

นำเนื้อเยื่อไปเอา wax ออกสองครั้งเป็นเวลา 5 นาที ใน xylene และนำเอาน้ำออกด้วย ethanol และนำไปอุ่นใน 1 mM EDTA pH 7.5 ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสไลด์ 2 ครั้งใน TBST pH 7.5 (0.1% Tween 20, 25mM Tris-HCl, 2.7 mM KCl and 140 mM NaCl, pH 7.5) และนำเนื้อเยื่อไปบ่มกับ blocking buffer (4%BSA and 0.02% NaN₃ in PBS) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และนำมาล้างด้วย TBST นำเนื้อเยื่อมาบ่มซ้ำกับ 5% skim milk ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วย TBST นำเนื้อเยื่อมาบ่มกับ mouse monoclonal anti-RPL10a (Abcam, Cambridge, UK) 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างสไลด์ด้วย TBST อีกครั้งและบ่ม rabbit anti-mouse-AP (alkaline phosphatase) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และนำมาแช่ในสารละลายที่มี 0.37 mM NBT (Nitro blue tetrazolium) and 0.23 mM BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), 0.1 M NaHCO₃, 1mM MgCl₂, pH 9.8 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และถ่ายภาพเนื้อเยื่อที่ได้โดย CH40 Olympus digital camera.

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลิตโปรตีนลูกผสม RPL10a

ได้ทำการเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPL10a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (แผนที่แบบดีเอ็นเอ pET-RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 แสดงใน Figure 1) นำดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2XYTA ที่มี ampicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กระตุ้นแบคทีเรียให้มีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 0.1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) บ่มเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็งก่อนจะนำไปสกัดโปรตีน นำเซลล์แบคทีเรียละลายในสารละลาย lysis buffer (50 mM Na₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) และสารละลาย lysozyme ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) นำไปหมุนเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์แยกออกจากกันละลายใน PBS (10mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl และ 140 mM NaCl, pH 7.4) แล้วทำให้ตะกอนแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) นำไปหมุนเหวี่ยงเก็บตะกอนและทำซ้ำเช่นนี้อีกหลายครั้งจนได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ในส่วนใส และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ผลการทดลองพบว่าโปรตีนลูกผสมมีขนาด 29.2 kDa ซึ่งสอดคล้องกับมวลที่ประมาณการจากการคำนวณคือ Rpl10A มีขนาด 25.7 kDa รวมกับ His protein ที่เป็นโปรตีนที่เชื่อมอยู่จากดีเอ็นเอพาหะ 3.5 kDa (Figure 2) เมื่อนำโปรตีนที่แยกโดย SDS-PAGE) และวิเคราะห์โดย western blot โดยใช้ anti-His monoclonal antibody พบโปรตีนมีขนาดประมาณ 30 kDa ซึ่งมีขนาดตามที่คาดการณ์ไว้ของ fusion protein, His-Rpl10A (Figure 3)

โปรตีนลูกผสม His-Rpl10A ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดย nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography technique โดยที่ Nickel เกาะอยู่กับวุ้นในคอลัมน์มีความสามารถที่จะเกาะกับ His Proteins และใช้ความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย phosphate และ imidazole ในการชะโปรตีนที่มีความชอบน้อยออกและใช้สารละลาย phosphate และ imidazole ที่มีความเข้มข้นสูงในการชะโปรตีนลูกผสมที่ต้องการออก Figure 4 แสดงโปรตีน His-Rpl10A ที่บริสุทธิ์

