

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การโคลนซอร์โอมที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของรังไข่กึ่งแซบวัย

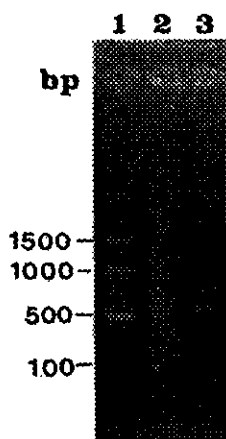
3.1.1 การเตรียม cDNA library ของก้านตากุ้งแซบวัย

จากการเตรียม phage library ในข้อ 2.3.1.1.3 และหาปริมาณของ packaged phage บน LB plates พบว่ามี ปริมาณของ plaque เป็น 2.5×10^5 pfu/ml จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้ phage library จำนวน 120 μ l นำมาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อซึ่งมีความกว้างประมาณ 90 cm ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.1.1.6 จากนั้นหาปริมาณ phage ที่เพิ่มปริมาณตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.1.1.5 ได้จำนวน 3.5×10^8 pfu/ml

3.1.2 การเตรียมตัวตรวจจับ

จากการทำ PCR โดยใช้ Primer จำเพาะ G12 (5'GGTAATCGTGACCTCTAC 3') ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น conserve sequence ในโปรตีนกลุ่ม CHH/MIH/GIH family (รูปที่ 1.7) กับ Primer oligo (dT) โดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้จากก้านตากุ้งแซบวัยในข้อ 2.3.1.1.2 เป็น template PCR product ที่ได้จำนวน 5 μ l นำมาตรวจสอบ โดยการทำ electrophoresis บน 1.5% agarose gel พบว่า DNA มีขนาดต่างๆกัน ในช่วง 200-1500 bp และไม่พบแถบ DNA จำเพาะซึ่งคาดว่าควรมีขนาดประมาณ 300 bp ดังรูปที่ 3.1 จึงนำ PCR product ที่เหลือจำนวน 20 μ l มาตกตะกอนตามวิธีในข้อ 2.3.1.2.1 แล้วนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy จากนั้น PCR product ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วนำมาเพิ่มจำนวน โดยการนำเข้าสู่เซลล์ *E.coli* (Top 10 F') ตามวิธีในข้อ 2.3.1.2.2 จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลวจำนวน 1 ml ซึ่งมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินจำนวน 80 μ g/ml นำมาบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 2.3.1.2.3 จากนั้นนำพลาสมิด

มาตรวจสอบชิ้น DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้พลาสมิด pGEM-T Easy ที่เชื่อมต่อดตัวเอง (โคโลนีสีฟ้า) เป็นตัวเปรียบเทียบ (ไม่ได้แสดงผล) จากนั้นเลือกชิ้นโคลนที่มีขนาดใหญ่กว่า pGEM-T Easy ที่ใช้เป็นตัวแทนมาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ตามวิธีในข้อ 2.3.1.2.5 (ไม่ได้แสดงผล) จากนั้นเลือกชิ้นที่มีขนาดเล็กประมาณ 300 bp มาหาลำดับเบส ตามวิธีในข้อ 2.3.1.2.4 เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของโปรตีนในธนาคารยีน (Genbank) พบว่าชิ้นของ DNA ซึ่งให้ชื่อว่า oli 1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I มีขนาดเล็ก ประมาณ 250 bp ดังรูปที่ 3.2 และเมื่อนำ โคลน oli 1 มาหาลำดับเบสพบว่า มีลำดับเบสของ DNA ขนาด 245 bp ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.3 เมื่อนำการเรียงตัวของกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับโปรตีนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH family พบว่าส่วนที่เป็น conserve sequence ของโปรตีนในกลุ่มนี้เหมือนกับ oli 1 คือส่วนของ CEDCTNIFR เป็นต้น ดังภาพที่ 3.4 แสดงว่าโปรตีน oli 1 อยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีนดังกล่าว จึงนำ DNA Oli 1 ชิ้นดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I แล้วแยกชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังกล่าวออกมาจากเจลและนำมาใช้ในการเตรียม Probe ต่อไป

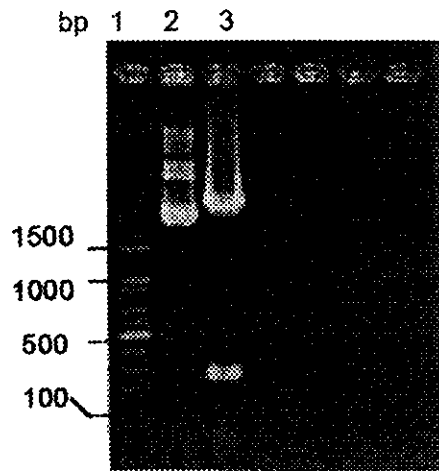


รูปที่ 3.1 แสดง แถบของ DNA ที่เกิดจากการทำ PCR ระหว่าง primer G12 กับ oligo (dT) โดยใช้ cDNA เป็น template แยกบน 1.5 % agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1. แถบ DNA มาตรฐาน ขนาด 100 bp

แถวที่ 2. แถบ DNA ที่เกิดจากการทำ PCR ระหว่าง primer G12 กับ oligodT โดยใช้ cDNA เป็น template

แถวที่ 3. แถบ DNA ของ Negative Control



รูปที่ 3.2 แสดงผล DNA oli 1 ซึ่งอยู่ในเวกเตอร์ pGEM-T easy เมื่อถูกย่อยด้วย
 เอนไซม์ *EcoR* I แยกบน 1.5 % agarose gel electrophoresis
 แถวที่ 1. แถบ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp
 แถวที่ 2. แถบ DNA โคลน oli1
 แถวที่ 3. แถบ DNA โคลน oli1 ภายหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์
 ตัดจำเพาะ *EcoR* I

Primer G12

	10	20	30	40	50	60															
	<u>GGTAATCGTGACATATACAAGAAGGTAGTGCGTGTGTGTGAGGACTGCACCAATATCTTC</u>																				
	G	N	R	D	I	Y	K	K	V	V	R	V	C	E	D	C	T	N	I	F	F1
	V	I	V	T	Y	T	R	R	*	C	V	C	V	R	T	A	P	I	S	S	F2
	*	S	*	H	I	Q	E	G	S	A	C	V	*	G	L	H	Q	Y	L	P	F3
	70	80	90	100	110	120															
	CGACTTCCAGGCTTGGACGGCATGTGCAGGTACCCTTTCACTTCATTTCTAAGGACTCAC																				
	R	L	P	G	L	D	G	M	C	R	Y	P	F	T	S	F	L	R	T	H	F1
	D	F	Q	A	W	T	A	C	A	G	T	L	S	L	H	F	*	G	L	T	F2
	T	S	R	L	G	R	H	V	Q	V	P	F	H	F	I	S	K	D	S	H	F3
	130	140	150	160	170	180															
	ATTATTCAAACAACCTATTTCAATTTATCTTTATACTTCCAAATACAGATCGCTTACGTTT																				
	I	I	Q	T	T	Y	F	I	Y	L	Y	T	S	K	Y	R	S	L	T	F	F1
	L	F	K	Q	P	I	S	F	I	F	I	L	P	N	T	D	R	L	R	F	F2
	Y	S	N	N	L	F	H	L	S	L	Y	F	Q	I	Q	I	A	Y	V	S	F3
	190	200	210	220	230	240															
	CGAAATCATTTACTCAAGTGCAATCATTGTTGCGTGAAATTACTCTGCGTTGATAACCACT																				
	R	N	H	L	L	K	C	N	H	C	C	V	K	L	L	C	V	D	T	T	F1
	E	I	I	Y	S	S	A	I	I	V	A	*	N	Y	*	A	L	I	P	L	F2
	K	S	F	T	Q	V	Q	S	L	L	R	E	I	T	K	R	*	Y	H	*	F3
	250	260	270	280	290	300															
GAATT																					
E	F1																				
N	F2																				
I	F3																				

