รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ: ผลของ RpL10a ต่อการพัฒนาเซลล์อวัยวะเพศผู้ในกุ้ง

Project title: Effect of RpL10a on testis cells in shrimp

คณะนักวิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ
3. นางสาว กุลวดี พลาสิน

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2560
รหัสโครงการ SCI600255S

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) ผลของ RpL 10a ต่อการพัฒนาเซลล์อวัยวะเพศผู้ในกุ้ง
(ภาษาอังกฤษ) Effect of RpL10a on testis cells in shrimp

ชื่อผู้วิจัย รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ สัดส่วนที่ทำการวิจัย (75%)
หน่วยงานที่สังกัด สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หมายเลขโทรศัพท์ 074-288383โทรสาร 074-288383 E-mail : wilaiwan.c@psu.ac.th
ผู้ร่วมโครงการ ดร. มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ สัดส่วนที่ทำการวิจัย (25%)
หน่วยงานหลัก สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งบประมาณที่ได้รับ 448,800.- บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี
เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) ตุลาคม 2559 ถึง (เดือน ปี) กันยายน 2560

สารบัญ

รายการตาราง หน้าที่

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของเซลล์ในระยะต่างๆของการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้ง 12

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของ 12% SDS-PAGE gel 14

ตารางที่ 3 primers ของยีน *rhau* และ *prm2* 17

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์ spermatogenic cells หลังจากที่บ่มด้วยโปรตีนลูกผสม rRpL10a เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 26

รายการภาพประกอบ หน้าที่

รูปที่1: การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RpL10a ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 และการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย 12 % SDS-PAGE (A), แถว M: Low molecular weight standard marker, แถว 1: non induce insoluble protein, แถว 2: non induce soluble protein, แถว 3: induce insoluble protein, แถว 4: induce soluble protein, แถว 5: โปรตีน His-RpL10a บริสุทธิ์ และการยืนยันผลด้วย western blot (B), แถว M: Pre-stained marker, แถว 1: โปรตีน His-RpL10a บริสุทธิ์ 19

รูปที่ 2: ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ testis ของกุ้งกุลาดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย100 เท่า แสดงเซลล์ในระยะการพัฒนาต่าง ๆ, (A): stage I ประกอบไปด้วยเซลล์ spermatogonia,B): stage II ประกอบไปด้วยเซลล์ spermatocytes, (C): stage III ประกอบไปด้วยเซลล์ spermatidและ spermatozoa 20

รูปที่ 3: ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ testis ของกุ้งกุลาดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า แสดงการพัฒนาของเซลล์ testis ในกุ้งแต่ละตัว (n=3) หลังจากการบ่ม testis ด้วยโปรตีนลูกผสม His-RpL10a (rRpL10a) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย dialysis buffer (กลุ่มควบคุม)ในอาหาร 2x L-15 mediumเป็นเวลา 4 ชั่วโมง 21

รูปที่ 4: แสดงร้อยละการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกุลาดำหลังจากการบ่มด้วยโปรตีนลูกผสม His-RpL10a (rRpL10a) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย dialysis buffer (กลุ่มควบคุม) หลังจากการบ่ม 4 ชั่วโมงในอาหาร 2x L-15 medium (ทดลอง 3 ซ้ำ) 21

รูปที่ 5: แสดงลักษณะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกุลาดำหลังจากการบ่มด้วยโปรตีนลูกผสม His RpL10a (rRpL10a) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย dialysis buffer (กลุ่มควบคุม) หลังจากการบ่ม 12 ชั่วโมง (n=3, ทดลอง 3 ซ้ำ) ลูกศรแสดงเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาเจริญเต็มที่ เป็น spermatozoa ที่มีหาง 22

รูปที่ 6: แสดงร้อยละการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกุลาดำหลังจากการบ่มด้วยโปรตีนลูกผสม His-RpL10a (rRpL10a) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย dialysis buffer (กลุ่มควบคุม) หลังจากการบ่ม 12 ชั่วโมง (ทดลอง 3 ซ้ำ) 23

รูปที่ 7: ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ testis ของกุ้งกุลาดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า แสดงการติดสีน้ำตาลของ SNA lectin ของเซลล์ในระยะการพัฒนาต่างๆ, (A): เซลล์ที่ไม่มีการบ่ม SNA lectin, (B): เซลล์ spermatozoa ที่มีการบ่ม SNA lectin, (C): stage I ประกอบไปด้วยเซลล์ spermatogonia, (D): stage II ประกอบไปด้วยเซลล์ spermatocytes, (E): stage III ประกอบไปด้วยเซลล์ spermatid และ spermatozoa 24

รูปที่ 8: การแสดงออกของยีน *Dmrt1* ในเซลล์ของเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หลังจากการบ่มกับโปรตีน RpL10a ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 ชั่วโมง 25

รูปที่ 9: ภาพตัดตามขวางของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหนูเซลล์ต่างๆที่พบในท่อส่งน้ำเชื้อ 25 ประกอบด้วย spermatogonia cells (Spn), spermatocytes (Spc), round spermatid (rSpt) และ elongated spermatid (eSpt). Original magnification ×400, scale bars = 20 μm.