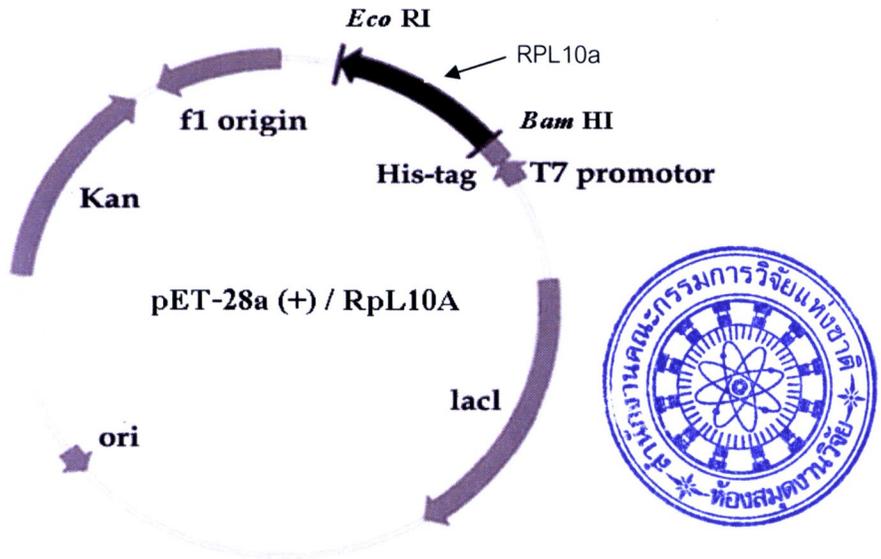
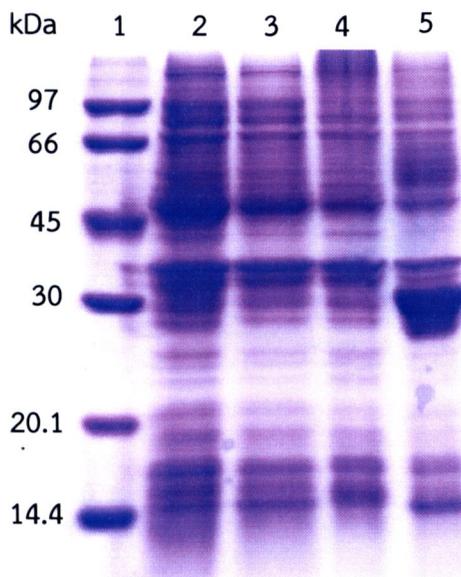


Figure1. แบบแผนของโคลน RpL10A เข้าสู่เวกเตอร์ pET-28a (+)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 ห้องสมุดงานวิจัย
 วันที่ 21 พ.อ. 2555
 เลขทะเบียน 191029
 เลขเรียกหนังสือ

Figure 2. การแสดงออกของ His-RpL10A จากเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มี ดีเอ็นเอ pET-RpL10A โปรตีนแยกบน 12% SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie blue แถบที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน, แถบที่ 2: สารละลายเซลล์ที่มีดีเอ็นเอพาหะ pET ที่ไม่ถูกชักนำ, แถบที่ 3: สารละลายเซลล์ที่มีดีเอ็นเอพาหะ pET ที่ถูกชักนำ, แถบที่ 4: สารละลายเซลล์ที่มีดีเอ็นเอพาหะ His-RpL10A-pET ที่ไม่ถูกชักนำ, แถบที่ 5: สารละลายเซลล์ที่มีดีเอ็นเอพาหะ His-RpL10A-pET ที่ถูกชักนำ

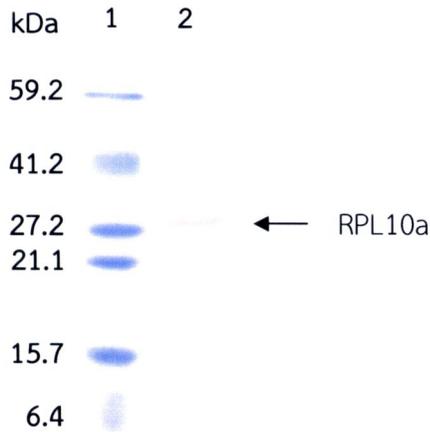


Figure 3. Western blot ของโปรตีนลูกผสม His-RpL10A ตรวจจับโดย anti-His monoclonal แลบที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน แลบที่ 2: His-RpL10A

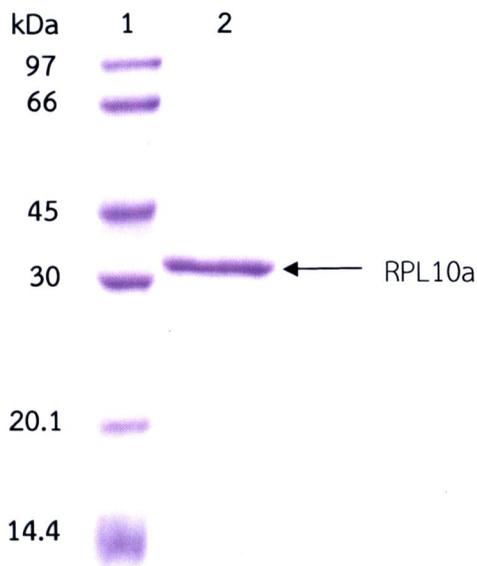


Figure 4. โปรตีน His-RpL10A บริสุทธิ์ ย้อมด้วย Coomassie blue staining ภายหลังแยกด้วย 12% SDS-PAGE แลบที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน แลบที่ 2: โปรตีน His-RpL10A บริสุทธิ์

