วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ผลิตโปรตีนลูกผสม RPL10a
2. ผล RPL10a ต่อการแสดงออกของ ยีน ต่างๆใน ovarian cell ในหลอดทดลอง
3. ผล RPL10a ต่อการพัฒนาของ ovaries ของกุ้ง (*in vivo study*)

2. วิธีการทดลองและวัสดุในการวิจัย

2.1 การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPL10a จากดีเอ็นเอลูกผสม pPET-RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

นำดีเอ็นเอลูกผสม pPET- RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* strain BL21 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2XYTA ที่มี ampicilin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 50 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ประมาณ 0.4-0.6 จึงกระตุ้นแบคทีเรียให้มีการผลิตโปรตีนด้วยสารละลาย 0.1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyronositol) บ่มเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์แบคทีเรียบนน้ำแข็งก่อนจะนำไปสกัดโปรตีน นำเซลล์แบคทีเรียละลายในสารละลาย lysis buffer (50 mM Na_2PO_4, pH 8.0, 300 mM NaCl และ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที โดยต้องทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนเซลล์แยกออกจากกันละลายใน PBS (10mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH2PO4, 2.7 mM KCl และ 140 mM NaCl, pH 7.4) แล้วทำให้ตะกอนแตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนและทำซ้ำเช่นนี้อีกหลายครั้งจนได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ในส่วนใส และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หาปริมาณโปรตีนของสารละลายโดยวิธี Lowry และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเล็คโตรโฟเรซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) และวิเคราะห์โดย western blot

2.2 ศึกษาผล RPL10a การเร่งการเจริญโตของ ovarian cell ในหลอดทดลอง

นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆกันนำมาเติมในอาหาร M199 (Zapta et al., 2003) ซึ่งใช้ในการเลี้ยง undeveloped ovary ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาดเล็กโดยเลี้ยงใน 24 ถาด 24 หลุมภายหลังการบ่มที่ 0.5, 2, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และตรวจดูการเพิ่มข้อการแสดงออกของยีน 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 จากอวัยวะต่างๆของกุ้งทั้งกุ้งในสภาวะที่มีไข่ประกอบด้วย 3 สภาวะของ ovarian stage ได้แก่ stage 1 state 2 และ stage 3 และกุ้งปกติโดยใช้ 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 iQ^{TM}SYBR$^{®}$Green Supermix (BIO-RAD) ปริมาณ 25 ไมโครลิตร , 20 pmol ของแต่ละ primer และ cDNA ปริมาณ 300 นาโนกรัม โดย primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน 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 เป็น 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 ($p<0.05$)

2.3 ศึกษาผล RPL10a การพัฒนาของ ovaries ในกุ้ง

2.3.1 แบ่งตัวเมียเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว แต่ละกลุ่มมีตัวผู้ 1 ตัว ทั้งหมด 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดสารใดๆ

กลุ่มที่ 2 ฉีดสารละลายบัฟเฟอร์ (350 mM NaCl, 50mM NaH_2PO_4, pH 8.0)

กลุ่มที่ 3 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อกุ้ง

กลุ่มที่ 4 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อกุ้ง

กลุ่มที่ 5 ฉีดโปรตีนลูกผสมที่ความเข้มข้น 180 ไมโครกรัมต่อกุ้ง

ทำการฉีดซ้ำในวันที่ 5 และ 10 ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งในวันที่ 15 ของการทดลองนับตั้งแต่ฉีดนำไปแช่ใน neutral buffered formalin solution (10% formalin, 33 mM NaH_2PO_4, 45 mM Na_2HPO_4) เป็นเวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ใน paraffin และทำการตัดชิ้นเนื้อเป็นแผ่นบางขนาดประมาณ 5-6 mm โดยใช้ 820 Spencer rotary microtome (MedCon, Colorado, USA) และนำไปย้อมด้วยสี haematoxylin-eosin (Bell and Lightner, 1988) ชิ้นที่ย้อมสีแล้วนำไปปิดด้วย cover slip และเคลือบให้ติดแน่น เพื่อไว้ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ต่อไป เนื้อเยื่อส่วนหนึ่งวางบนสไลด์ที่เคลือบด้วย 2% silane เพื่อนำไปทำ immunohistochemistry ต่อไป

2.3.2 Immunohistochemistry