รายการภาพประกอบ หน้าที่

รูปที่ 10: ผลของโปรตีน His-rRpL10a ที่ความเข้มข้นต่างๆกันในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ของหนูถีบจักร เมื่อบ่มที่ 4 ชั่วโมง ในอาหาร DMEMกราฟแสดงชนิดต่างๆของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ของหนูถีบจักร (n=4, ข้อมูล แต่ละชุดทำซ้ำ 3 ครั้ง) 26

รูปที่ 11: แสดง WGA lectin histochemistry เพื่อยืนยันเซลล์ spermatid ในท่อนำส่งสเปิมร์ (A) ชิ้นเนื้อของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ย้อมด้วย Alexa Fluor 594 WGA (Red) และ Hoechst 33342 (blue) acrosomal spermatids ติดสีแดงชี้ด้วยลูกศรสีขาวกำลังขยาย ×400, scale bars = 20 μm. (B) แสดงร้อยละของเซลล์ spermatid cells สังเกตุโดยวิธี WGA histochemistry ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทดสอบโดยวิธี one-way ANOVA test (mean±SD, n=4 and $p<0.05$). 27

รูปที่ 12: ผลของโปรตีน rRpL10a ต่อระดับ *Rhau* และ *Prm2* mRNA ในชิ้นเนื้อของอวัยวะเพศผู้ ของหนู ระดับการแสดงออกของยีน *Rhau* และ *Prm2* เปรียบเทียบกับ *β—actin* ภายหลังเมื่อบ่มกับ 1 μM โปรตีน rRpL10a ความแตกต่างเปรียบเทียบโดย t-test ค่าที่แสดงออกแสดงออกเป็นค่าเฉลี่ย (mean±SD, n=2 และ $p<0.05$) 28

รูปที่ 13. ผลของโปรตีน rRpL10a ต่อการเจริญของเซลล์ เมื่อชิ้นเนื้อของอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้ บ่มกับ ความเข้มข้นต่างๆของ rRpL10a และ EdU หลังจากนั้นย้อมด้วย Alexa Fluoro 488 (green) และ DAPI (blue) ภาพ A: bufferเป็น control, B. 1.0 μM, C. 2.0 μM. รูป A-E กำลังขยาย ×200, scale bars = 50 μm สำหรับภาพที่ขยาย กำลังขยาย ×400, scale bars = 20 μm 29

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัยด้วยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ในครั้งนี้ และขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

วิไลวรรณ โชติเกียรติ

บทคัดย่อภาษาไทย

ไรโบโซมอลโปรตีนเป็นองค์ประกอบหนึ่งของไรโบโซมที่เป็นที่รู้กันดีว่าช่วยในการสังเคราะห์โปรตีน RpL10a และเป็นส่วนหนึ่งของlarge subunit ของไรโบโซมมีรหัสพันธุกรรมที่เหมือนกันในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ มีการค้นพบหน้าที่ของ RpL10aในการพัฒนารังไข่และไข่ หากแต่หน้าที่ของโปรตีน RpL10a ในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ยังไม่แน่ชัดดังนั้นการศึกษาผลของ RpL10a ต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จึงเป็นที่หน้าสนใจในการศึกษานี้ใช้ กุ้งและหนูเป็นต้นแบบในการศึกษาจากการศึกษาการกระตุ้นการพัฒนาการเซลล์ของเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งหลังจากการบ่มชิ้นส่วนอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกับโปรตีน RpL10a ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 µM นาน 4 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1.0 µM สามารถกระตุ้น spermatogenesis เข้าสู่ stageIII ร้อยละ 55.6 เข้าสู่stage II (spermatid) ร้อยละ 27.8 และพบ stage I (spermatocyte) ร้อยละ 16.67% ในขณะที่ความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม RpL10a ที่ 2.0 µM พบว่าเซลล์เข้าสู่ stage I และ stage II ในเปอร์เซ็นต์ที่เท่ากันคือ 25% และmature stage ร้อยละ 50 ในทางตรงกันข้าม ในกลุ่มควบคุม (dialysis) พบ stage I และ II คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 27.27 และ 72.73% และไม่พบ mature stage ในกลุ่มควบคุม และเพื่อยืนยันการพัฒนาการเป็นเซลล์ spermatozoa จริงจึงตรวจดูเซลล์มีชีวิตโดย light microscope ภายหลังการบ่มเซลล์กับโปรตีน rRPL10a ที่ความเข้มข้น 1 µM rRpL10a และ 2 µM rRpL10a พบว่าเมื่อบ่มกับโปรตีนดังกล่าว พบการพัฒนาเซลล์spermatozoaที่มีหางร้อยละ52 และร้อยละ 12 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบการพัฒนาเซลล์spermatozoaที่มีหางร้อยละ15 และ เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนDmrt1 *จะแสดงออกได้น้อยลงเมื่ออยู่ในระยะ* stageIII (mature stage) *และเมื่อเซลล์ได้บ่มกับ* 1µM rRpL10aจะมีผลงการแสสดงออกได้น้อยกว่าเมื่อเซลล์บ่มกับ 2µM rRpL10a ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้น1 µM rRpL10aเหมาะสมที่สุดในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้ง

