



การวิเคราะห์โปรตีโอมในเซลล์สุจิของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*
SPERM PROTEOME ANALYSIS OF THE HOODED OYSTER *Saccostrea cucullata*

กุลนิษฐ์ ถนนอมจิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563



491486753

BUU_Thesis_59910212_thesis / recv: 29082563 12:06:53 / seq: 23



59910212_491486753

การวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์สุจิของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*

กุลนิษฐ์ ถนอมจิตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา



491486753

BUU_Thesis_59910212_thesis / recv: 29082563 12:06:53 / seq: 23

SPERM PROTEOME ANALYSIS OF THE HOODED OYSTER *Saccostrea cucullata*

KULLANIST THANORMJIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGICAL SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY

2020

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY




491486753



BUU iThesis 59910212 thesis / recv: 29082563 12:06:53 / seq: 23


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ กุลนิษฐ์ ถนอมจิตร ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุตินา ถนอมลสิทธิ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. วรณพ สุขภารังษี)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกสิริ ศรีสุข)

วันที่ 2 เดือน กันยายน พ.ศ. 2563

59910212: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: หอยนางรม, คุณภาพเซลล์สืบพันธุ์, hatchery, *Saccostrea cucullata*, โปรตีน
ในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

กฤนิษฐ์ ฌนอมจิตร : การวิเคราะห์โปรตีโอมในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปาก

จีบ *Saccostrea cucullata*. (SPERM PROTEOME ANALYSIS OF THE HOODED

OYSTER *Saccostrea cucullata*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุทิน กิ่งทอง ปี พ.ศ. 2563.

หอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญและมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย การผสมเทียมตัวอ่อนเป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ในระบบเพาะเลี้ยงหอยนางรมด้วยวิธี stripping หรือ spawning เพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผสมเทียม อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในการผสมพันธุ์และคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้จากระบบเพาะเลี้ยงในวิธีดังกล่าวยังไม่คงที่เนื่องจากยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์และคุณภาพของน้ำเชื้อ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์และการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและเพื่อวิเคราะห์และจำแนกชนิดโปรตีนทั้งหมดที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ ผู้วิจัยใช้วิธีในการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ 2 วิธี คือ spawning และ stripping จากนั้นใช้วิธี 2D gel electrophoresis ในการแยกโปรตีน โปรตีนที่ได้ทั้งหมดถูกนำมาตัด จากนั้นทำการย่อยโปรตีนด้วย trypsin และใช้ LC-MS/MS และ bioinformatics ในการระบุชนิดโปรตีน ผลการวิจัยพบว่า สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 188 spots เป็นโปรตีนทั้งหมด 112 ชนิด โดยแยกโปรตีนเป็นกลุ่มซึ่งแบ่งตามแหล่งที่พบได้เป็น 10 กลุ่ม ซึ่งโปรตีนที่พบส่วนใหญ่ทำงานเกี่ยวข้องกับโครงร่างของเซลล์ (cytoskeleton) เช่น tubulin และ กลุ่มโปรตีน tektin นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในเซลล์ การแบ่งเซลล์ การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และกระบวนการในการปฏิสนธิ (acrosomal process) ร่วมด้วย ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยทำการสร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีน (reference map) ที่ระบุชนิดได้ทั้งหมด โดยผลงานวิจัยในครั้งนี้สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจีบนำไปใช้ในการจำแนกความสมบูรณ์พันธุ์และคุณภาพของน้ำเชื้อได้ นอกจากนี้ความรู้ที่ได้เกี่ยวกับคุณภาพของน้ำเชื้อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเรื่องการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์หอยนางรม การคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์และการผสมเทียมตัวอ่อนเพื่อพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงหอยนางรมชนิดนี้ต่อไป



491486753

BUU-IThesis 59910212 thesis / rev: 29082563 12:06:53 / seq: 23

59910212: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCES; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCES)

KEYWORDS: oyster gamete quality hatchery *Saccostrea cucullata* sperm proteome.

KULLANIST THANORMJIT : SPERM PROTEOME ANALYSIS OF THE HOODED OYSTER *SACCOSTREA CUCCULLATA*. ADVISORY COMMITTEE: SUTIN KINGTONG, Ph.D. 2020.

The Hooded oyster, *Saccostrea cucullata* is economically important animal and has been cultured in Thailand. Artificial fertilizations are being used in oyster cultures by either stripping or spawning methods in order to collect gametes from broodstocks. However, reproductive success and embryo quality of hatcheries remains inconsistent. This may be due to gamete maturation and quality of sperm in this species are not well addressed. Thus, recent work aim to investigate sperm cell and developing sperm cells in gonadal tubules by using transmission electron microscope (TEM) and to analyze sperm proteome of the Hooded oyster in order to reveal protein profile and identify all proteins found in oyster sperms. Sperms were collected from male oysters by spawning and stripping methods. Sperm proteins were extracted and separated in two dimensional gel electrophoresis. Proteins in gel were cut, digested with trypsin and identified by using a LC-MS/MS and bioinformatics analysis. The results showed that we identified protein total 188 spots and detected as 112 proteins. We separated protein in 10 groups according to protein locations. Proteins found in sperm were involved in the cytoskeletons such as Tubulin and Tektin group, energy production, cell cycle of spermatogenesis and acrosomal process. Reference map of sperm proteome was also constructed for this species. The results obtained from this work improve current understanding of sperm protein component and function in this species and help us identify proteins associated to sperm maturity and quality. Additionally, knowledge of sperm quality would be applied to broodstock conditioning, gamete collection and artificial fertilization in order to improve hatchery system for this species.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้เป็นเล่มวิทยานิพนธ์ที่สมบูรณ์ อีกทั้งยังช่วยวิเคราะห์ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัย และสนับสนุนค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์นี้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่มอบทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษา สำหรับนิติตระดับปริญญาโท หลักสูตรหมาจ่าย แบบเต็มเวลา ปีการศึกษา ๒๕๕๙

ขอขอบพระคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุตินา วัฒนสมสิทธิ์ อาจารย์ ดร. วรณพ สุขภารังษี ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ รวมทั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ จันทรวงศ์ ศรีสมทรัพย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ในการทำวิจัย และให้คำปรึกษาด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ น.ส. ดารณี โชคชัยชำนาญกิจ นักวิจัยห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในเรื่องการทำวิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ น.ส. สุภัททา เฉื่อยฉ่ำ ที่ให้การช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ เสมอมา จนผู้วิจัยสำเร็จการศึกษา

กุลนิษฐ์ วัฒนสมสิทธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ช
บรรณานุกรม.....	2
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	4
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ในงานวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 หอยนางรม (Oyster).....	4
2.2 ข้อมูลด้านการเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบ.....	6
2.3 การสืบพันธุ์ของหอยนางรม.....	6
2.4 ช่วงฤดูกาลปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ	7
2.5 เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Sperm).....	7
2.6 การผสมเทียม	9
2.7 โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้.....	10
2.8 การศึกษาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในกลุ่มหอยสองฝา.....	11
2.9 Proteomics.....	12



491486753

BUU_1Thesis_59910212_thesis / rev: 29082563 12:06:53 / seq: 23

2.10 Gel Electrophoresis..... 13

2.11 Isoelectric Focusing (IEF)..... 13

2.12 Mass Spectrometry 16

2.13 Bioinformatics 21

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 23

3.1 การเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ศึกษา..... 23

3.2 การเลี้ยงปรับสภาพหอยนางรม 23

3.3 การตรวจสอบเพศหอยนางรม (เพื่อนำมาใช้ในการเก็บตัวอย่างแบบวิธี stripping) 23

 งานวิจัยส่วนที่ 1 Histology (TEM)..... 25

 งานวิจัยส่วนที่ 2 Proteomics 25

3.4 วิธีการเก็บตัวอย่าง 25

 3.4.1. การเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบบ Stripping method. 25

 3.4.2. การเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบบ Spawning method..... 26

3.5 การสกัดโปรตีนจากตัวอย่าง..... 27

3.6 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford’s..... 28

 3.6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน..... 28

 3.6.2 เตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างเพื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน 28

3.7 การแยกโปรตีนโดยใช้วิธี 2D-electrophoresis (มิติที่ 1) 28

 3.7.1 ขั้นตอนการโหลดโปรตีนลงใน IPG strip (Rehydration)..... 29

 3.7.2 ขั้นตอน Incubation 29

3.8. การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE (มิติที่ 2) 29

 3.8.1 ขั้นตอนการเตรียมเจล SDS-PAGE..... 29

 3.8.2 ขั้นตอนการวาง IPG strip ลงบนเจล 29

 3.8.3 ขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE 30

3.8.4	ขั้นตอนการย้อมสีโปรตีนใน SDS-PAGE	30
3.9.	การวิเคราะห์ภาพถ่ายเจลโดยใช้โปรแกรม Delta-2D (Germany).....	30
3.10	Protein digestions and LC -MS/MS.....	31
3.11	Bioinformatics	32
บทที่ 4	ผลการวิจัย.....	33
งานวิจัยส่วนที่ 1	การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (Histology).....	33
4.1	การเจริญและการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมปากจیب (<i>Saccostrea cucullata</i>)	33
4.2	ความแตกต่างของโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیبจากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี.....	38
4.3	แผนที่อ้างอิงโปรตีน (Reference map) ที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب (<i>Saccostrea cucullata</i>)	40
4.4	การจำแนกชนิดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب (<i>Saccostrea cucullata</i>)	41
4.5	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب โดยใช้เทคนิคการรีดน้ำเชื้อ (Stripping method) และเซลล์สืบพันธุ์ปล่อยออกมาตามธรรมชาติ (spawning method)	61
บทที่ 5	อภิปรายผลการทดลอง	70
5.1	ความแตกต่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب (<i>Saccostrea cucullata</i>) จากการเก็บตัวอย่างแบบ stripping และ spawning.....	70
5.2	โปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب <i>Saccostrea cucullata</i>	72
5.3	ความแตกต่างของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیبจากการเก็บตัวอย่างแบบ stripping และ spawning.....	75
	สรุปผลการทดลอง.....	80
	ข้อเสนอแนะ	81
	บรรณานุกรม.....	82



491486753

ภาคผนวก..... 88

 ภาคผนวก ก 89

 ภาคผนวก ก-1 90

 ภาคผนวก ก-2 90

 ภาคผนวก ก-3 90

 ภาคผนวก ก-4 91

 ภาคผนวก ก-5 92

 ภาคผนวก ก-6 93

 ภาคผนวก ก-7 95

 ภาคผนวก ข 97



491486753

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การศึกษาโปรตีนโอมของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พบในสัตว์หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู (Skerget *et al.*, 2015; Baker *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2006a) วัว (Peddinti *et al.*, 2008) ลิง (Sheri Skerget *et al.*, 2013) รวมถึงมนุษย์ (Amaral *et al.*, 2013) งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมโดยเฉพาะในมนุษย์ เป็นการศึกษาดำเนินที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เพื่ออธิบายถึงกลไกการทำงานและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อค้นหาโปรตีนจำเพาะสำหรับบ่งชี้ภาวะเป็นหมันในเพศผู้ รวมถึงบ่งชี้ความปกติและผิดปกติของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ และทำให้ทราบถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Johnston *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2016) ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานสำหรับใช้ภายในเซลล์ การแบ่งเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ การลำเลียงเซลล์ออกจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โครงร่างของเซลล์ (Martinez-Heredia *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงโปรตีนที่พบเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ไข่ในขั้นตอนการปฏิสนธิ (Dorus *et al.*, 2010) ทั้งนี้การศึกษาโปรตีนโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ สามารถอธิบายได้ถึงกลไกการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และสามารถประยุกต์ใช้ในเรื่องการคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ หรือใช้ในทางการแพทย์เพื่อนำไปพัฒนาเทคโนโลยีการรักษาภาวะเป็นหมันในเพศชายได้ (Kwon *et al.*, 2015)

สำหรับการศึกษาโปรตีนโอมในเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อ เพื่อการปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงให้ได้ลูกหลานที่มีคุณภาพดี เช่น ปลา (Nynca *et al.*, 2014) และเม่นทะเล (Qin *et al.*, 2018)

สำหรับสัตว์ในกลุ่มหอย (Mollusca) พบการศึกษาโปรตีนโอมในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้น้อย การศึกษาส่วนใหญ่พบในหอยเศรษฐกิจ เช่น หอยเชลล์ (*Pecten maximus*) (Boonmee *et al.*, 2016) หอยนางรมแปซิฟิก (*Crassostrea gigas*) (Kingtong *et al.*, 2013) และ หอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) (Diz *et al.*, 2012) โดยมีวัตถุประสงค์การศึกษาเกี่ยวข้องกับการคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อหาโปรตีนที่ใช้บ่งชี้คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์ (biomarker of gamete quality) โดยเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนโอมของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้กลุ่มที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (mature) และที่เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้กลุ่มที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์ (immature) ผลที่ได้จากการศึกษาเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการประยุกต์ใช้สำหรับการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดี ข้อมูลเชิงคุณภาพ



491486753

BUU_1Thesis_59910212_thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq : 23

สำหรับบ่งชี้คุณภาพน้ำเชื่อมีความสำคัญในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงหอยเศรษฐกิจให้มีคุณภาพสูง และพัฒนาไปสู่การเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อที่ดีจึงมีความจำเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาโปรตีนอมของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) ซึ่งเป็นชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี จันทบุรี ระยอง และ ตรัง การเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบอาศัยตัวอ่อนจากธรรมชาติเป็นหลัก ซึ่งอาจประสบปัญหาตัวอ่อนขาดแคลนเนื่องจากตัวอ่อนในธรรมชาติมีจำนวนลดลงซึ่งอาจมีผลมาจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น สภาพอากาศแปรปรวน ทำให้น้ำทะเลมีอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปจากปกติ ค่าความเป็นกรด ด่าง และความเค็มของน้ำทะเลเปลี่ยนแปลงไป ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ที่ปล่อยออกมาเพื่อปฏิสนธิในน้ำนั้นได้รับผลกระทบโดยตรงและไม่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของตัวอ่อน (Barros *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2013)

ในบางประเทศจึงได้มีความพยายามพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อแก้ไขปัญหาขาดแคลนตัวอ่อนดังกล่าว ซึ่งประสบความสำเร็จในหอยนางรมบางชนิด เช่น *Crassostrea gigas* (FAO, 2016) และ *Crassostrea virginica* (Ozby *et al.*, 2014) การเพาะเลี้ยงหอยนางรมในระบบการเพาะเลี้ยง ทำได้โดยการเก็บเซลล์สืบพันธุ์จากหอยเพศผู้และเพศเมียเพื่อผสมเทียมให้ได้ตัวอ่อน และอนุบาลตัวอ่อนในโรงเพาะเพื่อให้ได้ตัวอ่อนระยะลงเกาะ (veliger larva) แล้วจึงสามารถนำไปเลี้ยงต่อไป ซึ่งในขั้นตอนของการเก็บเซลล์สืบพันธุ์จากพ่อแม่พันธุ์นั้น ทำได้สองวิธี ได้แก่ วิธีแรก เป็นการกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เอง (spawning method) (Coppolino *et al.*, 1997; Richard K. Wallace *et al.*, 2008) หรืออาจมีการกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น การกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ (Thermal shock) (Chávez-Villalba *et al.*, 2002) เช่น ในระบบเพาะเลี้ยงหอยในแถบยุโรป หรือการฉีดฮอร์โมน serotonin เข้าไปในตัวหอยนางรม (Braley, 1985) เพื่อกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา วิธีที่สอง เป็นการใช้เทคนิคการกรีดน้ำเชื้อ (stripping method) ออกมาจากอวัยวะสืบพันธุ์โดยตรงซึ่งจะใช้มีดกรีดผ่านอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อให้เซลล์สืบพันธุ์หลุดออกมาจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยวิธีนี้อาจมีทั้งเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์และเซลล์ที่กำลังพัฒนาและเศษเนื้อเยื่อติดมาด้วย ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการผสมเทียมหอยนางรมในระบบเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามในระบบผสมเทียมหอยนางรมยังประสบปัญหาความแปรปรวนของระบบการผลิตตัวอ่อนทำให้ได้ผลผลิตไม่คงที่ ปัญหาดังกล่าวอาจเกิดจากคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์โดยตรง จึงได้มีการศึกษาศึกษาโปรตีนอมของเซลล์สืบพันธุ์ควบคู่กันไปเพื่อให้เข้าใจกลไกการทำงานของเซลล์สืบพันธุ์ในกลุ่มหอยสองฝามากขึ้น