3.2 ผล RPL10a ลูกผสมต่อการแสดงออกของ ยีน ต่างๆใน ovarian cell ในหลอดทดลอง

นำโปรตีนลูกผสมที่บริสุทธิ์ที่ได้ ที่ความเข้มข้นต่างๆกันนำมาเติมในอาหาร M199 (Zapta et al., 2003) ซึ่งใช้ในการเลี้ยง undeveloped ovary ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาดเล็กโดยเลี้ยงใน 24 ถาด 24 หลุมภายหลังการบ่มที่ 0.5, 2, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และตรวจดูการเพิ่มของการแสดงออกของยีน TCTP, SOP และ Vitellogenin (Vn) โดยวิธี Realtime PCR อนึ่งการเลี้ยงในทุกช่วงเวลาได้ทำการควบคุมโดยได้หาปริมาณการแสดงออกของ G3PDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) เป็นยีนที่แสดงออกอย่างสม่ำเสมอเมื่อเซลล์มีชีวิตอยู่หาปริมาณการแสดงออกของยีน TCTP, SOP และ Vn ใน undeveloped ovary ที่บ่มกับ RPL10a เปรียบเทียบกับ undeveloped ovary ที่ไม่บ่มด้วย RPL10a โดยวิธี Real-time PCR ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้

ทำการสกัด Total RNA จากอวัยวะต่างๆของกึ่งทั้งกึ่งในสภาวะที่มีไข่ประกอบด้วย 3 สภาวะของ ovarian stage ได้แก่ stage 1 state 2 และ stage 3 และกึ่งปกติโดยใช้ Trizol reagent (GIBCO BRL) แล้วเปลี่ยน Total RNA (4 ไมโครกรัม) ไปเป็น cDNA ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยใช้ random primer (500 นาโนกรัม) และ avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (5 U) (Promega).

Real-Time PCR ทำในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย iQTMSYBR[®]Green Supermix (BIO-RAD) ปริมาณ 25 ไมโครลิตร , 20 pmol ของแต่ละ primer และ cDNA ปริมาณ 300 นาโนกรัม โดย primers ที่ใช้ในการทำ ในการเพิ่มจำนวน RPL10a คือ 5' GGG TTT CAG TGG CAC AGT A 3' และ 5' TTC TGC CAA TGC TTC TCC AAC 3' ปฏิกิริยา PCR ทำโดยเริ่มด้วย step 1 denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 Cycle ทำ 40 cycles ของ step 2 ,3 และ 4 ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที ในการทดลองนี้ใช้ GAPDH (Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene เป็น internal standard และ primers สำหรับ GAPDH gene คือ 5' CAA GAA GGT CAT CAT CTC CGC T 3' และ 5' TCC ACG GTC TTC TGT GTG GC 3' การทำปฏิกิริยาและการวัด fluorescence ทำโดยใช้เครื่อง COBAS Taq Man 48 (Roche) ทำทุกตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ปฏิกิริยา PCR ทำโดยเริ่มด้วย step 1 denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 Cycle ทำ 40 cycles ของ step 2 ,3 และ 4 ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็น 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน copy number ของแต่ละปฏิกิริยาทำโดยคำนวณตามน้ำหนักโมเลกุลและเปลี่ยนไปเป็นจำนวน copy number ตาม Avogadro's number การเปรียบเทียบการแสดงออกทำโดย One Way ANOVA of SPSS program ที่ 95% confidence level ($p < 0.05$)

ผลการแสดงออกของยีน TCTP, SOP และ HSP70 จาก ovarian explants เมื่อกระตุ้นด้วย RPL10a พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อบ่ม His-RpL10A เป็นเวลา 0.5-2 ชั่วโมง และจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ TCTP mRNA ใน ovarian explants ในระหว่างการบ่ม 4-8 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณค่อยลดลงจนถึงระดับปกติเมื่อบ่มนาน 12 ชั่วโมง (Figure 5A) สำหรับปริมาณของ SOP mRNA พบเพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่ม 4 ชั่วโมง และคงที่ตลอด 12 ชั่วโมง (Figure 5B) ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของ while an HSP70 พบในระหว่าง 4 - 12 ชั่วโมง ของการบ่ม (Figure 5C) เพื่อให้แน่ใจว่า His-RpL10A มีผลเฉพาะรังไข่กึ่ง ดังนั้นจึงบ่ม His-RPL10a กับเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อและศึกษาการ