รูปที่ 3.3 ภาพแสดงลำดับเบสของ DNA oli1

1	Hoa-CHH-A	MAACRTECLWVWVAELIAGV---RRWECA-RMEKLI---N---LFLQDH-WNKRFED
2	Hoa-CHH-B	MFACRTECLWVWVAELIAGV---RRWECA-RMEKLI---L---LFLQDH-WNKRFED
3	PvMIH	-----LEKINL---L---LFLQDH-WNKRFED
4	Pej-SGP-III	-----WVIRNLAI---AVLILVLA---RFDAA---A---NH-WNKRFED
5	Me-CHH	-----HIAQNL---VAILVVA---AWW---A---WEAAL---WWEHRLP---R---LFD
6	Can-CHH	-MYK'U'AMLAIVWVYLCAI-HAHARAQAYRMDRIIAALK---MEPAAAYEN---H---LEKRFYD
7	Can-MIH	-----H---RAH---RF---QOR---WLL---VVA---LAAW---F---VHRAAAR---IND
8	Cas-MIH	-----WVLAH---KFC---QOR---RLLA---VVA---LAAW---F---LQQAAR---IND
9	HoaGIH	-----WVIRNLAI---VAILVVA---AWW---A---WEAAL---WWEHRLP---R---LFD
10	Pej-SGP-IV	-----MYREAMR---WVA---WV---L---LFD---A---A---FDN
11	MeMIH	-----WVIRNLAI---VAILVVA---AWW---A---WEAAL---WWEHRLP---R---LFD
12	OILI	-----
1	Hoa-CHH-A	RNLFKKEDRVEDDCYNLYRKFVAACRE---NCF---NWFRQCLDDEL-----LDDIDEYVNVQ
2	Hoa-CHH-B	RNLFKKLNRCEDDCYNLYRKFVAACRE---NCF---NRFRQCLDDEL-----MIDIDEYVNVQ
3	PvMIH	RELFRKIDRVEDDCYNVFRKVAACRE---NCF---NKRFNVCWADER-----HD---VRFKMAN
4	Pej-SGP-III	RQLLRKLRUCDDCYNVFRKVAACRE---NCF---NLFIDCLEYLI-----HLOQEEHMAANQ
5	Me-CHH	RELLRLNRUCDDCYNVFRKVAACRE---NCF---NLFIDCLEYLI-----EDLHEEYQHWQ
6	Can-CHH	RALENDLEHRCDDCYNLYRKYVAACRE---NCF---NWFRQCLDDEL-----MDEFDQYARKVQ
7	Can-MIH	RDLYKKVEVICEDDCANLYRKYVAACRE---NCF---NEDEFWCVHATE-----RBEELRDLEEW
8	Cas-MIH	RDLYKKVEVICEDDCANLYRKYVAACRE---NCF---NEDEFWCVHATE-----RBEELRDLEEW
9	HoaGIH	RDLYKVAWVONDCANLYRKYVAACRE---NCF---NEDEFWCVHATE-----RHBEIDQFRKW
10	Pej-SGP-IV	RDLYKKVRCEDDCNLYRKYVAACRE---NCF---NEDEFWCVHATE-----REDETEKFRW
11	MeMIH	RDLYKKVRCEDDCNLYRKYVAACRE---NCF---NEDEFWCVHATE-----RDDELDFKFW
12	OILI	RDLYKKVRCEDDCNLYRKYVAACRE---NCF---NEDEFWCVHATE-----RNHLLXXNHOCV
1	Hoa-CHH-A	-LDDIDEYVNVQNVQ---K---
2	Hoa-CHH-B	-MIDIDEYVNVQNVQ---K---
3	PvMIH	-HD---VRFKMAN---
4	Pej-SGP-III	-HLOQEEHMAANQ---K---
5	Me-CHH	-EDLHEEYQHWQ---K---
6	Can-CHH	-MDEFDQYARKVQ---RKK---
7	Can-MIH	-RBEELRDLEEW---L---
8	Cas-MIH	-RBEELRDLEEW---L---
9	HoaGIH	-RHBEIDQFRKW---L---
10	Pej-SGP-IV	-REDETEKFRW---L---
11	MeMIH	-RDDELDFKFW---L---
12	OILI	-RNHLLXXNHOCV---L---

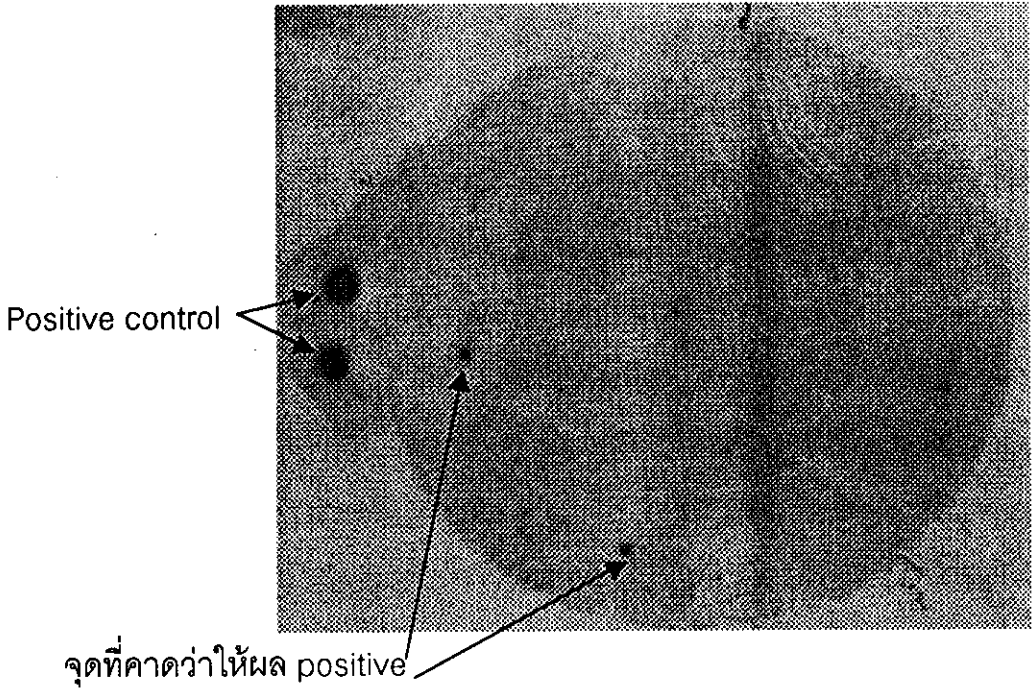
Color	Residue Code	Color	Residue Code
ORANGE	GPST	RED	HKR
BLUE	FWY	GREEN	ILMV

รูปที่ 3.4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DNA oli 1 กับลำดับกรดอะมิโนของ CHH/MIH/GIH