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบโปรตีนอมของเซลล์



491486753

BUU_1Thesis_59910212_thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

สปีพันธุ์เพศผู้ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทั้งสองวิธี คือ spawning method และ stripping method เพื่อเป็นข้อมูลด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลสำหรับประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกเซลล์สปีพันธุ์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงลูกหอยต่อไป

วัตถุประสงค์ในงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเจริญและพัฒนาของ sperm ภายในท่อสร้างเซลล์สปีพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)
2. เพื่อศึกษาความแตกต่างของน้ำเชื้อจากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี คือ การปล่อยเซลล์สปีพันธุ์เองตามธรรมชาติ (spawning method) และการเก็บตัวอย่างเซลล์สปีพันธุ์โดยการกรีดอวัยวะสปีพันธุ์ (stripping method) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)
3. เพื่อระบุชนิดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบ
4. เพื่อเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของโปรตีนที่พบในน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบจากการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ 2 วิธี คือ spawning method และ stripping method
5. เพื่อสร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีน (reference map) จากโปรตีนที่พบในน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบ

ขอบเขตการวิจัย

ใช้หอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) ในการทำวิจัยจากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยชายฝั่งอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยเลือกหอยโตเต็มวัยที่มีขนาดเปลือกประมาณ 4-7 เซนติเมตร จากนั้นนำหอยมาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยให้อาหารที่เป็นแพลงก์ตอนพืช (*Nannochloropsis* sp.) และแพลงก์ตอนสัตว์ (*Chaetoceros* sp.) อย่างละ 1 ลิตร/วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี คือ กระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สปีพันธุ์เองตามธรรมชาติ (spawning method) และใช้เทคนิค stripping method ในการเก็บตัวอย่างโดยการกรีดบริเวณอวัยวะสปีพันธุ์ หลังจากเก็บตัวอย่างแล้ว ผู้วิจัยแบ่งศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 การศึกษาโครงสร้างของเซลล์โดยใช้ TEM โดยผู้วิจัยตัดเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สปีพันธุ์ (gonad) จากหอยนางรมปากจีบเพศผู้ 3 ตัว เพื่อดูการเจริญและพัฒนาของเซลล์ในท่อสร้างเซลล์สปีพันธุ์ นอกจากนั้น ยังทำการศึกษาถึงความแตกต่างของเซลล์ที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี คือ stripping method (3 ตัว) และ spawning method (3 ตัว)

ส่วนที่ 2 ทำการศึกษาเพื่อระบุชนิดโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยใช้เทคนิค 2D gel electrophoresis โดยทำการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และนำไปเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุชนิดโปรตีนที่พบและทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนที่พบจากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธีจากโปรแกรม Delta 2D (DECODON, Germany)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับในงานวิจัย

1. ข้อมูลการเจริญและพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ
2. องค์ความรู้ด้านชนิดและปริมาณของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบ
3. ทราบถึงความแตกต่างของโปรตีนที่พบในประชากรเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จากการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ 2 วิธี คือ การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เองตามธรรมชาติ (spawning method) และการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์โดยการกรีดอวัยวะสืบพันธุ์ (stripping method)
4. ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการหาตัวบ่งชี้คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (biomarker of male gamete quality) นำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์คุณภาพดีสำหรับการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต



491486753

BUU_1Thesis_59910212_thesis / recv: 29082563 12:06:53 / seq: 23

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หอยนางรม (Oyster)

หอยนางรมเป็นหอยสองฝา (bivalve) ที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากคนไทยนิยมนำมาบริโภคเป็นอาหาร หอยนางรมเป็นสัตว์ที่เกาะอยู่กับที่โดยมีเปลือกข้างซ้ายเกาะอยู่กับวัสดุที่เป็นของแข็ง เช่น ตามแนวโขดหิน ดังนั้นหอยนางรมที่ลงยึดเกาะแล้วจึงไม่มีการเคลื่อนที่อีกตลอดชีวิต ด้วยเหตุนี้หอยนางรมจึงไม่มีเท้า (foot) เหมือนกับหอยสองฝาชชนิดอื่น ๆ เปลือกหอยนางรมประกอบด้วยสารประกอบหินปูน (CaCO_3) เป็นส่วนใหญ่เช่นเดียวกับหอยสองฝาชชนิดอื่น ๆ เปลือกด้านบนที่มีลักษณะแบนและบาง ส่วนเปลือกด้านล่างจะเกาะติดกับวัสดุ เช่น โขดหิน ซึ่งจะหนากว่าเปลือกบน และมีลักษณะโค้งเว้าคล้ายถ้วย สำหรับรองรับตัวหอย เชื่อมกันด้วยบานพับ (hinge) ขอบเปลือกมีลักษณะเป็นจีบ และเปลือกมีลักษณะเป็นเกล็ดเรียงซ้อนทับกันเป็นรอยหยัก ขนาดความยาวในตัวโตเต็มวัยประมาณ 4-7 เซนติเมตร ซึ่งจะไม่รูปร่างลักษณะที่แน่นอน โดยจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่หอยนางรมปากจیبนั้นอาศัยอยู่ สามารถพบหอยนางรมได้ในบริเวณน้ำขึ้นน้ำลงทั้งในน้ำกร่อยและในทะเล เช่น บริเวณปากแม่น้ำ ชายฝั่งที่มีกระแสน้ำหมุนเวียนตลอดเวลา (ไพโรจน์ พรหมานนท์, 2526) หอยนางรมกินอาหารโดยการกรองกินอาหารขนาดเล็ก ได้แก่ แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ หอยนางรมเป็นสัตว์ที่แยกเพศ (dioecious) ในช่วงที่มีการผสมพันธุ์หอยตัวเมียจะปล่อยไข่ และหอยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาปฏิสนธิกันในน้ำ ซึ่งเป็นการผสมพันธุ์แบบภายนอกลำตัว (external fertilization)

หอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata* Born, 1778)

หอยนางรมปากจیب หรือที่เรียกกันว่า หอยนางรมพันธุ์เล็ก หรือหอยเงาะ มักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ตั้งแต่ชายฝั่งถึงระดับน้ำลึก 5 เมตร พบมากใน จังหวัดระยอง จันทบุรี ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และระนอง (กรมประมง, 2536) สำหรับในการจำแนกหอยนางรมปากจیبตามหลักอนุกรมวิธานของสัตว์ สามารถจำแนกได้ดังนี้



491486753

BUU_1Thesis_59910212_thesis / recv: 29082563 12:06:53 / seq: 23

อาณาจักร (Kingdom): Animalia

ไฟลัม (Phylum): Mollusca

ชั้น (Class): Bivalvia

อันดับ (Order): Ostreoida

วงศ์ (Family): Ostreidae

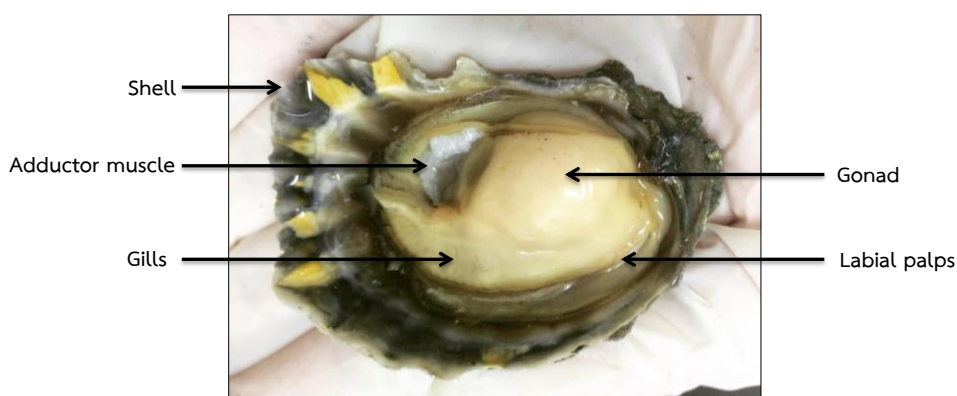
สกุล (Genus): *Saccostrea*

ชนิด (species): *S. cucullata* (Born, 1778)

อวัยวะภายนอกของหอยนางรมปากจีบ

อวัยวะที่สำคัญของหอยนางรมปากจีบ ดังแสดงในภาพที่ 2-1 ซึ่งประกอบด้วย

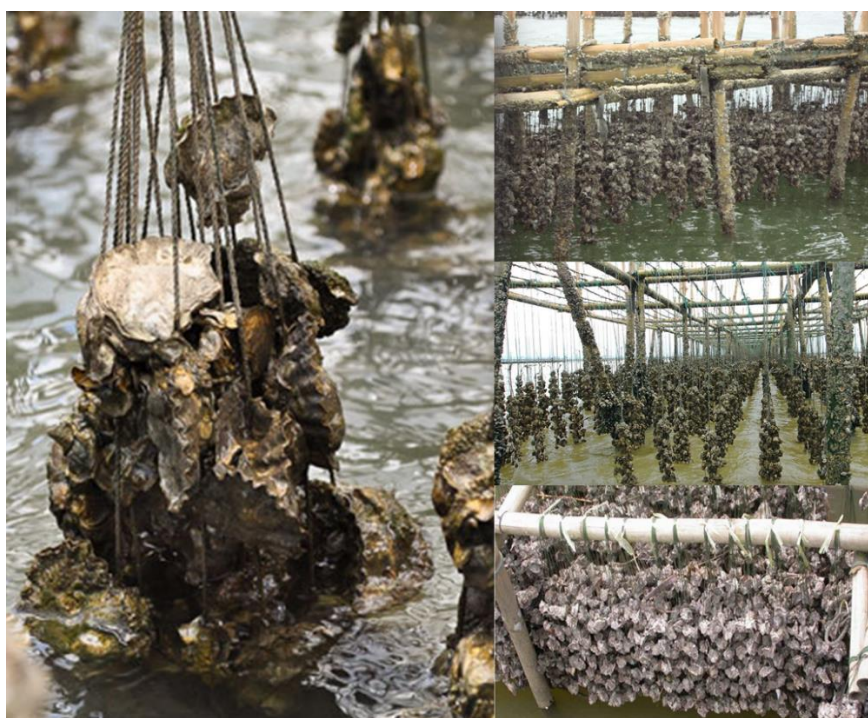
1. Shell มีลักษณะเป็นรอยหยัก มี 2 ฝาประกบกัน โดยที่เปลือกซ้ายจะแบนกว่าเปลือกขวา ซึ่งเปลือกขวามีลักษณะเว้าลึกเป็นที่รองรับลำตัวของหอย
2. Adductor muscle หรือกล้ามเนื้อยึดเปลือก ทำหน้าที่ในการยึดเปลือกทั้ง 2 ข้างให้เชื่อมกัน
3. Gills เป็นอวัยวะที่ใช้สำหรับกรองอาหารและใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ
4. Gonad เป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยหอยนางรมนั้นเป็นสัตว์ที่ไม่สามารถแยกเพศได้จากการมองด้วยตาเปล่า ซึ่งในการตรวจสอบเพศต้องตรวจสอบภายในกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็นเซลล์ไข่ ภายใต้อกล้องพบไข่ที่มีลักษณะสีน้ำตาล รูปร่างกลม รี ถ้าเป็น sperm ภายใต้อกล้องพบ sperm มีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ เคลื่อนที่ได้
5. Labial palps หรือแผ่นปาก ทำหน้าที่เป็นอวัยวะที่ควบคุมปริมาณอาหารที่กินเข้าไปให้มีอนุภาคเล็ก



ภาพที่ 2-1 อวัยวะภายนอกของหอยนางรมปากจีบ

2.2 ข้อมูลด้านการเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมปากจีบมีการเลี้ยงหลายรูปแบบ เช่น เลี้ยงบนก้อนหิน เลี้ยงโดยใช้ไม้ไผ่ เลี้ยงแบบใช้ท่อซีเมนต์ เลี้ยงแบบแขวน หรือเลี้ยงในกระบะไม้ เป็นต้น (ภาพที่ 2-2) โดยระยะเวลาการเลี้ยงขึ้นอยู่กับขนาดของหอยที่นำมาเลี้ยง (ไพโรจน์ พรหมานนท์, 2533) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเหล่านี้ใช้ตัวอ่อนจากธรรมชาติเป็นหลัก (กรมประมง, 2536)



ภาพที่ 2-2 ตัวอย่างรูปแบบการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทย

ที่มา: ดัดแปลงจาก (<http://www.dmcg.go.th>)

2.3 การสืบพันธุ์ของหอยนางรม

หอยสองฝาส่วนใหญ่มีเพศแยก ไม่มีการจับคู่ผสมพันธุ์ ฤดูผสมพันธุ์จะอยู่ในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน ช่วงที่อุณหภูมิเริ่มสูงขึ้นหลังฤดูหนาวในแถบเขตร้อนหลายแห่งหอยนางรมสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี หอยนางรมสามารถเปลี่ยนเพศได้ ตอนเล็ก ๆ จะเป็นเพศผู้ ถ้าโตขึ้นจะเปลี่ยนเพศเป็นตัวเมีย การสืบพันธุ์ในหอยนางรมจะเป็นการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย คือ หอยนางรมจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (egg) ปล่อยออกมาภายนอกร่างกายผ่านทางช่องปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (gonophore) (Galtsoff, 1964) และมีปฏิสนธิภายนอกในตัวในน้ำทะเลและเจริญเติบโตเป็นลูกหอย โดยเริ่มจากการเกิด polar body เมื่อเซลล์ไข่ได้รับการปฏิสนธิ จากนั้นเกิด

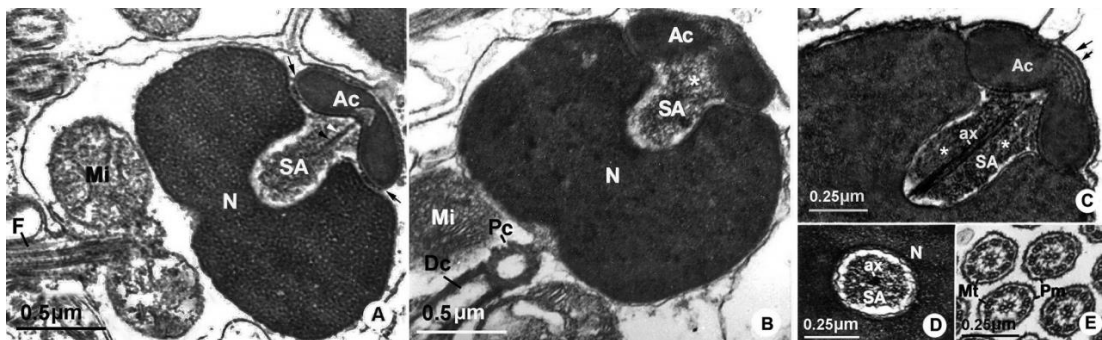
การแบ่งเซลล์จนพัฒนาเป็นตัวอ่อนที่สามารถว่ายน้ำได้ เรียกระยะการเจริญนี้ว่า trochophore larva เมื่อตัวอ่อนมีการเจริญและพัฒนาเป็นลูกหอยระยะ veriger ซึ่งเป็นระยะที่ลูกหอยเริ่มสร้างเปลือก และเป็นระยะที่พร้อมลงเกาะกับโคคหิน หรือวัสดุแข็งเพื่อเจริญเติบโตต่อไป เมื่อลูกหอยลงเกาะแล้ว ลูกหอยนางรมจะไม่เคลื่อนที่อีกตลอดชีวิต (ธรณ์ ธารงนาวาสวัสดิ์ และคณะ, 2551)

2.4 ช่วงฤดูกาลปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมที่พบในประเทศไทยจะวางไข่ตลอดปี ซึ่งมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดแหล่งที่อยู่ และสภาพแวดล้อม เช่น ความเค็มและอุณหภูมิของน้ำทะเล โดยในหอยนางรมปากจีบจะวางไข่เป็น 3 ช่วง คือช่วงแรก เดือนมีนาคม-เมษายน (ฤดูร้อน) ช่วงที่ 2 เดือนมิถุนายน-กรกฎาคม (ฤดูฝน) และ ช่วงที่ 3 เดือนกันยายน-ตุลาคม (ปลายฤดูฝน) (คเชนทร เฉลิมนวัฒน์, 2544)

2.5 เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Sperm)

sperm ในหอยนางรมมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 2-3 μm เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไข่ ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ คือ ส่วนหัว ประกอบด้วย nucleus และ acrosome ซึ่งภายในบรรจุ เอนไซม์ที่ใช้ย่อย vitelline membrane ส่วนตัวประกอบด้วย mitochondrial body ที่ใช้เป็นแหล่ง ให้พลังงานของเซลล์อสุจิโดยจะอยู่ล้อมรอบ centriole และ ส่วนหางที่ช่วยในการเคลื่อนที่ (Franco *et al.*, 2008; Nurai *et al.*, 2016) (ภาพที่ 2-3)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของเซลล์อสุจิของหอยนางรม *Saccostrea forskali* ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ที่มา: (Boonmee *et al.*, 2016)