แสดงออกของยีน *TCTP*, *SOP* และ *HSP70* พบการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นภายหลังการบ่ม (Figure 6)

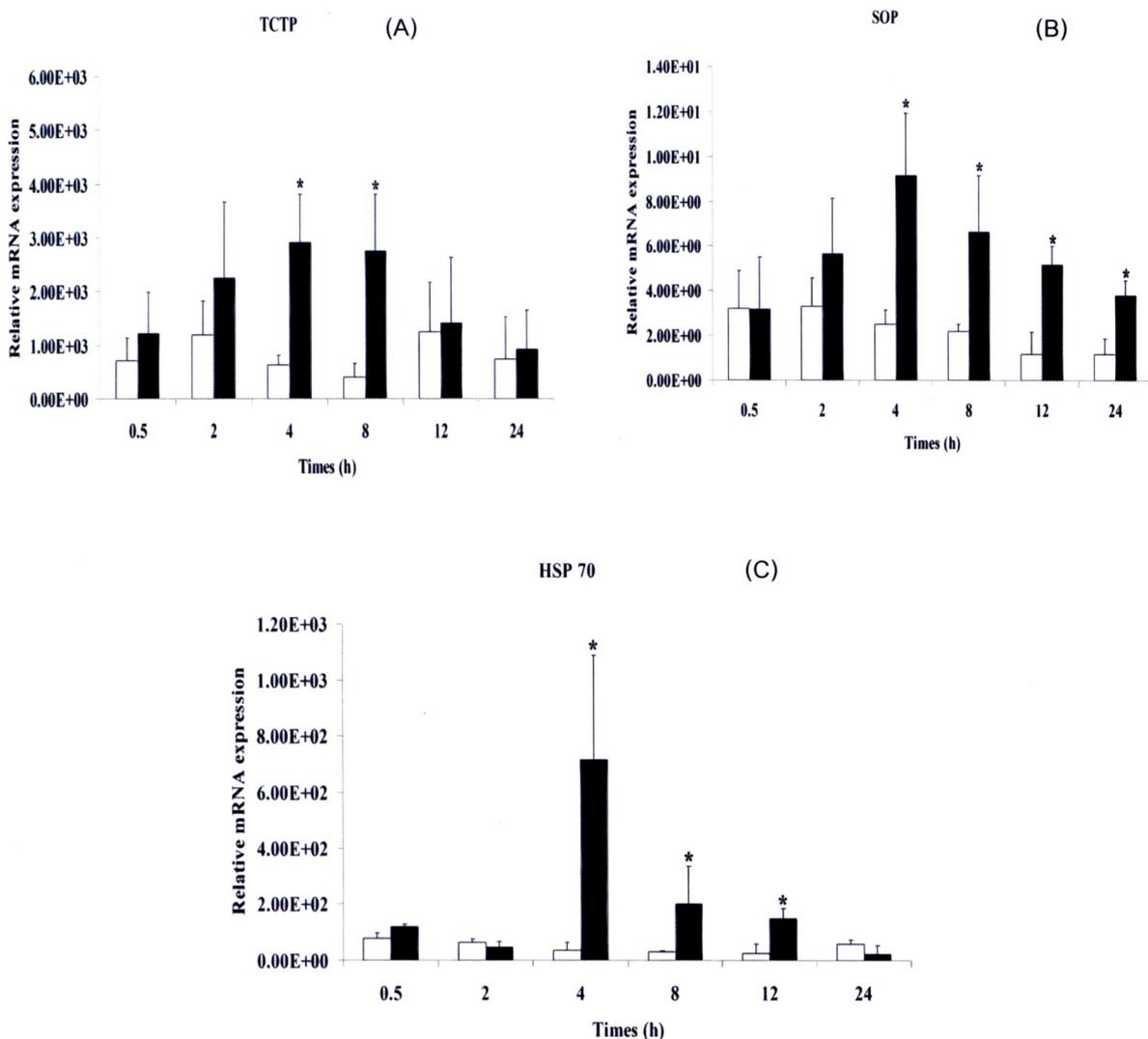


Figure 5. ผลของ recombinant RpL10A ต่อปริมาณของ *TCTP*, *SOP*, และ *HSP70* mRNA ใน ovarian explants ของกึ่ง เมื่อบ่มในเวลาต่างๆกัน และหาปริมาณโดยวิธี real-time PCR และปริมาณนั้นเปรียบเทียบกับ internal standard *GAPDH* (mean \pm SD, n=3 and $p < 0.05$). แถบสีขาวแสดงระดับ mRNA ของยีน ใน ovarian explants ที่ไม่ได้บ่มกับ recombinant RpL10A แถบสีดำแสดงระดับของ mRNA ของยีนภายหลังการบ่ม ovarian explants ด้วย recombinant RpL10A ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ของระดับ mRNA ของยีนแสดงโดย *