3.1.2 การค้นหา DNA เป้าหมายจาก phage library

เตรียม plaque ประมาณ 3,000 plaque/plate จำนวน 10 plates เพื่อทำการค้นหา DNA เป้าหมายจาก phage library และเมื่อทำการตรวจจับ DNA จาก phage library โดย oli 1 probe พบ positive clone ใน primary plate ดังรูปที่ 3.5 จากรูปจะเห็นจุดสีดำ 2 จุดซึ่งคาดว่าเป็น plaque ของ DNA เป้าหมาย เมื่อนำ plaque ตรงบริเวณที่ตรงกับจุดดำดังกล่าวมาเตรียม plaque ตามวิธีในข้อ 2.3.1.1.5 เพื่อทำการตรวจจับครั้งที่ 2 ปรากฏว่าไม่พบ positive plaque ของ cDNA เป้าหมายดังกล่าว

จากการเตรียม cDNA โดยวิธีในข้อ 2.3.1.4 เมื่อทำ colony hybridization กับตัวตรวจจับและนำพลาสมิดมาสกัดเพื่อทำการ hybridize เพื่อค้นหายีนเป้าหมายพบโคลนจำนวน 11 โคลนที่ hybridized ติดกับตัวตรวจจับ oli 1 (ไม่ได้แสดงผล) โดยให้ชื่อแต่ละโคลนที่ได้เป็น M1 M2 M3 M6 M7 M8 M9 M10 M11 M13 และ 152 เมื่อนำ DNA ของโคลนดังกล่าวมาหาลำดับเบส แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลในธนาคารยีน พบว่าโคลนทั้ง 11 โคลนไม่อยู่ในกลุ่มของ CHH/MIH/GIH family (แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลในธนาคารยีนในภาคผนวก ข) และเมื่อนำโคลนทั้ง 11 โคลนมาเปรียบเทียบกับ oli 1 (ใช้ program DNASIS) พบว่า M1 M2 M3 M6 M7 M8 M9 M10 M11 M13 และ 152 มีความเหมือนกับโคลน oli 1 ร้อยละ 32 38 29 48 47 38 27 48 48 49 และ 48 ตามลำดับ

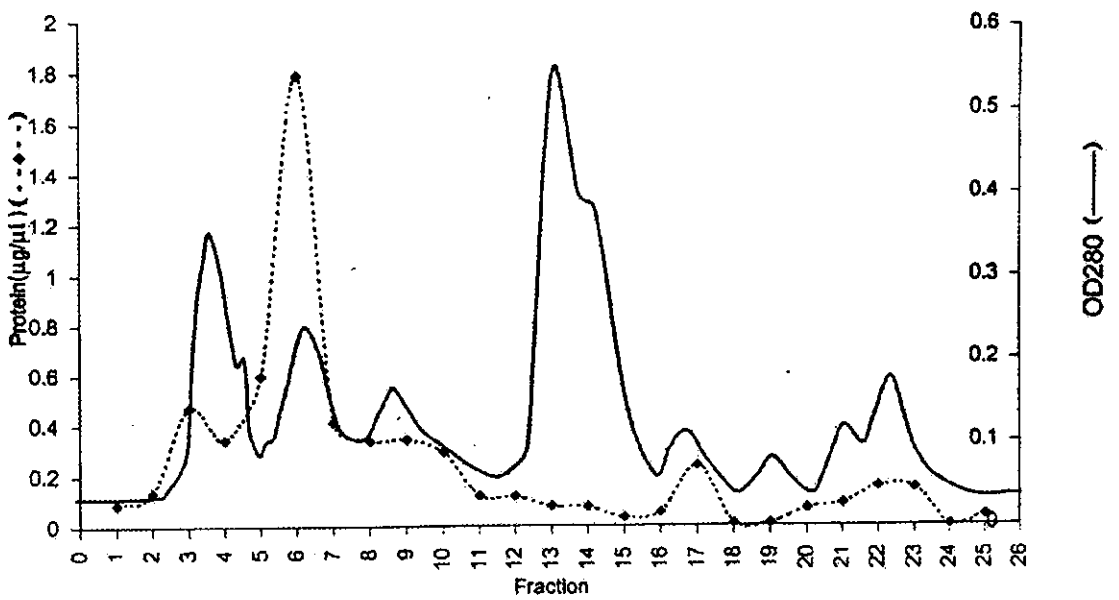


รูปที่ 3.5 แผ่น X-ray film จากการทำ hybridized ครั้งที่ 1

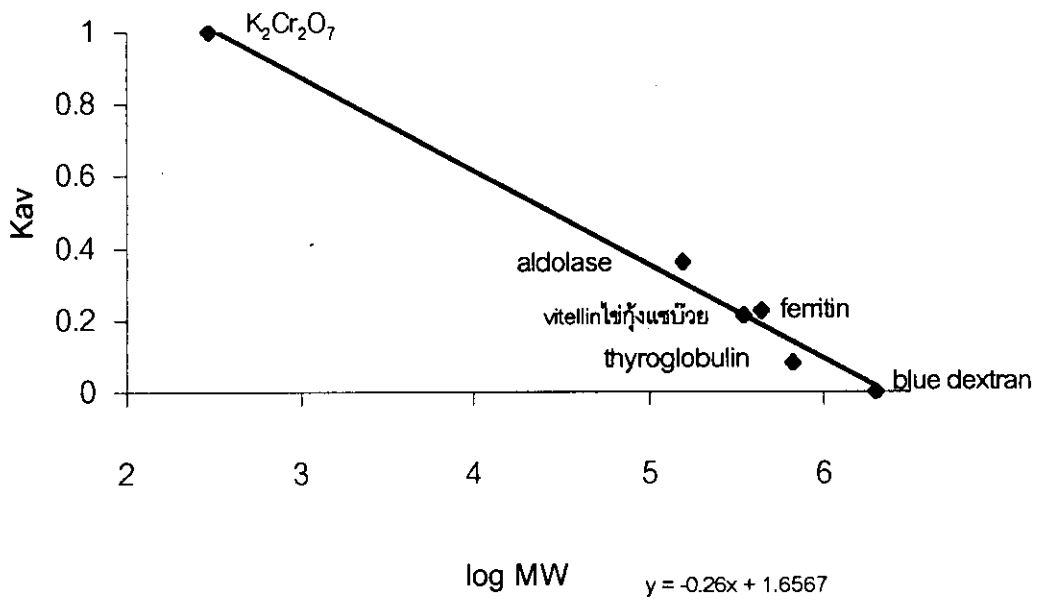
3.2 การเตรียมแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ vitellin เพื่อใช้สำหรับการทดสอบ ปฏิกิริยาทางชีวภาพ

