



191029

รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554
(รหัสโครงการวิจัย SCI540043S)

เรื่อง (ภาษาไทย): ผลของโปรตีนลูกผสม RPL10a ต่อรังไข่กุ้ง

(อังกฤษ) : Effect of a Recombinant RPL10a on ovarian of shrimp

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย และ ที่อยู่ : หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

คณะผู้วิจัย และสัดส่วนที่ทำงานวิจัย

1. นางสาว วิไลวรรณ โชติเกียรติ หัวหน้าโครงการ สัดส่วนที่ทำการวิจัย 100%

ประเภทของงานวิจัย : การวิจัยประยุกต์

สาขาที่ทำการวิจัย: สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

600 255529

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



191029

รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554
(รหัสโครงการวิจัย SCI540043S)

เรื่อง (ภาษาไทย): ผลของโปรตีนลูกผสม RPL10a ต่อรังไข่กุ้ง

(อังกฤษ) : Effect of a Recombinant RPL10a on ovarian of shrimp

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย และ ที่อยู่ : หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

คณะผู้วิจัย และสัดส่วนที่ทำงานวิจัย

1. นางสาว วิไลวรรณ โชติเกียรติ หัวหน้าโครงการ สัดส่วนที่ทำการวิจัย 100%

ประเภทของงานวิจัย : การวิจัยประยุกต์

สาขาที่ทำการวิจัย: สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยและนักศึกษาที่ช่วยกันทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วง งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554 รหัส SCI540043S

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
1. สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	2
2. สารบัญภาพ (List of Illustration)	3
3. คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	5
4. บทคัดย่อ	6
5. abstract	7
6. บทนำ (Introduction)	8
7. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)	10
8. ผลการวิจัย (Results)	12
9. วิจารณ์ผลการวิจัย (Discussion)	20
10. เอกสารอ้างอิง	21

สารบัญภาพ (List of Illustration)

	หน้า
Figure 1. แบบแผนของโคลน Rpl10A เข้าสู่เวกเตอร์ pET-28a (+)	13
Figure 2. การแสดงออกของ His-Rpl10A จากเซลล์ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่มี ดีเอ็นเอ pET-Rpl10A โปรตีนแยกบน 12% SDS-PAGE และย้อมด้วย สี Coomassie	13
Figure 3. Western blot ของโปรตีนลูกผสม His-Rpl10A ตรวจจับโดย anti-His monoclonal antibody	14
Figure 4. โปรตีน His-Rpl10Aบริสุทธิ์ ย้อมด้วย Coomassie blue staining ภายหลังแยกด้วย 12% SDS-PAGE บริสุทธิ์	14
Figure 5. ผลของ recombinant Rpl10A ต่อปริมาณของ <i>TCTP</i> , <i>SOP</i> , และ <i>HSP70</i> mRNA ใน ovarian explantsของกึ่ง เมื่อบ่มในเวลาต่างๆกัน และหาปริมาณโดยวิธี real-time PCR และปริมาณนั้นเปรียบเทียบกับ internal standard <i>GAPDH</i> (mean \pm SD, n=3 and $p < 0.05$)	16
Figure 6. ผลของ recombinant Rpl10A ต่อปริมาณของ <i>TCTP</i> , <i>SOP</i> , และ <i>HSP70</i> mRNA ใน muscle explantsของกึ่ง เมื่อบ่มในเวลาต่างๆกัน และหาปริมาณโดยวิธี real-time PCR และปริมาณนั้นเปรียบเทียบกับ internal standard <i>GAPDH</i> (mean \pm SD, n=3 and $p < 0.05$)	17
Figure 7. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 1 ที่ไม่ได้ฉีดสารละลายใดๆ ย้อมด้วยสี H&E	18
Figure 8. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 2 ฉีดสารละลายบัฟเฟอร์ (350 mM NaCl, 50mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0) ย้อมด้วยสี H&E	19
Figure 9. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 3 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อกึ่ง ย้อมด้วยสี H&E	19
Figure 10. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 4 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อกึ่ง ย้อมด้วยสี H&E	19

สารบัญภาพต่อ (continue list of illustration)

