นหาลำดับกรดอะมิโนยีนดังกล่าวในสัตว์ที่อยู่ในกลุ่ม Crustaceans จากฐานข้อมูลของโปรตีน (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/) จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้ของแต่ละยีน จะถูกนำมาเรียงลำดับด้วยโปรแกรม ClustalW (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) เพื่อหาตำแหน่งที่ถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved region) ซึ่งจะใช้เป็นตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (degenerate primers) โดยการใช้โปรแกรม(https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้จะนำไปค้นหายีนดังกล่าวใน cDNA ของต่อม Y-organs ดังรายละเอียดในเอกสารอ้างอิงนี้ (Chung, 2008) โดยจะใช้เทคนิคทัชดาวน์พีซีอาร์ (touch-down PCR:TD PCR) ดำเนินการกับไพรเมอร์คู่นอกสุดก่อนด้วยการใช้ Advantage Taq Polymerase (LifeScience, BD) ภายใต้เงื่อนไข PCR ตามที่อธิบายไว้ (Chung, 2008) PCR รอบที่สองจะถูกดำเนินการด้วยผลิตผลของปฏิกิริยา TD ที่ได้เจือจาง 20 เท่าในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดำเนินการกับไพรเมอร์คู่ใน นำผลิตผลที่ได้มาแยกขนาดด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis (1.2% gel) ชิ้นส่วนที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดการณ์ไว้จะถูกตัดออกมาและดำเนินการเพิ่มชิ้นส่วนและอ่าน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามขั้นตอนทางชีวโมเลกุลทั่วไป ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค้นหาได้จะเป็นชิ้นส่วนที่พบในปูทะเลดำ ซึ่งจะถูกนำไปออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อค้นหาชิ้นส่วนที่เหลือของ mRNA ของยีนดังกล่าว ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้จะนำมาค้นหาโดยใช้เทคนิค TD PCR ดำเนินการกับไพรเมอร์ตำแหน่งนอกสุดกับไพรเมอร์ UPMด้วย Advantage Taq Polymerase (LifeScience, BD) ภายใต้เงื่อนไข PCR ตามที่อธิบายไว้ (Chung, 2008) นำเอาผลิตผลของ TD PCR มาเจือจาง 20 เท่าในน้ำแล้วดำเนินการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ตำแหน่งข้างในกับไพรเมอร์ NUP แล้วนำผลิตผลที่ได้มาแยกขนาดด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis (1.2% gel) ชิ้นส่วนที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดการณ์ไว้จะถูกตัดออกมาและดำเนินการเพิ่มชิ้นส่วนและอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ตามขั้นตอนทางชีวโมเลกุลทั่วไป

สำหรับยีน GPCR ไพรเมอร์ของ GPCR ได้รับการออกแบบจากลำดับที่ได้รับจากการสร้างลำดับจำลองด้วยการใช้ *de novo* assembly โดยใช้โปรแกรม Trinity รุ่น 2.3.2 ตามด้วยรุ่น Blast 2.2.26 (blastn และ tblastx) ที่มียีน GPCR สองตัวใน *Spodoptera frugiperda* (DQ295917.1) และ *Helicoverpa armigera* (JQ809653.1) ไพรเมอร์ที่ได้จะทำการแยกค้นหาชิ้นส่วนของยีน GPCR จาก cDNA ของต่อม Y-organ เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้โปรแกรมและเพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต่อไป ดังรายละเอียดการดำเนินการทางชีวโมเลกุลข้างต้น

3.9 การวัดระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยการเทคนิค real-time PCR

การค้นหาระดับการแสดงออกของยีน *40S rRNA, EIF5A, GPCR1, GPCR2, Gαq, Gαs, Gαo* และยีน *β-arrestin* ในเนื้อเยื่อได้แก่ต่อม Y-organs, สมอง, ทรวงอกปมประสาทและลำไส้ส่วนหลังที่ได้จากปูในระยะ intermolt และ premolt รวมทั้งต่อม Y-organs ที่บ่มด้วยฮอร์โมน 20-HE ด้วยการใช้เทคนิค PCR แบบเรียลไทม์เชิงปริมาณ (qPCR) เส้นโค้งมาตรฐาน (standard curve) ของแต่ละยีนจะสร้างจากการนำของชิ้นส่วนของยีนนั้นๆ เชื่อมต่อเข้าไปในพลาสมิด pGEM-T easy vector (Promega) โดยพลาสมิดที่ถูกสกัดออกมาจะใช้ในการคำนวนเพื่อเจือจางให้อยู่ในอนุกรม 10 เท่า คือ 10^2–10^7 copies/µl แตละปฏิกิริยา (10 µl) ประกอบด้วย 50 nM Primer mix (forward & reverse primers) แม่แบบ cDNA (ขึ้นอยู่กับชนิดของยีนที่จะทำการวัด), qPCR Green Master Mix LRox (Biotech Rabbit, Germany)

ความเข้มข้นของ cDNA ในกลุ่มตัวอย่างของยีน *GPCR1, GPCR2* จะใช้ความเข้มข้นที่ 200 ng/rxn ขณะที่ยีน *Gαq, Gαs, Gαo/Gαi*, *β-arrestin* และ *40s* จะใช้ความเข้มข้นของ cDNA ที่ 100 ng/rxn ในขณะที่ ยีน *EIF5A* (ซึ่งจะใช้เป็น reference gene) จะใช้ความเข้มข้นของ cDNA ที่ 10 ng/rxn

การวิเคราะห์ qPCR ดำเนินการด้วยการเปิดใช้งานครั้งแรกเป็นเวลา 3 นาทีและ 40 รอบของวงจรที่ประกอบด้วย denature ที่ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่ 60°C เป็น

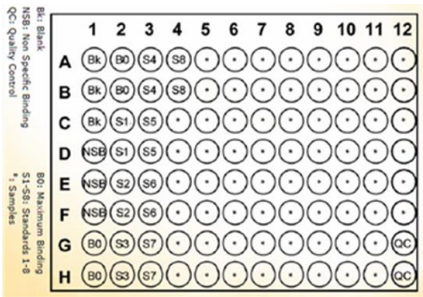
เวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ความจำเพาะของผลิตภัณฑ์ PCR ได้รับการยืนยันจากการวิเคราะห์เส้นโค้งการหลอมละลาย (melting curve)

3.10 การวัดระดับฮอร์โมน 20-HE ด้วยชุดตรวจสำเร็จ

เลือดที่ดูดออกมาจากปูในระยะลอกคราบต่างๆ จะถูกผสมกับ anti-coagulant ในอัตราส่วน 1:1 สารละลายของเลือดใน anti-coagulant ปริมาณ 100 µl ถูกนำไปสกัดเอาฮอร์โมน 20-HE ด้วยเมธานอลบริสุทธิ์ปริมาณ 1,900 µl แล้วปั่นให้เข้ากัน นำไปปั่นตกที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดเอาสารละลายเก็บไว้ ก่อนที่จะนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Speed Vacuum ทำการละลายตะกอนด้วย EIA buffer จำนวน 500 µl โดยขั้นตอนของการทำการวัดระดับของฮอร์โมน 20-HE จะทำตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ในคู่มือของ 20-Hydroxyecdysone Enzyme Immunoassay (EIA) Kit (Cayman Chemical, USA) ซึ่งมีหลักการคร่าวๆ ดังนี้

EIA มีหลักการทำงานจากการแข่งขันระหว่าง unlabelled 20-HE (จากตัวอย่าง) และ acetylcholinesterase (AChE®) -labelled 20-HE (Tracer) กับแอนติบอดีจำเพาะของ 20-HE (สร้างจากกระต่าย) ที่มีอยู่อย่างจำกัด โปรตีนเชิงซ้อนของแอนติบอดีจำเพาะของ 20-HE และฮอร์โมน 20-HE ที่สกัดได้หรือ 20-HE ที่เป็น Tracer จะถูกยึดติดให้อยู่ใน 96-well plate ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของกระต่ายที่เคลือบไว้ในแต่ละหลุม หลังจากบ่มแล้วจะทำการชะล้างแอนติบอดีที่ไม่ได้ยึดเกาะอยู่ในเพลท เติม Ellman's reagent (สารตั้งต้นของเอนไซม์ AChE และ chromogen) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองที่สามารถดูดซับคลื่นแสงที่ 414 นาโนเมตร ความเข้มของสีถูกวัดโดยเครื่อง microplate reader โดยสัดส่วนของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนผกผันกับจำนวนของ 20-HE ที่พบในตัวอย่าง

โดย 20-HE standard ของชุดตรวจสำเร็จนี้มีอยู่ 8 จุด ได้แก่ 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1,250, 2,500 และ 5,000 pg/ml โดยจะทำการเตรียมตัวอย่างดังรูปข้างล่างนี้



Enzyme Immunoassay Protocole (volumes are in µL)						
	Blank	NSB	B0	Standard	QC	Sample
EIA Buffer	-	100	50	-	-	-
Standard	-	-	-	50	-	-
QC	-	-	-	-	50	-
Sample	-	-	-	-	-	50
Tracer	-	50				
Antiserum	-	-	50			
Cover plate, incubate overnight at +4°C						
Wash plate 5 times & discard liquid from the wells						
Ellman's reagent	200					
Incubate with an orbital shaker at 400 rpm in the dark at RT						
Read the plate between 405 and 414 nm						

ผลที่ได้จะถูกนำมาคำนวณตามรายละเอียดดังนี้

1. นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของ NSB ออกจากค่า B0, standard, QC และตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่าง (จาก 2 ซ้ำ)

2. คำนวณ B/B0 (%) ของแต่ละตัวอย่าง

3. พล็อตค่า B/B0 (%) บนแกน y กับความเข้มข้น (pg / mL) บนแกน x วาดเส้นที่ดีที่สุดผ่านจุดต่างๆ

4. ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เหมาะสมควรมีค่า B/B0 ที่อยู่ระหว่าง 20% ถึง 80%

5. สามารถใช้โปรแกรมจากเครื่องอ่านเพลทด้วยซอฟต์แวร์ที่สามารถทำกราฟข้อมูลเหล่านี้ได้ (พารามิเตอร์ 4 ตัว หรือ logistic fit 5 พารามิเตอร์)

3.11 การเตรียมตัวอย่างต่อม Y-organ ที่ได้จากการบ่มด้วยฮอร์โมน 20HE สำหรับตรวจวัดระดับของ Ca^{2+}, cAMP และ cGMP

หลังจากบ่มต่อม Y-organ ในฮอร์โมน 20-HE ที่เวลาต่างๆ แบ่งต่อม Y-organs เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่รวมต่อม Y-organ 2 ต่อมเป็น 1 ตัวอย่าง (n=1) สำหรับวัดระดับ Ca^{2+} และกลุ่มที่รวมต่อม Y-organ 4 ต่อมมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง (n=1) สำหรับตรวจวัดระดับ cAMP และ cGMP

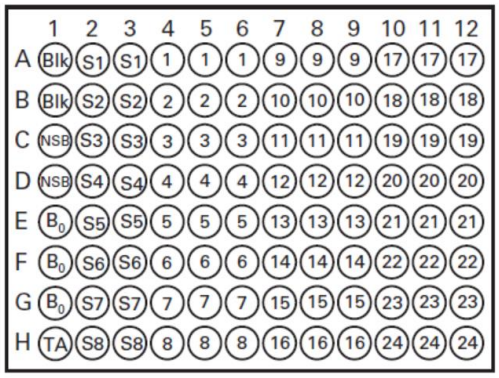
นำต่อม Y-organ ที่จะวัดระดับ Ca^{2+} มาล้างด้วย PBS buffer ที่มี glyceral 20% จำนวน 100 µl แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator เป็นเวลา 10 วินาที แล้วปั่นตกเนื้อเยื่อที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดเอาสารละลายเก็บไว้ แล้วเจือจางด้วย 2X calcium assay buffer ในอัตราส่วน 1:1 ใช้จำนวน 10 µl สำหรับนำไปวัดระดับ Ca^{2+} ด้วยชุดตรวจสำเร็จต่อไป

สำหรับกลุ่มของต่อม Y-organ ที่จะวัดระดับ cAMP และ cGMP นำต่อม Y-organ ไปบดและสกัดด้วย 5% Trichloroacetic (TCA ในน้ำ) 250 µl เพื่อแตกเซลล์แล้วแยกเอาตะกอนเนื่อเยื่อที่เหลือด้วยการปั่นตกที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วค่อยๆดูดเอาสารละลายใส่ในหลอดใหม่ ทำการกำจัด TCA ในสารละลายด้วยอีเธอร์อิ่มน้ำ (water-saturated ether, เตรียมโดยเติมอีเธอร์ในน้ำจนเกิดการแยกชั้นเป็นสองชั้นแล้วใช้เฉพาะส่วนบน) โดยเติมในอัตราส่วน (สารละลาย:อีเธอร์อิ่มน้ำ) 1:5 ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาทีแล้วตั้งให้แยกชั้นแล้วค่อยๆดูดเอาชั้นของอีเธอร์ที่อยู่ส่วนบนออก แล้วสกัดซ้ำด้วยอีเธอร์อิ่มน้ำอีกรอบ แล้วกำจัดอีเธอร์ที่เหลือในสารสกัดด้วยการให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากสารสกัดที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ชุด สำหรับวัดระดับของ cAMP และ cGMP โดยแต่ละชุดจะใช้สารละลายที่สกัดได้จำนวน 100 µl (ซ้ำละ 50 µl จำนวนสองซ้ำ)

3.12 วัดระดับสารสื่อสัญญาณ cAMP ด้วยชุดตรวจสำเร็จ

ทำการเตรียม standard โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นที่เจือจางลง 3 เท่าได้แก่ 0.3, 1.0, 3.1, 9.3, 27.8, 83.3, 250, และ 750 pmol/ml ด้วย ELISA buffer ตามคู่มือแล้วเตรียม standard กลุ่มตัวอย่าง NSB, blank (Blk) และ B_0 ดังตารางข้างล่าง

Well	ELISA Buffer	Standard/Sample	Tracer	Antiserum
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 µl (at devl. step)	-
NSB	100 µl	-	50 µl	-
B_0	50 µl	-	50 µl	50 µl
Std/Sample	-	50 µl	50 µl	50 µl



Blk - Blank
TA - Total Activity
NSB - Non-Specific Binding
B_0 - Maximum Binding
S1-S8 - Standards 1-8
1-24 - Samples

โดยเติม ELISA buffer ในหลุม NSB จำนวน 100 µl, ในหลุม B_0 50 µl แล้วเติม standard จำนวน 50 µl ในแต่ละหลุม โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.3 pmol/ml ขึ้นไปจนครบที่ความเข้มข้น 750 pmol/ml เติมชุดของกลุ่มตัวอย่าง 50 µl (จำนวน 2 ซ้ำ) จนครบแล้วเติม cAMP AChE Tracer จำนวน 50 µl ในแต่ละหลุม ยกเว้น หลุมของ TA และ Blk สุดท้ายเติม cAMP ELISA antiserum จำนวน 50 µl ในทุกหลุม ยกเว้น หลุมของ TA, NSB และ Blk ปิดเพลทด้วยฟิล์มแล้วทำการบ่มที่ 4 องศาเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วล้างเพลทด้วย Wash Buffer จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติม Ellman's reagent ที่เตรียมใหม่จำนวน 200 µl ในแต่ละหลุม แล้วเติม tracer จำนวน 5 µl ในหลุมของ TA ปิดเพลทด้วยฟิล์ม บ่มที่มีเครื่องเขย่าแนวนอนในที่มืดเป็นเวลา 90-120 นาที นำการอ่านค่าการเปลี่ยนระดับสีที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

ผลที่ได้จะถูกนำมาคำนวณตามรายละเอียดดังนี้

1. หาค่าเฉลี่ยของ NSB, B_0 แล้วนำค่าเฉลี่ยของ NSB ลบออกจากค่า B_0 ซึ่งค่า B_0 ที่ได้จะเป็นค่า maximum binding

2. คำนวณ B/B0 (%) โดยนำค่า absorbance ของตัวอย่างและ standard แต่ละตัวลบออกด้วยค่าของ NSB แล้วหารด้วย B_0 แล้วแปลงค่าให้เป็นเปอร์เซนต์โดยคูณด้วย 100

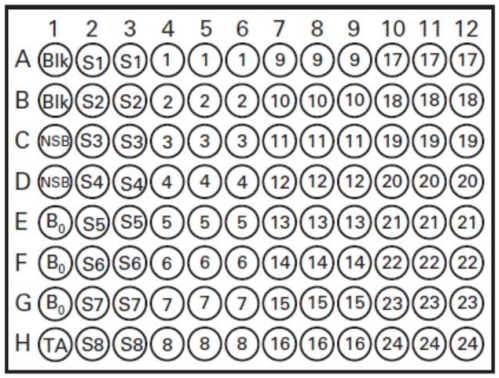
3. พล็อตสมการเส้นตรงของ ค่า B/B0 (%) ของ standard บนแกน y กับ log (ความเข้มข้น) บนแกน x โดยใช้ 4-parameter logistic fit

หรือจากสมการ logit $(B/B_0)=\ln[B/B_0/(1-B/B_0)]$

3.13 วัดระดับสารสื่อสัญญาณ cGMP ด้วยชุดตรวจสำเร็จ

ทำการเตรียม standard โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นที่เจือจางลง 2 เท่าได้แก่ 0.23, 0.46, 0.93, 1.87, 3.75, 7.5, 15 และ 30 pmol/ml ด้วย ELISA buffer ตามคู่มือแล้วเตรียม standard กลุ่มตัวอย่าง NSB, blank (Blk) และ B_0 ดังตารางข้างล่าง

Well	ELISA Buffer	Standard/Sample	Tracer	Antiserum
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 µl (at devl. step)	-
NSB	100 µl	-	50 µl	-
B_0	50 µl	-	50 µl	50 µl
Std/Sample	-	50 µl	50 µl	50 µl



Blk - Blank
TA - Total Activity
NSB - Non-Specific Binding
B_0 - Maximum Binding
S1-S8 - Standards 1-8
1-24 - Samples

โดยเติม ELISA buffer ในหลุม NSB จำนวน 100 µl, ในหลุม B_0 50 µl แล้วเติม standard จำนวน 50 µl ในแต่ละหลุม โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.23 pmol/ml ขึ้นไปจนครบที่ความเข้มข้น 30 pmol/ml เติมชุดของกลุ่มตัวอย่าง 50 µl (จำนวน 2 ซ้ำ) จนครบแล้วเติม cGMP AChE Tracer จำนวน 50 µl ในแต่ละหลุม ยกเว้น หลุมของ TA และ Blk สุดท้ายเติม cGMP ELISA antiserum จำนวน 50 µl ในทุกหลุม ยกเว้น หลุมของ TA, NSB และ Blk ปิดเพลทด้วยฟิล์มแล้วทำการบ่มที่ 4 องศาเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วล้างเพลทด้วย Wash Buffer จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติม Ellman's reagent ที่เตรียมใหม่จำนวน 200 µl ในแต่ละหลุม แล้วเติม tracer จำนวน 5 µl ในหลุมของ TA ปิดเพลทด้วยฟิล์ม บ่มที่มีเครื่องเขย่าแนวนอนในที่มืดเป็นเวลา 90-120 นาที นำการอ่านค่าการเปลี่ยนระดับสีที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

ผลที่ได้จะถูกนำมาคำนวณตามรายละเอียดดังนี้

1. หาค่าเฉลี่ยของ NSB, B_0 แล้วนำค่าเฉลี่ยของ NSB ลบออกอจากค่า B_0 ซึ่งค่า B_0 ที่ได้จะเป็นค่า maximum binding