3.2.1 การเตรียม vitellin จากไข่กุ้ง

ไข่กุ้งหลังจากบดด้วยเครื่อง hand homogenizer แล้วจะได้สารละลายสีเขียวขุ่น มีความหนืด เมื่อนำมาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยก ส่วนที่เป็นไขมันและเศษเซลล์ทิ้งไป ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่ได้มากรองด้วย กระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ จากนั้นหาปริมาณ โปรตีนตามวิธีของ Lowry's (1951) ซึ่งได้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ โปรตีนที่ได้นี้ จำนวน 5 mg จะนำมาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้เครื่อง FPLC คอลัมน์ superose 12 HR 10/30 และใช้ PBS เป็นตัวชะ ด้วยอัตราเร็ว 0.5 ml ต่อนาที เก็บตัวอย่าง 1 ml ต่อ หลอด จำนวน 30 หลอด โดยเริ่มเก็บตัวอย่างหลังจากฉีดตัวอย่างไข่กุ้งเป็นเวลา 10 นาที คอลัมน์ superose 12HR 10/30 สามารถแยกโปรตีนจาก ไข่กุ้งได้ 8 peak เมื่อนำแต่ละ fraction มาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry's (1951) พบว่า fraction ที่มีค่าโปรตีนสูงที่สุดอยู่ที่ fraction 5 และ 6 ดังแสดงในรูป 3.6 เมื่อนำโปรตีนมาตรฐานมาฉีดเข้า คอลัมน์ พบว่า blue dextran (MW = 2,000 กิโลดาลตัน) ออกมาที่นาทีที่ 14.82, thyroglobulin (MW = 669 กิโลดาลตัน) ออกมาที่ นาทีที่ 16.60, ferritin (MW = 440 กิโลดาลตัน) ออกมาที่นาทีที่ 19.75, aldolase (MW = 158 กิโลดาลตัน) ออกมาที่นาทีที่ 22.64 และ potassium dichromate (MW = 294.2 ดาลตัน) ออกมาที่นาทีที่ 36.52 เมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_{av} พบว่ามีค่า 0, 0.082, 0.227, 0.36 และ 1 ตามลำดับ สามารถเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างค่า K_{av} กับค่า $\log MW$ ของโปรตีนมาตรฐานได้ดังรูปที่ 3.7 จากกราฟสามารถ หาค่า MW ของโปรตีน fraction 6 ซึ่งออกมาจาก column ในนาทีที่ 19.46 โดยมีค่า $K_{av} = 0.2145$ สามารถคำนวณ MW ได้ประมาณ 352 ± 7.4 กิโลดาลตัน



รูปที่ 3.6 การแยกโปรตีน vitellin จากไข่กึ่งแซบวัยโดย เครื่อง FPLC คอลัมน์ superose 12 HR 10/30 ซะด้วย PBS ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โปรตีนที่ได้แต่ละ fraction นำมาหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry's

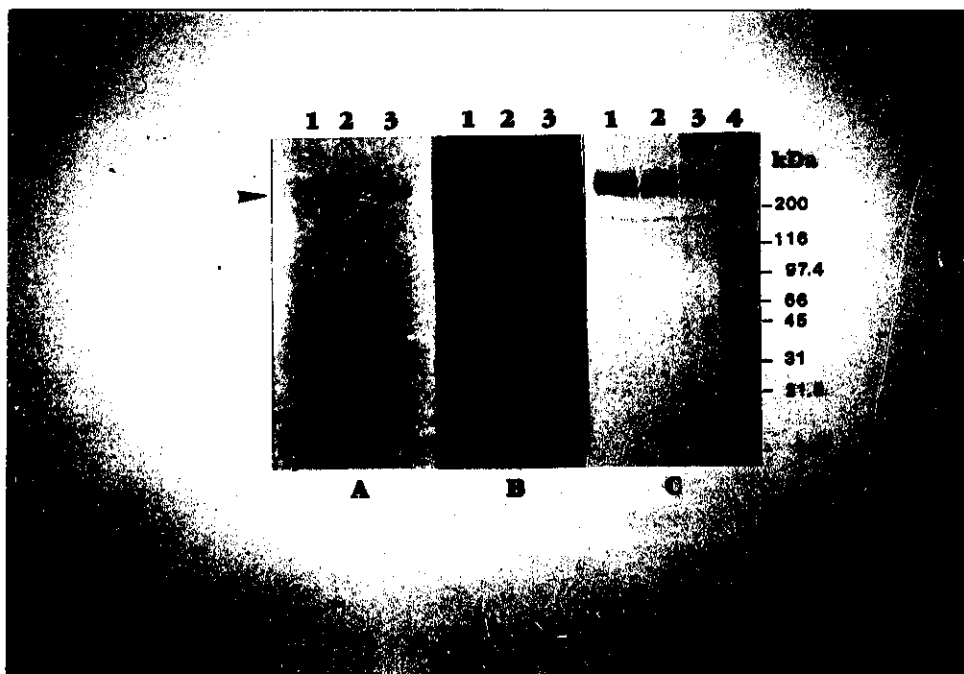


รูปที่ 3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน คือ blue dextran (MW 2,000 กิโลดาลตัน), thyroglobulin (MW 669 กิโลดาลตัน), ferritin (MW 440 กิโลดาลตัน), aldolase (MW 158 กิโลดาลตัน), potassium dichromate (MW 294.2 ดาลตัน) กับค่า Kav ของการแยกสารมาตรฐานด้วยเครื่อง FPLC คอลัมน์ superose 12 HR 10/30

3.2.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของ vitellin จากไขกุ้งแซบวียที่แยกได้

จากกราฟแสดงปริมาณโปรตีนของแต่ละ fraction พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะอยู่ที่ fraction 5, 6 เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ในรังไข่เป็น vitellin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย โปรตีน ไชมัน และน้ำตาล เมื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาทำ Native electrophoresis โดยหยอดตัวอย่าง 3 ชุด ดังนี้ ชุด A ประกอบด้วยสารสกัดหยาบโปรตีนจากไขกุ้งแซบวียก่อนฉีดลงคอลัมน์ จำนวน 125 μg โปรตีนจาก fraction 5 และ 6 อย่างละ 15 μg ชุด B ประกอบด้วย สารสกัดหยาบจากไขกุ้ง จำนวน 10 μg โปรตีนจาก fraction 5 และ 6 อย่างละ 5 μg และ ชุด C ประกอบด้วย Protein Standard Marker (BIO-RAD, USA) จำนวน 24 μg โปรตีนจากสารสกัดหยาบจากไขกุ้ง จำนวน 10 μg โปรตีนจาก fraction 5 และ 6 อย่างละ 5 μg เมื่อตัดชุด C มาย้อมโปรตีนด้วยสีโคแมสซึบลู R 250 แสดงผลดังรูป ที่ 3.8 C เมื่อนำชุด B มาย้อมไขมัน พบว่า แถบโปรตีนของ fraction 5 และ 6 สามารถย้อมไขมันติดเช่นเดียวกับ สารสกัดหยาบจากไขกุ้ง แสดง ดังรูปที่ 3.8 B และเมื่อนำชุด A มาย้อมน้ำตาลพบว่า fraction 5 และ 6 สามารถย้อม น้ำตาลติดเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากไขกุ้ง แสดงดังรูปที่ 3.8 ดังนั้น โปรตีนใน fraction 5 และ 6 จึงเป็น vitellin ซึ่งเป็น glycolipoprotein สามารถย้อมติดทั้ง โปรตีน น้ำตาลและไขมัน

เมื่อนำโปรตีนจาก fraction 6 จำนวน 15 μg -protein มาทำ electrophoresis บน 10 % SDS-PAGE พบว่า โปรตีนจาก fraction 6 แยกออกเป็นหน่วยย่อย ทั้งหมด 6 หน่วยย่อย แสดงดังรูปที่ 3.9 ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเมื่อเทียบกับ standards SDS-PAGE broad range: 6,500-200,000 (BIO-RAD, USA) (รูปที่ 3.10) ได้ 101 ± 4.1 , 88 ± 3.5 , 79 ± 1.6 , 61 ± 1.9 , 55 ± 4.8 , 47 ± 0.9 , กิโลดาลตัน ตามลำดับซึ่งรวมน้ำหนักโมเลกุลทั้งหมดได้ 431 ± 12 กิโลดาลตัน