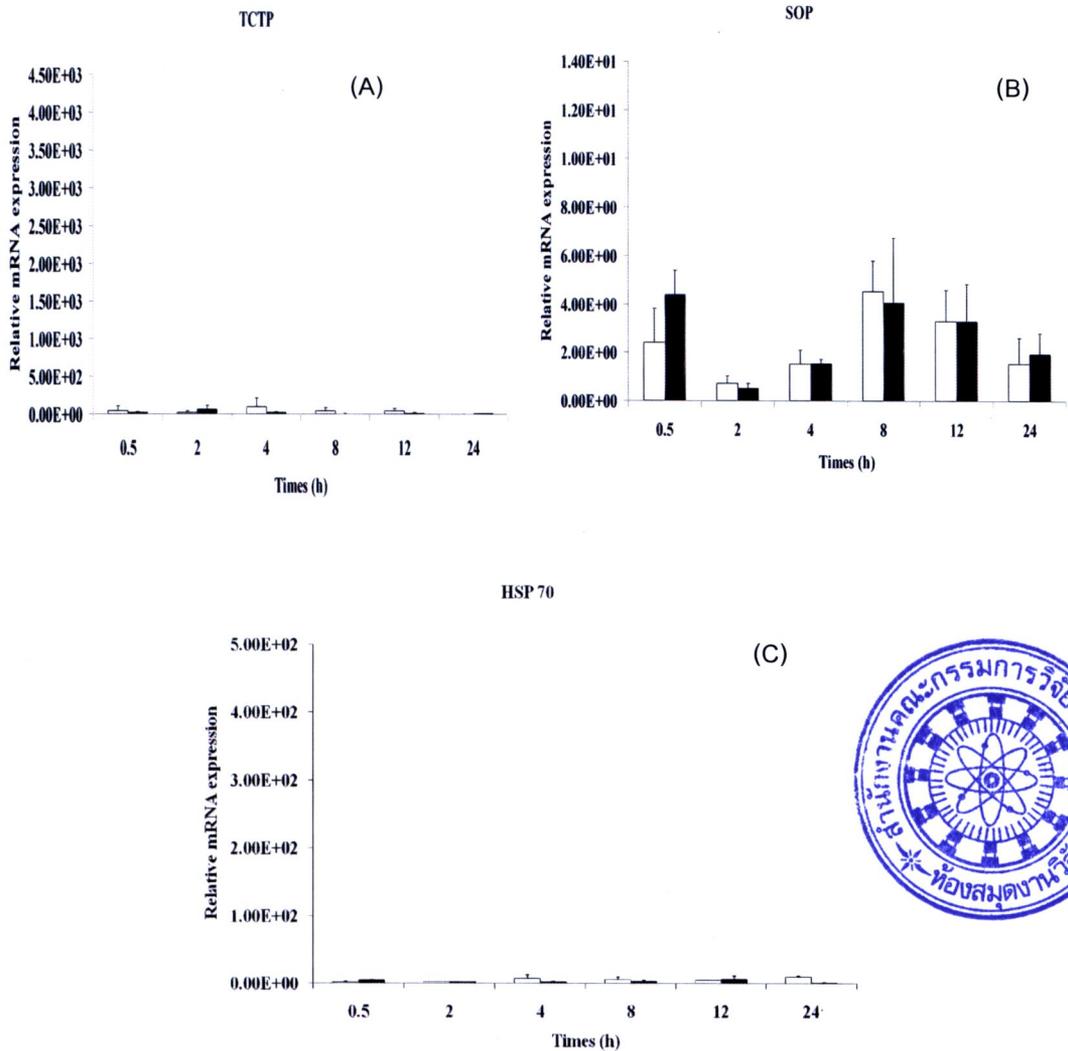


Figure 6. ผลของ recombinant RpL10A ต่อปริมาณของ *TCTP*, *SOP*, และ *HSP70* mRNA ใน muscle explants ของกึ่ง เมื่อบ่มในเวลาต่างๆกัน และหาปริมาณโดยวิธี real-time PCR และปริมาณนั้นเปรียบเทียบกับ internal standard *GAPDH* (mean \pm SD, n=3 and $p < 0.05$). แถบสีขาวแสดงระดับ mRNA ของยีน ใน ovarian explants ที่ไม่ได้บ่มกับ recombinant RpL10A แถบสีดำแสดงระดับของ mRNA ของยีนภายหลังการบ่ม ovarian explants ด้วย recombinant RpL10A ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ของระดับ mRNA ของยีนแสดงโดย *