หมายเหตุ: acrosome (Ac), axial rod (ax), flagella (F), microtubule (Mt), mitochondria (Mi), nucleus (N), plasma membrane (Pm) และ subacrosomal space (SA)

ในหอยนางรมพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เช่นเดียวกับที่พบในสัตว์กลุ่มมีกระดูกสันหลัง แต่พบโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต่างกันเล็กน้อย โดยจะพบไมโทคอนเดรียรวมกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ 4-5 ไมโทคอนเดรีย (Yurchenko, 2012)

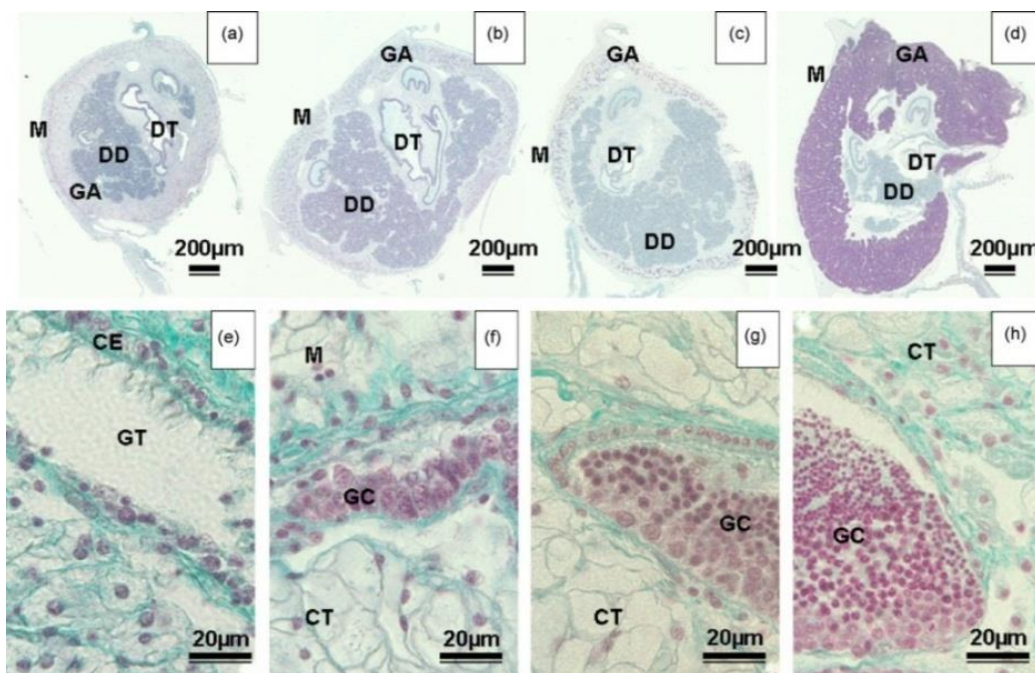
เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogonium) มีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้น และมีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต่อไป และเมื่อถึงระยะที่พร้อมปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้วนั้น หอยจะเริ่มปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544)

โดยในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สามารถแบ่งตามการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ออกเป็น 4 ระยะ (ภาพที่ 2-4) ซึ่งประกอบด้วย

1. ระยะที่ 0 เป็นระยะพักตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ เซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ยังไม่มีการพัฒนา ทำให้ไม่สามารถแยกเพศหอยได้ เนื่องจากไม่พบเซลล์ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal tubule)
2. ระยะที่ 1 เป็นระยะที่เริ่มมีพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์โดยมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ primary spermatocytes จำนวนมาก
3. ระยะที่ 2 เป็นระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ spermatid จำนวนมากอยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์
4. ระยะที่ 3 เป็นระยะสุดท้ายของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังจะปล่อย จะพบเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาเกือบสมบูรณ์ (spermatid) และพัฒนาสมบูรณ์แล้ว (spermatozoa) ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Franco *et al.*, 2008)



491486753



ภาพที่ 2-4 ระยะเวลาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรม *Crassostrea gigas* (Franco *et al.*, 2008) (a and e) ระยะเวลาที่ 0, (b and f) ระยะเวลาที่ 1, (c and g) ระยะเวลาที่ 2, (d and h) ระยะเวลาที่ 3

หมายเหตุ: (mantle (M), gonadal area (GA), connective tissue (CT), digestive diverticula (DD), digestive tract (DT), gonadal tubule (GT), ciliated epithelium (CE), germ cells (GC)

2.6 การผสมเทียม

ในระบบการเพาะเลี้ยงหอยนางรมนิยมใช้เทคนิคในการผสมเทียมอยู่ 2 วิธีหลัก ๆ คือ วิธี Stripping method (Allen and Bushek, 1992) ซึ่งเป็นการผสมเทียมหอยโดยวิธีการผ่าอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) และเขี่ยเอาเซลล์สืบพันธุ์ออกมาผสมกันโดยตรง ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้ผลเป็นอย่างดีกับหอยนางรม ข้อควรระวังของวิธีนี้คือควรใช้เฉพาะหอยที่มีความสมบูรณ์เพศเท่านั้นเนื่องจากในการผสมเทียมด้วยวิธีนี้ต้องการเซลล์สืบพันธุ์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้เมื่อนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วควรเห็นลักษณะเซลล์สืบพันธุ์ดังนี้ ในไข่ควรมีลักษณะค่อนข้างกลมสีน้ำตาล ส่วนน้ำเชื้อตัวผู้เมื่อส่องดูจากกล้องจุลทรรศน์จะพบ sperm เคลื่อนที่ ถ้าใช้หอยที่ไม่สมบูรณ์เพศ อาจทำให้ได้ลูกหอยที่ไม่สมบูรณ์ หรืออีก 1 วิธี คือ Spawning method โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาเองตามธรรมชาติ ซึ่งมีการกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น การกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ (thermal shock) (Chávez-Villalba *et al.*, 2002) เช่น ในระบบเพาะเลี้ยง

หอยในแถบยุโรป หรือการฉีดฮอร์โมน serotonin เข้าไปในตัวหอยนางรม (Braley, 1985) เพื่อกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาภายนอก

2.7 โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

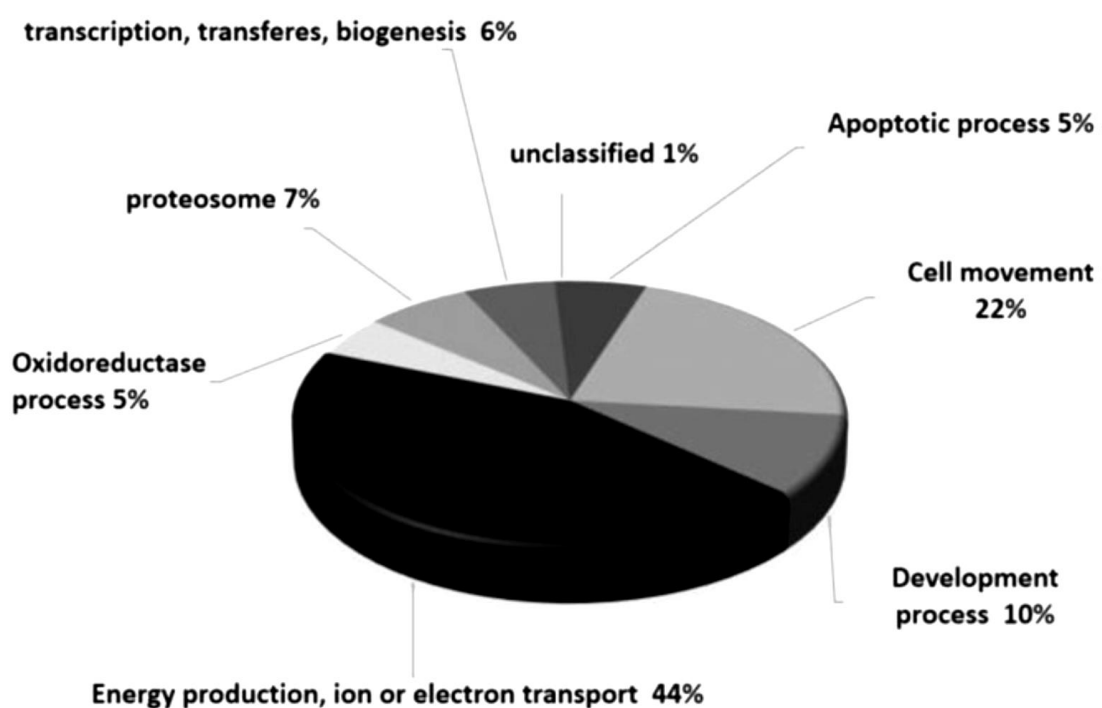
การศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ นั้น ส่วนใหญ่มีการศึกษากันในสัตว์หลายชนิด ทั้งในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น โนหนู (Skerget *et al.*, 2015) มีการศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีนที่พบในแฟลเจลลัมในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ พบโปรตีนกลุ่ม Tektins ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในแฟลเจลลัม (Cao *et al.*, 2006b) (Baker *et al.*, 2008) ไนวัว (Peddinti *et al.*, 2008) ไนลิง (Sheri Skerget *et al.*, 2013) รวมทั้งในมนุษย์ (Johnston *et al.*, 2005; Martínez-Heredia *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013) ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เป็นการศึกษาถึงโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เพื่ออธิบายถึงกลไกการทำงานและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อตรวจสอบภาวะเป็นหมัน โดยโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัด (Biomarker) ถึงความปกติและผิดปกติของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ เนื่องจากพบโปรตีนต่างชนิดกัน ทำให้ทราบถึงโปรตีนที่เป็นตัวกำหนดและควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เช่น ในการศึกษาของ (Li *et al.*, 2016) ศึกษาถึงโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในมนุษย์ เพื่อนำไปพัฒนาเทคโนโลยีเกี่ยวกับการรักษาภาวะเป็นหมัน ซึ่งพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทั่วไปใน sperm เช่น Tubulin, Acrosin, mitochondrial proteins หรือ cytoskeletal proteins และพบโปรตีนที่ควบคุมภาวะเจริญพันธุ์ คือ P25b ซึ่งสามารถบอกถึงคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ โดยถ้าระดับ P25b ต่ำลงทำให้ความสมบูรณ์ในเซลล์สืบพันธุ์ลดลงด้วยเช่นกัน (Parent *et al.*, 1999) เป็นต้น

โดยทั่วไปโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างพลังงานที่ใช้ภายในเซลล์ การแบ่งเซลล์ในท่อสืบพันธุ์ เช่น Heat shock-related 70 kDa protein 2 (HSPA2) ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเซลล์ เช่น Cyclin dependent kinase 5 (CDK5) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น ACTB, ARPM2, Tektin 2 (TEKT2), Tubulin beta subunit (TUBB) หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงเซลล์ออกจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Martinez-Heredia *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงกลไกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ไข่ในขั้นตอนการปฏิสนธิ (Dorus *et al.*, 2010) ซึ่งพบโปรตีน เช่น Cysteine rich secretory protein 2 (CRISP2), AKAP-binding sperm protein ropporin (ROPN1), Sperm acrosome associated (SPACA) เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษาโปรตีนโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ สามารถอธิบายได้ถึงกลไกการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และสามารถประยุกต์ใช้ในเรื่องการคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

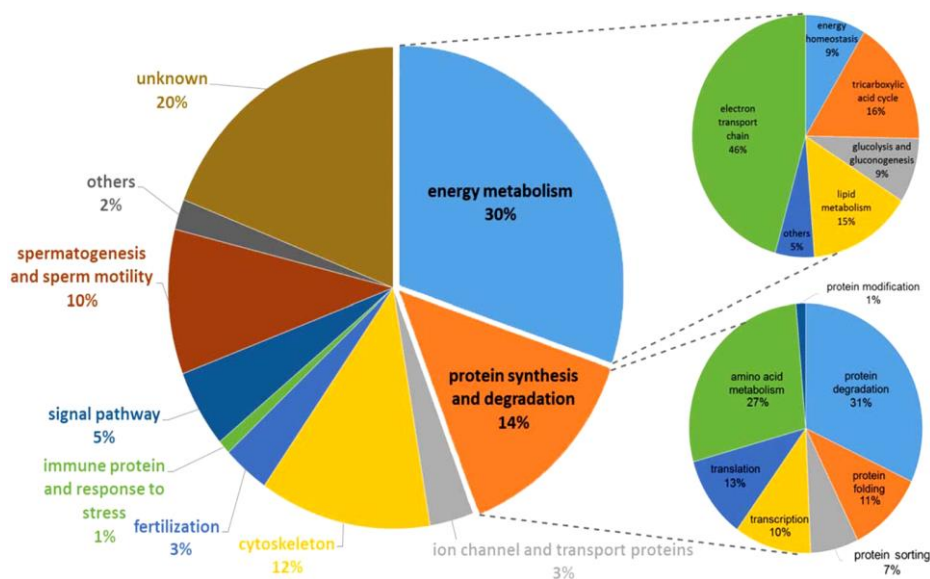
หรือใช้ในทางการแพทย์เพื่อนำไปพัฒนาเทคโนโลยีการรักษาสภาวะเป็นหมันในเพศชายได้ (Kwon *et al.*, 2015)

2.8 การศึกษาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในกลุ่มหอยสองฝา

มีการศึกษาโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยหลายชนิด เช่น ในหอยนางรมในแถบแปซิฟิก (*Crassostrea gigas*) พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ โครงร่างของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เช่น Actin-1, Tubulin beta-4B chain, Tektin-2, Tektin-4, Ropporin-1, and Dynein light chain เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงานเพื่อใช้ในเซลล์ เช่น Isocitrate dehydrogenase, ATP synthase subunit D โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์ เช่น Heat shock 70 kDa protein A (Kingtong *et al.*, 2013) (Boonmee *et al.*, 2016) (ภาพที่ 2-5) หรือการศึกษาและระบุชนิดโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยแมลงภู (Zhang *et al.*, 2015) ซึ่งพบโปรตีนที่แบ่งกลุ่มได้ (ภาพที่ 2-6) รวมทั้งมีการศึกษาถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารระหว่างเซลล์ด้วยเช่นกัน (Xiaohong *et al.*, 2015)



ภาพที่ 2-5 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยเซลล์ (*Pecten maximus*)
ที่มา: (Boonmee *et al.*, 2016)



ภาพที่ 2-6 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยแมลงภู

(*Mytilus galloprovincialis*)

ที่มา: (Zhang *et al.*, 2015)

2.9 Proteomics

โปรตีโอมิกส์ (Proteomics) คือ การศึกษาโมเลกุลโปรตีนจำนวนมากทั้งระบบ ทำการตรวจวัดโปรตีนหลายชนิดได้พร้อมกันในคราวเดียว เพื่อวัดปริมาณและรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนทุกชนิด โดยโปรตีโอมิกส์สามารถลงลึกได้มากถึงระดับการศึกษาโปรตีนทุกชนิดที่พบได้ในเซลล์ (whole proteome) ที่เป็นผลผลิตของยีนทั้งหมด (whole genome) โดยเริ่มจากการสกัดโปรตีนในตัวอย่างที่สนใจจะนำมาวิเคราะห์ จากนั้นนำไปวัดปริมาณโปรตีนเพื่อให้ทราบถึงความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง ก่อนที่จะนำมาแยกโปรตีน ซึ่งการแยกโปรตีนนั้นมีหลายวิธี เช่น 1. Gel-based proteomic technologies เป็นแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบน polyacrylamide gel (Polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) โดยสามารถแยกได้ตามขนาดมวลโมเลกุล (1 มิติ) หรือแยกตามขนาดโมเลกุลและค่าประจุสุทธิของโปรตีน (2 มิติ) 2. Gel-free proteomic technologies เป็นการแยกโปรตีนโดยไม่ใช้เจล แต่จะใช้วิธีการอื่นในการแยกโปรตีนแทน เช่น ใช้เทคนิค HPLC (High-performance liquid chromatography) หลังจากทำการแยกโปรตีนแล้วก็นำมาเปรียบเทียบการแสดงออกของกลุ่มตัวอย่าง กรณีที่มีตัวอย่างมากกว่า 1 กลุ่มตัวอย่าง จากนั้นนำส่วนของโปรตีนที่สนใจมาย่อยด้วย Trypsin ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่ในการตัดสาย polypeptide ให้สั้นลงเพื่อให้สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass spectrometer ได้ จากนั้นทำการวิเคราะห์ peptide ด้วย Mass spectrometer เพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีน

