ศึกษาผลของ Ribosomal protein L10a ต่อการพัฒนารังไข่ในกุ้งแชบ๊วย

Effect of Ribosomal Protein L10a on Ovarian Development of White Shrimp: *Fenneropenaeus merguiensis* de Man

นฤมล ขุนจันทร์, มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ* และ วิไลวรรณ โชติเกียรติ

Narumon Kunjun, Monwadee Wonglapsuwan* and Wilaiwan Chotigeat

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

Department of Molecular Biotechnology and Bioinformatics, Faculty of Science, Prince of Songkla University, 90112

**Corresponding author: monwade@hotmail.com*

บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของโปรตีน Ribosomal protein L10a *(RPL10a)* ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันต่อการแสดงออกของยีน Shrimp Ovarian Peritrophin *(SOP)* และ Translational control tumour protein *(TCTP)* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงในช่วงแรกของการพัฒนาของรังไข่ในกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี real-time PCR โดยการผลิตโปรตีน His-RPL10a จากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 จากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีน His-RPL10a ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA และทำให้โปรตีนมีความเข้มข้น 1,5 และ 10 ไมโครโมลาร์ บ่มรังไข่ของกุ้งแชบ๊วยในระยะที่ไข่ยังไม่พัฒนากับโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองพบว่า โปรตีน His-RPL10a ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการพัฒนาของรังไข่ และมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *SOP* และ *TCTP* ในขณะที่ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 5 และ10 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *SOP* และ *TCTP* และทำให้รังไข่หยุดการพัฒนา แสดงให้เห็นว่าปริมาณที่เหมาะสมของโปรตีน His-RPL10a มีผลต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของรังไข่

ABSTRACT

We study effect of Ribosomal protein L10a to expression of *SOP* and *TCTP* genes. The both genes had highest expression in the early stage of shrimp ovarian development. The recombinant His-RPL10a protein was expressed in *E. coli* BL21.The His-RPL10a protein was purify by Ni-NTA column. The undeveloped ovaries were incubated with the recombinant His-RPL10a at 1, 5 and 10 micromolar. The result show that 1 micromolar of His-RPL10a can stimulate the expression of *SOP* and *TCTP* genes. While 5 and 10 micromolar of the His-RPL10a cannot effect to the expression of both genes. This study indicated that the dose of RPL10a is important to the development of shrimp ovary.

คำสำคัญ: โปรตีน *RPL10a*, ยีน *SOP*, ยีน *TCTP*, รังไข่, เรียล-ไทม์ พีซีอาร์

Keywords: *RPL10a, SOP, TCTP,* ovary, real-time PCR

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท ประกอบกับความนิยมบริโภคกุ้งที่มีมากเช่นกัน ในจำนวนกุ้งทะเลหลายชนิด กุ้งแชบ๊วย *(Fenneropenaeus merguiensis)* เป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ โตเร็ว มีราคาสูง เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ แต่มักจะประสบปัญหาต่างๆมากมาย เช่น กุ้งแชบ๊วยไม่ทนทานต่อสภาวะน้ำเสีย ต้องการการดูแลค่อนข้างมาก และเนื่องจากเป็นกุ้งทะเลที่สามารถจับได้ในธรรมชาติ จึงส่งผลให้ทรัพยากรกุ้งแชบ๊วยมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับการขาดแคลนพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่มีคุณภาพในการขยายพันธุ์ ซึ่งกุ้งแชบ๊วยที่เพาะเลี้ยงในบ่อไม่สามารถชักนำให้กุ้งแม่พันธุ์สร้างไข่ได้ ซึ่งลูกพันธุ์ยังคงต้องอาศัยแม่พันธุ์ตามธรรมชาติในการขยายพันธุ์ การศึกษาระดับโมเลกุลเพื่อดูการแสดงออกของยีนที่มีบทบาทในกระบวนการสร้างไข่หรือกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาและขยายพันธุ์กุ้ง เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนพ่อพันธุ์แม่พันธุ์กุ้งได้ ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่า Ribosomal protein มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรังไข่ เช่น Ribosomal protein L10a (RPL10a) ซึ่งมีการแสดงออกสูงในระหว่างการสร้างและพัฒนาของรังไข่ในกุ้งแชบ๊วย (Wonglapsuwan *et al.,* 2011)