หน้า

- Figure 11. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 5 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 180 ไมโครกรัมต่อกึ่ง ย้อมด้วยสี H&E 20
- Figure 12. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไข่ชนิดต่างๆ ของรังไข่แม่กึ่งที่พัฒนา หลังจากได้รับโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้นต่างๆ 20

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

BCIP	=	Bromochloro indolyl phosphate
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	=	1, 4-Dithio-DL-threitol
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
GST	=	Glutathione-s-transferase
IgG	=	Immunoglobulin G
IPTG	=	Isopropylthiogalactose
kb	=	Kilobase (s)
kDa	=	Kilodalton (s)
LB	=	Luria-Bertani (medium)
M	=	Molarity
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute (s)
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
NBT	=	Nitroblue tetrazolium salt
ng	=	nanogram
nmole	=	nanomole
OD	=	Optical density
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethyl) aminoethane hydrochloric acid

บทคัดย่อ

191029

ได้มีการศึกษากระบวนการระดับโมเลกุลในไข่ของกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguensis*, *F. merguensis* de man) ในระยะที่มีการสร้างไวเทลลิน ยีน ribosomal protein L10a (*RPL10a*) ได้ถูกโคลน (GeneBankTM/EBI accession no. FJ623402) และนำมาศึกษาพบว่ามีขนาดมวล์โมเลกุลบน SDS-PAGE ประมาณ 30 kDa เมื่อนำโปรตีน RPL10a ไปบ่มกับเนื้อเยื่อเซลล์ไข่ในหลอดทดลองพบว่า RPL10a กระตุ้นการแสดงออกของยีน translationally controlled tumor protein (*TCTP*), heat shock protein (*HSP70*) และ shrimp ovarian peritrophin (*SOP*) genes พบการแสดงออกสูงสุดภายหลัง 4 ชั่วโมงของการกระตุ้นด้วย RPL10a และการแสดงออกของยีน *TCTP*, *HSP70* ลดลงหลังจาก 12 ชั่วโมงของการกระตุ้น ในขณะที่ *SOP* ยังคงแสดงออกสูงถึง 24 ชั่วโมง RPL10a ไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *TCTP*, *SOP* และ *HSP70* ในเซลล์กล้ามเนื้อกุ้ง นอกจากนี้เมื่อทำการกระตุ้นการพัฒนารังไข่กุ้งโดยการฉีดโปรตีน RPL10a พบว่า ความเข้มข้นที่ 180 ไมโครกรัมต่อกุ้ง สามารถกระตุ้นให้มีการพัฒนาของเซลล์ไข่ในระยะ developing oocyte (OV1) ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบในกลุ่มทดลองอื่นๆ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของโปรตีน RPL10a ที่เหมาะสมอาจนำไปสู่การกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของกุ้งได้ในอนาคต

คำสำคัญ: Expression, *Fenneropenaeus merguensis*, Genes, Ovary, RPL10, Shrimp

Abstract

191029

The molecular events in the ovaries of *Fenneropenaeus merguensis* De Man during vitellogenesis were investigated. The ribosomal protein L10a (*RPL10a*) was characterized and cloned (GeneBankTM/EBI accession no. FJ623402). The molecular weight on SDS-PAGE was about 30 kDa. Treatment of undeveloped ovarian explant cultures with recombinant histidine (His)-RPL10a stimulated the expression of translationally controlled tumor protein (*TCTP*), heat shock protein (*HPS70*), and shrimp ovarian peritrophin (*SOP*) genes, previously shown to be involved in ovarian maturation. The transcripts of all three genes in the ovarian explants showed their highest expression after 4 h incubation with the His-RPL10 at 37°C. The *TCTP* and *HPS70* transcripts declined after 12 h, while the transcripts of *SOP* remained high until 24 h. The His-RPL10a did not stimulate the expression of the *TCTP*, *SOP*, and *HSP70* genes in shrimp muscle tissue. In addition, His-RPL10a at concentration of 180 µg/shrimp could stimulate ovarian cell of shrimp to developing oocyte (ov1), calculated to about 5%. Therefore, suitable concentration of His-RPL10 could stimulate the shrimp ovarian maturation. The information on the molecular behavior of the RPL10a in this study may, in the future, lead to new methods to stimulate ovarian development in shrimp.

Keywords: Expression, *Fenneropenaeus merguensis*, Genes, Ovary, RPL10, Shrimp