จากนั้นทำการแปรผลโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่อง Mass spectrometer ให้เป็นลำดับของกรดอะมิโน เพื่อระบุชนิดโปรตีนที่พบโดยเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน (protein database) (Aebersold and Mann, 2016) ซึ่งเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์นี้ทำให้เห็นภาพรวมได้ว่าโปรตีนทั้งเซลล์ทำงานเชื่อมโยงกันอย่างไร ประกอบด้วยโปรตีนกลุ่มไหนบ้าง และมีความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตใดบ้าง เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนที่มีอยู่

2.10 Gel Electrophoresis

Electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลชีวภาพที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และสารพันธุกรรม DNA RNA ผ่านเจลที่มีรูพรุน โดยอาศัยการทำงานของกระแสไฟฟ้าผลักให้โมเลกุลมีการเคลื่อนที่ ซึ่งโมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะสามารถเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ โดยทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงข้ามกัน ทำให้เกิดการแยกโมเลกุลแต่ละชนิดได้ (Schagger, 2006)

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาหน้าหนักโมเลกุลของ polypeptide สายเดี่ยว ช่วยในการแยกสารออกจากกันได้ โดยโมเลกุลขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเจลสามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลไปได้ ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนจะถูกขัดขวางการเคลื่อนที่ ทำให้สามารถแยกขนาดของโมเลกุลได้ซึ่งขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้มข้นของ acrylamide และ bis-acrylamide โดยอาศัยหลักคือ การสร้าง cross-linked polymer ที่เกิดจากการสร้าง polymer ระหว่าง acrylamide monomer กับ bis โดยมี TEMED เป็น catalyst ซึ่งสารตัวอย่าง อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นต่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent ที่มีประจุลบที่สามารถแยก polypeptide ที่อยู่รวมกันออกเป็นสายเดี่ยวได้ และทุกสายมีประจุลบจึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก โดยมี Dithiothreitol (DTT) เป็น reducing agent ในสารตัวอย่างด้วย เพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide ในโปรตีน ซึ่งผลของการแยกโปรตีน สามารถมองเห็น band polypeptide เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie blue และ หน้าหนักโมเลกุลของ polypeptide แต่ละสายของสารตัวอย่างได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่าง log ของหน้าหนักโมเลกุล กับอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (Schagger, 2006)

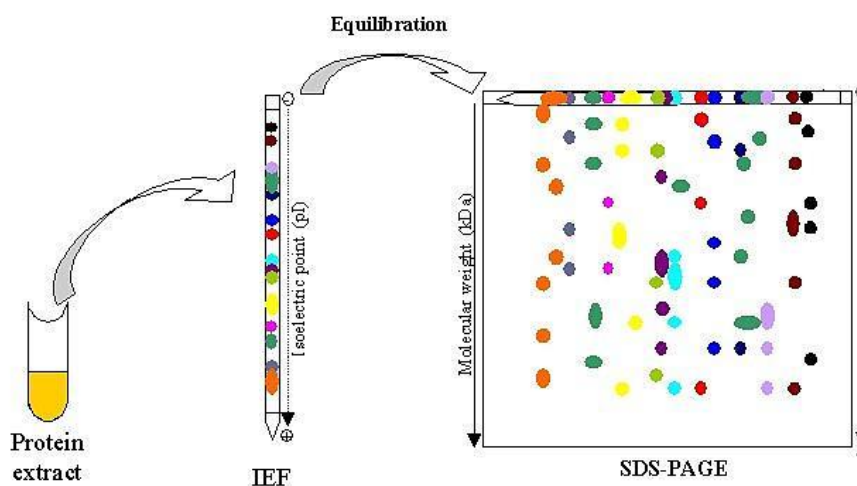
2.11 Isoelectric Focusing (IEF)

Isoelectric focusing เป็นการแยกประจุที่เป็นกลางในสนามไฟฟ้าโดยเป็นวิธีการแยกโมเลกุลที่มีประจุแตกต่างกัน สำหรับการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้ ของผสมโปรตีนต้องอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยใช้ตัวค้ำจุนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย (inert support) โดยการแปรผันความแตกต่าง

ของค่า pH ทำให้บริเวณขั้วบวก (anode) มีค่า pH ต่ำกว่าบริเวณขั้วลบ (cathode) และช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่เลือกใช้ต้องรวมถึงค่า pH ที่โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (isoelectric point, pI) ของโปรตีนที่เราสนใจ โปรตีนที่มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI จะมีประจุเป็นบวกและเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ เมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ไปจะทำให้ค่า pH ลดลงจนกระทั่งค่า pH เท่ากับค่า pI ทำให้มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (ไม่มีประจุ) และโปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่ ในทางกลับกัน เมื่อโปรตีนมีค่า pH สูงกว่าค่า pI โปรตีนจะมีประจุเป็นลบและเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ดังนั้นโปรตีนแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่เป็นแถบเข้าขั้วไฟฟ้าและไปหยุดที่ค่า pH เท่ากับค่า pI

2-Dimensional Gel Electrophoresis

2-Dimension gel electrophoresis เป็นการแยกโปรตีนใน 2 มิติ โดยการรวม IEF และ SDS-PAGE เข้าด้วยกัน โดยมิติแรกโปรตีนจะถูกแยกด้วย IEF ซึ่งจะแยกโดยอาศัยความต่างของ pI จากนั้นจึงแยกโปรตีนอีกครั้งในมิติที่สองด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล (ภาพที่ 2-7)



ภาพที่ 2-7 2-Dimensional Gel Electrophoresis

ที่มา: (<http://www.creative-proteomics.com>)

การแยกบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ (two-dimensional gel electrophoresis: 2D gel) เป็นการแยกบนเจลด้วยกระแสไฟฟ้าไปในสองทิศทางที่ตั้งฉากกันและในแต่ละทิศทางอาศัยหลักการแยกที่ต่างกัน เรียกว่า การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ (two-dimensional electrophoresis) อาจทำได้โดยแยกโปรตีนตามประจุในมิติแรกและติดตามด้วยการแยกตามขนาด

ในมิติที่สอง การแยกในมิติแรกตามประจุเป็นการแยกตัวอย่างโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าในเจล ซึ่งปกติแยกโดยอาศัยวิธี IEF จากนั้นนำ strip ที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในมิติแรกแล้วมาวางในแนวนอนต่อกับขอบบนของ polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้สำหรับแยกในมิติที่สองด้วยวิธี SDS-PAGE สาย polypeptide ที่แยกตามประจุใน strip (ในมิติแรก) จะเคลื่อนที่เข้าไปในแผ่นเจลและแยกตามขนาดของสาย polypeptide การแยกในมิติที่ 2 นี้อาจใช้ polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นเดียวกันตลอดทั้งเจล หรือใช้ polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการทำ และเมื่อแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ในมิติที่สองเรียบร้อยแล้ว โปรตีนจะแยกออกจากกันซึ่งจะปรากฏเป็นจุด (เมื่อนำมาย้อมด้วยสี Coomassie blue) ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนตามประจุและมวลโมเลกุล ทำให้โปรตีนที่แยกออกมาได้นั้นมีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (Wilkins *et al.*, 1996) หลักการทำ 2D gel electrophoresis มีขั้นตอนตามลำดับดังนี้

1. สกัดโปรตีน (protein extraction) และการวัดปริมาณโปรตีน (protein quantification)
2. โหลดโปรตีนใน IPG strip (rehydration)
3. แยกโปรตีนในมิติที่ 1 ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนตามประจุสุทธิของโปรตีน หรือ pI (isoelectric focusing: IEF)
4. นำ IEF gel มาทำให้สามารถรันใน SDS-PAGE ได้ โดยการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ใน IEF gel เป็น SDS buffer ซึ่งใช้ incubation buffer 2 ชนิดเพื่อทำลายโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ชนิดแรกจะประกอบด้วย SDS-sodium dodecyl sulfate และ DTT เพื่อทำให้โปรตีนมีประจุลบตลอดทั้งสายและทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน ส่วน incubation buffer ชนิดที่ 2 จะมีส่วนของ Iodoacetamide เป็นส่วนประกอบ ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้พันธะไดซัลไฟด์คืนตัว และนำ strip ที่แยกด้วย IEF ในมิติที่หนึ่ง มาวางให้แนบกับหน้าเจลของ SDS-PAGE ตามแนวนอน
5. นำไปแยกโปรตีนในมิติที่สองด้วยวิธี SDS-PAGE ต้องใช้เจลที่เหมาะสมกับการวาง IPG strip ตามแนวยาว ดังนั้นจึงต้องใช้ซี่หวี (comb) แบบยาวในการเตรียมเจล และเหลือช่องสำหรับหยอด protein molecular weight marker 1 ช่อง และเมื่อวาง IPG strip ลงในช่องของ SDS-PAGE แล้ว จะใช้ agarose ช่วยยึด IPG strip ไม่ให้เคลื่อนที่
6. ย้อมสีเจลโดยใช้สี 0.1% Coomassie blue
7. วิเคราะห์รูปแบบ (pattern) ของโปรตีนที่ได้ ซึ่งใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้โปรแกรม Delta 2D (Germany) มาช่วยวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโปรตีนที่เหมือนกันที่อยู่ต่างแผ่นเจลกัน โดยใช้เทคนิคการซ้อนภาพสแกนเจล โดยโปรแกรมนี้อาจสามารถบอกความแตกต่างของระดับการแสดงออกของโปรตีนบนแผ่นเจลและสามารถจัดกลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกที่เหมือนกันได้อีกด้วย ซึ่งโปรแกรมนี้อาจจะแปลงข้อมูลที่ได้จากภาพสแกนเจลเป็นตัวเลขและสามารถหาเป็นค่าทางสถิติได้ด้วยเช่นกัน



491486753

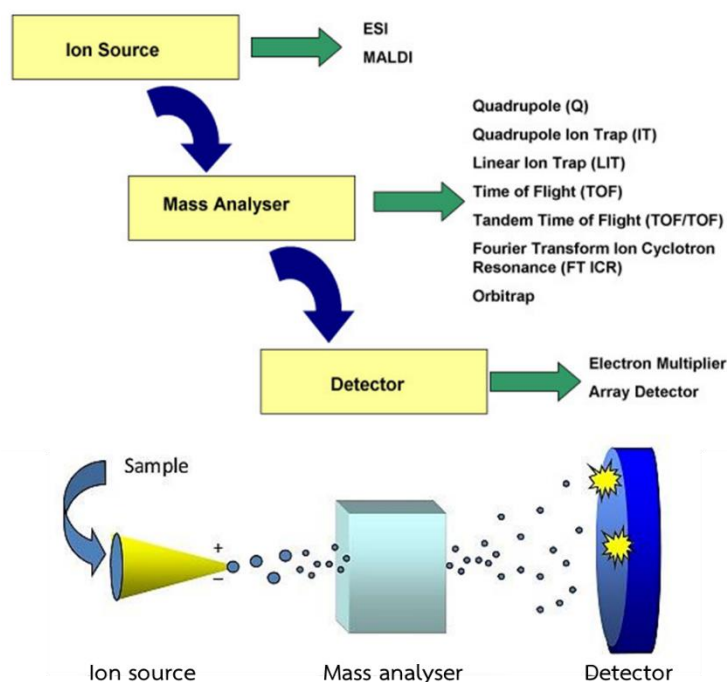
BUU 1Thesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

8. นำจุดที่สนใจในการศึกษา นำไปย่อยเจลด้วย trypsin แล้วนำไปเข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

9. หลังจากที่ได้ไฟล์จากเครื่อง LC-MS/MS ทำให้ได้มาซึ่งข้อมูลโครมาโทแกรมและแมสสเปกตรัม จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปค้นหาและระบุชนิดของโปรตีนจากฐานข้อมูลโดยจะยึดหลักความเหมือนของข้อมูลที่วิเคราะห์และข้อมูลในฐานข้อมูล ซึ่งแสดงเป็นคะแนนความน่าเชื่อถือ อีกทั้งยังมีผลทางสถิติสำหรับประกอบการตัดสินใจ (Kingtong *et al.*, 2013)

2.12 Mass Spectrometry

เป็นเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้หลักการการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน (ionization) และทำการวิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่งที่นำมาวิเคราะห์ โดยมีส่วนประกอบแรกของเครื่องมือที่เรียกว่า ส่วนผลิตไอออน (ionization source) ซึ่งมีวิธีการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออนหลายวิธี เช่น Electrospray ionization (ESI) หรือ Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) และเมื่อสารตัวอย่างเปลี่ยนไปเป็นไอออนแล้วจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่จำแนกมวลโดยคัดเลือกโมเลกุลที่มีประจุที่ผ่านจากส่วนผลิตไอออนโดยมีหลายประเภท เช่น Quadrupole, Time-of-flight (TOF) และ Orbitrap เป็นต้น ส่วนประกอบสุดท้ายได้แก่ ส่วนตรวจวัด (detector) ทำหน้าที่เป็นฉากรับเมื่อมีไอออนมาตกกระทบและขยายสัญญาณที่ได้เพื่อส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผล ได้แก่ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม เพื่อจะแสดงผลออกมาในกราฟที่มีชื่อเรียกเฉพาะว่า แมสสเปกตรัม (Mass Spectrum) ที่มีแกนตั้งเป็นค่า relative intensity และแกนนอนเป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z) เทคนิคนี้ใช้ในการหามวลโมเลกุล (molecular mass) (Aebersold and Mann, 2016) โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน คือ Ion source Mass analyzer และ Detector (ภาพที่ 2-8)



ภาพที่ 2-8 องค์ประกอบของ Mass Spectrometer

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Graham *et al.*, 2007)

องค์ประกอบของ Mass spectrometer

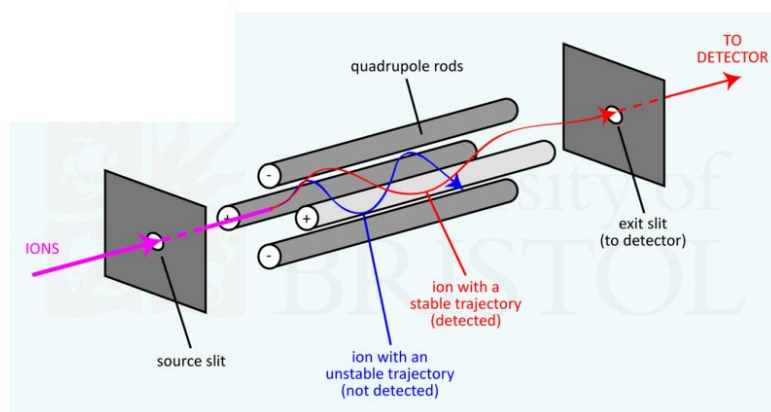
1. Ion source/ionization เป็นส่วนที่ทำให้โมเลกุลที่ต้องการวิเคราะห์กลายเป็นไอออนและเคลื่อนที่เข้าไปยังส่วน Mass Analyser เพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป โดยวิธีการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออนมีหลายวิธี เช่น

1.1 Electrospray ionization (ESI) เป็นเทคนิคการทำให้สาย polypeptide กลายเป็นโมเลกุลที่มีประจุโดยใช้การพ่นตัวอย่างผ่านท่อขนาดเล็กให้เกิดเป็นละอองฝอยผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูง เมื่อตัวอย่างถูกพ่นให้เป็นละอองฝอย ผ่านสนามไฟฟ้าแรงสูงก็จะเกิดประจุบวก (anion) ขึ้นรอบผิวของละอองฝอยนั้น จากนั้นสารละลายที่อยู่ในละอองฝอยก็จะระเหยออกไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งเหลือโมเลกุลของ peptide ที่มีประจุบวก และเคลื่อนที่เข้าสู่ mass analyzer ซึ่งนิยมติดตั้งระบบ LC (liquid chromatography) เพื่อทำการแยก peptide ที่ย่อยด้วย trypsin ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass spectrometer เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้น โดยเรียกเครื่องมือนี้ว่า LC-MS สำหรับ single mass spectrometer หรือ LC-MS/MS สำหรับ tandem mass spectrometer

1.2 Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) เป็นเทคนิคการทำให้สาย poly peptide กลายเป็นโมเลกุลที่มีประจุหรือไอออนโดยใช้เลเซอร์ยิง คือนำตัวอย่างที่ทำการย่อยด้วย trypsin มาแล้วผสมกับ matrix ที่ทำให้ตัวอย่างแห้ง แล้วยิงด้วยเลเซอร์ สาร matrix จะทำหน้าที่ดูดซับพลังงานจากเลเซอร์แล้วส่งต่อให้ peptide ทำให้ peptide กลายเป็นโมเลกุลที่มีประจุ พร้อมทั้งจะเข้าสู่ mass analyzer