Ribosomal protein L10a (RPL10a) เป็นองค์ประกอบของ 60S subunit ของไรโบโซม จัดอยู่ในกลุ่ม L1 family ของ Ribosomal protein เป็นยีนหนึ่งที่มีบทบาทในกระบวนการ embryogenesis และ organogenesis (Fisicaro *et al*., 1995; Kubiczek *et al*., 1997) RPL10a ยังมีบทบาทในกระบวนการแบ่งเซลล์ระหว่างการเจริญเติบโตของรังไข่กุ้งแชบ๊วย (Wonglapsuwan *et al.,* 2010, 2011) และพบว่ามีการแสดงออกในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาและในเซลล์ฟอลิเคิล จากการศึกษาก่อนหน้า เมื่อทำการบ่มโปรตีน His-RPL10a ที่ความเข้มข้น 1 ไมโคโมลาร์กับรังไข่กุ้งแชบ๊วยระยะที่ยังไม่การพัฒนา พบว่าโปรตีน His-RPL10a สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน TCTP, SOP และ HSP70 ได้ (Wonglapsuwan *et al.,* 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษายีนนี้ในแมลงหวี่โดยการ Knockout RPL10a ในแมลงหวี่ มีผลทำให้รังไข่หยุดการพัฒนา และทำให้เซลล์ในเนื้อเยื่อหลายชนิดตายในที่สุด ขณะเดียวกันเมื่อทำการ Over-expression RPL10a ในแมลงหวี่ พบว่าเซลล์ในหลายๆเนื้อเยื่อของแมลงหวี่ตายเช่นเดียวกัน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน RPL10a มีความสำคัญจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต

ในงานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาผลของโปรตีน RPL10a ในรังไข่ของกุ้งแชบ๊วยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยการผลิตโปรตีน RPL10a และบ่มกับรังไข่ของกุ้งแชบ๊วยในระยะที่ยังไม่มีการพัฒนา จากนั้นวัดปริมาณการแสดงออกของยีน SOP และ TCTP ซึ่งเป็นยีนที่พบว่า มีการแสดงออกสูงในระยะแรกของการสร้างไข่ในกุ้งแชบ๊วย พบว่าที่ความเข้มข้นสูงของโปรตีน RPL10a มีผลทำให้รังไข่หยุดการพัฒนาได้ แสดงให้เห็นว่า ปริมาณที่เหมาะสมของโปรตีน RPL10a จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโตของรังไข่กุ้งแชบ๊วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

กุ้งแชบ๊วยระยะที่ไข่ยังไม่มีการพัฒนา เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส เครื่องวัดการดูดกลืนแสง เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) เครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส และเครื่อง Real-time PCR

2. การเตรียมโปรตีนลูกผสม His-RPL10a

นำดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มี Kanamycin 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีนลูกผสมด้วยสารละลาย IPTG (Isopropyl-β-D-1-

thiogalacto-pyranoside) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แยกเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วนำส่วนของตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียจากการปั่นเหวี่ยงมาละลายในสารละลาย Lysis buffer และสารละลาย Lysozyme จากนั้นบ่มบนน้ำแข็ง 30 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (sonication) นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยง เก็บสารละลายส่วนใสและตะกอนแยกออกจากกัน ตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Lowry และวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้วิธี โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมีเอสดีเอส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE)

3. **การทำบริสุทธิ์โปรตีน** His-RPL10a

นำโปรตีน His-R1PL0a ที่ผลิตได้มาทำบริสุทธิ์ โดย Ni-NTA bead จากนั้นเตรียมโปรตีนให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการได้แก่ 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์

4. **การบ่มรังไข่กุ้งแชบ๊วยกับโปรตีน** His-RPL10a

บ่มรังไข่กุ้งแชบ๊วยระยะที่ไข่ยังไม่พัฒนาในอาหาร M199 ที่มีโปรตีน His-R1PL0a ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติมโปรตีน His-R1PL0a ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (รังไข่กุ้งแชบ๊วย + อาหาร M199)

