รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของยีน Ribosomal Protein L10A **ที่มีต่อตาของแมลงหวี่** *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) **เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคเบาหวาน**

Effect of Ribosomal Protein L10A on Eyes of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) for Diabetes Treatment.

คณะผู้วิจัย

ดร. มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ SCI570372S

สารบัญ

สารบัญ	**หน้า**
รายการภาพประกอบ	3
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	4
กิตติกรรมประกาศ	6
บทคัดย่อภาษาไทย	7
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	8
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	10
บทตรวจเอกสาร	11
วิธีการทดลอง	21
ผลการทดลอง	25
วิจารณ์ผลการทดลอง	31
สรุปผลการวิจัย	32
ข้อเสนอแนะ	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	38

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. แสดงวัฏจักรชีวิตของแมลงหวี่	12
2. แสดงลักษณะตาประกอบของแมลงหวี่ (Compound eyes)	13
3. แสดงลักษณะความผิดปกติของนิวเคลียสและผนังเซลล์ เมื่อทำการ knock out ยีน RpL10A ในเซลล์ฟอลลิเคิล	16
4. แสดงลักษณะฟีโนไทป์ PWOP เนื้อเยื่อรังไข่แมลงหวี่ที่ขาดยีน RpL10A ในเซลล์สืบพันธุ์	16
5. แสดงลักษณะผิดปกติเมื่อแมลงหวี่ที่ถูก Over-expression ยีน RpL10A	17
6. แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนอินซูลิน	18
7. ตรวจสอบลักษณะตาแมลงหวี่บ่มด้วย DAPI สำหรับตรวจสอบนิวเคลียสของเซลล์	25
8. ลักษณะเมมเบรนของเซลล์ภายในตาแมลงหวี่	26
9. ตรวจสอบโปรตีน insulin receptor ในตาแมลงหวี่ที่ถูก over expression ยีน RpL10A โดยเทคนิค Immunohistochemistry	27
10. การตรวจสอบยีน InR ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)	28
11. แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน InR ในตาแมลงหวี่ โดยเทคนิค Realtime PCR	29
12. แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน RpL10A และ InR จากการทำนายโดยเทคนิคทางชีวสารสนเทศ	30

สัญลักษณ์และตัวย่อ

AMV	=	Avain myeloblastosis virus
APS	=	Ammonium persulphatase
BSA	=	Bovine serum albumin
bp	=	base pair
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleotide acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
g	=	gram
GAPDH	=	Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase
H	=	hour (s)
HEPES	=	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
kb	=	kilobase
kDa	=	Kilodalton (s)
LB	=	Luria Bertaini (medium)
M	=	Molar
mg	=	milligram
min	=	minute (s)
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
mm	=	millimeter
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
MW	=	molecular weight
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
O.D.	=	optical density
PCR	=	Polymerase chain reaction
pH	=	-Log hydrogen ion concentration
RNA	=	Ribonucleic acid

RNase	=	Ribonuclease
RpL10A	=	Ribosomal protein L10A
rpm	=	revolutions per minute
RT	=	Reverse transcription
S	=	Second
U	=	unit (s)
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume per volume
w/v	=	weight per volume

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัย สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และคณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้อุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัยด้วยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประเภททุนดรุณาจารย์ (รอบแรก) ประจำปีงบประมาณ 2557 ในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ อาจารย์พี่เลี้ยงที่คอยให้คำปรึกษา ชี้แนะอย่างใกล้ชิด รวมถึงสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีรายงานว่าโปรตีน Ribosomal protein L10A หรือ RpL10A มีบทบาทในกระบวนการสร้างไข่ของกุ้งแชบ๊วยและแมลงหวี่ ในแมลงหวี่นั้นพบว่าการ น็อคเอ้าท์ยีน *RpL10A* ในเซลล์สืบพันธุ์ส่งผลให้เซลล์ฟอลิเคิลซึ่งอยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่นั้นหายไป ซึ่งลักษณะฟีโนไทป์ดังกล่าวนี้มีลักษณะเดียวกับที่พบในแมลงหวี่ซึ่งโดนทำลายยีน insulin receptor (InR) ในทางกลับกันหากมีการแสดงออกของยีน RpL10A ที่มากเกินไปในดวงตา จะส่งผลให้สีบริเวณตรงกลางของดวงตาเปลี่ยนแปลงไป ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงศึกษาโครงสร้างภายในดวงตาที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปนี้ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ซึ่งพบว่านิวเคลียสของเซลล์ภายในดวงตามีการจัดเรียงตัวที่ผิดปกติ และเซลล์เมมเบรนบางส่วนขาดหายไป นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน InR ทั้งในระดับยีนและโปรตีนโดยใช้เทคนิค realtime-PCR และ immunohistochemistry พบว่ายีน InR มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อโปรตีน RpL10A มีการแสดงออกที่มากเกินกว่าปกติ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างยีน RpL10A และ InR โดยใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศในการทดสอบการปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน ผลการทดลองพบว่าโปรตีน RpL10A และ InR มีปฏิสัมพันธ์กันในระดับคะแนนที่สูง (-1143.6) ซึ่งจากการค้นพบนี้ทำให้สันนิษฐานได้ว่า RpL10A มีความเกี่ยวข้องกับ insulin signaling pathway และยีน insulin receptor สามารถถูกชักนำได้ด้วย RpL10A

Abstract

Several ribosomal proteins have been identified that exhibit functions other than protein synthesis in ribosomes. Ribosomal protein L10A (RpL10A) in the banana prawn and fruit fly has been shown to play a role in oogenesis. Interestingly, germ line clones with knocked out RpL10Ab genes result in a loss of follicle cells surrounding the egg chamber but nurse cells that appear normal. This phenotype is reminiscent of insulin receptor mutants. In contrast, over-expression of RpL10A in the eyes of the fruit flies results in abnormal ommatidia, with a loss of red pigment in the center of the eye. In this study, the structure of RpL10A in eyes over-expressing RpL10A was elucidated using immunohistochemistry techniques. Abnormal rearrangements of nuclei and a lack of cell membranes in those eyes were both demonstrated. Furthermore, the expression of the insulin receptor gene (InR) and the insulin receptor protein were considerably increased as determined by real-time PCR and immunohistochemistry, respectively. In addition, an interaction between RpL10A and InR was demonstrated using the program ClusPro, which found that RpL10A bound to the InR protein with an acceptable score (-1143.6). From these discoveries, we conclude there is an additional function of RpL10A activation via the insulin signaling pathway, while InR was also induced by RpL10A.