2. Mass analyzer ทำหน้าที่คัดเลือกโมเลกุลที่มีประจุโดยคัดเลือกไอออนตามสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio; m/z) ไอออนที่มีขนาดเล็กและมีประจุมากจะเคลื่อนที่ได้เร็วและถูกแยกออกมาก่อน ไอออนที่มีขนาดใหญ่ มีหลายชนิด ได้แก่

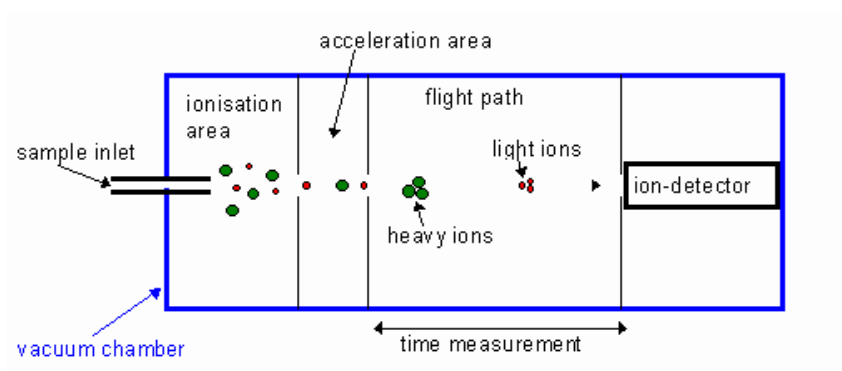
2.1 Quadrupole ประกอบด้วยแกนโลหะ 4 แท่งวางขนานกัน เพื่อใช้เป็นสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ดังภาพที่ 8 เมื่อโมเลกุลของเพปไทด์ที่มีประจุเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าที่ประกอบด้วยแกนโลหะ 4 แท่ง โมเลกุลก็จะถูกคัดเลือกโดยการสลับขั้วสนามแม่เหล็กไฟฟ้าไปมาระหว่างแท่งอย่างรวดเร็วทำให้ประจุที่แกนทั้ง 4 เปลี่ยนจากลบเป็นบวกสลับกันไปมา ซึ่งโมเลกุลของเพปไทด์ที่มีประจุบวกที่วิ่งผ่านแกนทั้ง 4 ก็จะถูกดึงเข้าหาแกนที่มีขั้วลบ หากประจุที่ผ่านเข้ามามีความเหมาะสมกับสภาพของสนามแม่เหล็กในขณะนั้นก็จะสามารถผ่าน quadrupole ออกไปได้ก่อน (เกิด resonance) ส่วนไอออนที่ยังไม่เหมาะสมก็ยังคงเคลื่อนที่ผ่านไปไม่ได้ ด้วยหลักการนี้จึงสามารถคัดเลือกไอออนที่ผ่านเข้ามาได้ โดยอาศัยสัดส่วนของ ประจุ/มวล (m/z ratio) ดังนั้นเมื่อปรับสนามแม่เหล็กไฟฟ้าไปเรื่อยๆ โมเลกุลที่เหมาะสมกับสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงนั้นๆ ก็จะผ่าน quadrupole ออกมาได้ (ภาพที่ 2-9)



ภาพที่ 2-9 Mass analyzer ชนิด quadrupole

ที่มา: <http://www.chm.bris.ac.uk>

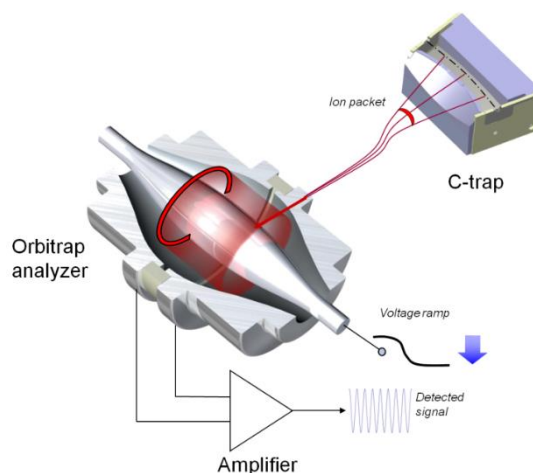
2.2 Time-of-flight (TOF) จะใช้หลักการเคลื่อนที่ของโมเลกุลตามสัดส่วนของมวล/ประจุ (m/z) ภายในท่อ TOF ซึ่งเป็นท่อสุญญากาศที่ปราศจากสนามไฟฟ้า โมเลกุลของเพปไทด์เมื่อผ่าน ions source จะกลายเป็นโมเลกุลที่มีประจุ โมเลกุลเหล่านี้จะถูกผลักในสนามไฟฟ้าก่อนที่จะเข้าสู่ท่อ TOF ซึ่งแรงที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วน m/z โดยตรง เมื่อโมเลกุลเคลื่อนที่เข้าสู่ TOF โมเลกุลที่มีประจุเท่ากันแต่มีมวลต่างกัน ทำให้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่มากกว่ากระทบ detector ได้เร็วกว่ามวลที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2-10) ซึ่งสามารถหาความสัมพันธ์ของ m/z ความยาวของท่อ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และ ความต่างศักย์ไฟฟ้าได้



ภาพที่ 2-10 Mass analyzer ชนิด Time-of-flight (TOF)

ที่มา: <http://www.alevelnotes.com/Mass-Spectrometry>

2.3 Orbitrap ประกอบด้วยอิเล็กโตรดรูปร่างคล้ายรูปกรวยล้อมรอบอิเล็กโตรดด้านในที่มีรูปร่างคล้ายกระสวย (ภาพที่ 2-11) โมเลกุลที่มีประจุเมื่อผ่านเข้ามาถึงบริเวณนี้ก็จะเคลื่อนที่รอบ ๆ แกนอิเล็กโตรดด้านใน และถูกแปลงเป็นสัญญาณ mass spectrum เพื่อใช้สร้างโครมาโทแกรมสำหรับวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนต่อไป

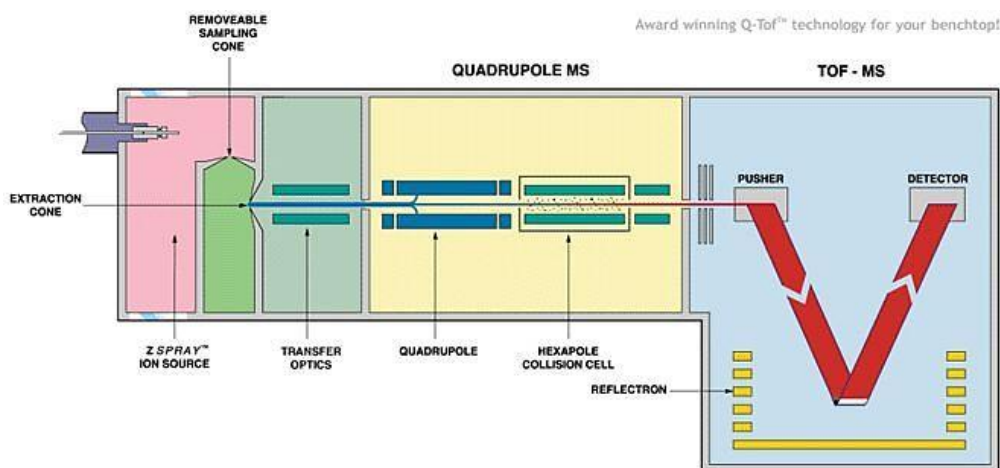


ภาพที่ 2-11 Mass analyzer ชนิด Orbitrap

ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap>

3. Ion detector: เป็นระบบการตรวจสัญญาณไอออนและบันทึกผลของไอออนแต่ละชนิดที่วิ่งมากระทบ detector ซึ่งจะขยายสัญญาณและส่งข้อมูลเข้าสู่คอมพิวเตอร์เพื่อประมวลผลและบันทึกเป็นสเปกตรัมของไอออนนั้น ๆ (สุทิน กิ่งทอง, 2557)

โดยในงานวิจัยนี้ใช้ Mass spectrometer ชนิด ESI-Q-TOF MS/MS ประกอบด้วยเทคนิคการสร้างประจุแบบ Electrospray ionization และ mass analyzer ประกอบด้วย MS1 เป็นแบบ quadrupole ร่วมกับ MS2 เป็น time-of-flight (TOF) (ภาพที่ 2-12)



ภาพที่ 2-12 ESI-Q-TOF Mass Spectrometer

ที่มา: <https://www.chem.uni-potsdam.de>

2.13 Bioinformatics

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) เป็นศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการจัดการข้อมูล พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ทั้งการจัดเก็บ และการนำข้อมูลมาใช้อย่างเป็นระบบ ซึ่งเป็นการนำโปรแกรม คอมพิวเตอร์เข้ามาใช้กับงานทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (Molecular biology) ซึ่งช่วยในการเก็บ รวบรวม วิเคราะห์ คำนวณ ประเมิน และแปลผลข้อมูลจากเครือข่าย ในปัจจุบันมีระบบฐานข้อมูล สากัลทำหน้าที่ให้ข้อมูลสาธารณะ (knowledge-based database) เพื่อให้ผู้สนใจสามารถเข้าไปใช้ ข้อมูลเพื่อการเรียนรู้ เช่น GenBank (National Center for Biotechnology Information; www. ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศมาช่วยในการใช้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล เช่น BLAST เป็นต้น

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับ peptide ด้วย MS/MS ผู้วิจัยจะได้ไฟล์ที่เป็นข้อมูลโครมาโตแกรมจากนั้นผู้วิจัยจะนำไฟล์ดังกล่าวไปค้นหาและระบุชนิดโปรตีนในโปรแกรม Mascot (ภาพที่ 2-13) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ช่วยระบุชนิดโปรตีนโดยใช้ข้อมูลที่ได้จาก Mass spectrometer โปรแกรม Mascot จะทำหน้าที่แปลผลข้อมูล spectrum ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อนำไปใช้ในการ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่อไปว่าลำดับกรดอะมิโนชนิดนี้ไปเหมือนกับองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต ใดบ้างที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยหลังจากที่ได้ลำดับกรดอะมิโนแล้ว ให้นำข้อมูลที่ได้ไปค้นหาใน ฐานข้อมูล เช่น SWISS-PROT, GenBank, Uniprot, NCBI, EMBL หรือ DDBJ ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่ หลายประเทศพัฒนามาเพื่อการเรียนรู้ และสามารถใช้ในการระบุชนิดโปรตีนที่พบในตัวอย่างที่ ทำการศึกษาได้โดยจะแสดงเป็นคะแนนความน่าเชื่อถือ (Score) และค่าทางสถิติที่ใช้ในการพิจารณา การยอมรับได้ (Kingtong *et al.*, 2013)



491486753

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name	<input type="text" value="Kullanist"/>	Email	<input type="text" value="kim_kullanist@hotmail.com"/>
Search title	<input type="text" value="SP"/>		
Database(s)	<input type="text" value="SwissProt (AA)"/>	<ul style="list-style-type: none"> Amino acid (AA) contaminants cRAP NCBIprot Nucleic acid (NA) Environmental_EST Fungi_EST Human_EST Invertebrates_EST Mammals_EST 	
Taxonomy	<input type="text" value="All entries"/>		
Enzyme	<input type="text" value="Trypsin"/>	Allow up to	<input type="text" value="1"/> missed cleavages
Quantitation	<input type="text" value="None"/>		
Crosslinking	<input type="text" value="None"/>		
Fixed modifications	<input type="text" value="--- none selected ---"/>		
Display all modifications <input type="checkbox"/>			
Variable modifications	<input type="text" value="Carbamidomethyl (C)"/>		
Peptide tol. ±	<input type="text" value="1.2"/> Da	# 13C	<input type="text" value="0"/>
Peptide charge	<input type="text" value="2+, 3+ and 4+"/>		
MS/MS tol. ±	<input type="text" value="0.6"/> Da		
Data file	<input type="text" value="เลือกไฟล์ ไม่ได้เลือกไฟล์ใด"/>		
Data format	<input type="text" value="Mascot generic"/>		
Instrument	<input type="text" value="Default"/>		
Decoy	<input checked="" type="checkbox"/>		
Monoisotopic	<input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>		
Precursor	<input type="text" value=""/> m/z		
Error tolerant	<input type="checkbox"/>		
Report top	<input type="text" value="AUTO"/> hits		
<input type="button" value="Start Search ..."/>		<input type="button" value="Reset Form"/>	

ภาพที่ 2-13 โปรแกรม MASCOT

ที่มา: <http://www.matrixscience.com>

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ศึกษา

เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบจากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยบริเวณสะพานอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบระยะโตเต็มวัยที่มีขนาดเปลือกประมาณ 4-7 เซนติเมตร จำนวน 50 ตัว

3.2 การเลี้ยงปรับสภาพหอยนางรม

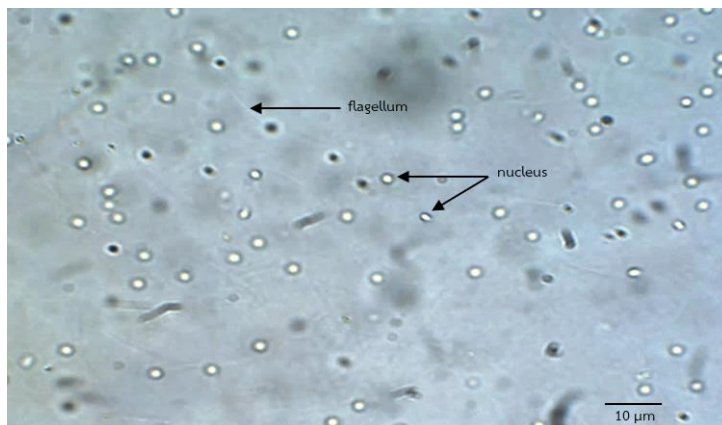
1. นำหอยนางรมปากจีบที่เก็บมาทำความสะอาดโดยใช้แปรงขัดสิ่งสกปรกที่ติดมาให้หลุดออก และแกะเพรียงหินที่ติดมากับเปลือกออก (เพื่อลดการแย่งอาหารจากเพรียงหิน)
2. นำหอยนางรมที่ขัดสิ่งสกปรกและเพรียงออกแล้วมาใส่ตู้เลี้ยงหอย จำนวน 15 ตัว/ตู้ และใส่น้ำทะเลเทียมที่มีความเค็ม 25 ppt. ลงไปในตู้
3. ให้อาหารหอย คือ แพลงก์ตอนพืช (*Nannochloropsis* sp.) และแพลงก์ตอนสัตว์ (*Chaetoceros* sp.) ทุกวัน อย่างละ 1 ลิตร/วัน
4. เลี้ยงหอยเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วันก่อนทำการเก็บตัวอย่าง และเปลี่ยนน้ำเลี้ยงหอยทุก ๆ 3 วัน

3.3 การตรวจสอบเพศหอยนางรม (เพื่อนำมาใช้ในการเก็บตัวอย่างแบบวิธี stripping)

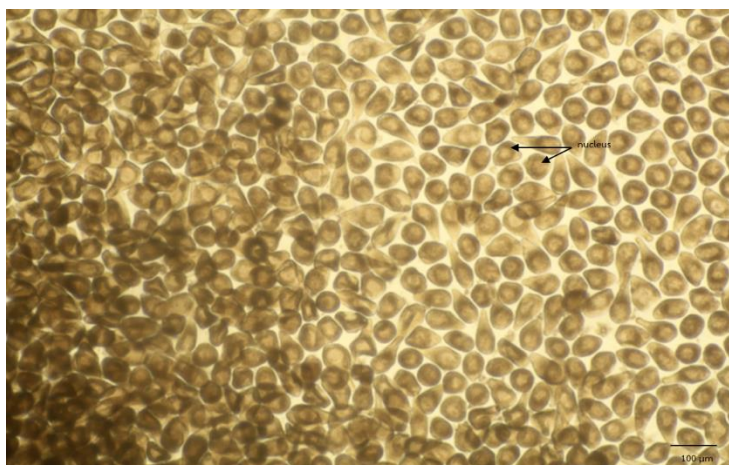
เนื่องจากหอยนางรมปากจีบเป็นสัตว์ที่ไม่สามารถตรวจสอบเพศได้จากการมองด้วยตาเปล่าจากภายนอกได้ จึงต้องใช้เทคนิคการตรวจสอบเพศโดยการส่องดูเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยมีวิธีการ คือ นำหอยนางรมปากจีบมาทำการเปิดเปลือก จากนั้นใช้มีดผ่าตัดเขี่ยบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ซึ่งทำให้เซลล์สืบพันธุ์หลุดติดใบมีดออกมา จากนั้นนำไปป้ายบนสไลด์ แล้วส่องดูเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

- ถ้าเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) จะพบ sperm เคลื่อนที่ (ภาพที่ 3-1)
- ถ้าเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (egg) จะพบเซลล์ไข่ที่มีลักษณะกลมหรือรี และจะพบนิวเคลียสบริเวณกลางเซลล์ (ภาพที่ 3-2)