รูปที่ 3.8 แสดงแถบโปรตีนจากการทำ Native-PAGE บน 7% acrylamide gel

ภาพ A แสดงการย้อมน้ำตาลด้วยสีย้อม PAS

แถวที่ 1.โปรตีนจาก fraction 6 จำนวน 15 μg

แถวที่ 2.โปรตีนจาก fraction 5 จำนวน 15 μg

แถวที่ 3.โปรตีนจาก Crude จำนวน 125 μg

ภาพ B แสดงการย้อมไขมันด้วยสีย้อม Sudan Black B

แถวที่ 1.โปรตีนจาก fraction 6 จำนวน 5 μg

แถวที่ 2.โปรตีนจาก fraction 5 จำนวน 5 μg

แถวที่ 3.โปรตีนจาก Crude จำนวน 10 μg

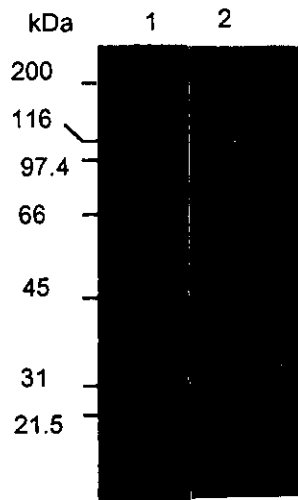
ภาพ C แสดงการย้อมโปรตีนด้วยสีย้อม โคแมสทีบลู R250

แถวที่ 1.โปรตีนจาก fraction 6 จำนวน 5 μg

แถวที่ 2.โปรตีนจาก fraction 5 จำนวน 5 μg

แถวที่ 3.โปรตีนจาก Crude จำนวน 10 μg

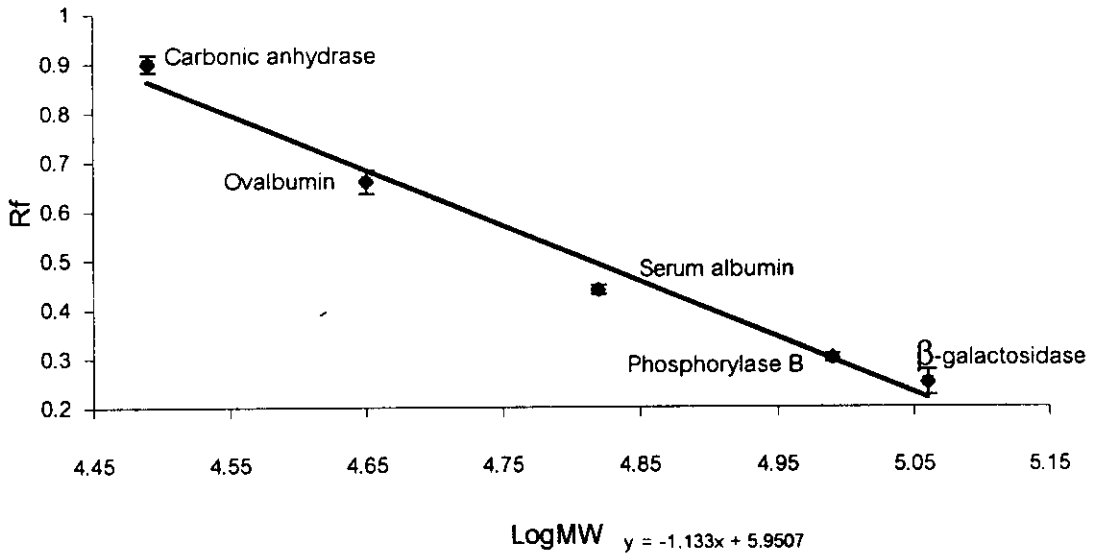
แถวที่ 4.โปรตีนมาตรฐาน (BIO-RAD, USA) 24 μg



รูปที่ 3.9 แถบโปรตีนจาก fraction 6 ที่ได้ทำการแยกบน 10 % SDS-PAGE

แถวที่ 1. โปรตีนมาตรฐาน (BIO-RAD) 24 μg

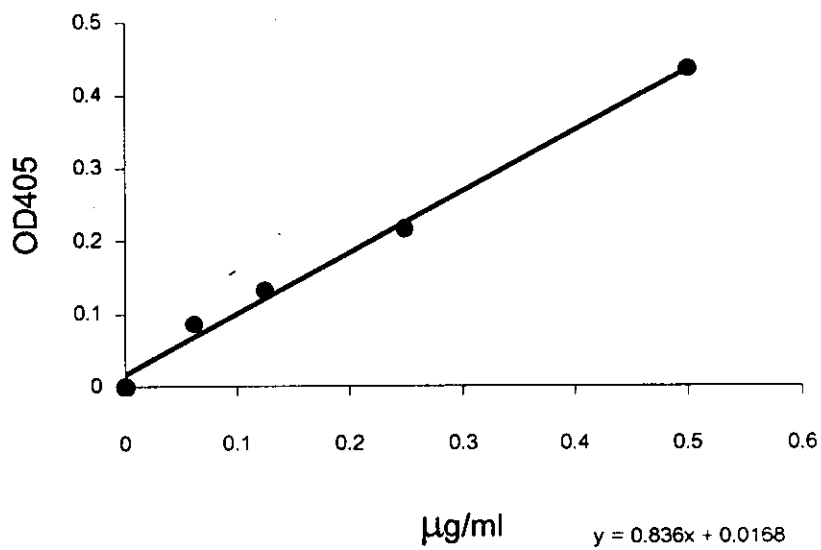
แถวที่ 2. โปรตีนจาก fraction 6 ปริมาณ 15 μg



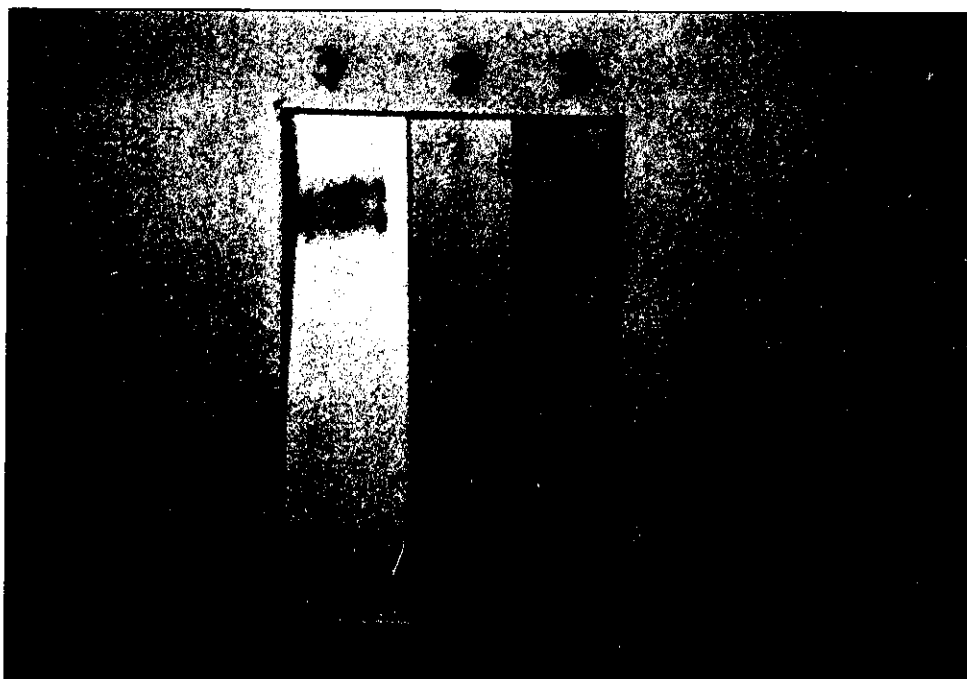
รูปที่ 3.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน คือ β -galactosidase (MW 116 kDa), Phosphorylase B (MW 97.4 kDa), Serum albumin (MW 66 kDa), Ovalbumin (MW 45 kDa), Carbonic anhydrase (MW 31 kDa) กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ใน 10% SDS-PAGE