3.3 ศึกษาผลโปรตีนลูกผสม RPL 10a ต่อการพัฒนาของไข่กึ่งแม่กึ่งแซบวัย โดยการทดลองแบบ

in vivo

แบ่งแม่กึ่งที่อยู่ในระยะที่รังไข่ยังไม่พัฒนาที่ยังมีชีวิตออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดสารใด ๆ กลุ่มที่ 2 ฉีดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายโปรตีนลูกผสม (350 mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, pH 8.0 กลุ่มที่ 3 ฉีดสารละลายโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อกึ่ง กลุ่มที่ 4 ฉีดสารละลายโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อกึ่งและกลุ่มที่ 5 ฉีดสารละลายโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้น 180 ไมโครกรัมต่อกึ่ง ทำการฉีดซ้ำในวันที่ 5, 10 และ 15 วันหลังจากทำการฉีดครั้งแรก และทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละกลุ่มในวันที่ 20 หลังจากทำการฉีดครั้งแรก เพื่อศึกษาการพัฒนาของรังไข่ด้วยเทคนิค Histology โดยการย้อมด้วยสี H&E (Hematoxylin และ Eosin) ผลการทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของรังไข่ในกลุ่มทดลองที่ 1-4 แสดงใน Figure 7-10 ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้น 180 ไมโครกรัมต่อกึ่ง พบการพัฒนาการเจริญของไข่กึ่งจากเห็นมีการขยายของเซลล์และมีเซลล์ไข่ม้วนมากขึ้นและมีการติดสีกรดมากขึ้น มีการพัฒนาของเซลล์ไข่จนถึงระยะ developing oocyte (OV1) ซึ่งไม่พบในกลุ่มอื่น ๆ และเมื่อคำนวณชนิดเซลล์ไข่ที่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ดังแสดงใน Figure12 พบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ มีการพัฒนาของเซลล์ไข่ได้สูงสุดได้เพียงในระยะ previtellogenic oocyte grade I (Ooc I; 100%) ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ได้รับบัฟเฟอร์มีการพัฒนาของเซลล์ไข่ได้สูงสุดในระยะ previtellogenic oocyte grade III (Ooc III; 4%) สำหรับกลุ่มที่ได้รับโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้น 60 และ 120 ไมโครกรัมต่อกึ่ง พบว่ามีการพัฒนาของเซลล์ไข่ได้สูงสุดในระยะ Ooc III คิดเป็น 3 และ 15% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้น 180 ไมโครกรัมต่อกึ่ง มีการพัฒนาของเซลล์ไข่จนถึงระยะ OV1 (5%) ซึ่งไม่พบในกลุ่มอื่น ๆ นั้นแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นโปรตีนลูกผสม RPL10a ที่อาจเหมาะสมต่อการกระตุ้นสำหรับการทดลองนี้ คือ 180 ไมโครกรัมต่อกึ่ง

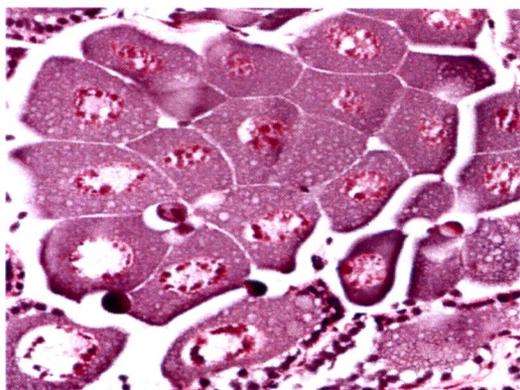


Figure 7. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 1 ที่ไม่ได้ฉีดสารละลายใดๆ ย้อมด้วยสี H&E