2. คำนวณ B/B0 (%) โดยนำค่า absorbance ของแต่ละตัวอย่างและ standard ลบออกด้วยค่าของ NSB แล้วหารด้วย B_0 แล้วแปลงค่าให้เป็นเปอร์เซนต์โดยคูณด้วย 100

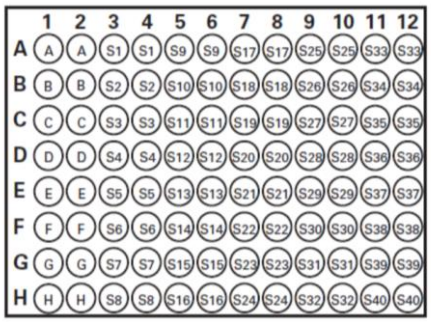
3. พล็อตสมการเส้นตรงของ ค่า B/B0 (%) ของ standard บนแกน y กับ log (ความเข้มข้น) บนแกน x โดยใช้ 4-parameter logistic fit

หรือจากสมการ logit $(B/B_0)=\ln[B/B_0/(1-B/B_0)]$

3.12 การวัดระดับสารสื่อสัญญาณ Ca^{2+} ด้วยชุดตรวจสำเร็จ

การวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของ Ca^{2+} ในสารละลายที่ใช้บ่มซึ่งใช้ Crustacean normal saline ที่ประกอบด้วย $CaSO_4$ จำนวน 3.4 g/L จึงต้องมีการเจือจางในส่วนของสารละลายลง 25 เท่า โดยเติมสารละลายที่ใช้บ่ม 10 µl กับน้ำจำนวน 240 µl แล้วใช้สารละลายดังกล่าวนี้ 15 µl ผสมกับ assay buffer จำนวน 15 µl

ทำการเตรียมตัวอย่างต่อม Y-organs ที่บ่มด้วยฮอร์โมนตามขั้นตอน 3.11 และเตรียม standard ให้มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 mg/dl ด้วย assay buffer แล้วเติม standard และตัวอย่างจำนวน 10 µl ต่อหลุม ตามตัวอย่างข้างล่างนี้



A-H = Standards
S1-S40 = Sample wells

Tube	Calcium Standard (µl) (20 mg/dl)	Assay Buffer (µl)	Final Calcium Concentration (mg/dl)
A	0	100	0
B	2.5	97.5	0.5
C	5	95	1
D	10	90	2
E	20	80	4
F	30	70	6
G	40	60	8
H	50	50	10

แล้วเติม working detector reagent จำนวน 200 µl ในแต่ละหลุม แล้วเขย่าเบาประมาณ 20-30 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดซับแสงที่ 570-590 นาโนเมตร

ผลที่ได้จะถูกนำมาคำนวณตามรายละเอียดดังนี้

1. หาค่าเฉลี่ยของค่าดูดซับแสงของแต่ละตัวอย่าง
2. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 mg/dl (A) ออกจากทุกตัวอย่างซึ่งจะเป็นค่าดูดกลืนแสงที่แท้จริง
3. พลอตค่าดูดกลืนแสงของ standard ที่ได้จากข้อ 2 กับความเข้มข้นนั้นๆ
4. คำนวนความเข้มข้นจาก linear regression

$$\text{Calcium (mg/dl)} = \left[\frac{\text{Corrected sample absorbance - (y-intercept)}}{\text{Slope}}\right] \times \text{Sample dilution}$$

3.13 การค้นหาตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน GPCR2

นำต่อม Y-organ ที่ได้จากการบ่มด้วยฮอร์โมนที่ 1 และ 6 ชั่วโมง และที่ไม่ได้รับฮอร์โมนไปแช่ใน 4% Paraformadehyde (PFA ใน PBS) ข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBS ทำการถ่ายต่อม Y-organ ลงในซูโครส 10% (PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้ายลงในซูโครส 20% ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ต่อด้วยซูโครส 30% แล้วทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นเตรียมถ่ายโอนต่อม Y-organ ไปยังสารละลายสำหรับการหล่อเย็น (specimen matrix, Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound) เก็บแม่พิมพ์แช่แข็งในอลูมิเนียมฟอยล์และเก็บไว้ใน -80°C จนกว่าจะใช้

ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา10 µm ใน cryostat ที่ −20°C แล้วย้ายเนื้อเยื่อที่ตัดได้ไปยังสไลด์โดยแตะสไลด์ไปยังเนื้อเยื่อซึ่งจะละลายลงบนสไลด์ แล้วทำการยึดเนื้อเยื่อให้ติดกับสไลด์โดยบ่มแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาข้ามคืน แล้วทำการบ่มเนื้อเยื่อด้วย blocking solution ที่ประกอบด้วย BSA 1% และ glycine 22.52 mg/mL ใน PBST (PBS + 0.1% Tween 20) เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อป้องกันการจับแอนติบอดีที่ไม่เฉพาะเจาะจง แล้วทำการบ่มเนื้อเยื่อกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน GPCR2 (โดยใช้เปปไทด์สังเคราะห์) ที่สร้างในหนู (Abclonal Technology, China) ด้วยอัตราส่วน 1:10 ใน 1% BSA ใน PBST ในห้องที่มีความชื้น ค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างสไลด์ด้วย PBS โดยแช่เป็น 5 นาที จำนวนสามครั้ง แล้วทำการบ่มเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีที่ติดสารฟลอออเรสเซส ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู (Anti-mouse IgG, conjugated with Alexa Fluor® 488, Cell Signaling Technology) ที่ความเข้มข้น 1:500 ใน 1% PBS บ่มค้างคืนที่ 4 องศาเซลเซียสในที่มืดและมีความชื้น เมื่อครบกำหนด ล้างสไลด์ด้วย PBS สามครั้งเป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด แล้วทำการย้อมสีด้วย Fluoroshield Mounting Medium With DAPI (Abcam) นำสไลด์ไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง confocal microscope (Olympus) ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า

3.14 ชีวสถิติ

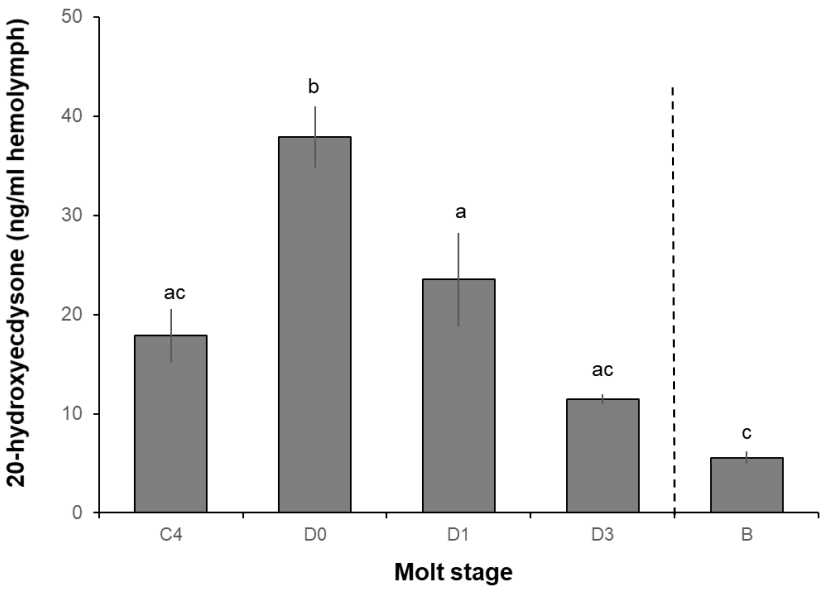
ระดับการแสดงออกของยีนที่ใช้เทคนิค real-time PCR จะถูกคำนวณจากรอบการทำงาน (Ct) ที่ได้ ผลที่คำนวณได้จะถูกนำมาแปลงค่าเป็น relative expression โดยใช้ยีน EIF5A เป็นระดับอ้างอิง ซึ่งจะคำนวณโดยใช้ระดับการแสดงออกของแต่ละยีนจะถูกนำไปหารด้วยระดับการแสดงออกของยีน EIF5A ในแต่ละตัวอย่าง (level of designated gene/level of EIF5A) ระดับการแสดงออกของกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกันได้รับการทดสอบทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (*one-way ANOVA*) ตามด้วยการทดสอบ Tukey post hoc test (p <0.05) ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในระยะปกติและระยะเตรียมลอกคราบในแต่ละเนื้อเยื่อจะทำการตรวจสอบทางสถิติด้วย t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances โดยมีระดับความเชื่อมั่นอยู่ที่ (p <0.05)

ส่วนระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน 20-HE, cAMP, cGMP, และ Ca^{2+} ที่ตรวจวัดด้วยชุดตรวจสำเร็จ ผลที่ได้จะทำการการทดสอบทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ตามด้วยการทดสอบ Tukey post hoc test ($p < 0.05$)

4. ผลการทดลอง

4.1 ระดับฮอร์โมน 20-HE ในเลือดของปูในระยะลอกคราบต่างๆ

ระดับของฮอร์โมน 20-HE ที่ตรวจวัดด้วยชุดตรวจสำเร็จ EIA assay พบว่าระดับของฮอร์โมน 20-HE มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะลอกคราบอย่างมีนัยยะสำคัญ (*one-way ANOVA*, $p<0.01$) โดยพบว่าระดับของฮอร์โมน 20-HE ที่ระยะปกติซึ่งอยู่ที่ 17.8±2.7 ng/ml hemolymph เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p<0.01$) เมื่อปูเข้าสู่ระยะเตรียมลอกคราบ (D_0 stage: 37.9±3.1 ng/ml hemolymph) ในระยะเตรียมลอกคราบ (D_1 และ D_3 stages) ระดับของฮอร์โมน 20-HE ลดลงจากระยะ D_0 stage อย่างมีนัยยะสำคัญ ($p<0.05$) มาอยู่ที่ 23.5±4.7 และ 11.4±0.5 ng/ml hemolymph ตามลำดับ และระดับของฮอร์โมน 20-HE ลดลงมาต่ำที่สุดที่ 5.6±0.6 ng/ml hemolymph ต่างจากระยะเตรียมลอกคราบ (D_0 และ D_1 stage) อย่างมีนัยยะสำคัญ ($p<0.01$) ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กราฟแท่งแสดงระดับของฮอร์โมน 20-HE ที่ตรวจวัดได้จากเลือดปูในระยะลอกคราบต่างๆ ได้แก่ ระยะปกติ (C_4 stage) ระยะเข้าสู่ระยะเตรียมการลอกคราบ (D_0 stage) ระยะเตรียมการลอกคราบ (D_1 stage) ระยะปลายของเตรียมการลอกคราบ (D_3 stage) และระยะหลังลอกคราบ (B stage) โดยเส้นประแสดงถึงช่วงเวลาลอกคราบ (ecdysis) ตัวอักษรข้างบนกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Gαo*

ลำดับของยีน *Gαo* ที่ค้นพบในปูทะเลดำประกอบด้วย 1,712 คู่เบส (accession no. MK757482) ซึ่งแบ่งออกเป็น 5'untranslated region (5'UTR) จำนวน 181 คู่เบส 3'UTR จำนวน 466 คู่เบส และส่วนที่จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน Gαo (coding region) จำนวน 1,065 คู่เบส ซึ่งให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 40.3 kDa (ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 354 ตัว) ดัง

แสดงในภาพที่ 8 (A) โดยยีน *Gαo* ที่ค้นพบในปูทะเลดำมีความใกล้เคียงกับยีน *Gαo* ของกลุ่ม crustaceans (Clade II) ได้แก่กุ้ง *Penaeus japonicus* (*PejGao*: BAH98114.1), กุ้งขาว *Penaeus vannamei* (*PevGao*: ROT62867.1), ไรน้ำ *Daphnia pulex* (*DapGao*: EFX72162.1), ไรน้ำ *Daphnia magna* (*DamGao*: KZS21762.1) ในขณะที่ arthropod อื่นๆ ได้แบ่งกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 (Clade I) ได้แก่กลุ่ม Hymenopterans เช่น มด กระโดดอินเดีย *Harpegnathos saltator* (*HasGao*: XP_011143020.1), *Cephus cinctus* (*CecGao*: XP_015610444.1), มด *Pseudomyrmex gracilis* (*PsgGao*: XP_020282499.1) กลุ่ม Isoptera ได้แก่ *Zootermopsis nevadensis* (*ZonGao*: XP_021925018.1), *Bombus terrestris* (*BotGao:* XP_003401632.1), มด *Trachymyrmex septentrionalis* (*TrsGao*: KYN36943.1) กลุ่ม Lepidoptera ได้แก่ หนอนยาสูบ *Helicoverpa armigera* (*HeaGao*: XP_021183096.1) *Trichoplusia ni* (*TrnGao*: XP_026729026.1) *Plutella xylostella* (*PlxGao*: XP_011551652.1), *Solenopsis invicta* (*SoiGao*: XP_011159405.1), กลุ่มที่ 3 (Clade III) ได้แก่ แมลงวัน *Musca domestica* (*MudGao*: XP_005174853.1), ยุง *Culex quinquefasciatus* (*CuqGao*: XP_001841737.1) มด *Acromyrmex echinatior* (AceGao: XP_011051870.1), ปลวก *Dermatophagoides pteronyssinus* (*DepGao*: XP_027204719.1), ด้วงงวงกินรากข้าว *Lissorhoptrus oryzophilus* (*LioGao*: ADK94869.1) *Tribolium castaneum* (*TrcGao*: XP_966421.1), ด้วง *Diabrotica virgifera virgifera* (*DivGao*: XP_028131218.1) และกลุ่มที่ 4 (Clade IV) ได้แก่ แมงมุม *Cupiennius salei* (*CusGao*: CFW94164.1), ปลวก *Galendromus occidentalis* (*GaoGao*: XP_003743353.1), แมงดาทะเล *Limulus Polyphemus* (*LipGao*: XP_022238148.1) และ *Centruroides sculpturatus* (*CesGao*: XP_023218410.1) โดยมี ยีน *Gαo* ของหนู (*Mus musculus*) เป็น out group (*MusGao*: NP_034438.1 และ NP_001106855.1) ดังแสดงในภาพที่ 8 (B)

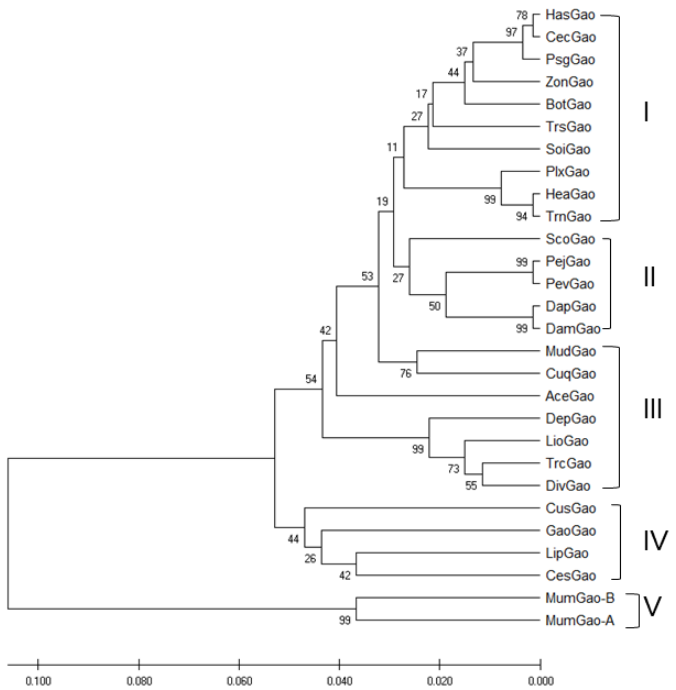
(A)

```
   1  ACATGGGGAGTGTGCTCTGCGCTGGGCTTAGCTGCGGAACTTTGCTGCCTTCTGACTGTGCCGTGTGTGTGTGGGTGTGG
  81  TGTAGTGTGGTACAGTTGTGGCGCTGCCACTGTGGGGTGTGGTGGAGGTCGGTAGGACCGTATAGCGTGGTCGGTGAGGA
 161  GTGCTAGCCGACACCGCAACC

 182  atggggtgcgccatgtctgcggaggagcgtgccgctcaggcccgcagcaaacagatcgaa
       M  G  C  A  M  S  A  E  E  R  A  A  Q  A  R  S  K  Q  I  E    20
 242  aggaacctgaaggaggatgggattcaggcggcgaaagatatcgagcttctgctactggga
       R  N  L  K  E  D  G  I  Q  A  A  K  D  I  E  L  L  L  L  G    40
 302  gcgggagagtctggaaagagcaccattgtgaagcaaatgaaaatcatccacgagtctggt
       A  G  E  S  G  K  S  T  I  V  K  Q  M  K  I  I  H  E  S  G    60
 362  tttacccccgaggacttcaagcagtaccggccggtggtttattccaacaccatccagtcc
       F  T  P  E  D  F  K  Q  Y  R  P  V  V  Y  S  N  T  I  Q  S    80
 422  ctcgtggccatcctgcgagccatgcccaacctcggaatatccttcggcaacaacgagcga
       L  V  A  I  L  R  A  M  P  N  L  G  I  S  F  G  N  N  E  R   100
 482  gagcccgacgcaaaaatggtgttcgacgtgatctcccgcatggaggacacagagcccttc
       E  P  D  A  K  M  V  F  D  V  I  S  R  M  E  D  T  E  P  F   120
 542  tcggaggagctactgtcggccatgaagcgcctctgggacgacacgggcgtgaaggagtgt
       S  E  E  L  L  S  A  M  K  R  L  W  D  D  T  G  V  K  E  C   140
 602  ttcggccgctccaacgagtatcaactcaacgactcggctaaatatttcctggacgacttg
       F  G  R  S  N  E  Y  Q  L  N  D  S  A  K  Y  F  L  D  D  L   160
 662  gaccgcctgggtgctaaggagtaccagcccacagcacaggacatcctgaggacccgcgtc
       D  R  L  G  A  K  E  Y  Q  P  T  A  Q  D  I  L  R  T  R  V   180
 722  aagaccactggcatcgtggaggttcacttctccttcaaaaacctcaacttcaagttattt
       K  T  T  G  I  V  E  V  H  F  S  F  K  N  L  N  F  K  L  F   200
 782  gatgtcggtggccagcgctcagaaagaaagaaatggatccactgttttgaggatgtgaca
       D  V  G  G  Q  R  S  E  R  K  K  W  I  H  C  F  E  D  V  T   220
 842  gccatcatcttctgtgtagccatgtctgaatatgaccaagtcttgcacgaggatgagacc
       A  I  I  F  C  V  A  M  S  E  Y  D  Q  V  L  H  E  D  E  T   240
 902  acgaatcgcatgcaagagtctctaaaactgtttgactctatttgtaataacaagtggttc
       T  N  R  M  Q  E  S  L  K  L  F  D  S  I  C  N  N  K  W  F   260
 962  accgacacatcaattatttgttcttgaataagaaggacttgtttgaggataagatcaag
       T  D  T  S  I  I  L  F  L  N  K  K  D  L  F  E  D  K  I  K   280
1022  aagagtccaatcactatatgcttctcggaatacactggagcccaagattatggagaagct
       K  S  P  I  T  I  C  F  S  E  Y  T  G  A  Q  D  Y  G  E  A   300
1082  gcagcttacatccaggcccagtttgaggccaagaacaaatcaacatctaaggagatctac
       A  A  Y  I  Q  A  Q  F  E  A  K  N  K  S  T  S  K  E  I  Y   320
1142  tgccacatgacctgtgctactgacaccaacaacatccagtttgtgtttgatgctgtgacg
       C  H  M  T  C  A  T  D  T  N  N  I  Q  F  V  F  D  A  V  T   340
1202  gacgtgattattgccaacaacctccgtgggtgtggcctttattaa
       D  V  I  I  A  N  N  L  R  G  C  G  L  Y  *Stop  354

1247 GGAGTGCCTCTCCACATAGCTGTGTTCACAGTAGGAAATTTCCGGTACAGTCGTGGTCTAGCTTGCTGCCCCAACGGTGT
1327 TCCTACCTTGTGTAAGGGTTGGAGCATCTGCTGGGAGGAGCTGCTAGTTGTACCTCCCCACCAGCCTGCCCCAGCCTGCC
1407 CCTCATTCATGCCTAAGTGAAGGGTAGGACTGGGGAGCAGCCTGATGTTTGAGTCAGACTCTGATAGTGGGGCATTTATT
1487 GTTGAGGAGGAAACCAGGATACTGTTGAGTGTTACATGTAATTAACTATTTATTGCAAAAGTTTACTGAAGTACGAATCA
1567 TGAAAGATACTATGGACCTGTTTAGGGAATACTCTTGAAACTGTATGACAGTCTCAGTGAGTTAAGTTCCCAGACTAGCC
1647 TTATGGTACCAAATATTTGCTTCAAAATTTATATCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1712
```