ภาพที่ 3-1 เซลล์สเปิร์มเพศผู้ (sperm) ของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 3-2 เซลล์สเปิร์มเพศเมีย (egg) ของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เมื่อเลี้ยงหอยครบ 1 สัปดาห์แล้ว จนหอยทุกตัวอยู่ใน conditions เดียวกัน จึงนำหอยมาทำวิจัย โดยในงานวิจัยนี้ แบ่งวิธีศึกษาเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาและการศึกษาโปรตีนที่พบในเซลล์สเปิร์มเพศผู้ (sperm) ของหอยนางรมปากจีบ

งานวิจัยส่วนที่ 1 Histology (TEM)

ในงานวิจัยส่วนแรก ผู้วิจัยทำการศึกษาการเจริญและการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatogenesis) รวมทั้งทำการศึกษารูปร่างและองค์ประกอบที่พบใน sperm เพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับชนิดของโปรตีนที่พบใน sperm ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้ Transmission Electron Microscope (TEM) ในการศึกษาโครงสร้างอย่างละเอียดของ sperm cell ผู้วิจัยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน โดยในส่วนแรก ผู้วิจัยทำการศึกษารูปร่างและองค์ประกอบของ sperm เพื่ออธิบายโครงสร้างภายในเซลล์ โดยการตัดเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) มาศึกษาถึงการเจริญและการพัฒนาของเซลล์ จากหอยนางรมปากจีบเพศผู้จำนวน 3 ตัว ส่วนที่สอง ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่าง sperm จากวิธีการเก็บตัวอย่าง 2 รูปแบบ คือ 1. Stripping 2. Spawning ตัวอย่างละ 3 ตัว เช่นกัน จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดที่ต้องการศึกษามาทำการคงสภาพเซลล์ใน 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) 4 hrs. จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ใน 1% Osmium tetroxide in 0.1 M PBS และนำตัวอย่างผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) จากนั้น infiltrate ด้วย Propylene oxide (PO) และ embed เนื้อเยื่อใน pure Araldite resin จากนั้นนำตัวอย่างไปตัดด้วย Ultramicrotome ด้วยความหนา 90 นาโนเมตร และย้อมด้วย Uranyl acetate in 70% methanol and 0.1% lead citrate จากนั้นนำเซลล์ไปศึกษาผ่าน TEM (TECNAI 20, Philips)

งานวิจัยส่วนที่ 2 Proteomics

ในการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) นั้น ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่าง 2 วิธีดังวิธีการเก็บตัวอย่างในข้อ 3.4

3.4 วิธีการเก็บตัวอย่าง

3.4.1. การเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบบ Stripping method.

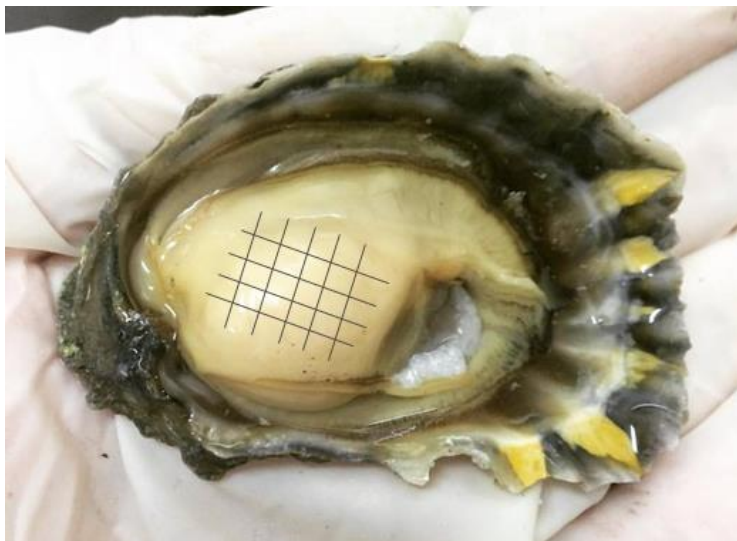
เมื่อทำการตรวจสอบเพศหอยแล้ว นำหอยเพศผู้จำนวน 3 ตัว มารีดเซลล์สืบพันธุ์ออกโดยวิธีการกรีดบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เซลล์สืบพันธุ์ (gonad) เป็นตาราง (ภาพที่ 3-3) โดยพยายามอย่ากรีดลึกลงไปถึงอวัยวะภายใน เนื่องจากใบมีดอาจไปโดนบริเวณต่อมย่อยอาหารได้ ซึ่งภายในบรรจุเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหาร ซึ่งอาจย่อยโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์ได้ และใช้บริเวณสันมีดค่อย ๆ รีดน้ำเชื้อออกมา จะได้น้ำเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น จากนั้นนำไปใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำทะเลเทียมอยู่ เมื่อได้น้ำเชื้อแล้ว ในน้ำเชื้อที่ได้ไปใส่ใน falcon tube 15 ml. และนำไปเข้าเครื่อง centrifuge เพื่อแยกเซลล์สืบพันธุ์ออกจากน้ำทะเล ที่ความเร็ว 3,000g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูด



491486753

BUU-IThesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

ส่วนใสที่เป็นน้ำทะเลออก และดูส่วนที่ตกตะกอน (sperm) ใส่ centrifuge tube ขนาด 1.5 ml และนำตัวอย่างที่ได้ไปแช่ในตู้ -20°C เพื่อหยุดกิจกรรมของเซลล์

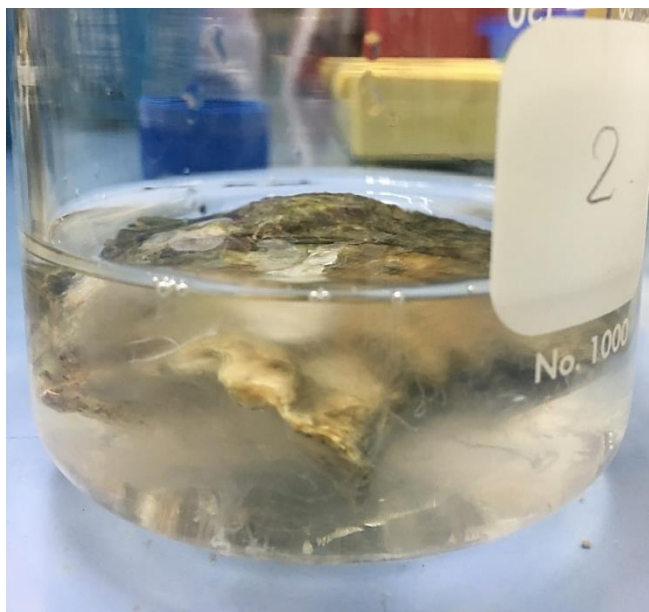


ภาพที่ 3-3 วิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบบ Stripping

3.4.2. การเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบบ Spawning method

เมื่อเลี้ยงปรับสภาพหอยครบ 1 สัปดาห์แล้ว สุ่มตัวอย่างหอยเพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่า หอยมีความสมบูรณ์พันธุ์เป็นอย่างมาก เนื่องจากพบลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เป็นสีขาวขุ่น ซึ่งภายในบรรจุเซลล์สืบพันธุ์อยู่เป็นจำนวนมาก และหอยพร้อมปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมานอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้ว จึงทำการเก็บตัวอย่างซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. นำหอยแต่ละตัวมาใส่ในบีกเกอร์ โดยใส่หอย 1 ตัว/บีกเกอร์ ที่มีน้ำทะเลอยู่ความเข้มข้น 25 ppt.
2. สังเกตลักษณะพฤติกรรมหอย (เวลาที่หอยกำลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สังเกตได้จากหอยจะเปิดปิดเปลือกถี่ขึ้น และในขณะที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์นั้นจะเห็นน้ำเชื้อออกมาจากตัวหอยเป็นสีขาวขุ่น)
3. เมื่อหอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้ว ตรวจสอบเพศโดยการดูน้ำเชื้อที่ปล่อยออกมา จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และแยกเฉพาะหอยเพศผู้ออกมา (ภาพที่ 3-4)
4. และเมื่อได้เซลล์สืบพันธุ์ที่ต้องการแล้ว ทำการแยกเซลล์สืบพันธุ์ออกจากน้ำทะเล ซึ่งใช้วิธีการเดียวกับที่ใช้ในการเก็บเซลล์สืบพันธุ์แบบ stripping



ภาพที่ 3-4 วิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบบ Spawning

3.5 การสกัดโปรตีนจากตัวอย่าง

เนื่องจากตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธีนั้นมีเกลืออยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีผลต่อการแยกโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธี acetone precipitation โดยใช้อัตราส่วน Sample/acetone (1:4) โดยนำ acetone แช่เย็นใน -20°C และนำมาใส่นำตัวอย่างตามอัตราส่วนดังกล่าว และนำไป vortex ทุก 2 นาทีสลับกับการแช่เย็น ทั้งหมด 20 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไป centrifuge ที่ $12,000g$ 4°C เป็นเวลา 15 นาที และดูด acetone ทิ้ง ก่อน dye ตัวอย่างให้แห้งก่อนจะนำตัวอย่างไปสกัดโปรตีนต่อไป (Kingtong *et al.*, 2013; Grintzalis *et al.*, 2009)

หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีนแล้ว นำ lysis buffer ใส่ลงในตัวอย่าง โดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อปริมาตร lysis buffer (1:1) จากนั้นทำการ vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนจะนำตัวอย่างที่ได้ไป centrifuge ที่ความเร็ว $15,000g$ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ และนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดปริมาณของโปรตีนต่อไป หรือหากยังไม่ทำการวัดปริมาณโปรตีนให้เก็บตัวอย่างไว้ที่ -80°C (ทุกขั้นตอนของการสกัดโปรตีนทำบนน้ำแข็งเพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีนเสียสภาพ)

3.6 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford's

3.6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard protein) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับการคำนวณความเข้มข้นโปรตีนในตัวอย่าง (Kingtong *et al.*, 2013) ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ (Bovine serum albumin) BSA โดยเตรียม stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำ stock solution มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/ml และทำ 2-fold dilution จนครบทุกความเข้มข้น เมื่อทำ dilution ครบแล้ว นำโปรตีนแต่ละความเข้มข้นมาไหลลงใน microplate well ละ 200 µl และเติม Bradford's solution ในทุก well ๆ ละ 50 µl จากนั้นทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ประมาณ 5 นาที ก่อนจะนำไป Shaker เป็นเวลา 5 นาที และนำเข้าเครื่อง Microplate reader เพื่อทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. (แต่ละความเข้มข้นของโปรตีนให้เตรียม 2 ครั้ง (1 ครั้งใส่ 2 well เพื่อทำการวัด 2 ซ้ำ) เพื่อหาค่าเฉลี่ย จากนั้นทำการบันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำไปพลอตกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับใช้เทียบเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนต่อไป

3.6.2 เตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างเพื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน

นำตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างมาเจือจางเป็น 500 เท่า และนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่เจือจาง 500 เท่าแล้ว ใส่ใน microplate well ละ 200 µl (ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) และเติมสารละลาย Bradford ลงไป 50 µl ในทุก well ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำไป Shaker เป็นเวลา 5 นาที และนำเข้าเครื่อง Microplate reader เพื่อทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. จากนั้นทำการบันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำไปพลอตกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA โดยสร้างกราฟในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อหาสมการและค่าความสัมพันธ์ (R^2) จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปแทนค่าในสมการเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างต่อไป (Kingtong *et al.*, 2013)

3.7 การแยกโปรตีนโดยใช้วิธี 2D-electrophoresis (มิติที่ 1)

ปรับใช้ตามวิธีการของ (Khondee *et al.*, 2016; Kingtong *et al.*, 2013)

3.7.1 ขั้นตอนการโหลดโปรตีนลงใน IPG strip (Rehydration)

นำโปรตีนที่คำนวณปริมาณที่ต้องการแล้วมาผสมกับสี 0.1% Bromophenol blue 2 μ l เพื่อให้สามารถสังเกตเห็นการดูดซึมของสารละลายโปรตีนเข้าสู่เจล จากนั้นโหลดโปรตีนลงบน tray เฉพาะ และใช้ forceps คีบ IPG strip วางทับลงไปโดยให้ด้านที่มีเจลทับลงบนสารละลายโปรตีนและโหลด DryStrip Cover Fluid ให้ท่วมแผ่น strip ทั้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้สารละลายโปรตีนซึมเข้าสู่เจล จากนั้นนำ IPG strip ไปแยกโปรตีนตามประจุนุติของโปรตีนต่อไป โดยใช้ protocol ดังนี้

4 steps

S1: 300 V 200 Vhr.

S2: 1000 V 300 Vhr.

S3: 5000 V 4500 Vhr.

S4: 5000 V 2000 Vhr.

3.7.2 ขั้นตอน Incubation

นำ IPG strip ไปแช่ใน incubation buffer I และ II ขั้นตอนละ 15 นาที ตามลำดับ เพื่อให้แผ่น strip อยู่ในสภาพที่เหมาะสมที่พร้อมนำไปแยกโปรตีนมิติที่ 2 จึงนำไปแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุลโดยใช้ 12.5% gel SDS-PAGE ต่อไป (Khondee *et al.*, 2016)

3.8. การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE (มิติที่ 2)

ปรับใช้ตามวิธีการของ (Khondee *et al.*, 2016; Kingtong *et al.*, 2013)

3.8.1 ขั้นตอนการเตรียมเจล SDS-PAGE

ทำการโหลด separating 12.5% gel ให้ห่างจากขอบบนของกระจกเซตเจล ประมาณ 1 เซนติเมตร พร้อมใส่ซี่หวี (comb) แบบยาวสำหรับใส่ strip ที่มีช่องไว้สำหรับโหลด protein molecular weight marker 1 ช่อง รอจนกว่าเจลแข็งตัว เมื่อเจลเซตตัวแล้วให้นำซี่หวีออกก็สามารถใช้งานได้

3.8.2 ขั้นตอนการวาง IPG strip ลงบนเจล

คีบแผ่น strip วางลงในช่องที่เตรียมไว้ และโหลด 0.1% Agarose ทับ strip สำหรับยึด IPG strip ไม่ให้เคลื่อนที่ ทั้งไว้ให้ agarose เซตตัว จากนั้นจึงนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าต่อไป



491486753

3.8.3 ขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE

เซตอุปกรณ์รันเจลให้เรียบร้อย จากนั้นโหลด protein molecular weight marker ปริมาตร 10 μ l ลงไปในช่องที่เตรียมไว้ ตั้งกระแสไฟฟ้า 16-18 mA/Strip ทำการรันด้วยกระแสไฟฟ้า ให้สังเกตจนกว่า tracking dye เคลื่อนที่ลงมาจนเลยแผ่นเจล จึงทำการปิด power supply

3.8.4 ขั้นตอนการย้อมสีโปรตีนใน SDS-PAGE

หลังจากแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว แกะแผ่นเจลออกมาจากกระจกและนำไปใส่ภาชนะสำหรับใช้ย้อมสี โดยใช้สี Coomassie Brilliant Blue/CBR-250 ความเข้มข้น 0.1% ย้อมไว้ 1 คืน (overnight)

เมื่อย้อมสีแล้ว นำเจลมาล้างสีออกด้วย destain solution I ครึ่งละ 30 นาที และทำการเปลี่ยน destain ใหม่ (ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง) จากนั้นล้างสีด้วย destain solution II จนกว่าเจลจะใส

3.9. การวิเคราะห์ภาพถ่ายเจลโดยใช้โปรแกรม Delta-2D (Germany)

หลังจากแยกโปรตีนมิติที่ 2 เรียบร้อยแล้ว ให้นำแผ่นเจลมาสแกนด้วย Silver fast® 8 Expression 11000XL หลังจากได้ภาพถ่ายเจลมาแล้ว นำภาพถ่ายเจลมาวิเคราะห์ความแตกต่างของ spot ด้วยโปรแกรม Delta-2D (DECODON, Germany) ซึ่งผู้วิจัยแบ่งข้อมูลที่ได้จากโปรแกรมออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. แผนที่อ้างอิงโปรตีน (Reference map)

เมื่อนำภาพถ่ายเจลเข้าโปรแกรมแล้ว โปรแกรมจะกำหนด spot ให้แบบอัตโนมัติ ซึ่งใช้ Detection parameters คือ local background 50, Average spot 70, sensitivity 80 และทำการตัด spot ทั้งหมด 206 spots ที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า และนำไปย่อยและวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนเพื่อทำเป็น sperm proteome profile reference map ในหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata*