กลุ่มที่ 2 โปรตีน His-R1PL0a 1 ไมโครโมลาร์ + รังไข่กุ้งแชบ๊วย + อาหาร M199

กลุ่มที่ 3 โปรตีน His-R1PL0a 5 ไมโครโมลาร์ + รังไข่กุ้งแชบ๊วย + อาหาร M199

กลุ่มที่ 4 โปรตีน His-R1PL0a 10 ไมโครโมลาร์ + รังไข่กุ้งแชบ๊วย + อาหาร M199

ในแต่ละกลุ่มทำ 5 ซ้ำ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง เก็บเนื้อเยื่อใส่ Trizol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อสกัด RNA และตรวจสอบการแสดงออกของยีน TCTP และ SOP ด้วยวิธีการ real-time PCR

5. Real-time PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน TCTP และ SOP ในทุกตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำโดยวิธี real-time PCR ตาม condition ดังนี้ Denaturation step ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Annealing step ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Extension step ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 cycle

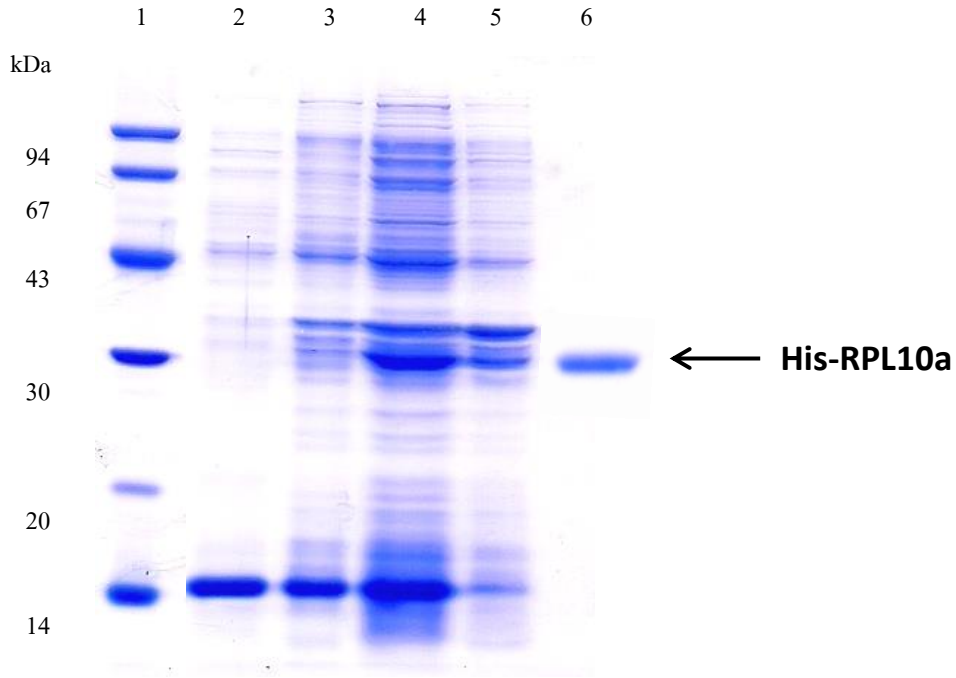
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **การกระตุ้นการสร้างโปรตีน** His-RPL10a **จากดีเอ็นเอลูกผสม** pET-RPL10a **ในแบคทีเรีย** *E. coli* **สายพันธุ์** BL21 **และการทำบริสุทธิ์โปรตีน** His-RPL10a **ด้วย** Ni-NTA bead