(B)



ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Gαo* ที่ค้นพบในปูทะเลดำ (A) และ Phylogenetic tree ซึ่งเปรียบเทียบกับยีน *Gαo* ที่พบในสปีชีส์อื่น โดยใช้โปรแกรม MegaX (B) โดยมียีน *Gαo* ของหนู (*MumGao*) เป็น out group

4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *β-arrestin*

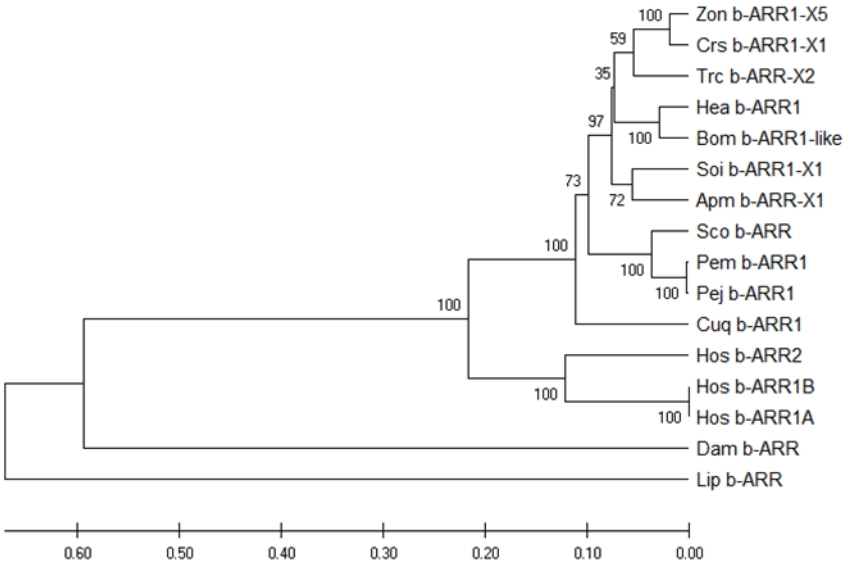
ลำดับของยีน *β-arrestin* ที่ค้นพบในปูทะเลดำประกอบด้วย 1,672 คู่เบส ซึ่งแบ่งออกเป็น 5'untranslated region (5'UTR) จำนวน 200 คู่เบส 3'UTR จำนวน 208 คู่เบส และส่วนที่จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน *β-arrestin* (coding region) จำนวน 1,263 คู่เบส ซึ่งให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 46.9 kDa (ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 420 ตัว) ดังแสดงในภาพที่ 9 (A) โดยยีน *β-arrestin* ในปูทะเลมีความใกล้เคียงกับ ยีน *β-arrestin* ในกุ้งมากที่สุด (*Penaeus monodon*: *Pem_b-ARR1*: AYF59252.1 และ *Penaeus japonicus*: *Pej_b-ARR1*: AME17864.1) ในขณะที่ยีน *β-arrestin* ของ crustaceans อื่นๆ ได้แก่ ไรน้ำ (*Daphnia magna*: *Dam_b-ARR*: JAN89191.1) และแมงดาทะเล (*Limulus polyphemus*: *Lip_b-ARR*: XP_013790023.1) ได้แยกออกมาจากกลุ่มของยีน *β-arrestin-1* ในขณะที่ arthropods อื่นๆ ได้แก่ *Apis mellifera* (*Aps_b-ARR1-X1*: XP_006561894.1), *Bombyx mori* (*Bom_b-ARR1*: NP_001266347.1), *Cryptotermes secundus* (*Crs_b-ARR1-X1*: XP_023726330.1), *Helicoverpa armigera* (*Hea_b-ARR1*: AJL99442.1), *Solenopsis invicta* (*Soi_b-ARR1*: XP_011165033.1), *Tribolium castaneum* (*Trc_b-ARRq-X2*: XP_015834370.1), และ *Zootermopsis nevadensis* (*Zon_b-ARR1-X5*: XP_021913016.1), ได้เกาะกลุ่มกันและอยู่ใน clade เดียวกับปูทะเลและกุ้ง ในขณะที่ *Culex quinquefasciatus* (*Cuq_b-ARR1*: EDS45452.1) แยกจากกลุ่มอื่นๆ ทั้งนี้ *β-arrestin-1* ในมนุษย์ (*Hos_b-ARR1-2, -1B* และ *-1A*: AAC99468.1, AAC34123.1, และ AAC33295.1) มีความใกล้เคียงกับยีน *β-arrestin-1* ในปูทะเล ดังแสดงในภาพที่ 9 (B)

(A)

```
   1   CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGAGTTGGATGAGAGGCAGTGAGAGGGGA
  81   GGACGCAGCGGCGGGTTATGCATTGAAACCTGTGTGTCTGTACGGGCGAGAGGGAGGAACGGAAAAATAACCTTACCAGT
 161   CTGAGCTCGAGGCACGGCGGAGGGCGGGGCGAGACAGAAGGCTGCTGAGGATCGCAGCACCAACTCATGCGACACCCTAG
 241   CCACC

 246   atggacgacaacagcaagaggcaaggcaccagagtgttcaagaagagttctccaaatggg
        M  D  D  N  S  K  R  Q  G  T  R  V  F  K  K  S  S  P  N  G    20
 306   aaaataacagtttacctgggcaaaagagactttgttgaccacatcacacacgttgatccc
        K  I  T  V  Y  L  G  K  R  D  F  V  D  H  I  T  H  V  D  P    40
 366   atagatggcgttgtcctgatcgacccagaatacctgaaggaccgcaaggtattcggccat
        I  D  G  V  V  L  I  D  P  E  Y  L  K  D  R  K  V  F  G  H    60
 426   gtgcttgctgccttcaggtacggccgggaggatctggacgtgctgggtctcaccttccgg
        V  L  A  A  F  R  Y  G  R  E  D  L  D  V  L  G  L  T  F  R    80
 486   aaagacctgtacctggcctctgaacggatctaccctctggacactgccaacaagcgggca
        K  D  L  Y  L  A  S  E  R  I  Y  P  L  D  T  A  N  K  R  A   100
 546   cttaccaggttacaggagcggcttatcaaaaagctaggacccaatgccttcccattcttc
        L  T  R  L  Q  E  R  L  I  K  K  L  G  P  N  A  F  P  F  F   120
 606   tttgagctaccaccacactgcccggcatctgtcacactgcagccggcccctggggacatg
        F  E  L  P  P  H  C  P  A  S  V  T  L  Q  P  A  P  G  D  M   140
 666   ggcaagccgtgtggggtggactatgagctcaaggcttatgttggggagagtgtggaggac
        G  K  P  C  G  V  D  Y  E  L  K  A  Y  V  G  E  S  V  E  D   160
 726   aagcctcacaaacggaactcagtgcgactagccatcaggaaagtgatgtatgcccccatg
        K  P  H  K  R  N  S  V  R  L  A  I  R  K  V  M  Y  A  P  M   180
 786   aagcaaggcgaccagcccagcgtggaagtcagcaaggagtttatgatgtcccctaacaag
        K  Q  G  D  Q  P  S  V  E  V  S  K  E  F  M  M  S  P  N  K   200
 846   ctgcatcttgaggcctccttagacaaagagctgtactaccacggagagacagtcgccgtc
        L  H  L  E  A  S  L  D  K  E  L  Y  Y  H  G  E  T  V  A  V   220
 906   aatgtccacatacagaacaactccaataaaagtgttaaaaaaataaaagtttcaatccgg
        N  V  H  I  Q  N  N  S  N  K  S  V  K  K  I  K  V  S  I  R   240
 966   cagttcacggacatctgcctcttctcaacagcccagtacaagtgcaccgtggctgaggtg
        Q  F  T  D  I  C  L  F  S  T  A  Q  Y  K  C  T  V  A  E  V   260
1026   gagagcgaggaagggtgccctgtggggcctggcttctccgtcagtaaagttttctcgctg
        E  S  E  E  G  C  P  V  G  P  G  F  S  V  S  K  V  F  S  L   280
1086   acacccctgctcaccaacaaccgggacaagtgggggctggcccttgatggcaagctcaag
        T  P  L  L  T  N  N  R  D  K  W  G  L  A  L  D  G  K  L  K   300
1146   gacgaggacaccaaccttgcgtcctccactgtaatcactgactcctcccagaaggagaac
        D  E  D  T  N  L  A  S  S  T  V  I  T  D  S  S  Q  K  E  N   320
1206   ttgggcattatagtgcagtacaaggtaaaagtcaagctcatcctaggaccccttgttgga
        L  G  I  I  V  Q  Y  K  V  K  V  K  L  I  L  G  P  L  V  G   340
1266   gacttggttgcagaacttccattcaccttgatgcatcccaagcctgaggaggaacctgag
        D  L  V  A  E  L  P  F  T  L  M  H  P  K  P  E  E  E  P  E   360
1326   aacaacaagactgctgccccaaccacctcctcaccaacacaggactctgaatccacccct
        N  N  K  T  A  A  P  T  T  S  S  P  T  Q  D  S  E  S  T  P   380
1386   cctgttgacaccaacctcattgaactggacacggatgggaccacttgctatgctgatcag
        P  V  D  T  N  L  I  E  L  D  T  D  G  T  T  C  Y  A  D  Q   400
1446   gacgatgacatcatctttgaagactttgctcgactgcggttgaagggagagacagaagca
        D  D  D  I  I  F  E  D  F  A  R  L  R  L  K  G  E  T  E  A   420
1506   tag
        -
1509   GACCAACCCAACAGGTCGGTGCTTCAGATAAAAGGTATTGTTTGATTTATACAGCTTGTCTTCCCCTGAGTATGCAAGGC
1589   AACTTTCAAGAGAGAAGCAGAAATATATAATTAGTCCATTTTTAAAGTTTGTTTATGCATGTTTTATGTAATCAATCCTT
1669   TCTCAAAATGTAGT GAGTCATAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1717
```

(B)



ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *β-arrestin-1* ที่ค้นพบในปูทะเลดำ (A) และ Phylogenetic tree ซึ่งเปรียบเทียบกับยีน *β-arrestin-1* ที่พบในสปีชีส์อื่น โดยใช้โปรแกรม MegaX (B) โดยเปรียบเทียบกับยีน *β-arrestin-1* ของมนุษย์ (*Hos_b-ARR1-2, -1B* และ *-1A*)

4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *G-protein coupled receptor (GPCR)*

การค้นหายีน *GPCR* ในปูทะเล พบว่าสามารถจำแนกยีน *GPCR* ได้เป็นสองชนิด ให้ชื่อว่า *GPCR1* และ *GPCR2* ดังแสดงในรูปที่ 10 (A) และ (B) ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ยีน GPCR1 ประกอบด้วย 2,110 คู่เบส (accession no. MH298824) ซึ่งแบ่งออกเป็น 5'untranslated region (5'UTR) จำนวน 201 คู่เบส 3'UTR จำนวน 235 คู่เบส และส่วนที่จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน GPCR1 จำนวน 1,674 คู่เบส ซึ่งให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 62.8 kDa (ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 557 ตัว) โดยที่ 20 ตัวแรกทำหน้าที่เป็น Signal Peptide (MWGPVSLAAMVMVAVAGVEG, แสดงด้วยแถบดำ ในภาพที่ 10 (A)) ในขณะที่ 7-transmembrane domain แสดงไว้ในแถบสีเทา

ยีน GPCR2 ประกอบด้วย 2,446 คู่เบส (accession no. MG983220) ซึ่งแบ่งออกเป็น 5'untranslated region (5'UTR) จำนวน 352 คู่เบส 3'UTR จำนวน 702 คู่เบส และส่วนที่จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน GPCR2 จำนวน 1,392 คู่เบส ซึ่งให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 52.1 kDa (ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 463 ตัว) โดยที่ 22 ตัวแรกทำหน้าที่เป็น Signal Peptide (MKPRPGNLLLSLLLLALLKATG, แสดงด้วยแถบดำ ในภาพที่ 10 (B)) ในขณะที่ 7-transmembrane domain แสดงไว้ในแถบสีเทา ในขณะที่ตำแหน่งของเปปไทด์ที่ใช้กระตุ้นในการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน GPCR2 แสดงด้วยแถบสีม่วง

(A)

```
   1  ATGGGGAGTAAGGCGGCGGCAAGGACTAGAGGAGGTTGTTCGTCGCATCCTCTCCTTGAAAGCTTGGACATGTATTGTGT
  81  CTCTCATAGAAAACGAGGCTGCACGTGACCCTCAAAGGAAAACTTGTACTACTATCATCACTCAATTTTCAGGAGTGTGT
 161  GAGGAATCTAGACACCGCATCAAGATCTGGTGGTGGACAAG

 202  atgtggggaccagttagtctggcggccatggtgatggtggcagtggcgggcgtggaaggc
       M  W  G  P  V  S  L  A  A  M  V  M  V  A  V  A  G  V  E  G   20
 262  tcctctgccttgcctgggctcagttggtgctctgagtcggatattgacaatatgaggatt
       S  S  A  L  P  G  L  S  W  C  S  E  S  D  I  D  N  M  R  I   40
 322  accaaggacatgaaaccacagctcagtcagatagaggctgtagtgaacgaattcatagag
       T  K  D  M  K  P  Q  L  S  Q  I  E  A  V  V  N  E  F  I  E   60
 382  acgaatgtggtggacgaggtgttcatcagaaaagagcctcagtgcggagggaccacagag
       T  N  V  V  D  E  V  F  I  R  K  E  P  Q  C  G  G  T  T  E   80
 442  ccgcaggtggcagtcatcgactgggagaatgctgaactcgtgatgcaagatgatggtaat
       P  Q  V  A  V  I  D  W  E  N  A  E  L  V  M  Q  D  D  G  N  100
 502  ttcagcctcttttggaaaccacctgacacgatgcctatctttcaggaagttactaacttt
       F  S  L  F  W  K  P  P  D  T  M  P  I  F  Q  E  V  T  N  F  120
 562  tgcatcactaataacaatcctgagaatccggaagaacagtcaacagaactctttacaaat
       C  I  T  N  N  N  P  E  N  P  E  E  Q  S  T  E  L  F  T  N  140
 622  ttacttgccaaattctgctatttgaaagcttctctgcaggtggaacatgagatgaaaatc
       L  L  A  K  F  C  Y  L  K  A  S  L  Q  V  E  H  E  M  K  I  160
 682  tgttcgaatgtcagttgtgtgcgaaagtgctgtcctgagggaatgacactgttttcgggc
       C  S  N  V  S  C  V  R  K  C  C  P  E  G  M  T  L  F  S  G  180
 742  tcgaattgtgtgcctatgaaggaaaggatggactggctgcccgatgcccagatgaccgtg
       S  N  C  V  P  M  K  E  R  M  D  W  L  P  D  A  Q  M  T  V  200
 802  ctgtacgggccgccacgcctctgtaccgatatcctcttgtaccgcaacttctccatccta
       L  Y  G  P  P  R  L  C  T  D  I  L  L  Y  R  N  F  S  I  L  220
 862  ccttcgggaataattaatctggatggaaaattggaattggaagttgacagctactgtgtc
       P  S  G  I  I  N  L  D  G  K  L  E  L  E  V  D  S  Y  C  V  240
 922  gaatacatcggtaacatcccctccctggtggccttgtcctgtgccaagaaagtgacctca
       E  Y  I  G  N  I  P  S  L  V  A  L  S  C  A  K  K  V  T  S  260
 982  tggtactgtgagtggagacacgcggtgctcagcaccgtgttgcagtgtatctctgtcgca
       W  Y  C  E  W  R  H  A  V  L  S  T  V  L  Q  C  I  S  V  A  280
1042  tgtctcatcctcgtttggaccgtgtacgtctccgtggccaggctgcgaagtctcaatgag
       C  L  I  L  V  W  T  V  Y  V  S  V  A  R  L  R  S  L  N  E  300
1102  ggccgctgcatcatctcactcgtcactacactcagcgtcgcctacgcatgcttgaacgtt
       G  R  C  I  I  S  L  V  T  T  L  S  V  A  Y  A  C  L  N  V  320
1162  gccaagcacacggtatccgaaaccaacacccaatcttgtgaggtggcaccacggctggct
       A  K  H  T  V  S  E  T  N  T  Q  S  C  E  V  A  P  R  L  A  340
1222  cacttcggcttcttggcttcatatttctggatgaacgtcttcagttttcataccttttgtt
       H  F  G  F  L  A  S  Y  F  W  M  N  V  F  S  F  H  T  F  V  360
1282  aaactcagatcaccgatgagcggcaagtgggagaaacctttggtgtttggcctgtactcc
       K  L  R  S  P  M  S  G  K  W  E  K  P  L  V  F  G  L  Y  S  380
1342  ctctatgcctggggcatgccgctggcggtggcggtggtgggcgcagtgctggacgctgta
       L  Y  A  W  G  M  P  L  A  V  A  V  V  G  A  V  L  D  A  V  400
1402  aattctgatgctatccggccccactttgaaacctgctggttccaagagaacagagagacc
       N  S  D  A  I  R  P  H  F  E  T  C  W  F  Q  E  N  R  E  T  420
1462  ctggcctacatgtacatccctatgatggtaatggtgctcatcaacttagtgctcttcctg
       L  A  Y  M  Y  I  P  M  M  V  M  V  L  I  N  L  V  L  F  L  440
1522  gggtgcgtggtgctcatgtgtcgcaggagtgggcgggttaccttcagtccttcctccagc
       G  C  V  V  L  M  C  R  R  S  G  R  V  T  F  S  P  S  S  S  460
1582  caataccacaccttcagcgcgtggctctacgtcaggctcttcatacttacgggcatcctc
       Q  Y  H  T  F  S  A  W  L  Y  V  R  L  F  I  L  T  G  I  L  480
1642  tggcatacggaagttgtggcgtggtacttcttcgagtactgcagtgtgctggaatggatc
       W  H  T  E  V  V  A  W  Y  F  F  E  Y  C  S  V  L  E  W  I  500
1702  gccgacatactcaactccctgcacggcgtcttcgtgttcatcgtcaccatctgtttcagg
       A  D  I  L  N  S  L  H  G  V  F  V  F  I  V  T  I  C  F  R  520
1762  agggaccttaaggtgttccactgtgggcgtcctaaactcgtccagaagagagggcagagc
       R  D  L  K  V  F  H  C  G  R  P  K  L  V  Q  K  R  G  Q  S  540
1822  gagatcaccaccaccgaggcgtcagaaatggcagcaaatcccttggtctcgtag
       E  I  T  T  T  E  A  S  E  M  A  A  N  P  L  V  S  -  557
1876 ATGCTGCCGACACTTCCTGGAAGCTCTGCTATTTTCTTCACATTTTCTTTTTGCTCCTTGCATCCAATTATTACTTACTG
1956 CTTACTTTACCACTTGTTTTTATTTTCTTATTTCACATTTTCATTATCTTCTATGTATTACCAATTATATATTTTTTTAC
2036 ATCTTAAAGTATTTGTCATTATCGTCTAATACTAATTACACTTTCTTTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2110
```