สำหรับทดสอบปฏิกิริยาของ RpL10a ต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหนู ผลจากจุลกายวิภาคของชิ้นเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหนูพบว่าหลังบ่มกับโปรตีน 1.0 และ 2.0 µM rRpL10a ร้อยละ 49.65 และ 45.33 เป็นเซลล์ spermatid ตามลำดับ ในขณะที่พบร้อยละ 21.72 ในกลุ่มควบคุมที่บ่มกับบัพเฟอร์ และเนื่องจากน้ำตาล N-acetyl glucosamine ที่อยุ่บนเซลล์spermatid สามารถเกาะได้ดีกับ wheat germ agglutinin (WGA) ดังนั้นหลังจากบ่มเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหนูกับ 1.0 µM rRpL10a และนำมาตรวจสอบโดย WGA histology พบว่าร้อยละ 36.24 คือเซลล์ spermatid ในขณะที่เซลล์spermatid ที่พบในกลุ่มที่บ่มกับบัฟเฟอร์พบประมาณร้อยละ15.96 นอกจากนั้นการแสดงออกของยีน prm2 *ซึ่งจะพบสูงในเซลล์* spermatid และมีการแสดงออกต่ำของยีน rhau gene ดังนั้นจึงใช้การแสดงออกของยีน 2 ตัวนี้จึงเป็นตัวบ่งชี้ของการพัฒนาเซลล์สู่เซลล์ spermatid และพบว่าการแสดงออกของเนื้อเยื่อที่บ่มกับ rRpL10a จะมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน prm2 และพบการแสดงออกที่ลดลงของยีน rhau เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่บ่มกับบัฟเฟอร์ที่เป็นกลุ่มควบคุม ยิ่งกว่านั้นพบว่ามีการเพิ่มขึ้นมากขึ้นของสัญญาณ EdU(5-ethynyl-2-m-deoxyuridine)ในเนื้อเยื่อที่บ่มกับโปรตีน 1 µM rRpL10a ซึ่งแสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในเซลล์ จากผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ว่าโปรตีน rRpL10a สามารถชักนำให้เกิด spermatogenesis ในหนูซึ่งจะอาจมีประโยชน์ในการเพาะพันธุ์สัตว์ได้ในอนาคต

Abstract

Ribosomal proteins are components of the ribosome that are generally known for protein synthesis. RpL10a is a component of the large ribosomal subunit and is conserved among living organisms. RpL10a functions in the development of ovaries, though the function of RpL10a in testes is not known. Therefore, the พนสำ of RpL10a in testes was clarified using shrimp and mouse testes as a model. The treated explant testis of shrimp by 1 μM and 2 μM recombinant RpL10a for 4 h, spermatogenesis was stimulated to stage III (mature stage=spermatozoa) at 55.6% and 50.0% while the cells developed to stage II 27.8% and 25 %, respectively. In addition, 1 μM and 2 μM recombinant RpL10a stimulated the cells to stage I at 16.67% and 25%, respectively. And the stage III cell was found in the control group.
To confirm the spermatozoa occurred after the explant shrimp's testis were treated by 1 μM rRpL10a and 2 μM rRpL10a, the cells were isolated and observed under a light microscope, they were found 52 % and 12 % of tailed spermatozoa, respectively. While in the control group was found 15 % of tailed spermatozoa. In addition, the expression of the Dmrt1 gene was low expressed during the mature stage and found the lower expression of *Dmrt1* gene in the cells incubated with 1 μM rRpL10a than the cells incubated with the buffer. Therefore the optimum concentration for stimulation shrimp's spermatogenesis in vitro was 1 μM rRpL10a.

Moreover, the other model for confirmation spermatogenesis by rRpL10a was tried. The histology of mouse's testis tissue was used to determine the percentage of spermatogenesis after treatment with recombinant RpL10a (rRpL10a). After treatment with 1.0 and 2.0 μM rRpL10a protein, there were 49.65% and 45.33% spermatid cells, respectively, while there were approximately 21.72% spermatid cells in the untreated testes. The sugar *N*-acetyl glucosamine binds wheat germ agglutinin (WGA) on spermatid cells, so the spermatid cells in the experimental tissue were confirmed by the WGA histology. After treatment with 1.0 μM rRpL10a protein, there were 36.24% spermatid cells, while approximately 15.96% of spermatid cells were detected in the untreated testis by WGA histology. Also, *prm2* gene expression in spermatid is high while the expression of the *rhau* gene is low. Therefore, gene expression in rRpL10a treated testes was determined and *prm2* was found to be increased and *rhau* expressions was decreased compared to the untreated testis. Furthermore, increased cell proliferation in testis tissue treated with 1.0 μM rRpL10a was found with a strong fluorescence signal using an EdU (5-ethynyl-2-m-deoxyuridine) assay. Together, these findings indicate that the rRpL10a protein induces spermatogenesis in mice and may be useful in breeding animals in the future.