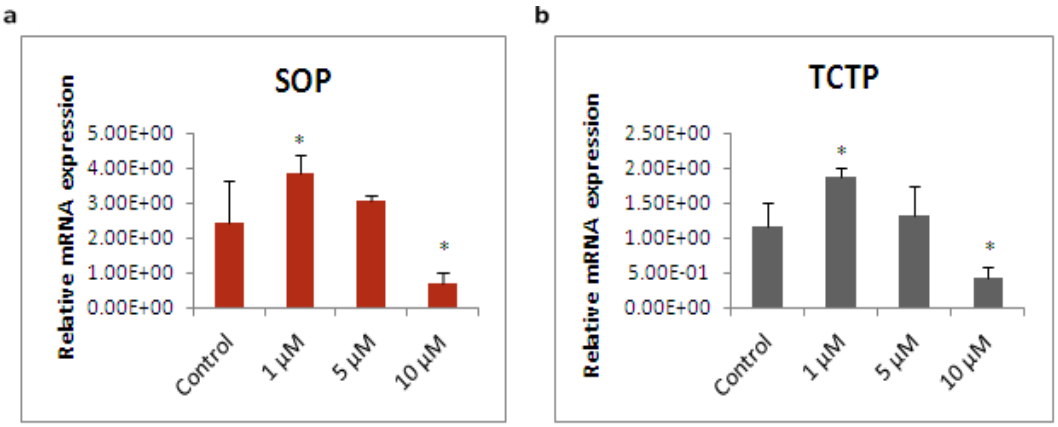
การกระตุ้นการสร้างโปรตีน His-RPL10a จากดีเอ็นเอลูกผสม pET-RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 และทำบริสุทธิ์โปรตีน His-RPL10a พบว่าโปรตีน His-RPL10a ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 1

2. **ผลของ** RPL10a **ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการแสดงออกของยีน** TCTP **และ** SOP **ด้วยเทคนิค** Real-time PCR

จากการบ่มรังไข่กุ้งแชบ๊วยระยะที่ไข่ยังไม่พัฒนาในอาหารที่มีโปรตีน His-R1PL0a ทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ โปรตีน His-R1PL0a ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มี โปรตีน His-R1PL0a พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 1 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ได้ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งที่ความเข้มข้นของโปรตีน 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า รังไข่หยุดการพัฒนา และไม่มีการเจริญเติบโต



รูปที่ 1 การแสดงออกของโปรตีน His-RPL10a ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue: แถวที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน, แถวที่ 2: สารละลายเซลล์ก่อนการชักนำด้วย 1mM IPTG ของ His-RPL10a, แถวที่ 3: ตะกอนเซลล์ก่อนการชักนำด้วย 1mM IPTG, แถวที่ 4: สารละลายเซลล์หลังการชักนำด้วย 1mM IPTG, แถวที่ 5: ตะกอนเซลล์หลังการชักนำด้วย 1mM IPTG, แถวที่ 6: โปรตีน His-RPL10a ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA bead



รูปที่ 2 ผลของโปรตีน His-RPL10a ที่ต่างความเข้มข้นต่อการแสดงของยีน SOP และ TCTP ตรวจสอบด้วยวิธี Real-time PCR (* คือแตกต่างจากกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ)

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าของโปรตีน His-RPL10a จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต โดยมีบทบาทในกระบวนการแบ่งเซลล์ระหว่างการเจริญเติบโตของรังไข่กุ้งแชบ๊วย และสามารถกระตุ้นให้รังไข่เกิดการพัฒนาได้เร็วขึ้น แต่ต้องอยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมภายในเซลล์ กล่าวคือ หากมีความเข้มข้นของโปรตีนมากเกินไป ผลที่ได้จะเกิดผลในทางลบนั้นคือ การที่รังไข่หยุดการพัฒนาและอาจจะตายในที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณทุน Research Assistant (RA) ที่สนับสนุนทุนในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Fisicaro, N., Katerelos, M., Williams, J.,Power, D., D'apice, A. &Pearse, M. Identification of genes downregulated in the thymus by cyclosporin-A:preliminary characterizations of clone CsA-19. *Mol Immunol* 1995;32(8):565-575

Wonglapsuwan M, Miyazaki T., Loongyai W., Chotigeat W. Characterization and Biological Activity of the Ribosomal Protein L10a of the White Shrimp: *Fenneropenaeus merguiensis* De Man During Vitellogenesis. Mar Biotechnol 2010;12:230–240.

Wonglapsuwan M, Chotigeat W., Timmons A., McCall M. RpL10A regulates oogenesis progression in the banana prawn *Fenneropenaeus merguiensis* and *Drosophila melanogaster*. General and Comparative Endocrinology 2011;173:356–363.