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPCR1* (A) *GPCR2* (B) โดยตำแหน่งที่เป็น Signal peptide แสดงด้วยแถบสีดำ ในขณะที่ hydrophobic domain ซึ่งเป็น domain ที่สำคัญของโปรตีนใน 7-trans membrane family แสดงด้วยแถบสีเทา ตำแหน่งของเปปไทด์สังเคราะห์ที่ใช้กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเพาะของโปรตีน GPCR2 แสดงด้วยแถบสีม่วง

(B)

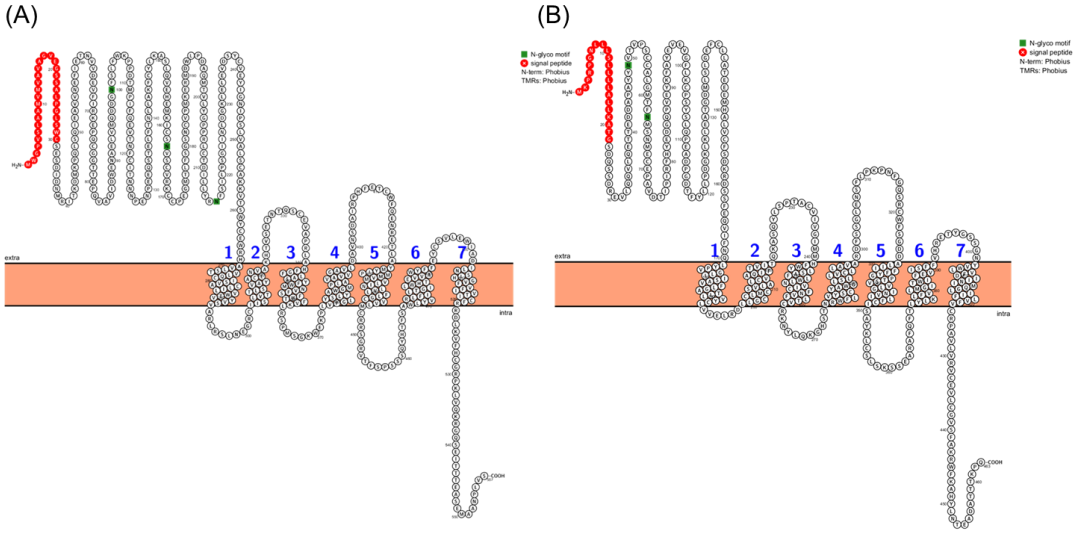
```
   1  TGGGGAGTAGACATTGAGACTTGGGAGGGAGAGGTTGCGTTGTTCTCTCCGCACCTCGCTCATAAACGTG
  71  ACTCAATTACTTGTGTTCTAAAAAAGTTATTAGACATTGATGGAGTCGAGAAAAAATTGGAACTTTGTGA
 141  TTGATATTTGAACTCAATTTGGGGAGAGAAACTTATTCGGTACTGATGCCGTGACTTTAGTGGAAATAAT
 211  TAAGAGTTGATGAAAGAAGTTTGTTTTTAGTACTATAAAGGAGTGAATTGCAAGTTGTTAAGTATCTTTT
 281  TCATTTACTCATCCAGGTACACTGAGAAAGCCAACAAGGATATTTCCGTGACCATCCATCAAAACACAGCC

 353  atgaagccaagaccgggcaacctgcttctgagccttctgctgctggctctcctgaaggct
       M  K  P  R  P  G  N  L  L  L  S  L  L  L  L  A  L  L  K      20
 413  acgggcagcgaccagagcagcgacagggaggtgctacagcaggtactacaggaaacgaca
       T  G  S  D  Q  S  S  D  R  E  V  L  Q  Q  V  L  Q  E  T  T   40
 473  gaggatgacgcgccagcttactacaacgtgacagtgccgtcgtgttgcgcccttgggatg
       E  D  D  A  P  A  Y  Y  N  V  T  V  P  S  C  C  A  L  G  M   60
 533  acgttcaacatgagcaacatggagtgcgagccagctgttgataccatccctatcagattt
       T  F  N  M  S  N  M  E  C  E  P  A  V  D  T  I  P  I  R  F   80
 593  cattatgaggacggccaaccagttgaatacaagttcgcctacgaggtagaagtagggttc
       H  Y  E  D  G  Q  P  V  E  Y  K  F  A  Y  E  V  E  V  G  F  100
 653  ctcaagtgcccctcctacagcttgcaacctgaagcagatccgggcgacacctttacctg
       L  K  C  P  S  Y  S  L  Q  P  E  A  D  P  G  D  T  F  Y  L  120
 713  ctgcctgacggaaagcttaagttggaggccacaggtgatatgttgagtttaggggaattc
       L  P  D  G  K  L  K  L  E  A  T  G  D  M  L  S  L  G  E  F  140
 773  tgtctgctggcaactgaagaagagatgcacgcccttgtttgtttcagtgacaagcgcgac
       C  L  L  A  T  E  E  E  M  H  A  L  V  C  F  S  D  K  R  D  160
 833  tccagtttcgagcaggtcattttcaatcagctttatcccgtgggcttgatcatctcagcc
       S  S  F  E  Q  V  I  F  N  Q  L  Y  P  V  G  L  I  I  S  A  180
 893  gtgttcctgggggctactctgctagtgtactgcctggtggtggagctgagagacctgctg
       V  F  L  G  A  T  L  L  V  Y  C  L  V  V  E  L  R  D  L  L  200
 953  gggtgctgtctgatgtgcagtgtattggctttgtgtgtagcgcagatatttacagtgata
       G  C  C  L  M  C  S  V  L  A  L  C  V  A  Q  I  F  T  V  I  220
1013  acgcagaaggctagccaatacttatcacctactgcgtgtgtgattgtgggtataatgatg
       T  Q  K  A  S  Q  Y  L  S  P  T  A  C  V  I  V  G  I  M  M  240
1073  cacttctggtacctgtctgccttcctgtggcttaacgttatctgcttcaacgtctttcta
       H  F  W  Y  L  S  A  F  L  W  L  N  V  I  C  F  N  V  F  L  260
1133  actgtctgccgtaagaactacctgcagaagggccacagcaccaacagatggttcctggta
       T  V  C  R  K  N  Y  L  Q  K  G  H  S  T  N  R  W  F  L  V  280
1193  tactcctgctacgcttggggcctctccctcttagtgtgtctcctcgctgtggccagggat
       Y  S  C  Y  A  W  G  L  S  L  L  V  C  L  L  A  V  A  R  D  300
1253  ttctcctcaggcctcgagaattccttcctcccgaaacctaacttcggccagtctagatgc
       F  S  S  G  L  E  N  S  F  L  P  K  P  N  F  G  Q  S  R  C  320
1313  tggttttcaggtgacgatgcgctgattatttcttctacgggcccacgtcagtggtgctc
       W  F  S  G  D  D  A  L  I  I  F  F  Y  G  P  T  S  V  V  L  340
1373  gggatcaatgttattctgttctgcatctccgcctacaagttatgttctctcagtaaaagt
       G  I  N  V  I  L  F  C  I  S  A  Y  K  L  C  S  L  S  K  S  360
1433  tcggaggcaagagctttccagttcacgttgtacttgaagctgtttgttctaatgggcatc
       S  E  A  R  A  F  Q  F  T  L  Y  L  K  L  F  V  L  M  G  I  380
1493  acctggattttcgaagtcatctccttcttcgtgcaccgagagacttatggttccagcggc
       T  W  I  F  E  V  I  S  F  F  V  H  R  E  T  Y  G  S  S  G  400
1553  aactacgtgtggctggtgttcgacatcatcaacatcatgcagggcctgatcatcttcctg
       N  Y  V  W  L  V  F  D  I  I  N  I  M  Q  G  L  I  I  F  L  420
1613  gtattcgtgtgtcgccccgccgtattggtccgcgtgtgtgaggtgctctgcggcgtcagc
       V  F  V  C  R  P  A  V  L  V  R  V  C  E  V  L  C  G  V  S  440
1673  ttcgccaagagatggttcaaagcccactacctcaatacggaggcagacgcgacaacaacg
       F  A  K  R  W  F  K  A  H  Y  L  N  T  E  A  D  A  T  T  T  460
1733  aaaccacagtga
       K  P  Q  -   463

1745 AGCACTCTGTCATCTGAGCTTCAAAGACGGCGGCCGAGCTACTCCTGAAGCTCTGCAAGTCTGAGTAGCA
1815 GCCTGGGAGGGACGACCAAGCCTCCTCCAGCCCTGTGTGATAGGGAAACGGTCTCGCACTCACGCCGCGA
1885 AGGAACACTGGCGATAGTGATGTGCTGGACTCGGGAGACTGCGTGGTGTGTGCTTGTGTGGTGACAAACG
1955 TAGTGGTGCGGCATCAACGGACCTGGTGAGGCCTTTGGGCAAGGTAGGGGTGTGTTGCCACCCTAGGCAC
2025 TCCCTCCTGCCACAAAGCCACCGGCGTGGGCGTAGCAGTGGTTTCCTGGTGCTCAGTGCCGGTGTTGTGT
2095 TCAGAAGCCACCCCGTCAATCATGTCTCTGCCTCCCGGAAGAGACATTTTGTATTGTGTGGAATGTTTAC
2165 CGGCGTTACATTGCCACGAGTCATCACGTGCACACACATACACTTTAACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
2235 ACGTAACAGAATAGTTTTCCTGCATAGATATAATAATCAATTTAAGTTGTCTCTCATCTTTCAACTTCAC
2305 AGATGTTCTGGTATCACCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGGCCGCGCGCGCTGAT
2375 TGAATTAACTCAAGTTCACATCACAGAATAAAACTCCATGACCTAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

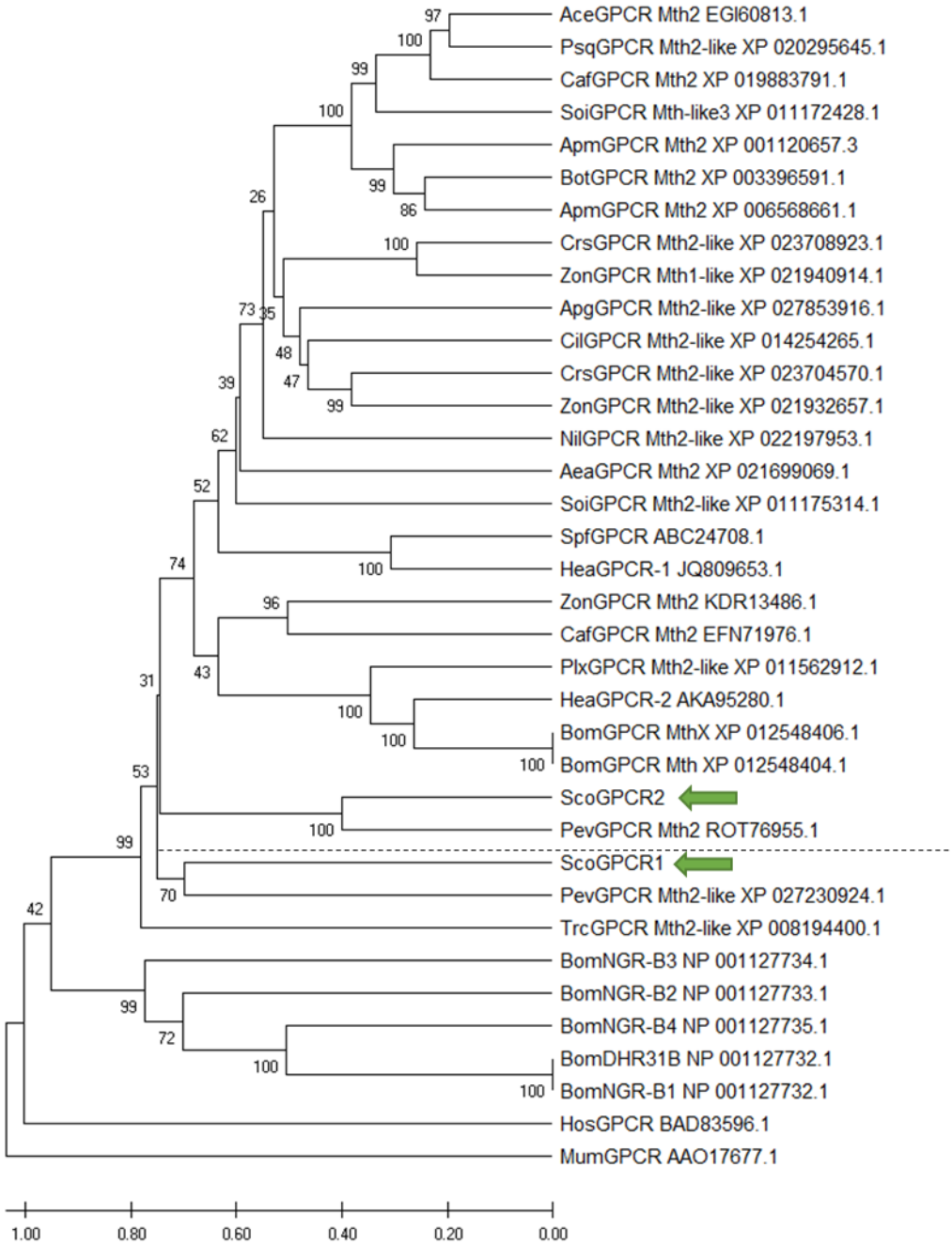
โปรตีนที่ได้จากยีน GPCR1 และ GPCR2 เป็นโปรตีนที่อยู่ใน Class-B family ของ seven-transmembrane GPCR และอยู่ใน GPCR-methuselah subfamily เมื่อทำการสร้าง

แบบจำลองโครงสร้างของโปรตีน GPCR1 และ GPCR2 พบว่าทั้งสองโปรตีนมีการจัดเรียงตัวของ 7-transmembrane บนเยื่อหุ้มเซลล์อย่างเด่นชัด (ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มนี้) ในทางด้าน N-terminus ที่อยู่ภายนอกเซลล์คาดว่ามีการสร้าง ligand-binding pocket ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แผนภาพแสดงแบบจำลองโครงสร้างของ GPCR1 (A) และ GPCR2 (B) โดยใช้โปรแกม Protter เส้นสีแดงแสดงถึง Signal Peptide สีเขียวแสดงถึงตำแหน่ง N-linked glycosylation และ จำนวนตัวเลขแสดง 7-transmembrane domain ที่เป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีนในกลุ่มนี้

เมื่อทำการเปรียบเทียบโปรตีน GPCR1 และ GPCR2 กับโปรตีน GPCR-Mth family จากสปีชีส์อื่นๆ พบว่าโปรตีน GPCR1 และ GPCR2 มีความใกล้เคียงกับโปรตีน GPCR-Mth2 ของกุ้งขาว (PevGPCR_Mth2-like_XP_027230924.1 และ PevGPCR_Mth2_ROT76955.1) ดังแสดงในภาพที่ 12 โดยที่โปรตีน GPCR2 ของปูทะเลอยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีน GPCR ที่รายงานใน *H. armigera* (HeaGPCR-1_ JQ809653.1 และ HeaGPCR-2_ AKA95280.1) ว่าทำหน้าที่เป็นตัวรับตัวใหม่ของฮอร์โมน 20-HE ในกลุ่มของแมลง (แสดงในส่วนบนของเส้นประ) รวมถึงแมลงกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ *Aedes aegypti* (*Apm*), *Acromyrmex echinatior* (*Ace*), *Apis mellifera* (*Apm*), *Bombyx mori* (*Bom*), *Camponotus floridanus* (*Caf*), *Cimex lectularius* (*Cil*), *Cryptotermes secundus* (*Crs*), *Nilaparvata lugens* (*Nil*), *Plutella xylostella* (*Plx*), *Pseudomyrmex gracilis* (*Psq*), *Solenopsis invicta* (*Soi*), *Spodoptera frugiperda* (*Spf*), *Zootermopsis nevadensis* (*Zon*) ในขณะที่ ScoGPCR1 มีความใกล้เคียงกับ GPCR ของ *Tribolium castaneum* (*Trc*) และ neuropeptide receptor ที่ได้จากผึ้ง *B. mori* (BomDHR31B, BomNGR-B1, -B2, -B3, และ -B4) ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของยีน GPCR1 และ GPCR2 ที่จำแนกได้จากปูทะเล (ScoGPCR1, ScoGPCR2 แสดงด้วยลูกศรสีเขียว) เปรียบเทียบกับยีน GPCR ที่พบในสปีชีส์อื่น วิเคราะห์โดยโปรแกรม MegaX

4.5 Transcriptomes ของต่อม Y-organs

จากการเปรียบเทียบ Transcriptomes ของต่อม Y-organs ทั้ง 4 ระยะ พบว่าในแต่ละกลุ่มคุณภาพของ RNA ที่ได้มีความใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวน reads ที่ได้จาก RNA ที่เตรียมได้จากต่อม Y-organs 4 ระยะ ได้แก่ ระยะเตรียมลอกคราบตามธรรมชาติ (Early_premolt) ตัดก้านตา (ESAB) ได้รับฮอร์โมน 20-HE (injected 20-HE) และ ระยะปกติ (intermolt)

Sample	Sequencing Strategy	Raw Data Size (bp)	Raw Reads Number	Clean Data Size (bp)	Clean Reads Number	Clean Data Rate (%)
Early_Premolt	SE49	1095826837	22363813	1094372027	22334123	99.86
ESAB	SE49	1095884216	22364984	1094579003	22338347	99.88
Injected_20_HE	SE49	1095804444	22363356	1094621829	22339221	99.89
Intermolt	SE49	1095611874	22359426	1090155136	22248064	99.5

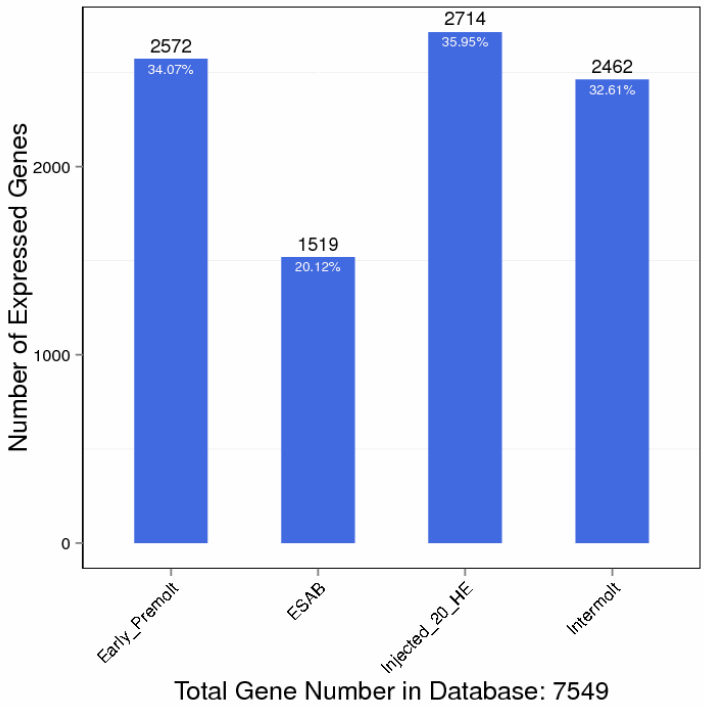
จากการเอาลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ได้ (reads) นำไปเทียบกับข้อมูลพันธุกรรมของ *E. sinesis* ได้ผลดัง**ตารางที่ 2** โดยทั้ง 4 ตัวอย่างมีประมาณ 5.04-8.89% ของข้อมูลพันธุกรรมของ *E. sinesis* ในขณะที่ได้เพียง 0.52-1.99% ของยีนที่พบใน *E. sinensis* ดังแสดงใน**ตารางที่ 3** โดยมีรายละเอียด คือ 1) กลุ่มที่เตรียมลอกคราบมี 2,572 ยีน คิดเป็น 34.07% 2)กลุ่มที่ถูกตัดก้านตามี 1,519 ยีน คิดเป็น 20.12% 3) กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE มี 2,714 ยีน คิดเป็น 35.95% และ 4) กลุ่มที่อยู่ในระยะปกติมี 2,462 ยีน คิดเป็น 32.61% ดังแสดงใน **ภาพที่ 13**

ตารางที่ 2 จำนวนเปอร์เซนต์ของ reads ที่ได้เมื่อนำไปอ้างอิงกับข้อมูลพันธุกรรมของ *E. sinensis* (genome mapping)

Sample	Total Reads	Total Mapped Reads (%)	Unique Match(%)	Multi-position Match (%)	Total Unmapped Reads (%)
ESAB	22338347	6.37	1.62	4.75	93.63
Early_Premolt	22334123	8.89	2.93	5.96	91.12