3.2.3 การศึกษาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อโปรตีน vitellin

จากการทำ ELISA ด้วยแอนติซีรัมความเข้มข้น 1:8 พบว่าสามารถวัดระดับความเข้มข้นของ vitellin ที่สามารถเขียนกราฟเป็นเส้นตรงได้ในช่วง 62.5 ng/ml ถึง 500 ng/ml ดังรูปที่ 3.11 จากการทำ immunoblotting ดังรูปที่ 3.12 โดยใช้ แอนติซีรัม 1:8 โปรตีนที่เป็นแอนติเจนในแถวที่ 1 คือโปรตีนจากไข่กึ่งแซบวียจำนวน 5 μ g แถวที่ 2 เป็นโปรตีนจาก hepatopancreas ของไข่กึ่งแซบวียจำนวน 5 μ g และแถวที่ 3 เป็นโปรตีนจากไข่กึ่งแซบวีย fraction 6 จำนวน 5 μ g จากรูป 3.12 แถวที่ 2 ซึ่งเป็นโปรตีนจาก hepatopancreas จะเห็นได้ว่าไม่พบแถบของโปรตีน vitellin ซึ่งต่างจากแถวอื่น ซึ่งพบแถบในแถวของโปรตีนจากไข่กึ่งแซบวียและโปรตีนจาก fraction 6 ซึ่งเป็น positive control แสดงว่าแอนติซีรัมดังกล่าวมีความจำเพาะต่อไข่กึ่งแซบวียสามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้



รูปที่ 3.11 กราฟแสดง Standard Vitellin



รูปที่ 3.12 แสดง immunoblotting

แถวที่ 1. โปรตีนจากไขกึ่งแสบัวยปริมาณ 5 μg

แถวที่ 2. โปรตีนจาก hepatopancreas ของกึ่งแสบัวยปริมาณ 5 μg

แถวที่ 3. โปรตีนจากไขกึ่งแสบัวย fraction 6 ปริมาณ 5 μg

3.3 การทดสอบทางชีวภาพของ GIH

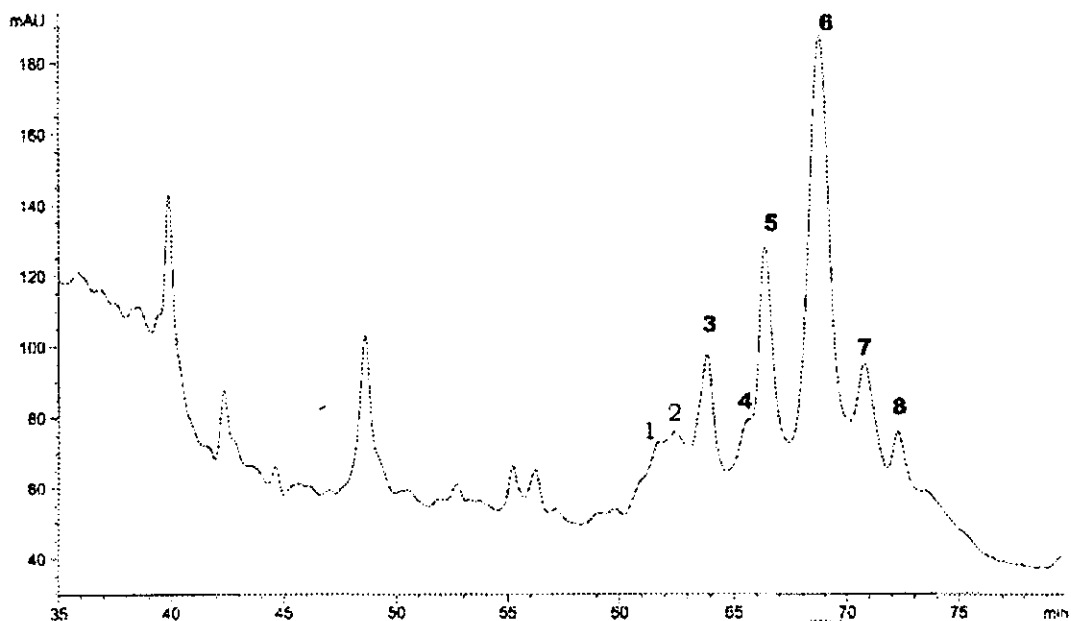
3.3.1 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein) ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่

การทดสอบนี้มีหลักการเพื่อหาโปรตีนซึ่งสังเคราะห์ขึ้นใหม่ในรังไข่กุ้งโดยที่หากสารตัวอย่างซึ่งทดสอบมีการยับยั้งการสร้างโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ลบ) ซึ่งใช้สารละลาย PBS จะได้ค่าการนำเข้าของ ^{14}C -leucine ลดลง สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารตัวอย่างก้านตากุ้งแยกโดย RP-HPLC (วรวิทย์ ฉิมเพชร ข้อมูลเตรียมวิทยานิพนธ์) ลักษณะที่แยกได้แสดงดังรูป 3.13 ซึ่งแยกออกจากกันได้ 8 peak ดังนั้นจึงใช้สารตัวอย่าง peak ที่มีปริมาณมากเพียงพอที่จะทดสอบทางชีวภาพได้มาทดสอบ ซึ่งได้แก่ตัวอย่างที่ 3 (peak 3) ตัวอย่างที่ 5 (peak 5) และตัวอย่างที่ 6 (peak 6) การทดสอบทางชีวภาพจะนำสารดังกล่าวจำนวน 10 ก้านตา มาผสมรวมกับ sterile culture medium ซึ่งมี ^{14}C -Leucine ($0.05 \mu\text{Ci} / 4 \text{ nmol}$) แล้วนำมาเลี้ยงขึ้นไข่กุ้งแซบวีย (ระยะที่ 2) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อล้างอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อออกแล้ว นำชิ้นเนื้อเยื่อไข่กุ้งมาบดกับสารละลาย PBS จำนวน $500 \mu\text{l}$ โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปริมาตร $400 \mu\text{l}$ นำไปหาปริมาณ vitellin ซึ่งสร้างขึ้นใหม่ผลการทดลองดังข้อ 3.3.2 ส่วนที่ 2 จำนวน $100 \mu\text{l}$ ใช้หาปริมาณโปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ทั้งหมดโดยนำมาตกตะกอนด้วย Ammonium sulphate อิมตัวปริมาตร $400 \mu\text{l}$ ตะกอนที่ได้นำมาละลายกลับด้วย PBS จำนวน $150 \mu\text{l}$ แล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจำนวน $50 \mu\text{l}$ นำมาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry's (1951) ส่วนที่ 2 จำนวน $100 \mu\text{l}$ นำมา หาปริมาณสารรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation counter แสดงค่าเป็น dpm/mg.protein ดังตารางที่ 3.1 ซึ่งสามารถนำมาเขียนกราฟได้ดังรูป 3.14 จากรูปจะเห็นได้ว่า ตัวอย่างหมายเลข 3 และ 5 เมื่อเทียบกับ control (บวก) ซึ่งใส่สารสกัดจากก้านตาจำนวน 10 ก้านตา ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และตัวอย่างหมายเลข 6 ให้ผลแตกต่างจาก control (บวก) แต่ไม่แตกต่างกับ control (ลบ) ซึ่งใส่ PBS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อนำค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างทดลองมาหาค่า % inhibition (ค่าการยับยั้งการสร้างโปรตีน) แสดงค่าดังตารางที่ 3.2 โดย control (ลบ) ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการ