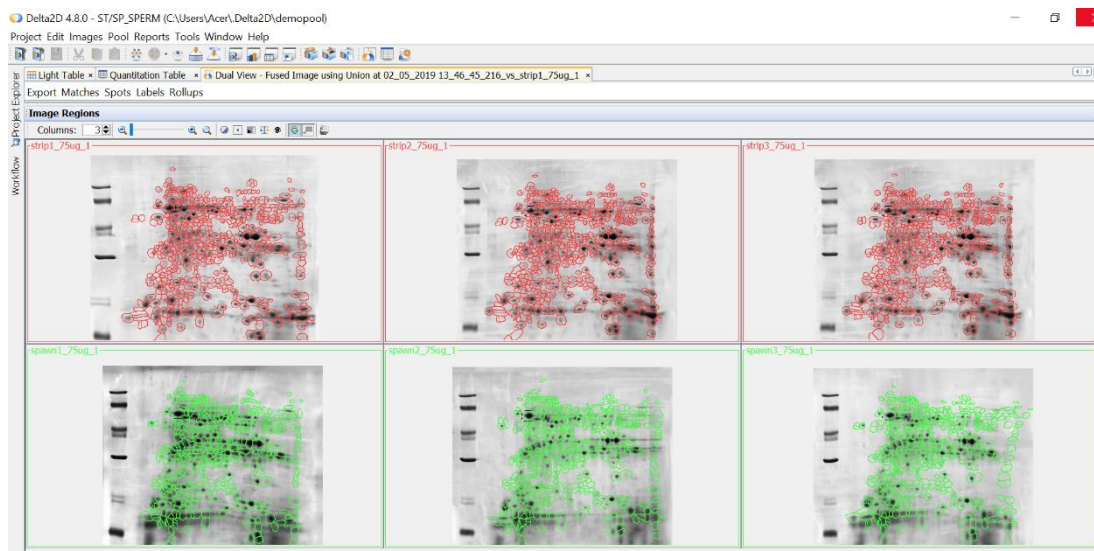
2. เปรียบเทียบความแตกต่างจากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี (Comparisons)

ในส่วนของการวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 stripping คือ sperm ที่เก็บโดยการเก็บจาก gonad โดยตรงและกลุ่มที่ 2 spawning คือ sperm ที่เก็บจากการที่หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เองตามธรรมชาติ ของหอยนางรมปากจีบ โดย criteria ที่ใช้ในการตัดสินใจ คือ 1. P-value (<0.05) 2. Fold change ซึ่งสามารถแบ่งได้



491486753

เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก เป็นกลุ่ม Upregulated ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีค่า fold change (>1.00) และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่ม Downregulated ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีค่า fold change (<1.00)



ภาพที่ 3-5 การวิเคราะห์ภาพถ่ายเจลโดยใช้โปรแกรม Delta2D 4.8.0

3.10 Protein digestions and LC -MS/MS

เมื่อได้ spot ที่สนใจแล้วทำการตัด spot ที่สนใจใส่ใน microcentrifuge tube และนำมาล้างด้วย DI 2 ครั้งๆละ 100 μ l จากนั้นล้างด้วย 50% acetonitrile (ACN)/ 0.1M NH_4HCO_3 50 μ l incubate ที่ 30 $^\circ\text{C}$ 20 นาที ดูดสารทิ้งและทำให้เจลแห้ง (Speed vacuum) จากนั้นใส่ 0.1 M NH_4HCO_3 / 10 mM DTT/ 1mM EDTA 50 μ l incubate at 60 $^\circ\text{C}$ 45 นาที ดูดสารทิ้ง จากนั้นใส่ 100 mM Iodoacetamide/ 0.1 M NH_4HCO_3 50 μ l incubate ที่ 25 $^\circ\text{C}$ 30 นาทีในที่มืด ดูดสารทิ้ง จากนั้นทำการล้างด้วย 0.05 M Tris-HCl, pH8.5/ 50% ACN 3 ครั้งๆละ 50 μ l และทำให้เจลแห้ง (Speed vacuum) จากนั้นใส่ digestion buffer ที่มี trypsin ลงไป 30 μ l/1 tube incubate ที่ 37 $^\circ\text{C}$ overnight และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) LC; (Water corporation Milford, nanoACQUITY system, USA), MS; (Bruker Billerica, AmaZon™ speed ETD mass spectrometer, USA)



3.11 Bioinformatics

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับ peptide ด้วย MS/MS ผู้วิจัยได้ไฟล์ ที่มีนามสกุล .mgf มา จากนั้นผู้วิจัยจะนำไฟล์ดังกล่าวไปค้นหาและระบุชนิดโปรตีนในโปรแกรม Mascot ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ช่วยระบุชนิดโปรตีนโดยใช้ข้อมูลที่ได้จาก Mass spectrometer โปรแกรม Mascot จะทำหน้าที่แปรผลข้อมูล spectrum ในไฟล์ .mgf ให้กลายเป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อนำไปใช้ในการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่อไปว่าลำดับกรดอะมิโนชนิดนี้ไปเหมือนกับองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตอะไรบ้างที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยหลังจากที่ได้ลำดับกรดอะมิโนแล้ว ให้นำข้อมูลที่ได้ไปค้นหาในฐานข้อมูล เช่น SWISS-PROT, GenBank, Uniprot, NCBI, EMBL หรือ DDBJ ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่หลายประเทศพัฒนามาเพื่อการเรียนรู้ และสามารถใช้เพื่อระบุชนิดโปรตีนที่พบในตัวอย่างที่ทำการศึกษา



491486753

บทที่ 4 ผลการวิจัย

ผลการวิจัยในครั้งนี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 คือ การศึกษาทางจุลกายวิภาค (Histology) ถึงการเจริญ การพัฒนา และโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیبในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และโครงสร้างของเซลล์ที่เกิดจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 stripping method ซึ่งเป็นการรีดน้ำเชื้อออกมาจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยตรง วิธีที่ 2 spawning method เป็นการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อที่หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาเองในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ในการศึกษา และการศึกษาในส่วนที่ 2 คือ การศึกษาทางโปรตีน (Proteomics) โดยเป็นการศึกษาถึงโปรตีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیبที่สามารถระบุชนิดโปรตีนได้เพื่ออธิบายกลไกการทำงานของโปรตีนและการศึกษาถึงความแตกต่างของโปรตีนที่ได้จากการเก็บตัวอย่างใน 2 วิธี คือ stripping และ spawning method เพื่ออธิบายถึงการแสดงออกของโปรตีนที่แสดงออกมากขึ้นหรือลดบทบาทหน้าที่ลง เมื่อเซลล์สืบพันธุ์กำลังพัฒนาภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จนกระทั่งเซลล์อยู่ในระยะสมบูรณ์พันธุ์ที่พร้อมปล่อยออกมาสู่ธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค 2D-gel electrophoresis ในการศึกษา ซึ่งผลการวิจัยในส่วนต่าง ๆ สามารถอธิบายได้ดังนี้

งานวิจัยส่วนที่ 1 การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (Histology)

ในงานวิจัยส่วนแรกเป็นการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب โดยการใช้ TEM สามารถอธิบายผลการวิจัยได้ดังนี้

4.1 การเจริญและการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*)

ผู้วิจัยทำการศึกษาโครงสร้างที่พบใน sperm ด้วยการใช้ TEM ในการศึกษาพบว่า การเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب มีการเจริญอยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubule) ซึ่งเซลล์ที่อยู่ติดกับขอบท่อ (acinus wall) เป็นเซลล์เริ่มแรกในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ เรียกการเจริญขั้นนี้ว่า Spermatogonium (2n) จากนั้นเซลล์จะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเซลล์เรื่อย ๆ (mitosis) จนเซลล์พัฒนาเข้าสู่ระยะ Primary spermatocyte (Psc) (2n) ในระยะนี้เซลล์จะมีนิวเคลียสเล็กลงและโครโมโซมเริ่มมอด



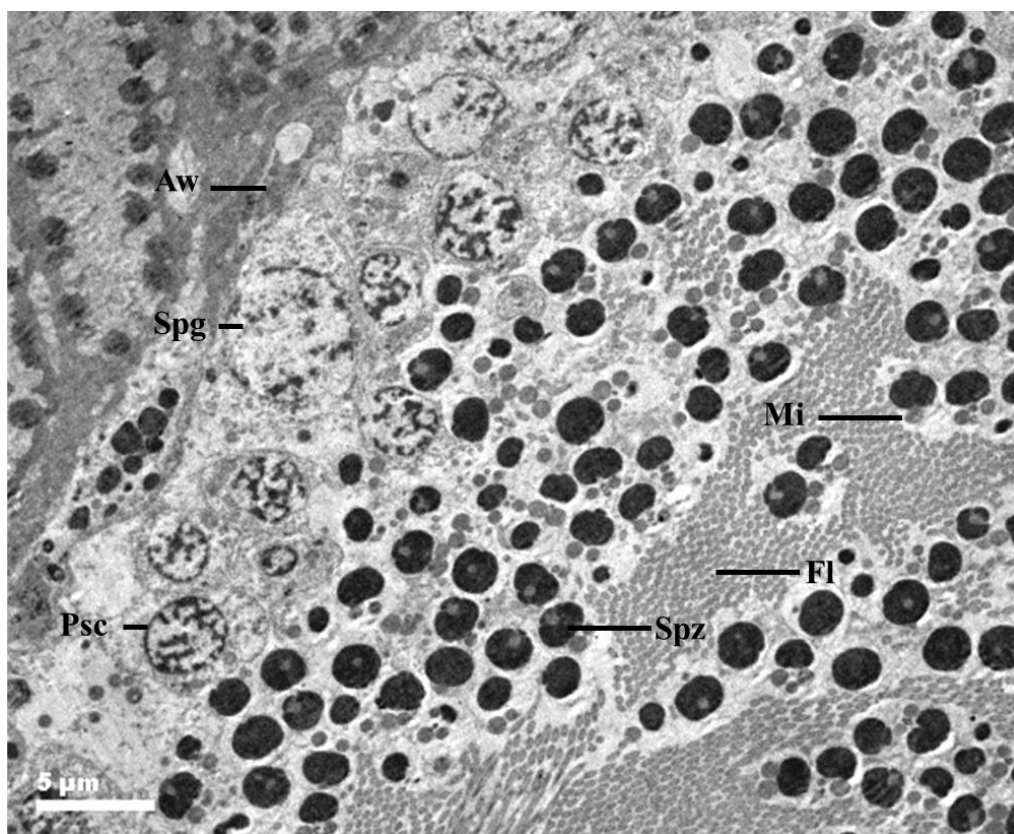
491486753

BUU-1Thesis 59910212 thesis / rev: 29082563 12:06:53 / seq: 23

ตัวหนาขึ้น โดยโปรตีน synaptonemal complex เป็นตัวยึด homologous chromosome เข้าด้วยกัน จากนั้น Primary spermatocyte จะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) เพื่อเป็นการลดโครโมโซมลงครึ่งหนึ่ง (n) เพื่อพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ เซลล์จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ secondary spermatocyte (n) โดยในหอยนางรมเซลล์จะพัฒนาเซลล์เข้าสู่ด้านใน gonadal tubule จากนั้นเซลล์จะเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) จาก spermatid เป็น spermatozoa ซึ่งเซลล์จะเริ่มสร้างส่วน acrosome และส่วนหาง (flagellum) เซลล์ที่พัฒนาแล้วจะอยู่ด้านในของท่อ ซึ่งเป็นระยะการเจริญเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยสมบูรณ์ที่พร้อมจะปล่อยออกนอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยเซลล์ในระยะนี้จะมีการพัฒนาของส่วนหาง flagellum (Fl) มากขึ้นซึ่งเซลล์จะใช้ส่วนหางในการเคลื่อนที่เมื่อปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่ภายนอก และส่วนประกอบที่สำคัญที่พบมากในระยะนี้คือ Mitochondria (Mi) ซึ่งเป็น organelle ที่ทำหน้าที่ผลิตพลังงานที่จำเป็นต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์ในระยะเริ่มต้น เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ต้องใช้พลังงานในการสร้างส่วนหางและใช้ในกระบวนการแบ่งเซลล์เพื่อเจริญและพัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ที่พร้อมปล่อยออกนอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยเรียกระยะการเจริญนี้ว่า Spermatozoa (Spz) (ภาพที่ 4-1)



491486753

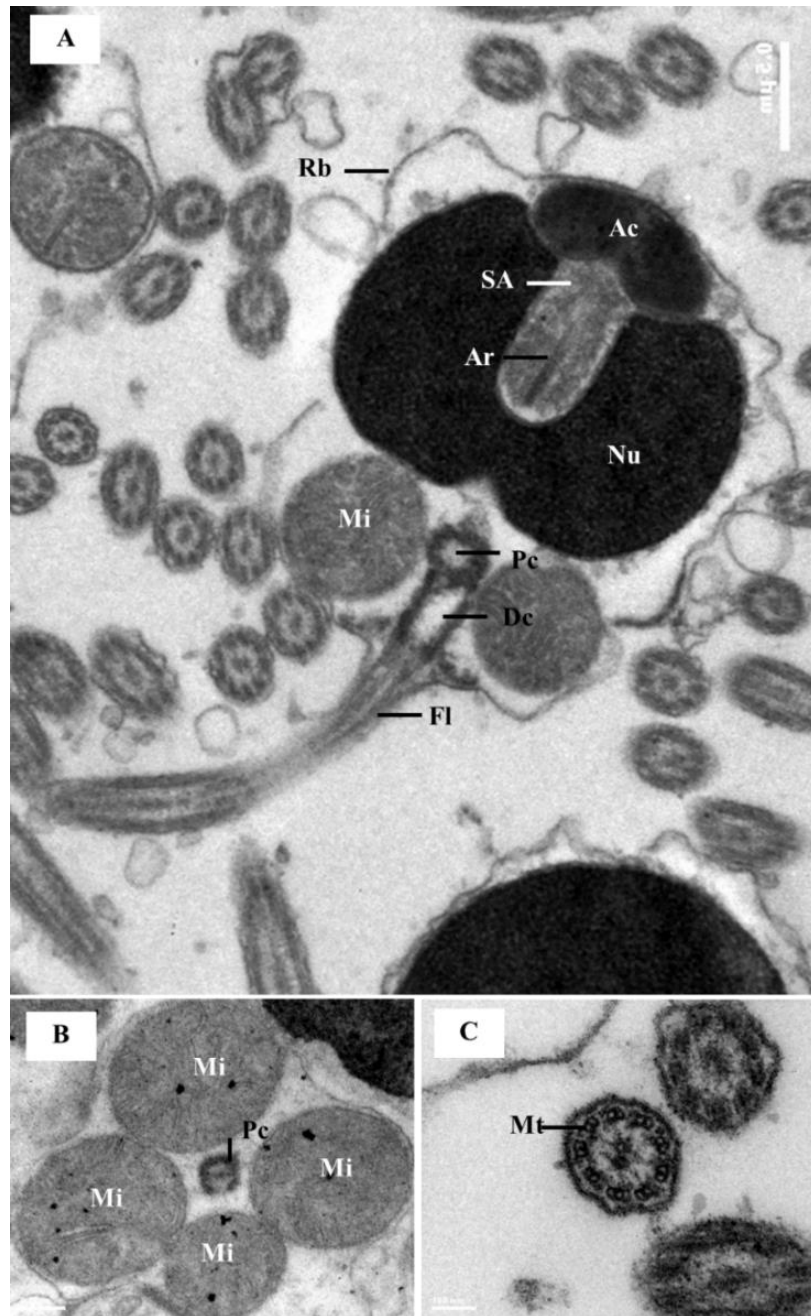


ภาพที่ 4-1 การเจริญและพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal tubule) ใน หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

(หมายเหตุ: Aw=Acinus wall, Mi=Mitochondria, Psc=Primary spermatocyte, Spg=Spermatogonium, Spz= Spermatozoa, Fl=Flagellum)

สำหรับโครงสร้างของ sperm ในหอยนางรมปากจีบ จากการศึกษาพบว่า โครงสร้างเซลล์ ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ (ภาพที่ 4-2A) ได้แก่ ส่วนที่ 1 ส่วนหัว (Head) ประกอบด้วยส่วน acrosome (Ac) ซึ่งภายในบรรจุ enzyme ที่ใช้ในการย่อยชั้น zona pellucida ของเซลล์ไข่ใน ขั้นตอนการปฏิสนธิ และ Nucleus ซึ่งบรรจุสารพันธุกรรม (DNA) ไว้ภายใน โดยบริเวณกลาง นิวเคลียสมีแกนตรงกลางเรียกว่า Axial rod (Ar) ที่ทำหน้าที่คงรูป sperm ไว้ ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อ เทียบกับขนาดที่พบใน sperm ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ส่วนที่ 2 Mitochondria (Mi) ซึ่ง sperm ใช้ mitochondria เป็นแหล่งผลิตพลังงานที่สะสมภายในเซลล์ ใน sperm ของ *S. Cucullata* พบ mitochondria 4 ก้อน โดยในภาพ 4-2B เป็นภาพตัดตามขวางของ mitochondria และโครงสร้าง ส่วนที่ 3 คือ โครงสร้างส่วนหาง (Tail) เป็นส่วนของ Flagellum (Fl) ที่ sperm ใช้ในการเคลื่อนที่ เมื่อ cross section บริเวณหางพบ axoneme ที่เป็นส่วนของ microtubule (Mt) เรียงตัวกันแบบ