Injected_20_HE	22339221	5.11	2.87	2.24	94.89
Intermolt	22248064	5.04	2.74	2.3	94.96

ตารางที่ 3 จำนวนเปอร์เซนต์ของ reads ที่ได้เมื่อนำไปอ้างอิงกับยีนของ *E. sinensis* (gene mapping)

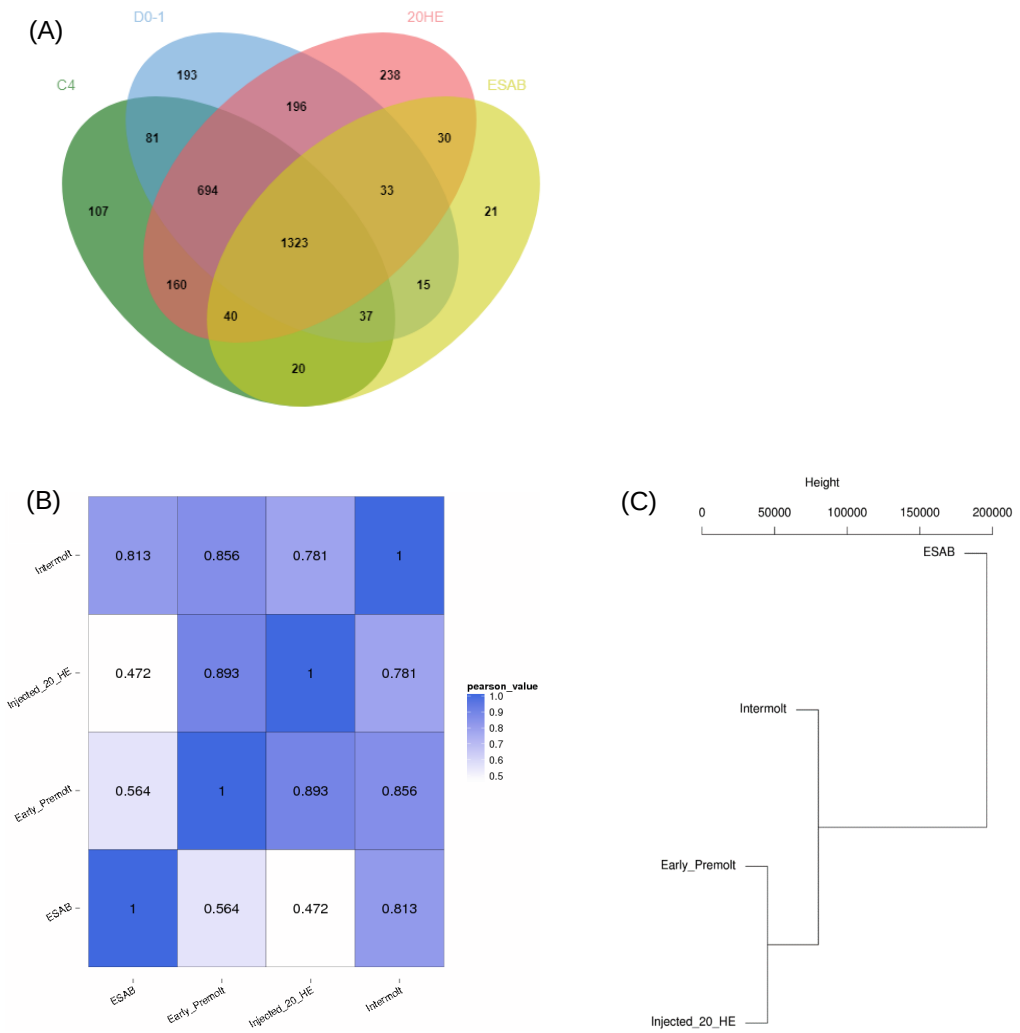
Sample	Total Reads	Total Mapped Reads (%)	Unique Match(%)	Multi-position Match (%)	Total Unmapped Reads (%)
Early_Premolt	22334123	1.9	1.53	0.38	98.1
ESAB	22338347	0.52	0.48	0.04	99.48
Injected_20_HE	22339221	1.99	1.64	0.35	98.01
Intermolt	22248064	1.82	1.6	0.22	98.18



ภาพที่ 13 แผนภาพกราฟแท่งแสดงจำนวนยีนที่จำแนกได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (reads) ที่ได้จากต่อม Y-organs 1) กลุ่มที่เตรียมลอกคราบ (Early premolt) 2)กลุ่มที่ถูกตัดก้านตา(ESAB) 3) กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE (Injected 20-HE) และ 4) กลุ่มที่อยู่ในระยะปกติ (intermolt)

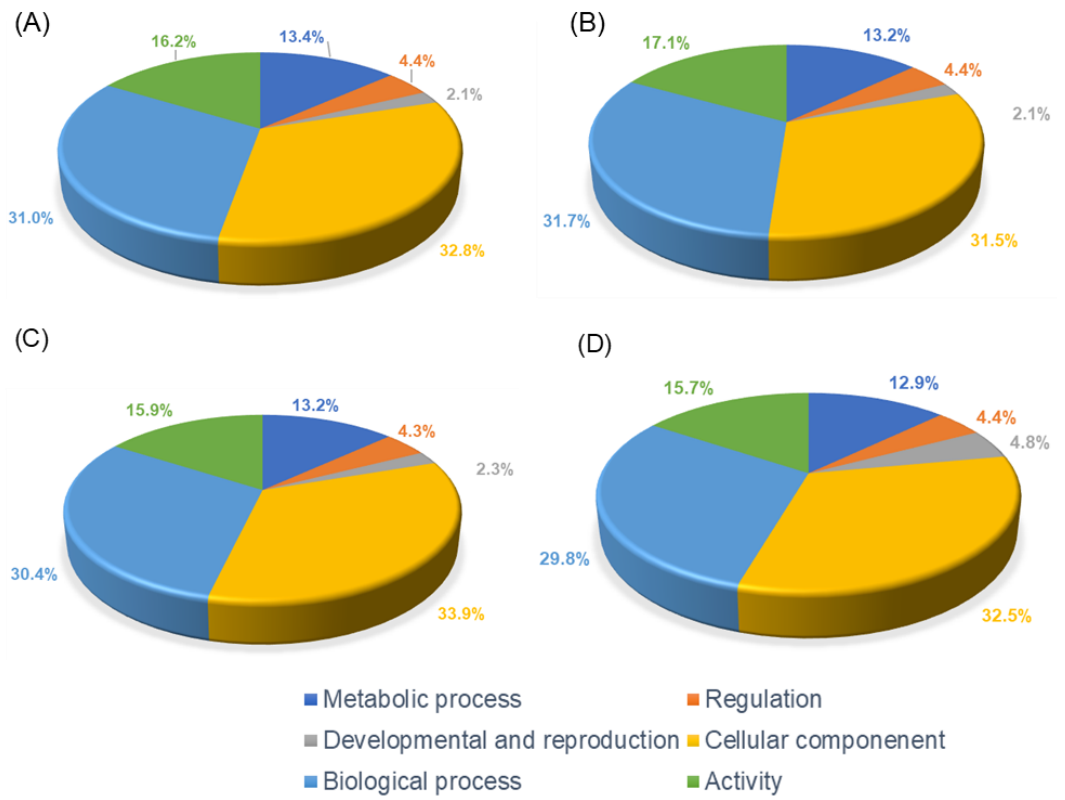
เมื่อนำเอา Transcriptomes ทั้ง 4 กลุ่มมาเปรียบเทียบกัน พบว่า ทั้ง 4 กลุ่มมียีนพื้นฐานที่พบในทุกๆ กลุ่มจำนวน 1,323 ยีน ในขณะที่ยีนที่พบเฉพาะในแต่ละระยะมีดังนี้ 1) ระยะปกติ พบจำนวน 107 ยีน 2) ระยะเตรียมลอกคราบ พบจำนวน 193 ยีน 3) กลุ่มได้รับฮอร์โมน 20-HE พบจำนวน 238 ยีน และ 4) กลุ่มที่ถูกตัดก้านตา พบจำนวน 21 ยีน ดังแสดงใน Venn diagram (ภาพที่ 14 (A))

เมื่อทำการเปรียบเทียบ Transcriptomes ทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า ต่อม Y-organs ที่ได้จากระยะเตรียมลอกคราบมีความใกล้เคียงมากที่สุดกับ transcriptome ของปูที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE (89.3 %) ตามด้วยต่อม Y-organs ที่ได้จากระยะปกติ (85.6%) ทั้งนี้ Y-organs ที่ได้จากระยะปกติมีความใกล้เคียงกับต่อม Y-organs ที่ได้จากปูที่ถูกตัดก้านตามากกว่ากลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน (81.3% และ 78.1% ตามลำดับ) ในทั้งหมด 4 กลุ่มนี้ ต่อม Y-organs ที่ได้จาก ปูที่ถูกตัดก้านตากับที่ได้รับฮอร์โมน มีความใกล้เคียงกันน้อยที่สุด (47.2%) และกลุ่มที่ได้จากปูที่ถูกตัดก้านตายังมีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นมากที่สุดดังแสดงในภาพที่ 14 (B และ C)



ภาพที่ 14 แผนภาพเปรียบเทียบ transcriptomes ที่ได้จากต่อม Y-organs ทั้ง 4 ระยะ (A) Venn diagram แสดงจำนวนยีนที่พบในระยะต่างๆ ทั้งที่พบแบบเฉพาะเจาะจงหรือแบบทั่วไป (B) Heatmap แสดงระดับความใกล้เคียงกันของ Transcriptomes ทั้ง 4 ระยะแสดงเปรียบเทียบด้วยระดับสีและ Pearson value และ (C) Cluster tree แสดงระดับความใกล้เคียงของกลุ่ม Transcriptomes ทั้ง 4 กลุ่ม

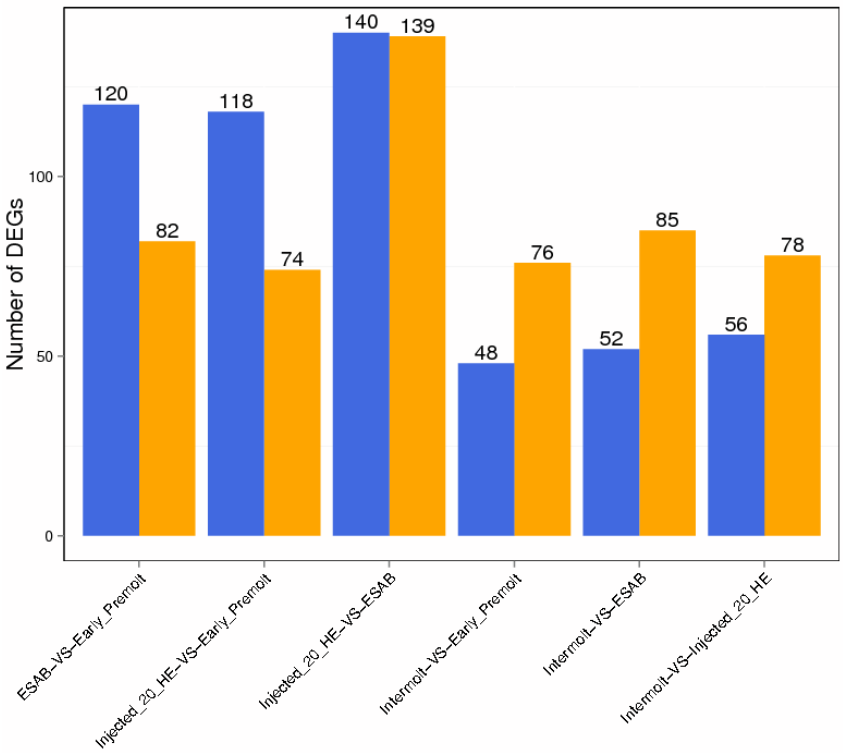
เมื่อทำการจำแนกกลุ่มของยีนที่อ่านได้ (reads) ที่พบในต่อม Y-organs พบว่า ทั้ง 4 กลุ่มมี ยีนที่อยู่ในหมวดหมู่ที่ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ (Cellular component) มากที่สุด (31.5-33.9%) ตามด้วย ยีนที่หมวดหมู่ของกระบวนการทางชีวภาพ (Biological process 29.8 - 31.0%) ในขณะที่ยีนในหมวดหมู่ของการพัฒนาและเจริญพันธ์ (development and reproduction) มีสัดส่วนที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างเด่นชัดในกลุ่มที่ถูกตัดก้านตา (4.8%) ดังแสดงในภาพที่ 15 (D)



ภาพที่ 15 แผนภาพแสดง KEGG Pathway ของ Transcriptomes ในต่อม Y-organs ทั้ง 4 ระยะ คือระยะปกติ (A), ระยะเตรียมลอกคราบ (B), กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE (C), และ กลุ่มที่ถูกตัดก้านตา (D).

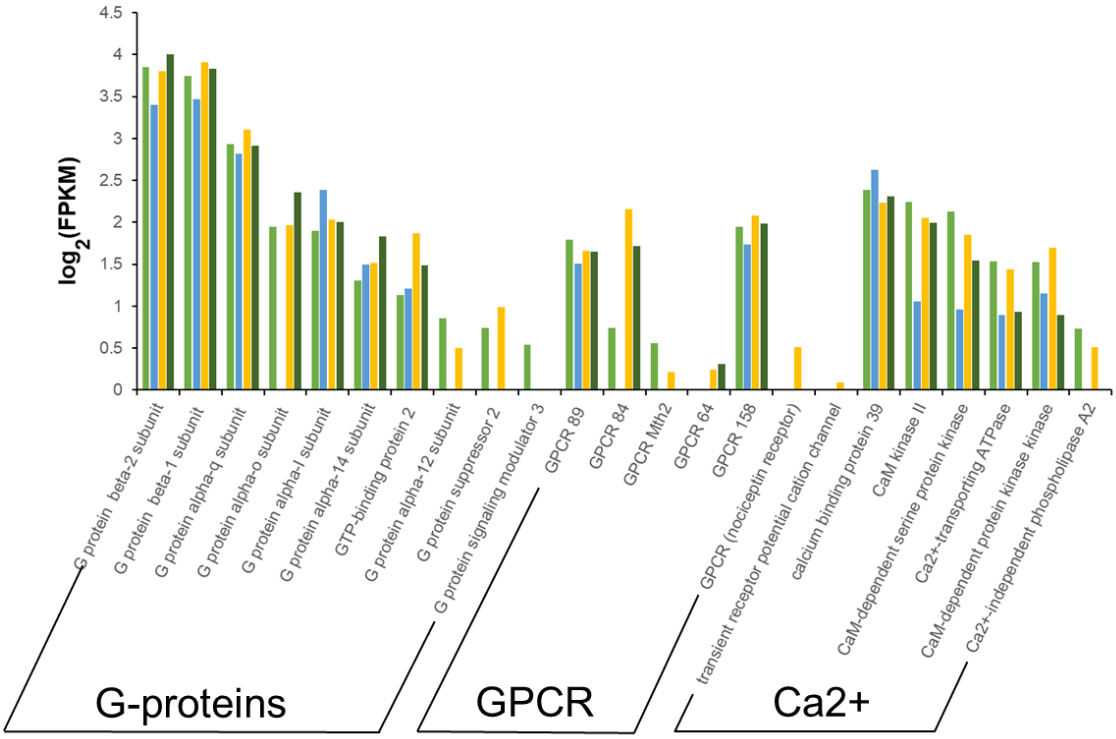
เมื่อทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับของยีนที่เกิดขึ้น (อ้างอิงจากจำนวน reads ที่อ่านได้ใน transcriptomes ของทั้ง 4 กลุ่มของต่อม Y-organs) ในทั้ง 4 transcriptomes พบว่า คู่ที่ได้รับปัจจัยภายนอก (manipulated) คือ ปูที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE และปูที่ถูกตัดก้านตา โดยพบว่ามีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ มีสัดส่วนของยีนที่เพิ่มขึ้นและลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกัน (เพิ่มขึ้น 139 ยีน ลดลง 140 ยีน) ดังแสดงใน**ภาพที่ 16** (กราฟแท่งสีน้ำเงินแสดงจำนวนยีนที่ลดลง ส่วนสีส้มแสดงยีนที่เพิ่มขึ้น ในแต่ละคู่ที่เปรียบเทียบกัน) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกลุ่มของต่อม Y-organ ที่อยู่ในสภาวะกระตุ้นให้ลอกคราบทั้งโดยธรรมชาติและบังคับโดยตัดก้านตาหรือให้ฮอร์โมน พบว่าต่อม Y-organs ที่ถูกบังคับมีสัดส่วนของยีนที่ถูกกระตุ้นมากกว่า คือ พบว่ามี 120 ยีนและ 118 ยีนในกลุ่มถูกตัดก้านตาและได้รับฮอร์โมน (ตามลำดับ) ในขณะเดียวกัน Y-organs ที่อยู่ในระยะเตรียมลอกคราบโดยธรรมชาติ มียีนที่มีสัดส่วนของการแสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวน 82 และ 74 ยีนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกตัดก้านตาและได้รับฮอร์โมน (ตามลำดับ)

ในทางตรงกันข้าม เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนการแสดงออกของยีนที่พบในสภาวะปกติ (intermolt) กับสภาวะอื่นๆ ที่เหลือ จะเห็นได้ชัดว่าต่อม Y-organs ที่อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นทางโดยธรรมชาติและบังคับโดยการตัดก้านตาหรือให้ฮอร์โมนมีสัดส่วนของยีนที่ถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากกว่า ดังแสดงใน**ภาพที่ 16**



ภาพที่ 16 แผนภาพแสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีน (Differential expressed genes (DEGs)) ที่ได้จากต่อม Y-organs ทั้ง 4 กลุ่ม กราฟแท่งสีน้ำเงินแสดงถึงสัดส่วนของยีนที่ลดลง กราฟสีส้มแสดงถึงสัดส่วนของยีนที่เพิ่มขึ้น โดยอ้างอิงจากกลุ่มตัวอย่างหลังเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละคู่ ตัวอย่างเช่น แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ กลุ่มยีนใน Early premolt เมื่อเปรียบเทียบในคู่ของ ESAB Vs Early_premolt

เมื่อแยกพิจารณาการเพิ่มระดับของยีน (อ้างอิงจากจำนวน reads ที่อ่านได้ใน transcriptomes ของทั้ง 4 กลุ่มของต่อม Y-organs) ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน GPCR ซึ่งได้แก่ ยีน GPCRs, G-protein complexes, GPCR regulator/suppressor และยีนที่เกี่ยวข้องการสื่อสัญญาณของ Ca^{2+} พบว่ายีน *GPCR-Mth2*, *G-protein suppressor 2*, *Gα-12* และ *Ca^{2+}-independent phospholipase A2* มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเฉพาะของกลุ่มที่เตรียมลอกคราบตามธรรมชาติและกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน (ดังแสดงใน**ภาพที่ 17**) จากผลที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบและยืนยันด้วยการวัดระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค realtime-quantitative PCR



ภาพที่ 17 แผนภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มของ GPCRs, G-protein complexes, และยีนที่เกี่ยวข้องการสื่อสัญญาณของ Ca^{2+} โดยอ้างอิงจากจำนวน reads ที่อ่านได้ใน transcriptomes ของทั้ง 4 กลุ่มของต่อม Y-organs กราฟแท่งสีเขียวเข้มแสดงถึงกลุ่มที่อยู่ในสภาวะปกติ (intermolt) สีเขียวอ่อนแสดงถึงกลุ่มเตรียมลอกคราบตามธรรมชาติ (premolt), สีเหลืองแสดงถึงกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE และสีฟ้าแสดงถึงกลุ่มที่ถูกตัดก้านตา

4.6 ระดับการแสดงออกของยีน *GPCR*, *G-proteins* และ *β-arrestin* ในต่อม Y-organs, สมอง ปมประสาทใต้ท้องและลำไส้ส่วนปลาย จากปูในระยะปกติและเตรียมลอกคราบ

จากผลของการแสดงออกของยีนที่อ้างอิงจากจำนวน reads ที่อ่านได้ Transcriptomes ที่พบว่ายีนในกลุ่มของ GPCRs, G-protein complexes, และยีนที่เกี่ยวข้องการสื่อสัญญาณของ Ca^{2+} มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะการลอกคราบ จึงได้ทำการวัดระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้ในต่อม Y-organs และเนื้อเยื่ออีก 3 ชนิด ได้แก่ สมอง ปมประสาทใต้ท้องและลำไส้ส่วนปลาย ดังแสดงใน**ภาพที่ 18**

ในต่อม Y-organs พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *Gαq* ลดลงจาก 0.52±0.10 ไปยัง 0.16±0.03 ในระยะเตรียมการลอกคราบอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p<0.05$) และพบว่ายีนที่แสดงออกเป็นส่วนใหญ่ในต่อม Y-organs ได้แก่ ยีน *GPCR1*, *Gαo* และ *40s* โดยมีระดับการแสดงออกอยู่ที่ 5.81-8.12, 3.06 และ 9.5-12.63 (ตามลำดับ)

ในสมอง พบว่ายีนที่พบเป็นส่วนใหญ่ได้แก่ยีน *Gαo* และ *40s* โดยมีระดับการแสดงออกอยู่ที่5.45-9.38 และ 6.32-7.36 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ยีน *Gαs*

และ *Gαq* มีระดับการแสดงออกที่ลดลงในระยะเตรียมการลอกคราบ คือลดลงจาก 0.07 ไปยัง 0.02 ($p<0.01$) และจาก 0.21 ไปยัง 0.06 ($p<0.05$) ตามลำดับ

ในปมประสาทใต้ท้อง พบว่ายีนที่พบเป็นส่วนใหญ่ได้แก่ยีน *Gαo* และ *40s* คล้ายกับที่พบในสมอง โดยมีระดับการแสดงออกอยู่ที่ 3.15-5.18 และ 4.68-9.22 ตามลำดับ โดยที่ระดับของยีน 40s ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p<0.05$) ในขณะที่ยีน *Gαs, Gαq* และ *β-arrestin* มีระดับการแสดงออกที่ลดลงในระยะเตรียมการลอกคราบ คือลดลงจาก 0.05 ไปยัง 0.02, 0.14 ไปยัง 0.07 และจาก 0.26 ไปยัง 0.08 (ตามลำดับ) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p<0.05$

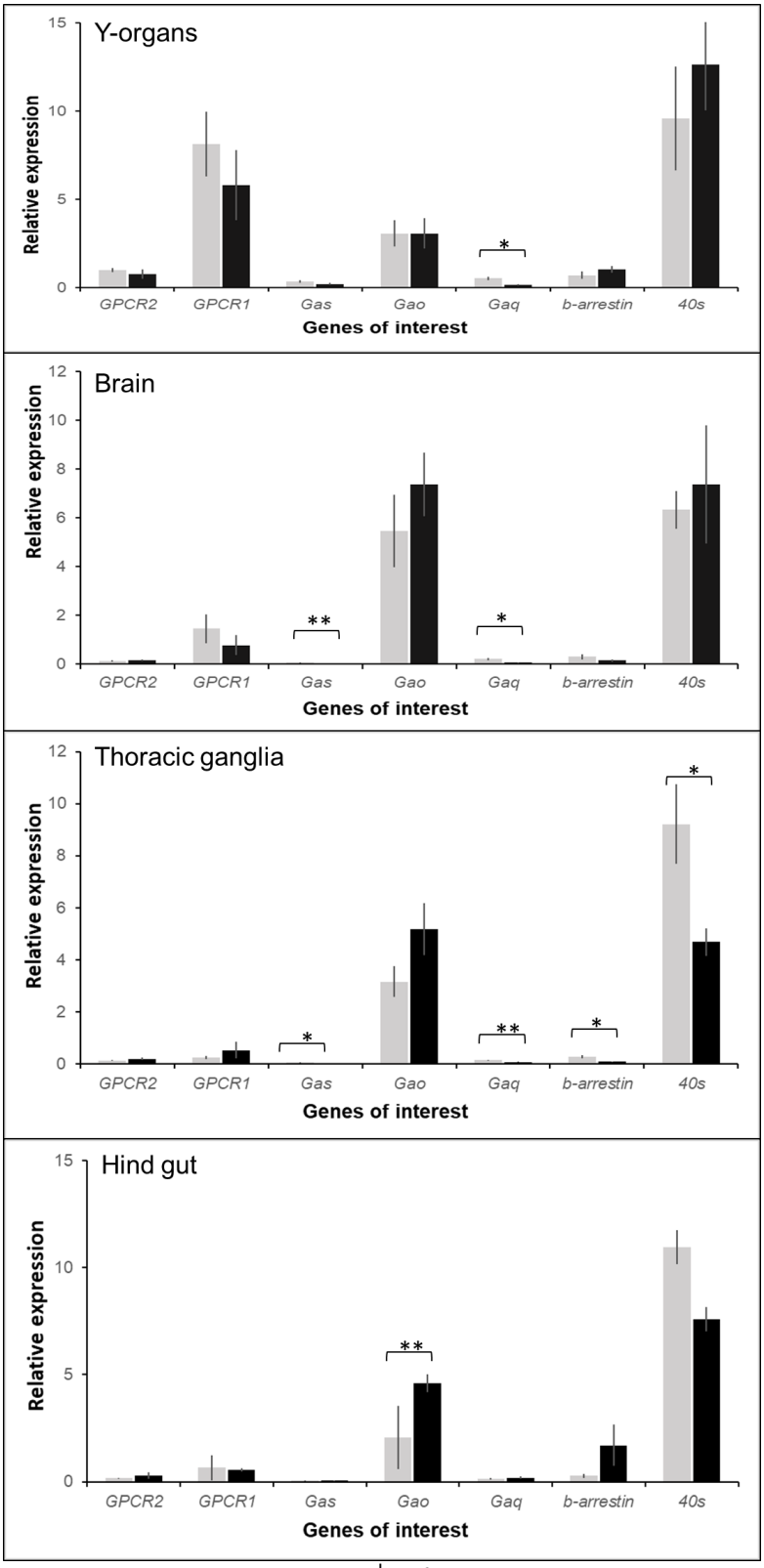
ในลำไส้ส่วนปลาย พบว่ายีนที่พบเป็นส่วนใหญ่ได้แก่ยีน *Gαo* และ *40s* มีระดับการแสดงออกอยู่ที่ 2.06-4.60 และ 7.59-10.96 ตามลำดับ โดยที่ระดับของยีน *Gαo* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p<0.05$)

ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของแต่ละยีนในเนื้อเยื่อที่ศึกษาทั้งสี่ชนิด พบว่า ยีน *GPCR2* และ *GPCR1* มีการแสดงออกมากที่สุดในต่อม Y-organs ในระยะปกติมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นอย่างมีนัยยะสำคัญ (**ภาพที่ 19** (**A** และ **B**) กราฟสีเทา) เมื่อเข้าสู่ระยะเตรียมการลอกคราบ ยีน *GPCR1* ในต่อม Y-organs ยังคงมีระดับการแสดงออกที่มากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ อย่างมีนัยยะสำคัญ (**ภาพที่ 19** (**B**) กราฟสีดำ)