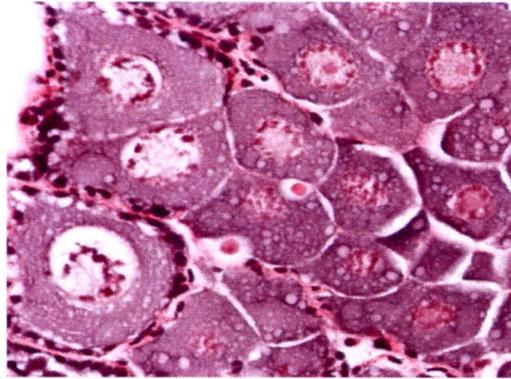


Figure 8. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 2 ฉีดสารละลายบัฟเฟอร์ (350 mM NaCl, 50mM NaH_2PO_4 , pH 8.0) ย้อมด้วยสี H&E

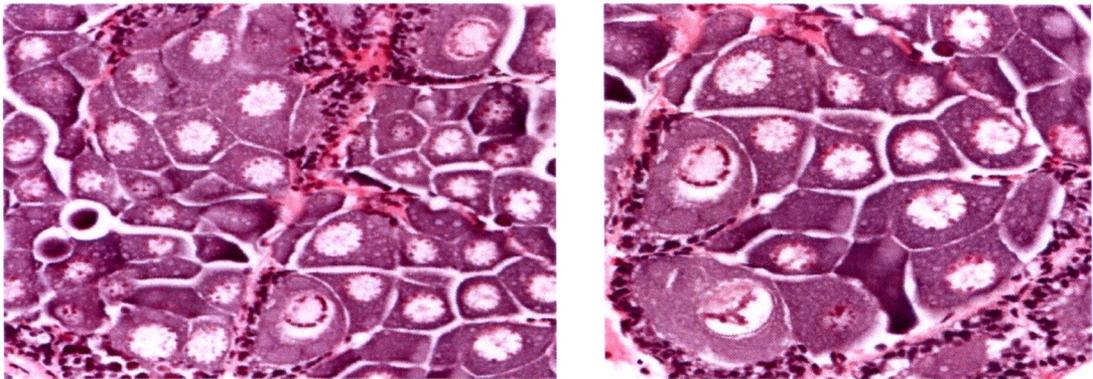


Figure 9. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 3 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อกึ่ง ย้อมด้วยสี H&E

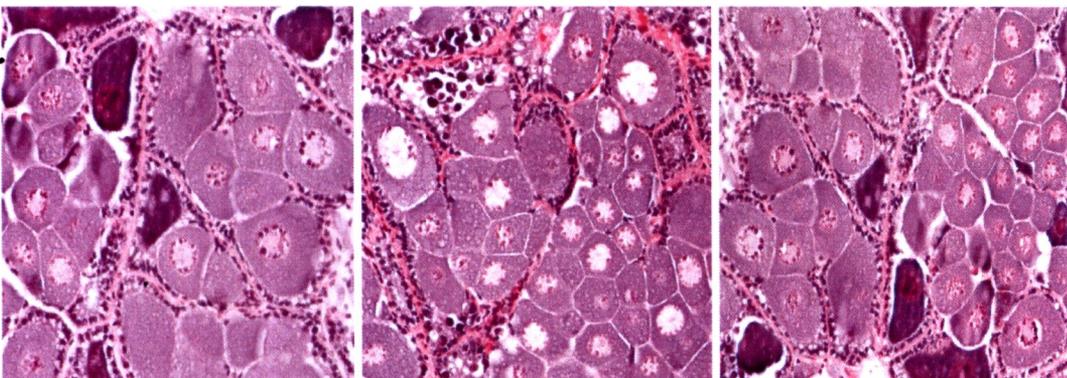


Figure 10. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกลุ่มที่ 4 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อกึ่ง ย้อมด้วยสี H&E