สร้างโปรตีนเป็น 0 และ control (บวก) ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนเป็น 100 และเมื่อนำมาเขียนกราฟแสดงค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีน (% inhibition) แสดงดังรูปที่ 3.15 พบว่า ตัวอย่างหมายเลข 5 ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีน สูงสุดที่ 108.4 รองลงมาคือตัวอย่างหมายเลข 3 ซึ่งให้ค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีน 75.1 และตัวอย่างหมายเลข 6 ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนที่ 35.0

จากการทดลอง เมื่อคำนวณโปรตีนที่สร้างใหม่ทั้งหมดเทียบกับตัวควบคุม control (ลบ) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 100 พบว่า control (บวก) ตัวอย่างหมายเลข 3 ตัวอย่างหมายเลข 5 และตัวอย่างหมายเลข 6 มีค่าร้อยละโปรตีนที่สร้างใหม่เมื่อเทียบกับ control (ลบ) เป็น 58.5 68.2 54.2 และ 85.2 ตามลำดับ

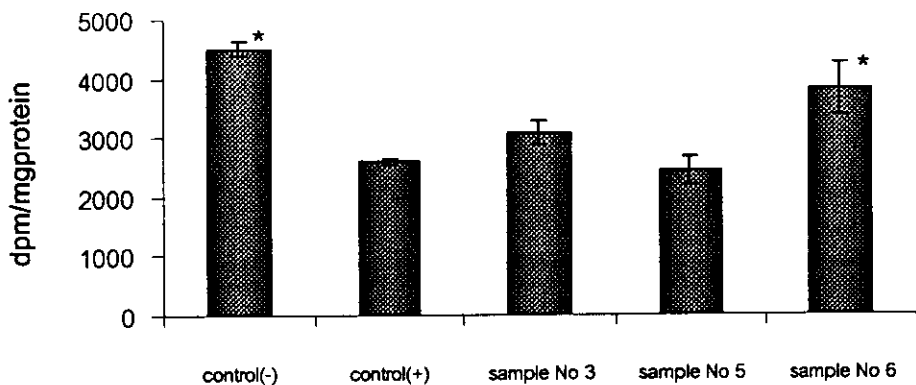


รูปที่ 3.13 แสดงการแยกโปรตีนจากก้านตากุ้งแข็บ้วยด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ คอลัมน์ μ Bondapak-Phenyl (300X3.9 mm i.d., 10 μ m particle size, Waters.) โดยฉีดสารสกัดจากก้านตาจำนวน 40 μ g โดยใช้ 0.1 % TFA เป็นสาร A, 0.1% TFA ใน 60% acetonitrile เป็นสาร B, แล้วทำ linear gradient จาก 30% B ถึง 80% B ในเวลา 80 นาที (วรวิทย์ ฉิมเพชร, ข้อมูลเตรียมวิทยานิพนธ์)

ตารางที่ 3.1 แสดงการยับยั้งการสร้างโปรตีนของชั้นรังไข่กึ่งโดยโปรตีนที่แยกจากก้าน
ตากุ้งมีหน่วยเป็น dpm/mg protein ซึ่งได้จากการทำ total protein
precipitation

ตัวอย่าง ซ้ำที่	Control(-)	Control(+)	Sample NO.3	Sample NO.5	Sample NO.6
1	4320	2655	2973	2342	4101
2	4441	2646	2764	2094	2979
3	4722	2478	3458	2865	4407
ค่าเฉลี่ย	4494*	2593	3065	2434	3829*
SD	206	99	356	394	752
SE	119	57	205	227	434

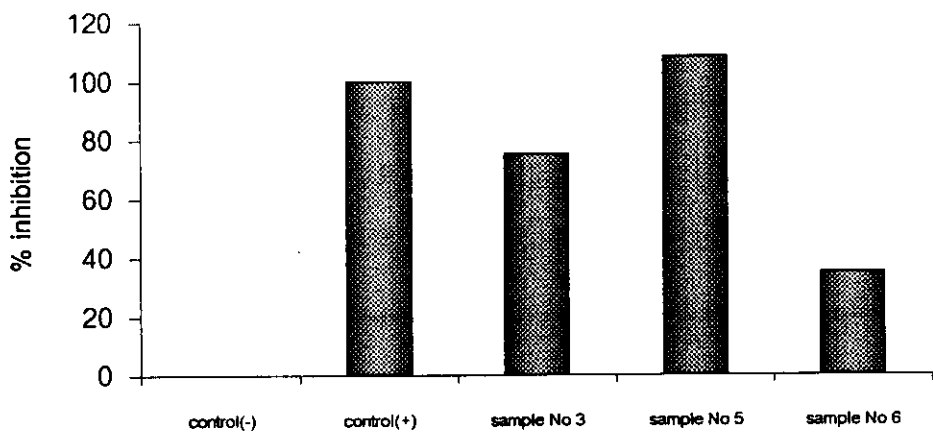
หมายเหตุ * แตกต่างจาก control (+) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น
95% วิเคราะห์โดย program SPSS



รูปที่ 3.14 กราฟแสดงการยับยั้งการสร้างโปรตีนของชั้นรังไข่กึ่งโดยโปรตีนที่แยกจาก
ก้านตากุ้งมีหน่วยเป็น dpm/mg protein ซึ่งได้จากการทำ total protein
precipitation

ตารางที่ 3.2 แสดง % inhibition และ % การสร้างโปรตีนใหม่ ของซึ้นรังไข่กั๋งโดยโปรตีนที่แยกจากก้านตากั๋ง ซึ่งได้จากการทำ total protein precipitation

ตัวอย่าง	Control(-)	Control(+)	Sample NO.3	Sample NO.5	Sample NO.6
% inhibition	0	100	75.2	108.4	35.0
% การสร้างโปรตีนใหม่	100	58.5	68.2	54.2	85.2



รูปที่ 3.15 กราฟแสดงค่า % inhibition ของการยับยั้งการสร้างโปรตีนของซึ้นรังไข่กั๋ง โดยโปรตีนที่แยกจากก้านตากั๋ง ซึ่งได้จากการทำ total protein precipitation

3.3.2 การหาปริมาณ vitellin ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่โดยวิธี Immunoprecipitation