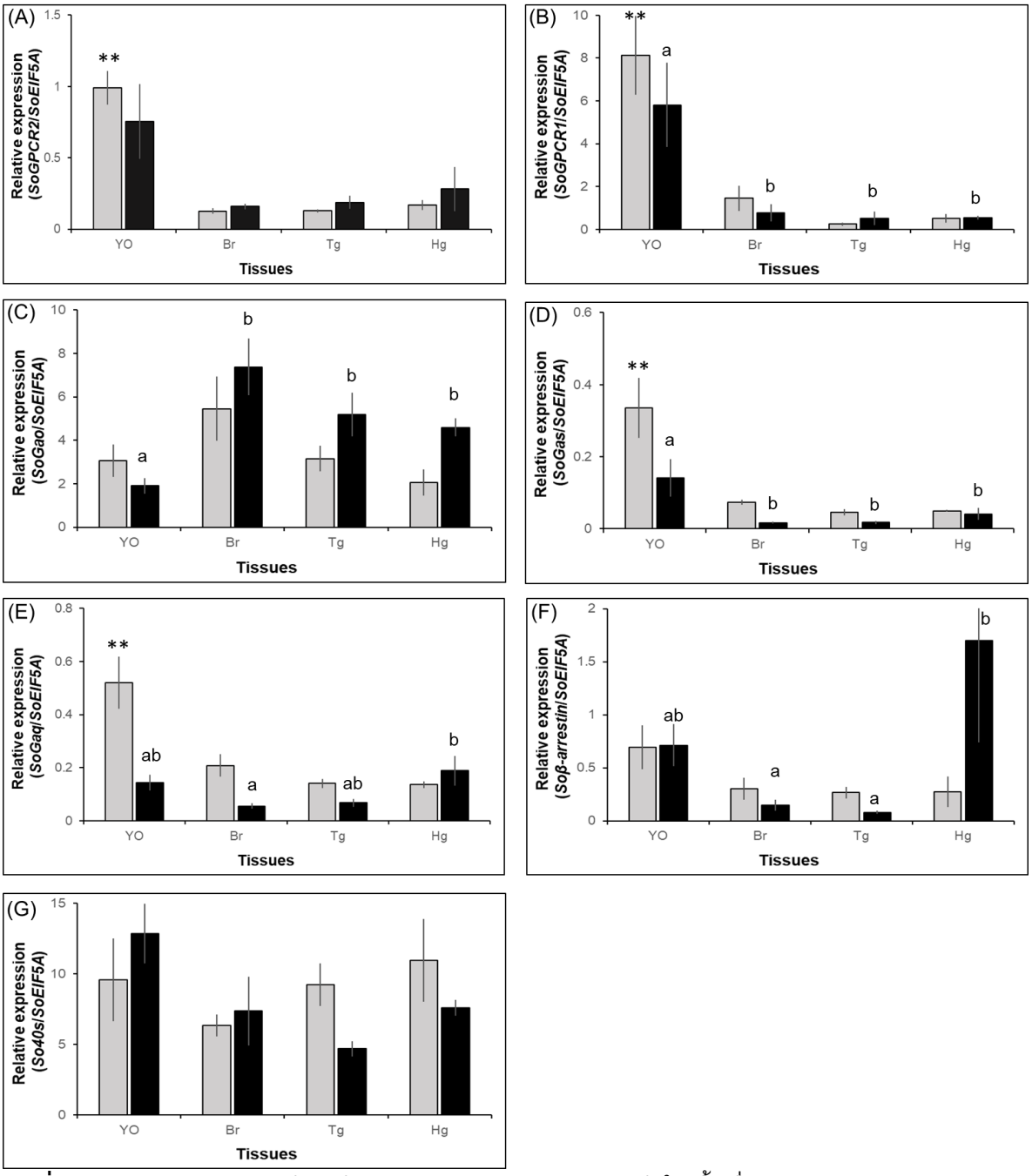
ยีน *Gαo* ในระยะปกติไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มเนื้อเยื่อ (**ภาพที่ 19 C** สีเทา) แต่เมื่อเข้าสู่ระยะเตรียมการลอกคราบ ยีน *Gαo* ในเนื้อเยื่ออื่นๆ มีการเพิ่มระดับการแสดงออก ซึ่งแตกต่างจากระดับการแสดงออกในต่อม Y-organs อย่างมีนัยยะสำคัญ (**ภาพที่ 19 C** สีดำ)

ยีน *Gαs* ที่แสดงออกในต่อม Y-organs ระยะปกติและระยะเตรียมการลอกคราบ มีระดับบการแสดงออกที่สูงกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ (**ภาพที่ 19 D** สีเทา และสีดำ ตามลำดับ) ในขณะที่พบว่ายีน *Gαq* ที่แสดงออกในต่อม Y-organs ในระยะปกติมีระดับที่สูงกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ อย่างมีนัยยะสำคัญ (**ภาพที่ 19 E** สีเทา) แต่เมื่อเข้าสู่ระยะเตรีมการลอกคราบ พบว่าการแสดงออกของยีน *Gαq* ในสมองมีระดับที่ต่ำว่าที่แสดงออกในลำไส้ส่วนปลาย (**ภาพที่ 19 E** สีดำ)

ยีน *β-arrestin* ไม่มีความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อในระยะปกติ แต่เมื่อเข้าสู่ระยะเตรียมการลอกคราบ พบว่า การแสดงออกในสมอง ปมประสาทใต้ท้องมีระดับที่ต่ำกว่าที่แสดงออกในลำไส้ส่วนปลาย (**ภาพที่ 19 F** สีดำ) ในขณะที่ยีน 40s ไม่มีความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อในระยะปกติและระยะเตรียมลอกคราบ (**ภาพที่ 19 G**)



ภาพที่ 18 แผนภาพแสดงระดับการแสดงออกของยีนซึ่งวัดโดยเทคนิค quantitative PCR จากต่อม Y-organs สมอง (brain) ปมประสาทใต้ท้อง (thoracic ganglia) และลำไส้ส่วนปลาย (hind gut) จากปูในระยะปกติ (กราฟสีเทา) และระยะเตรียมลอกคราบตามธรรมชาติ (กราฟสีดำ) ระดับการแสดงออกของแต่ละยีนในเนื้อเยื่อนั้นๆจะถูกตรวจสอบด้วย t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances โดยที่ ระดับความเชื่อมั่น * (p<0.05) ในขณะระดับความเชื่อมั่น ** (p<0.01)

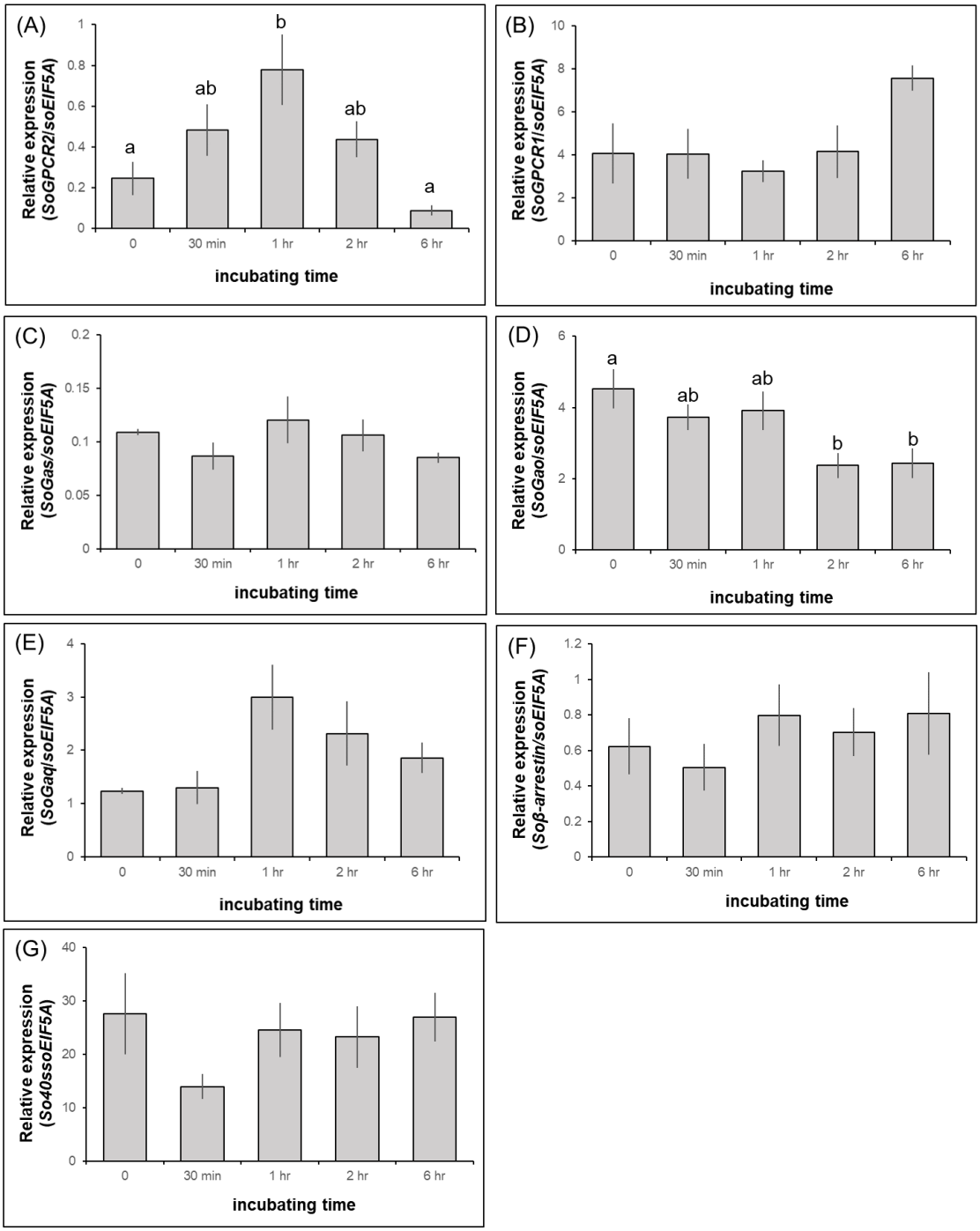


ภาพที่ 19 แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของแต่ละยีนในเนื้อเยื่อของต่อม Y-organs (YO) สมอง (Br) ปมประสาทใต้ท้อง (Tg) และลำไส้ส่วนปลาย (Hg) จากปูในระยะปกติ (กราฟสีเทา) และระยะเตรียมลอกคราบตามธรรมชาติ (กราฟสีดำ) โดยที่ ** แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มของระยะปกติ ตัวอักษร (a, b, ab) แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

4.7 ผลของฮอร์โมน 20-HE ต่อการแสดงออกของยีน *GPCR*, *G-proteins* และ *β-arrestin* ในต่อม Y-organs

เมื่อทำการบ่มต่อม Y-organ กับฮอร์โมน 20-HE ที่จำลองระยะเตรียมการลอกคราบเป็นเวลาที่แตกต่างกับพบว่า มีเฉพาะยีน *GPCR2* และ ยีน *Gαo* ที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน 20-

HE อย่างมีนัยยะสำคัญ โดยยีน *GPCR2* มีการเพิ่มระดับการแสดงออกหลังจากที่ได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เพิ่มจาก 0.24±0.08 ไปเป็น 0.78±0.17, $p<0.01$ ดังแสดงใน**ภาพที่ 20 A**) หลังจากนั้นได้ลดระดับการแสดงออกที่ 2 ชั่วโมง และกลับมาที่ระดับเดิมที่ 6 ชั่วโมง ในขณะที่ยีน *Gαo* มีการแสดงออกที่ลดลงหลังจากได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 2 และ 6 ชั่วโมง (จาก 0.43±0.55 ลงมาอยู่ที่ 2.37±0.35 และ 2.44±0.41 ตามลำดับ, $p<0.05$) ดังแสดงใน**ภาพที่ 20 D**

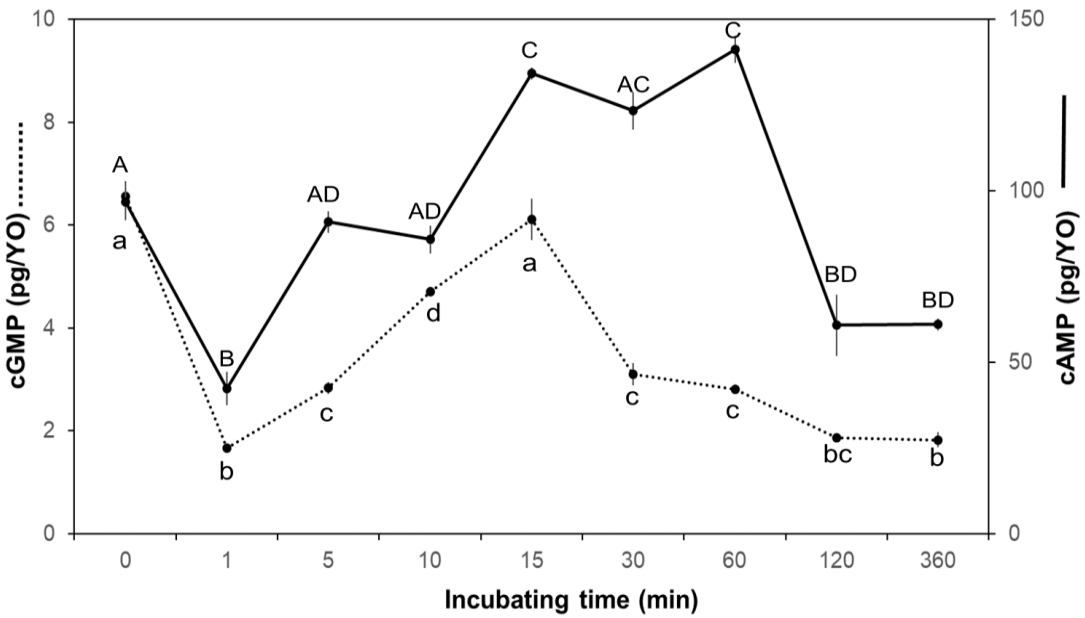


ภาพที่ 20 แผนภาพแสดงระดับการแสดงออกของยีน *GPCR1*, *GPCR2*, *Gαs*, *Gαo*, *Gαq*, *β-arrestin* และ 40s ในต่อมY-organs ที่บ่มในฮอร์โมน 20-HE (100 ng/ml) เป็นเวลา 30 นาที, 1, 2 และ 6 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดระดับการแสดงออกด้วย quantitative PCR

4.8 ผลของฮอร์โมน 20-HE ต่อ cAMP, cGMP และ Ca^{2+} ในต่อม Y-organs

การตอบสนองของต่อม Y-organs ต่อฮอร์โมน 20-HE แบบรวดเร็ว สามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อสัญญาณได้แก่ cAMP, cGMP และ Ca^{2+} ซึ่งพบว่า

ระดับของ cAMP (เส้นทึบใน**ภาพที่ 21**) ในต่อม Y-organs หลังจากที่ได้รับฮอร์โมน มีการลดระดับลงอย่างรวดเร็วภายใน 1 นาที (จาก 96.7±6.7 ลงมาอยู่ที่ 42.4±6.1 pg/YO, $p<0.01$) หลังจากนั้นระดับของ cAMP กลับมาเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยที่เวลา 5 และ 10 นาที หลังจากนั้นที่เวลา 15 นาที ระดับของ cAMP ได้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ (134.2±2.1 pg/YO, $p<0.01$) และระดับของ cAMP คงที่อยู่ที่ระดับ 123.3-141.3 pg/YO หลังจากได้รับฮอร์โมน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระดับของ cAMP ได้ลดลงอย่างรวดเร็วมาอยู่ที่ 60.8±11.2 pg/YO ($p<0.01$) และคงระดับเรื่อยจนสิ้นสุดการทดลองที่ 6 ชั่วโมง

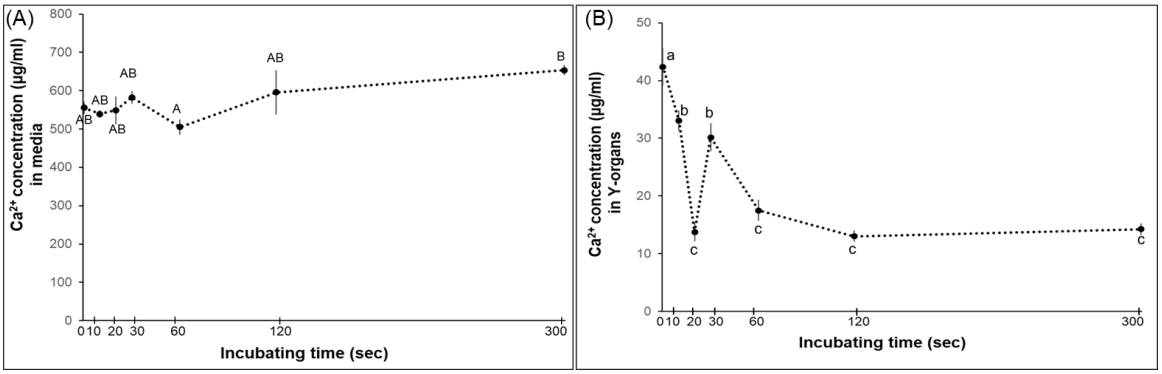


ภาพที่ 21 แผนภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับ cAMP และ cGMP ในต่อม Y-organs (n=3) หลังจากที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE (100 ng/ml) ในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จ (ELISA assay, Cayman Chemical)

การเปลี่ยนแปลงของระดับ cGMP ในต่อม Y-organs (ตัวอย่างเดียวกับที่วัดระดับของ cAMP) หลังจากที่ได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 1, 5, 10, 15, 30, 60, 120 และ 360 นาที (เส้นประใน**ภาพที่ 21**) พบว่ามีรูปแบบคลายคลึงกับที่พบในการเปลี่ยนแปลงของระดับ cAMP โดยที่หลังจากได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 1 นาที ระดับของ cGMP ได้ลดลงมาอยู่ที่ 1.67±0.07 pg/YO ($p<0.01$) แล้วเพิ่มระดับขึ้นเรื่อยๆ เมื่อได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 5 นาที (2.83±0.11 pg/YO), 10

นาที (4.7±0.1 pg/YO) และระดับเพิ่มสูงขึ้นที่สุด เมื่อได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 15 นาที (6.1±4.1 pg/YO) หลังจากนั้นระดับของ cGMP ได้ลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องจนคงระดับหลังจากได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 2 และ 6 ชั่วโมง (1.82-1.86 pg/YO)

การเปลี่ยนแปลงระดับของ Ca^{2+} สามารถวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของต่อม Y-organs และการเปลี่ยนแปลงใน culture media โดยพบว่า การเปลี่ยนแปลงในช่วง 0-5 นาที แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ Ca^{2+} ใน culture media (**ภาพที่ 22 A**) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงในต่อม Y-organs พบว่า หลังจากต่อม Y-organs ได้รับฮอร์โมน 20-HE ที่เวลา 10 วินาที ระดับของ Ca^{2+} มีการลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญ (จาก 42.4±3.2 มาอยู่ที่ 33.0±1.8 μg/ml, $p<0.05$) และลดลงอย่างรวดเร็ว (13.7±1.6 μg/ml, $p<0.01$) เมื่อได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 20 วินาที หลังจากนั้นระดับของ Ca^{2+} ได้กลับมาเพิ่มสูงขึ้นหลังจากได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 30 วินาที (30.1±2.4 μg/ml, $p<0.01$) แล้วลดลงอีกรอบที่เวลา 1 นาที (17.5±1.8 μg/ml, $p<0.01$) หลังจากนั้น ระดับของ Ca^{2+} คงระดับอยู่ที่ 13.0-14.2 μg/ml เมื่อได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 2 และ 5 นาที ดังแสดงใน**ภาพที่ 22 (B)**

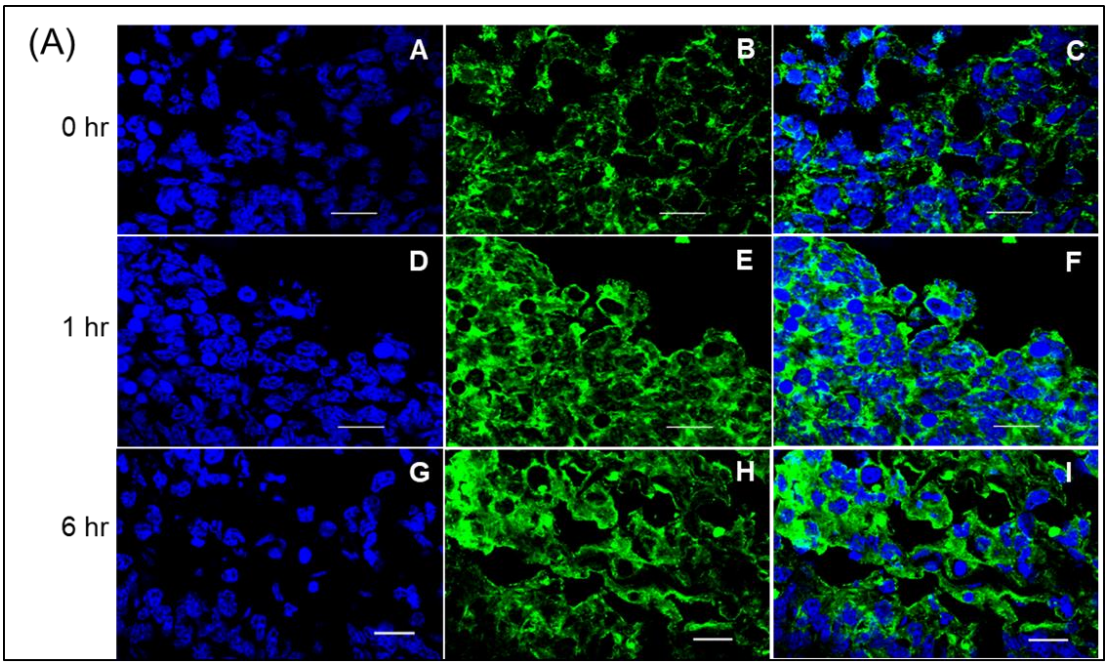


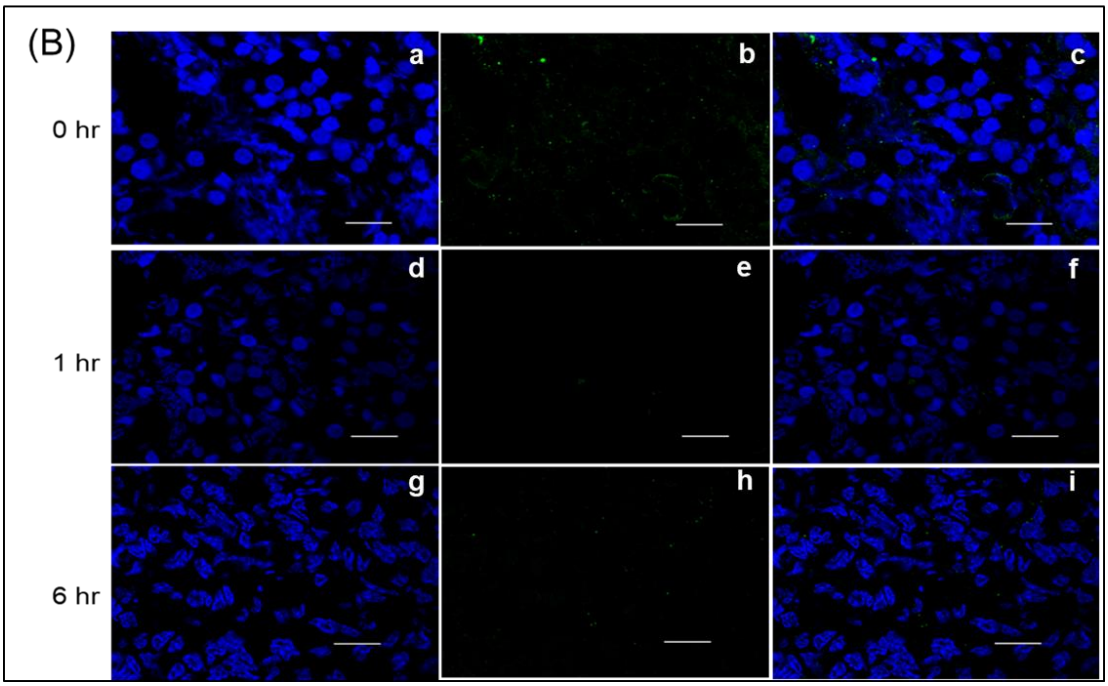
ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของระดับ Ca^{2+} ใน culture media (n=5, A) และภายในต่อม Y-organs (n=5, B) หลังจากได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 0,10, 20, 30, 60, 120 และ 300 วินาที โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จ (Calcium assay kit)

4.9 ตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน GPCR2 ในต่อม Y-organs หลังจากได้รับฮอร์โมน 20-HE

การค้นหาและยืนยันการแสดงออกของโปรตีน GPCR2 ในต่อม Y-organs ดำเนินการโดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry ซึ่งใช้แอนติบอดีที่สร้างขึ้นในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย เปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน GPCR2 ดังแสดงใน**ภาพที่ 10 B** (แสดงในแถบสีม่วง) แล้วทำการตรวจจับสัญญาณด้วย Alexa Fluor® 488 ซึ่งพบว่า โปรตีน GPCR2 มีการแสดงออกในต่อม Y-organs อยู่ตลอดเวลา แม้จะไม่ได้รับฮอร์โมน 20-HE ก็ตาม โดยตำแหน่งที่พบโปรตีน GPCR2 เป็นส่วนใหญ่ได้แก่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 22 (A: A และ B)

หลังจากบ่มต่อม Y-organs ในฮอร์โมน 20-HE เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของโปรตีน GPCR2 เพิ่มมากขึ้นในส่วนของ cytosol (ดังแสดงในภาพที่ 22 A: E และ F) เช่นเดียวกับการแสดงออกของโปรตีน GPCR2 เมื่อบ่มต่อม Y-organs เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 22 A: H และ I)





ภาพที่ 23 แสดงตำแหน่งของโปรตีน GPCR2 (A, A-I) โดยตรวจจับด้วย แอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีน GPCR2 (GPCR2-antisera) ในต่อม Y-organs หลังจากได้รับฮอร์โมนเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบ preimmunized antisera (B, a-i) ที่กำลังขยาย 100 เท่า ด้วย confocal microscope (Olympus) โดยที่ scale bar แสดงถึงความยาวที่ 10 ไมครอน ภาพ A, D, G และ a, d, g แสดงการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, ภาพ

B, E, H และ b, e, h แสดงสัญญาณที่ได้จาก secondary antibody (Anti-mouse IgG, conjugated with Alexa Fluor® 488) และ ภาพ C, F, I และ c, f, i แสดงภาพที่ได้จากการรวมกันสัญญาณที่ได้จาก DAPI และ Alexa Fluor® 488 ถ่ายภาพด้วย

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการดำเนินการค้นหาและจำแนกยีน *GPCR* ที่คาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับชนิดใหม่ของฮอร์โมน 20-HE ในปูทะเลดำ ได้ข้อสรุปดังนี้

1. การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GPCR ในปูทะเลดำ ได้ดำเนินการโดยการค้นหาผ่านการสร้าง transcriptomes ของต่อม Y-organs ซึ่งทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในสภาวะปกติและสภาวะที่ถูกกระตุ้นให้มีการลอกคราบ (ตามธรรมชาติและบังคับโดยการให้ฮอร์โมน 20-HE และตัดก้านตา) จาก transcriptomes ที่ได้พบว่ายีน GPCR-methuselah 2 subfamily มีการเพิ่มระดับการแสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจงใน transcriptomes ของต่อม Y-organs ที่ได้มาจากระยะเตรียมลอกคราบตามธรรมชาติและปูที่ให้ฮอร์โมน 20-HE (ภาพที่ 15) จึงนำไปสู่การสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์จำลองของยีน GPCR-Mth2 จาก transcriptomes โดยนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ทั้งหมด (reads) มาเรียงต่อกันเป็นสายยาว แล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงออกในต่อม Y-organs

จากการเปรียบเทียบ transcriptomes ของต่อม Y-organs ทั้ง 4 สภาวะ พบว่าการให้ฮอร์โมน 20-HE (100 ng/ml hemolymph) เป็นเวลา 4 วัน สามารถกระตุ้นให้ต่อม Y-organs มีการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกับระยะเตรียมการลอกคราบตามธรรมชาติได้ดีกว่าการตัดก้านตา ซึ่งเป็นสภาวะที่กำจัดฮอร์โมนทั้งหมด (ได้แก่ ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ ฮอร์โมนยับยั้งการสร้างไข่ ฮอร์โมน CHH และฮอร์โมนกระตุ้นการกระจายเม็ดสี: Chan *et al*., 2003) ในก้านตาออกไป ทำให้ปูมีตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในทางด้านอื่นๆ ร่วมด้วย ดังที่เห็นได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ (ดังแสดงในภาพ 15 D)

2. ยีน *GPCR* ที่ค้นพบในปูทะเลดำเป็นโปรตีนใน Class-B family อยู่ใน GPCR-methuselah subfamily ซึ่งมีลักษณะเฉพาะได้แก่ seven-transmembrane domain และมี Signal Peptide อยู่ทางด้าน N-terminus สำหรับส่งสัญญาณให้มีการเคลื่อนย้ายโปรตีนมาฝังตัวอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยยีน *GPCR* ที่ได้จากปูทะเลดำ มีความใกล้เคียงกับยีน *GPCR* ของกุ้งขาวมากที่สุด และคาดว่ายีน *GPCR* ที่ค้นพบนี้ อาจจะเป็นยีน GPCR ทีทำหน้าที่ในการถ่ายทอดสัญญาณแบบรวดเร็ว (rapid-signaling pathway) ดังที่รายงานในแมลง เนื่องจากมีความใกล้เคียงกับยีน *ecdysone receptor GPCR* ในกลุ่มของแมลง (99% Bootstrap)

3. ยีน *GPCR* ได้ถูกจำแนกออกเป็นสองชนิด คือ *GPCR1* และ *GPCR2* โดยโปรตีนที่สร้างได้จากยีน *GPCR1* มีขนาด 62.8 kDa ในขณะที่โปรตีนของยีน *GPCR2* มีขนาด 52.1 kDa ในขณะเดียวกัน ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสัญญาณของโปรตีน GPCR ได้ถูกค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ได้แก่ ยีน *G-protein alpha-o subunit* (*Gαo*) และยีน *β-arrestin* โดยพบว่า ยีน *Gαo* มีความใกล้เคียงกับยีน *Gαo* ที่พบใน กุ้ง (*P. vannamei* และ *P. japonicus*) และไรน้ำ (Daphnia) มากที่สุด เช่นเดียวกันยีน *β-arrestin* ที่ได้ มีความใกล้เคียงกับกุ้ง (*P. monodon* และ *P. japonicus*) มากที่สุด

4. เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน GPCR และยีนที่เกี่ยวข้องการส่งสัญญาณผ่านวิถีการทำงานของ GPCR ได้แก่ยีน *GPCR1*, *GPCR2*, *Gαo*, *Gαs*, *Gαq*, และ *β-arrestin* ในต่อม Y-organs, สมอง ปมประสาทใต้ท้องและลำไส้ส่วนปลายของปูในระยะปกติและระยะเตรียมลอกคราบพบว่า ในระยะปกติ (intermolt) ยีน *GPCR1*, *GPCR2*, *Gαs*, และ *Gαq* มีการแสดงออกในต่อม Y-organs มากกว่าสมอง ปมประสาทใต้ท้องและลำไส้ส่วนปลาย อย่างมีนัยยะสำคัญ (ภาพที่ 19 A, B, D และ E) เมื่อเข้าสู่ระยะเตรียมการลอกคราบ มีเพียงยีน *GPCR1* และ *Gαs* ที่ยังคงแสดงออกในต่อม Y-organs มากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ ในขณะที่ยีน *Gαo* มีการเพิ่มระดับการแสดงออกใน สมอง ปมประสาทใต้ท้องและลำไส้ส่วนปลายแต่กลับลดลงในต่อม Y-organs

จากการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวใน 4 เนื้อเยื่อ บ่งชี้ให้เห็นว่าต่อม Y-organs ในระยะปกติ (intermolt) มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากเนื้อเยื่ออื่นๆ อย่างเด่นชัด แต่เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของแต่ละยีนในระยะปกติกับระยะเตรียมการลอกคราบกลับไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนต่าง (ดังแสดงในภาพที่ 18) ซึ่งผลที่ได้ก่อให้เกิดข้อเสนอแนะว่า การวางรูปแบบของการแสดงออกของยีน *GPCR* และยีน *G-proteins* ภายในต่อม Y-organs ในระยะปกติอาจจะทำให้ต่อม Y-organs มีความรวดเร็วต่อการตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนทั้งสองฮอร์โมน อันได้แก่ ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบและฮอร์โมน 20-HE

5. การเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อสัญญาณ cAMP, cGMP และ Ca^{2+} ในต่อม Y-organs หลังจากที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE พบว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงของ calcium เกิดขึ้นรวดเร็วที่สุด โดยระดับ Ca^{2+} ภายในต่อม Y-organs ได้ลดระดับเมื่อได้รับฮอร์โมน 10 และ 20 วินาที หลังจากนั้นกลับเพิ่มระดับสูงขึ้นที่เวลา 30 วินาที แล้วระดับลดลงอย่างต่อเนื่อง และคงที่ภายใน 2-5 นาที ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ren *et al*., 2014 ที่พบว่าระดับของ Ca^{2+}เพิ่มระดับสูงขึ้นในช่วง 1 นาทีแรกหลังจากที่ได้รับฮอร์โมน 20-HE

ในขณะที่ช่วงระยะเวลา 2-5 นาทีแรกของการบ่ม ระดับของ cAMP และ cGMP ภายในต่อม Y-organs เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ cAMP และ cGMP จะเห็นได้ว่าระดับที่สูงที่สุดของ cGMP เกิดขึ้นก่อน ซึ่งอยู่ที่ 15 นาทีหลังจากนั้นระดับของ cGMP ค่อยๆลดลงและคงที่ รูปแบบการเปลี่ยนแปลงระดับของ cGMP สอดคล้องกับการตอบสนองของต่อม Y-organs (จากระยะเตรียมลอกคราบของ crayfish) เมื่อได้รับฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ ดังที่พบในรายงานของ Saidi et al., 1994 และ Nakatsuji *et al*., 2006 ซึ่งพบว่าฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบกระตุ้นต่อม Y-organs การสร้าง cGMP ขึ้นในช่วง 2-30 นาทีแต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ cAMP เมื่อพิจารณาผลที่ได้เข้าด้วยกันทำให้สันนิษฐานว่า cGMP อาจจะเป็นสารสื่อสัญญาณทั่วไป (common second messenger) ที่ใช้ร่วมกันทั้งในฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบและฮอร์โมน 20-HE ในขณะที่ cAMP อาจจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณหลักของฮอร์โมน 20-HE เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของระดับ cAMP อยู่ที่ช่วงกว้างและ

ยาวนานกว่า cGMP โดยระดับสูงที่สุดอยู่ในระหว่าง 15 นาที – 1 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการตอบสนองของโปรตีน GPCR ต่อฮอร์โมนกระตุ้น ซึ่งจะสื่อสารผ่านโปรตีน G-protein (Gαs/Gαq) กระตุ้นเอนไซม์ adenylyl cyclase ให้มีการสร้าง cAMP (New and Wong, 2007: Jing *et al*., 2016) ซึ่งคาดว่าจะทำให้เซลล์ในต่อม Y-organs มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มขยายและสร้างฮอร์โมน 20-HE เตรียมเข้าสู่ระยะเตรียมลอกคราบต่อไป

6. ต่อม Y-organs มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน 20-HE จากการทดสอบโดยการบ่มต่อม Y-organs ในสารละลายที่จำลองความเข้มข้นของฮอร์โมน 20-HE ในระยะเตรียมการลอกคราบ ซึ่งพบว่ามีเพียงยีน *GPCR2* และ *Gαo* ที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยยะสำคัญ โดยพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *GPCR2* เพิ่มสูงขึ้นในตัวอย่างที่บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วลดลงที่ 6 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการสร้างโปรตีนในเซลล์ของต่อม Y-organs จากการทดสอบด้วย Immunohistochemistry โดยพบว่าโปรตีน GPCR2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในส่วนของ cytosol และที่เยื่อหุ้มเซลล์ การที่พบโปรตีน GPCR2 ในส่วนของ cytosol อาจจะเป็นช่วงระหว่างการเคลื่อนย้ายโปรตีน (Protein trafficking) ที่สร้างภายในเซลล์ไปยังที่เยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่การแสดงออกของยีน *Gαo* ลดลงในตัวอย่างที่บ่มเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง เมื่อพิจารณากลไกการทำงานของโปรตีน Gαo ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการส่งสัญญาณของโปรตีน GPCR จึงสันนิษฐานว่าการลดระดับการแสดงออกโปรตีน Gαo อาจจะช่วยผลักดันการส่งวิถีสัญญาณของโปรตีน GPCR ได้ดียิ่งขึ้นสอดคล้องกับผลของการแสดงออกของยีน *Gαo* ที่พบในต่อม Y-organs ในระยะเตรียมการลอกคราบตามธรรมชาติ

โดยสรุป ผลการดำเนินการของโครงการวิจัยนี้นี้ ได้ผลตามที่ได้เสนอ คือ สามารถค้นหาและจำแนกยีน *GPCR* ในปูทะเลดำออกมาได้สองชนิดคือ GPCR1 และ GPCR2 โดยพบว่ายีน *GPCR2* ในต่อม Y-organs มีการตอบสนองอย่างจำเพาะเจาะจงกับฮอร์โมน 20-HE อีกทั้งยังเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อสัญญาณ ได้แก่ Ca^{2+}, cAMP และ cGMP (ตามลำดับ) ภายในต่อม Y-organs ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ คือ โปรตีน GPCR2 อาจจะทำหน้าที่เป็นตัวรับชนิดใหม่ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณแบบรวดเร็ว (Rapid signaling pathway) ดังที่มีการเสนอในการวิจัยในแมลง ทั้งนี้เมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีน GPCR ในต่อม Y-organs เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่ออื่นๆ พบว่าระดับการแสดงออกของทั้ง GPCR1 และ GPCR2 มีมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ อย่างเด่นชัด อีกทั้งพบว่ามีโปรตีน GPCR2 อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ในต่อม Y-organs อยู่ตลอดเวลาและสามารถกระตุ้นให้สร้างขึ้นได้ภายใน 1 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าต่อม Y-organs มีลักษณะเฉพาะของการแสดงออกของยีน *GPCR* และยีน *G-proteins* ซึ่งการวางรูปแบบของการแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้ อาจจะทำให้ต่อม Y-organs ในระยะ intermolt สามารถตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนทั้งสองฮอร์โมน อันได้แก่ ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบและฮอร์โมน 20-HE ได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้การยืนยันสมมติฐานดังกล่าวนี้ยังอยู่ในระหว่างการตรวจสอบเพื่อยืนยันหน้าที่ของโปรตีน GPCR และบทบาทของโปรตีน Gαq, Gαs,