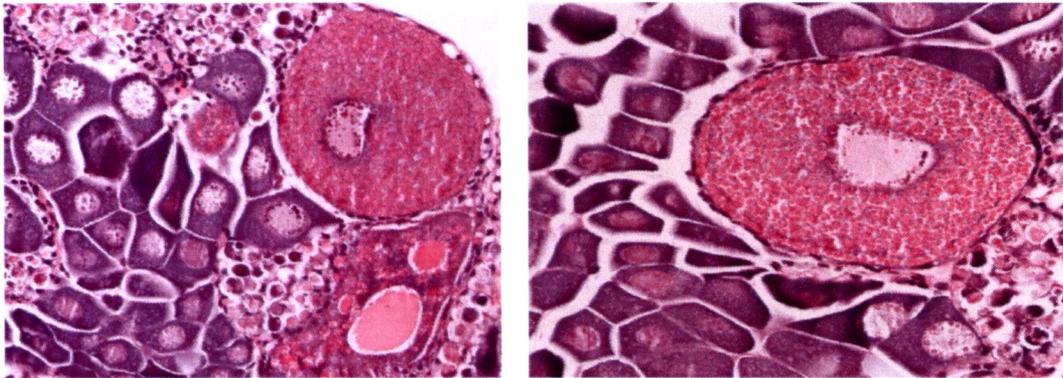


Figure 11. เนื้อเยื่อของรังไข่กึ่งของกุ่มที่ 5 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 180 ไมโครกรัมต่อกึ่ง ย้อมด้วยสี H&E

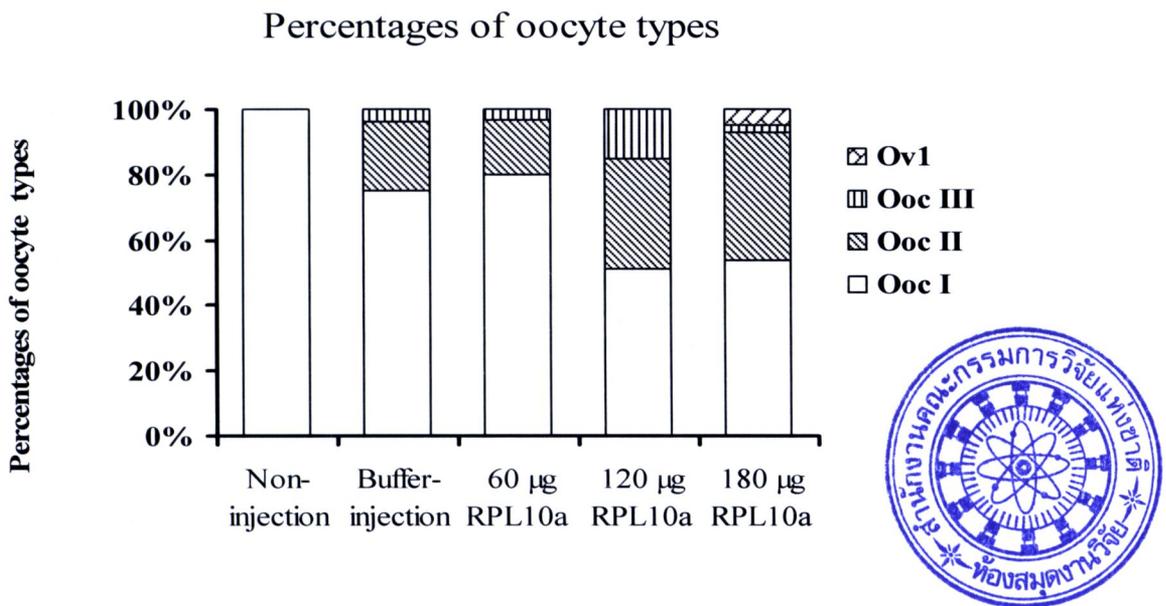


Figure 12. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไข่ชนิดต่างๆ ของรังไข่แม่กึ่งที่พัฒนา หลังจากได้รับ โปรตีนลูกผสม RPL10a ที่ความเข้มข้น 60, 120 และ 180 ไมโครกรัมต่อกึ่ง เปรียบเทียบกับกุ่มที่ฉีด สารละลายบัฟเฟอร์และไม่มีการฉีดสารใดๆ ในวันที่ 20 หลังจากการฉีดครั้งแรก Ooc I; previtellogenic oocyte grade I, Ooc II; previtellogenic oocyte grade II, Ooc III; previtellogenic oocyte grade III, OV1; Deveoping oocyte

4. วิจารณ์ผลการวิจัย

ความพยายามของนักวิจัยในการที่จะทราบกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่ เพื่อหาวิธีการในการควบคุมคุณภาพและปริมาณของไข่กึ่งในการเพาะเลี้ยง จากการทดลองที่ผ่านมาพบ ยีนที่แสดงออกปริมาณมากในระหว่างที่มีการพัฒนาไข่ (Lo et al. 2007; Loongyai et al. 2007; Wonglapsuwan et al. 2009) ยีน *RPL10a* ribosomal protein L10a เป็นหนึ่งในหลายๆยีนที่มี