ตัวอย่างไข่ที่บดกับ PBS จำนวน 400 μ l ดังกล่าวในข้อ 3.3.1 เมื่อนำมาปั่นที่ความเร็ว 10,000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วน supernatant จำนวน 500 μ g protein มาเติมแอนติซีรัมต่อ vitellin จำนวน 50 μ l หลังจากบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แอนติเจนจะจับกับแอนติซีรัม เมื่อเติม 10% โปรตีน A (เซลล์ของ *S. aureus*) จำนวน 50 μ l โปรตีน A บนผนังเซลล์จะจับกับแอนติซีรัม จากนั้น 30 นาที จึงปั่นตะกอนเซลล์ ที่ความเร็ว 10,000g ที่ 4°C นาน 1 นาที หลังจากนั้นจึงล้างตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer เพื่อให้โปรตีนอื่นๆหลุดออก แล้วต้มตะกอนเซลล์ใน sample buffer ที่มี 2% SDS และ 100 mM DTT ซึ่งจะทำให้ แอนติเจน แอนติซีรัม และโปรตีน A หลุดออกจากกัน เมื่อนำมาปั่นแยกเศษเซลล์ออก ส่วนของ supernatant จะนำมาวัดค่ารังสี ซึ่งได้ค่า dpm/mg protein ดังตารางที่ 3.3 และสามารถนำมาเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 3.16 จากรูปพบว่า ตัวอย่างหมายเลข 5 และ 6 มีค่าเฉลี่ย dpm/mg protein ไม่แตกต่างจาก control (บวก) แต่หมายเลข 3 มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เมื่อนำค่าเฉลี่ยมาหาร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่ (% inhibition) ดังตารางที่ 3.4 โดยให้ control (ลบ) มีค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่เป็น 0 และ control (บวก) มีค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่เป็น 100 ตัวอย่างหมายเลข 3 มีค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่เป็น -78.8 ตัวอย่างหมายเลข 5 มีค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่เป็น 64.2 และตัวอย่างหมายเลข 6 มีค่าร้อยละการยับยั้งการสร้างโปรตีนไข่เป็น 70.7 ดังกราฟในรูปที่ 3.17 จากการทดลองเมื่อคำนวณร้อยละโปรตีน vitellin ที่สร้างใหม่เทียบกับตัวควบคุม control (ลบ) ซึ่งคิดเป็น 100 พบว่า control (บวก) ตัวอย่างหมายเลข 3 ตัวอย่างหมายเลข 5 และตัวอย่างหมายเลข 6 มีค่าร้อยละโปรตีน vitellin ที่สร้างใหม่เมื่อเทียบกับ control (ลบ) เป็น 78.9 116.5 86.5 และ 85.1 ตามลำดับ

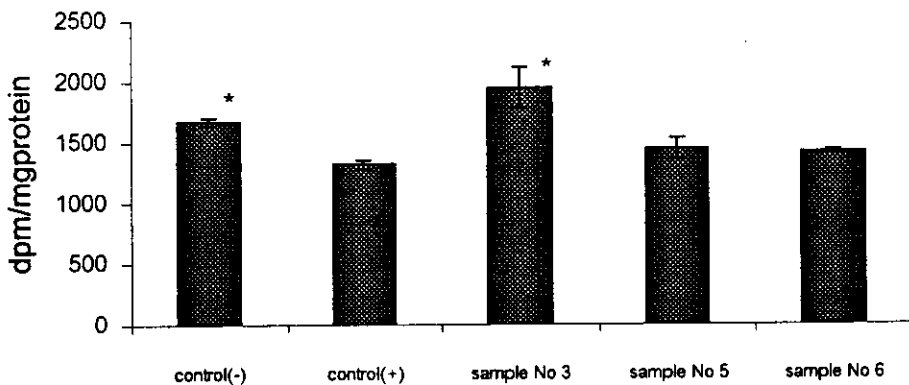
จากตารางที่ 3.5 แสดงการเปรียบเทียบร้อยละโปรตีนที่สร้างใหม่ระหว่างโปรตีนทั้งหมดและโปรตีน vitellin โดยเปรียบเทียบกับ control (ลบ) ซึ่งคิดเป็น 100/100

พบว่า control (บวก) ตัวอย่างหมายเลข 3 ตัวอย่างหมายเลข 5 และตัวอย่างหมายเลข 6 มีค่าร้อยละโปรตีน vitellin ที่สร้างใหม่เมื่อเทียบกับ control (ลบ) เป็น 58.5/78.9 68.2/116.5 54.2/86.5 และ 85.2/85.1 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 แสดงการยับยั้งการสร้างโปรตีนของชินรังไข่กุ้งโดยโปรตีนที่แยกจากก้าน
ตากุ้ง จากการทำให้ immunoprecipitation มีหน่วยเป็น dpm/mg protein

ตัวอย่าง ซ้ำที่	Control(-)	Control(+)	Sample NO.3	Sample NO.5	Sample NO.6
1	1639	1294	1967	1623	1383
2	1630	1262	1644	1392	1436
3	1744	1400	2233	1320	1447
ค่าเฉลี่ย	1671*	1319	1948*	1445	1422
SD	63	72	295	158	34
SE	37	42	170	91	20

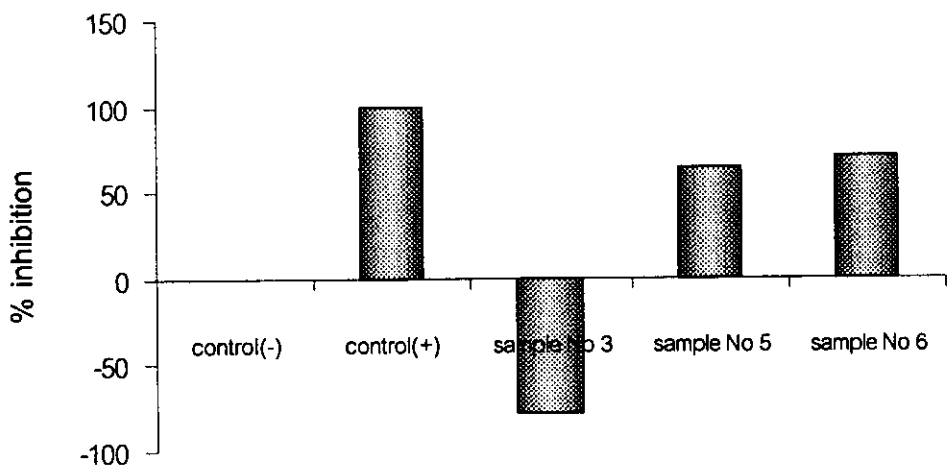
หมายเหตุ * แตกต่างจาก control (+) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น
95% วิเคราะห์โดย program SPSS



รูปที่ 3.16 กราฟแสดงการยับยั้งการสร้างโปรตีนของชินรังไข่กุ้งโดยโปรตีนที่แยกจาก
ก้านตากุ้ง จากการทำให้ immunoprecipitation มีหน่วยเป็น dpm/mg protein

ตารางที่ 3.4 แสดงค่า % inhibition และ % การสร้างโปรตีน vitellin ใหม่ ของชันร้งไข่
กึ่งโดยโปรตีนที่แยกจากก้านตา กึ่ง จากการทำ immunoprecipitation

ตัวอย่าง	Control(-)	Control(+)	Sample NO.3	Sample NO.5	Sample NO.6
%inhibition	0	100	-78.8	64.2	70.7
%การสร้าง โปรตีนใหม่	100	78.9	116.5	86.5	85.1



รูปที่ 3.17 กราฟแสดงค่า % inhibition ของการยับยั้งการสร้างโปรตีนของชันร้งไข่กึ่ง
โดยโปรตีนที่แยกจากก้านตา กึ่ง จากการทำ immunoprecipitation

ตารางที่ 3.5 แสดงการเปรียบเทียบโปรตีนที่สร้างใหม่ระหว่างโปรตีนทั้งหมดต่อโปรตีน vitellin

ตัวอย่าง	Control(-)	Control(+)	Sample NO.3	Sample NO.5	Sample NO.6
โปรตีนทั้งหมด/โปรตีน vitellin (%)	100/100	58.5/78.9	68.2/116.5	54.2/86.48	85.2/85.1