Gαo และ β-arrestin รวมทั้งสารสื่อสัญญาณ cAMP, cGMP Ca^{2+} ในการถ่ายทอดสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE ในต่อม Y-organs

6. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากการดำเนินการโครงการวิจัยนี้ในปูทะเล พบว่า ต่อม Y-organs มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน 20-HE ผ่านการแสดงออกของยีน *GPCR* และยีน *G-proteins* และ สารสื่อสัญญาณ ได้แก่ cAMP, cGMP, Ca^{2+} จึงเป็นหลักฐานที่สำคัญที่บ่งชี้ว่า ต่อม Y-organs ในปู (รวมถึง crustaceans อื่นๆ) มีระบบการถ่ายทอดสัญญาณแบบรวดเร็วเหมือนกับที่พบในแมลง ซึ่งการค้นพบนี้ เป็นหลักฐานแรกในกลุ่มของ Crustaceans ดังนั้นการตรวจสอบยืนยันผลและรายละเอียดของการถ่ายทอดวิถีสัญญาณยังคงต้องมีการตรวจสอบต่อไป ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. จำแนกหน้าที่เฉพาะของโปรตีน GPCR1 และ GPCR2 ผ่านการศึกษา Knockdown study โดยนำต่อม Y-organs ของปูที่ได้รับ RNAi ของยีน *GPCR1* และ *GPCR2* มาบ่มกับฮอร์โมน 20-HE แล้วทำการตรวจสอบและจำแนกการส่งสัญญาณผ่าน cAMP, cGMP และ Ca^{2+} ซึ่งผลที่ได้จะสามารถบ่งชี้ได้ว่าการถ่ายทอดสัญญาณมีความเฉพาะเจาะจงหรือไม่

2. ทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน GPCR และ G-protein โดยต้องมีการจำแนกว่าโปรตีน GPCR ถ่ายทอดสัญญาณของฮอร์โมน 20-HE ผ่าน Gαq, หรือ *Gαs* รวมทั้งบทบาทของ *Gαo* และ *β-arrestin*

3. ศึกษาการตอบสนองของสารสื่อสัญญาณภายในต่อม Y-organs ของปูทะเลดำแบบองค์รวม ซึ่งต้องมีการสร้างองค์ความรู้เนื่องจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Crustaceans มีรูปแบบการตอบสนองของสารสื่อสัญญาณหลากหลายแบบและแตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ ดังนั้น มีความจำเป็นต้องทราบว่า สารสื่อสัญญาณมีการตอบสนองต่อ 1) ฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ 2) ฮอร์โมน 20-HE และทั้งสองฮอร์โมน ในรูปแบบใด ในสภาวะปกติและระยะเตรียมการลอกคราบ

จากองค์ความรู้ที่ได้จะทำให้มีความเข้าใจกลไกการเปลี่ยนแปลงภายในต่อม Y-organs ว่ามีการเตรียมพร้อม การตอบสนองต่อฮอร์โมนหลักที่ควบคุมการลอกคราบในรูปแบบใด ซึ่งจะนำไปสู่การหาวิธีที่จะสามารถควบคุมและกระตุ้นกระบวนการลอกคราบและทำให้ปูเตรียมเข้าสู่ระยะเตรียมการลอกคราบที่ใกล้เคียงกับระบบธรรมชาติที่สุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงปูนิ่มอย่างมหาศาล

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

   วารสารแรก อยู่ในระหว่างการนำส่งเสนอตีพิมพ์ โดยมีชื่อเรื่อง

   "Transcriptomes of basal and activated Y-organs providing as supporting information for studying molting control in mud crab, *Scylla olivacea"*

   Sirinart Techa, Phimsucha Bunphimpapha, Manon Boonbangyang, Alisa Wilantho, Chumpol Ngamphiw, Wanwipa Ittarat, Sissades Tongsima, Boonyarath Pratoomchat, Sirawut Klinbunga

   ในวารสาร Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics (Impact factor 2.913)

   วารสารที่สอง อยู่ในระหว่างการตรวจสอบความถูกต้องและเรียบเรียงข้อมูล โดยมีชื่อเรื่อง "Isolation of a novel ecdysone receptor (G-protein couple receptor) in mud crab, *Scylla alivacea*"

   Sirinart Techa, Phimsucha Bunphimpapha, Manon Boonbangyang, Alisa Wilantho, Chumpol Ngamphiw, Wanwipa Ittarat, Prachumporn Nounurai, Sissades Tongsima, Boonyarath Pratoomchat, Sirawut Klinbunga

   ในวารสาร Molecular and Cellular Endocrinology (Impact factor 3.56)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
   - เชิงพาณิชย์ N/A
   - เชิงนโยบาย N/A
   - เชิงสาธารณะ N/A
   - เชิงวิชาการ N/A

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

   - Oral presentation The 6th International Symposium on Cage Aquaculture in Asia 2018 (CAA6): 15th October 2018

   "Identification of G-protein coupled receptor from transcriptomes of premolt Y-organ in mud crab, *Scylla olivacea*"

   Sirinart Techa, Phimsucha Bunphimpapha, Manon Boonbangyang, Alisa Wilantho, Chumpol Ngamphiw, Sissades Tongsima, Boonyarath Pratoomchat2 and Sirawut Klinbunga

เอกสารอ้างอิง

Cai, M. J., *et al*., 2014. G-protein-coupled receptor participates in 20-hydroxyecdysone signaling on the plasma membrane. Cell Commun Signal. 12, 9.

Chan S.M., Gu P.L., Chu K.H., and Tobe S.S. 2003. Crustacean neuropeptide genes of the CHH/MIH/GIH family: implications from molecular studies. Gen Comp Endocr. 134(3): 214-219.

Chung, J.S. 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, Callinectes sapidus: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. Saline Systems 4: 18. doi: 10.1186/1746-1448-4-18 PMID: 19077285

Jing, Y. P., *et al.,* 2015. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone via nongenomic pathway activates Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II to regulate gene expression. J Biol Chem. 290, 8469-8481.

Keenan, C.P., Davie, P.J.F. and Mann, D.L. 1998. A revision of the genus Scylla DE HAAN, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura:Portunidae). Raffles Bull. Zool. 46: 217-245.

Kim, H-W. *et al.,* 2004. A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*. J Exp Bio 207: 2845-2857

Lee, S. G., *et al*., 2007. Effects of elevated ecdysteroid on tissue expression of three guanylyl cyclases in the tropical land crab *Gecarcinus lateralis*: possible roles of neuropeptide signaling in the molting gland. J Exp Biol. 210, 3245-3254.

Liu, W., Cai, M. J., Wang, J. X., and Zhao, X. F. 2014aใ In a nongenomic action, steroid hormone 20-hydroxyecdysone induces phosphorylation of cyclin-dependent kinase 10 to promote gene transcription. Endocrinology155, 1738–1750

Liu W. *et al*., 2014b. Phospholipase CγI connects the cell membrane pathway to the nuclear receptor pathway in insect steroid hormone signaling, J. Biol. Chem. 289 (2014) 13026–13041.

Mabashi-Asazuma, H., *et al*., 2005. Characterization of a Molt-Inhibiting Hormone (MIH) Receptor in the Y-Organ of the Kuruma Prawn, *Marsupenaeus japonicus*. Annals of the New York Academy of Sciences 1040(1):215-8

Manaboon, M., *et al.,* 2009. Intracellular mobilization of Ca^{2+} by the insect steroid hormone 20-hydroxyecdysone during programmed cell death in silkworm anterior silk glands. J Insect Physiol. 55, 122-128.

McDonald, A. A., *et al*., 2011. Cloning of a nitric oxide synthase from green shore crab, *Carcinus maenas*: a comparative study of the effects of eyestalk ablation on expression in the molting glands (Y-organs) of *C. maenas*, and blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 158, 150-162.

Nagai, C. *et al*. 2014. Identification and Characterization of Receptors for Ion Transport Peptide (ITP) and ITP-like (ITPL) in the Silkworm *Bombyx mori*. J Bio Chem. 289, 32166-32177.

Nakatsuji, T., Sonobe, H., 2004. Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by molt-inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. Gen Comp Endocrinol. 135, 358-364

Nakatsuji T., Sonobe H., Watson R.D. 2006. Molt-inhibiting hormone-mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): involvement of cyclic GMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase. Mol Cell Endocrinol 253: 76–82.

New D.C. and Wong, Y.H. 2007. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. J Mol Signal 2007, 2:2 doi:10.1186/1750-2187-2-2

Ren, J., *et al.,* 2014. G-protein alpha q participates in the steroid hormone 20-hydroxyecdysone nongenomic signal transduction. J Steroid Biochem Mol Biol. 144 Pt B, 313-323.

Saïdi, B. *et al*., 1994. Involvement of CAMP and cGMP in the mode of action of molt-inhibiting hormone (MIH) a neuropeptide which inhibits steroidogenesis in a crab. Mol and Cell Endo 102: 53-61.

Sedlmeier, D. and R. Fenrich. 1993. Regulation of ec-dysone biosynthesis in crayfish Y-organs: I. Role of cyclic nucleotides. J. Exper. Zool. 265:448–453

Spaziani, E., M. P. Mattson, W. L. Wang, and H. E. McDougall. 1999. Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in crustacean Y-organs. Amer. Zool , 39496-512.

Srivastava, D. P., *et al.,* 2005. Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel Drosophila G-protein-coupled receptor. J Neurosci. 25, 6145-6155.

Wang, D., *et al*., 2015. G-protein-coupled receptor controls steroid hormone signaling in cell membrane. Sci Rep. 5, 8675.

Zheng, J., *et al*., 2006. Molecular cloning of a putative receptor guanylyl cyclase from Y-organs of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Gen Comp Endocrinol. 146, 329-336.

Zheng, J*., et al*., 2008. Studies of a receptor guanylyl cyclase cloned from Y-organs of the blue crab (Callinectes sapidus), and its possible functional link to ecdysteroidogenesis. Gen Comp Endocrinol. 155, 780-788.