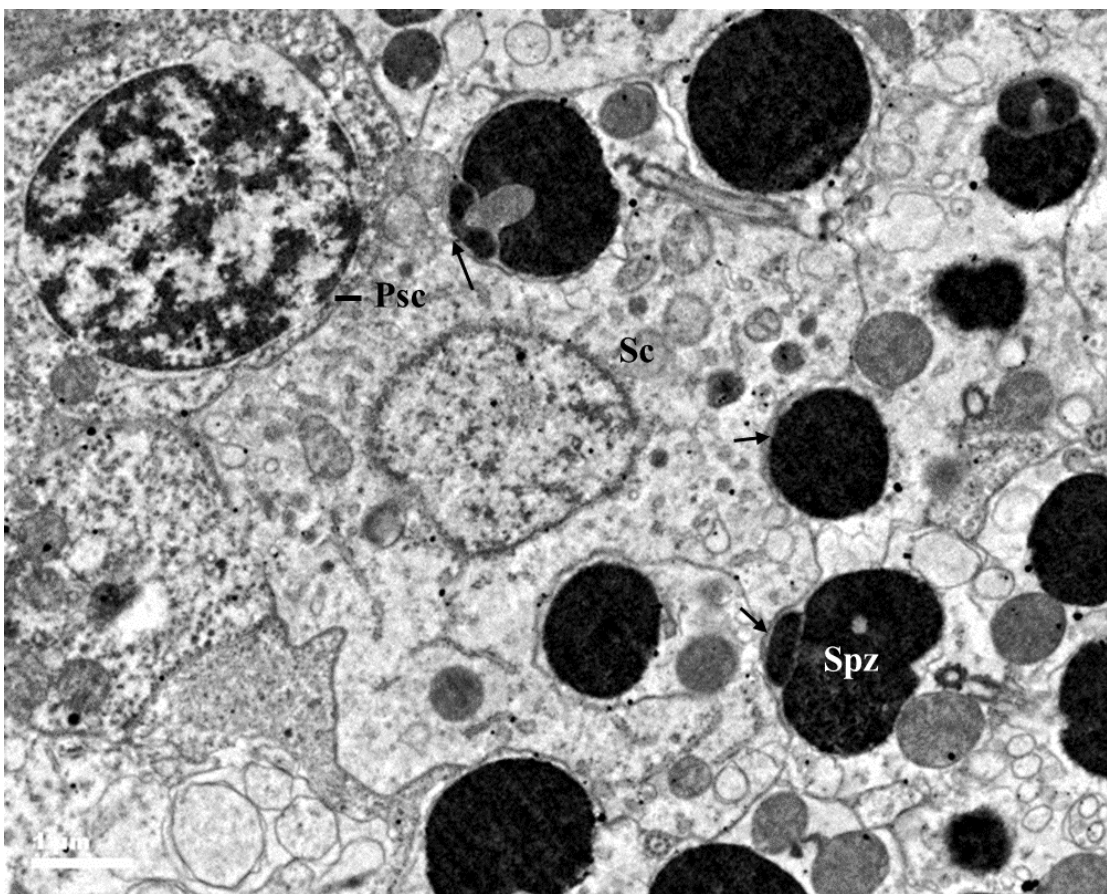
9+2 (ภาพ 4-2C) โดยในส่วนโคนหางพบ centriole วางตัวตั้งฉากกัน 2 แห่ง เรียกแกนนอนว่า Proximal centriole (Pc) และแกนตั้งเรียกว่า Distal centriole (Dc)



ภาพที่ 4-2 โครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

(หมายเหตุ: Ac=Acrosome, Ar=Axial rod, Dc=Distal centriole, Fl=Flagellum, Mi=mitochondria, Mt=microtubule, Nu=nucleus, Pc=Proximal centriole, Rb=Residual body, SA=Subacrosomal space)

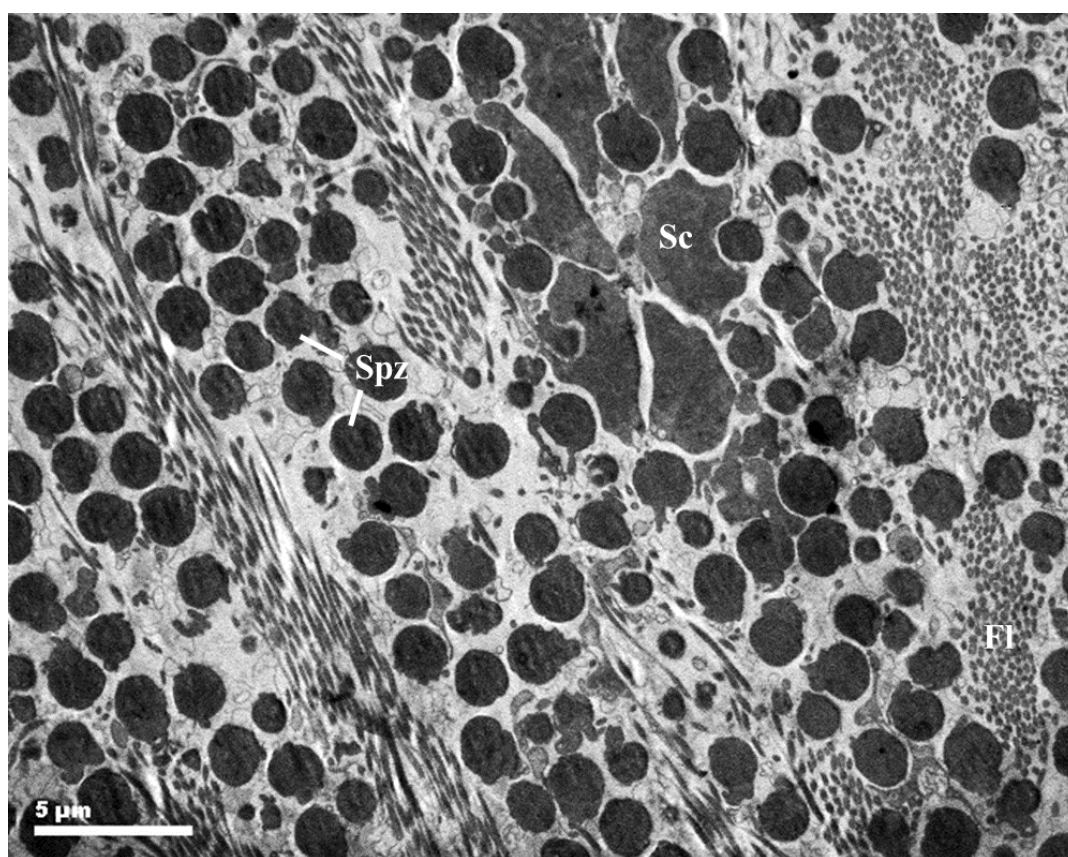
ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมพบ sertoli cell (Sc) ซึ่งมีลักษณะเซลล์เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ นิวเคลียสไม่กลมและแทรกตัวอยู่ร่วมกับเซลล์ที่กำลังพัฒนาอยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (ภาพที่ 4-3) สำหรับ sertoli cell ที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์นั้นทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่เลี้ยงซึ่งภายในสะสมพลังงานที่จำเป็นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์แรกเริ่ม จากลูกศรชี้แสดงให้เห็นถึงการเชื่อมต่อระหว่าง sertoli cell กับ developing sperm ซึ่งผู้วิจัยคิดว่าเป็น adheren junction เพื่อให้เกิดการสื่อสารกันระหว่างเซลล์ได้เช่นเดียวกันกับที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์ชนิดอื่น



ภาพที่ 4-3 Sertoli cell ที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)
(หมายเหตุ: Psc=Primary spermatocyte, Sc=Sertoli cell, Spz= Spermatozoa)

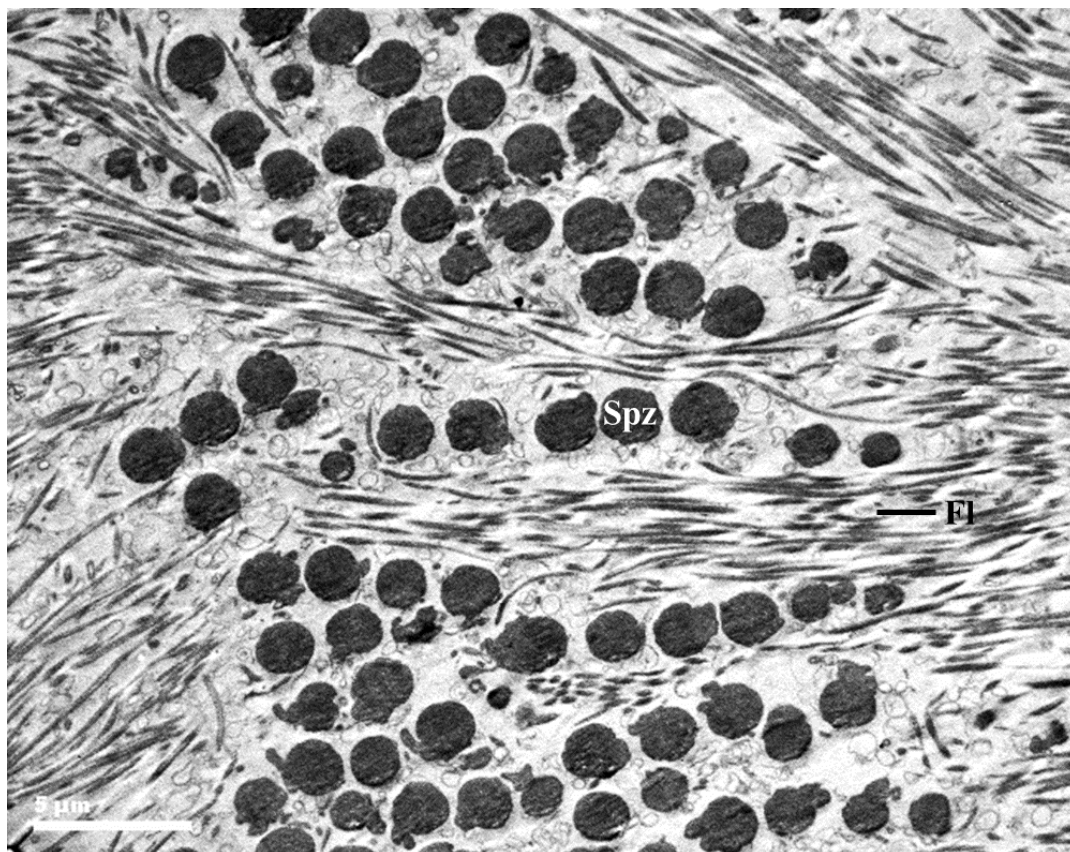
4.2 ความแตกต่างของโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیبจากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี

เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างเบื้องต้นของ sperm แล้วผู้วิจัยทำการศึกษาหาความแตกต่างระหว่าง sperm จากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธี คือ การเก็บตัวอย่างวิธีที่ 1 คือ Stripping method ซึ่งเป็นวิธีที่กรีตบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อนำเซลล์สืบพันธุ์ออกมาโดยตรง และการเก็บตัวอย่างในวิธีที่ 2 คือ Spawning method ซึ่งเป็นวิธีที่ให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาตามธรรมชาติในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม



ภาพที่ 4-4 โครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จากการเก็บตัวอย่างแบบ stripping ในหอยนางรมปากจیب (*S. cucullata*)

(หมายเหตุ: F=Flagellum, Sc=Sertoli cell, Spz= Spermatozoa)



ภาพที่ 4-5 โครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จากการเก็บตัวอย่างแบบ spawning ในหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

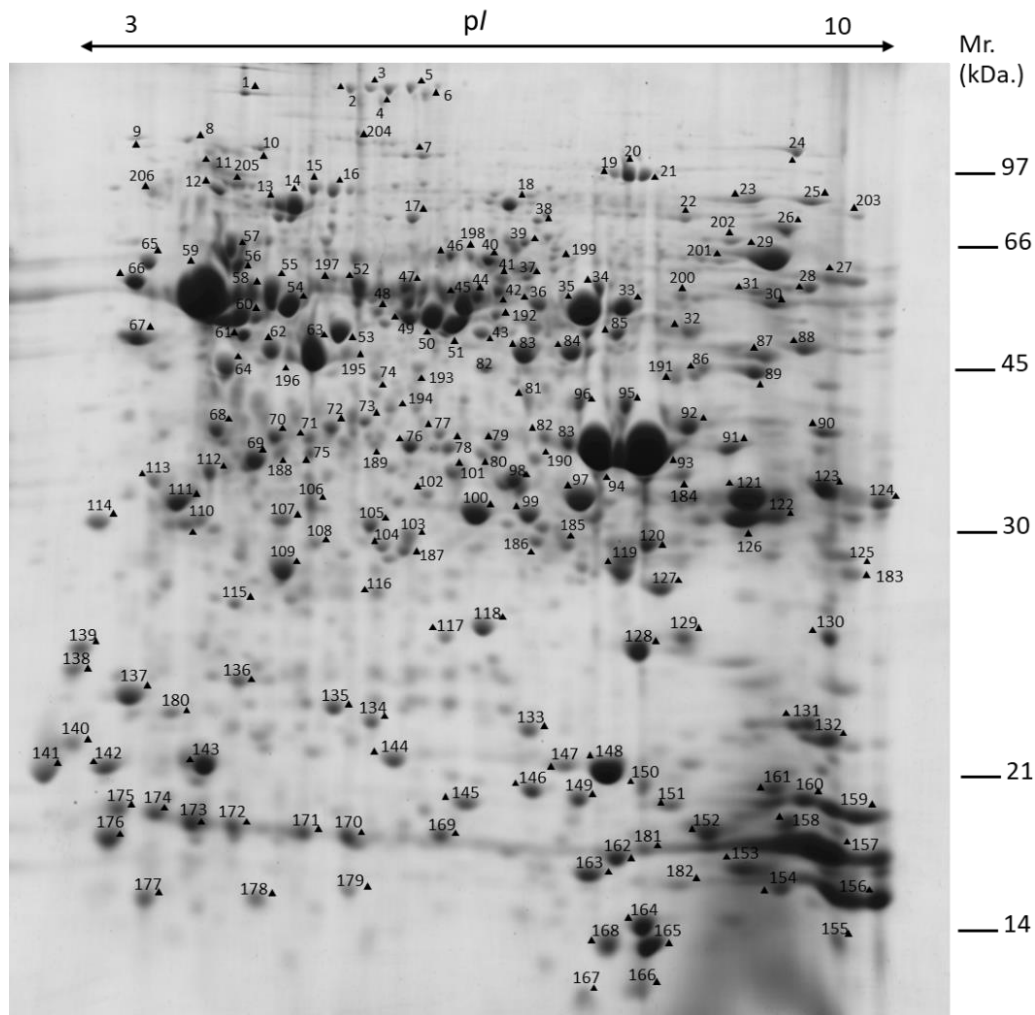
(หมายเหตุ: F=Flagellum, Spz= Spermatozoa)

จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทั้ง 2 วิธีได้ตัวอย่างเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งในวิธีที่ 1 เป็นการเก็บตัวอย่างแบบ stripping โดยเป็นการรีดน้ำเชื้อจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยตรง เมื่อนำไปศึกษาด้วย TEM ได้ผลการศึกษา (ภาพที่ 4-4) พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่กำลังพัฒนาและพัฒนาสมบูรณ์แล้ว (spermatozoa) กล่าวคือ พบการพัฒนาของส่วนหางทำให้ทราบว่าเซลล์ที่พบนั้นกำลังเจริญเข้าสู่ระยะสมบูรณ์แล้ว นอกจากนี้ สิ่งสำคัญที่พบจากการเก็บตัวอย่างแบบ stripping คือ พบ sertoli cell (Sc) (ภาพที่ 4-4) ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่อยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์หลุดติดมากับเซลล์เริ่มต้นในกระบวนการพัฒนาของเซลล์ (spermatogenesis) โดยกระบวนการในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้นต้องใช้ sertoli cell ในการผลิตสารและเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ที่กำลังพัฒนาอยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งไม่พบในภาพที่ 4-5 ที่เป็นการเก็บตัวอย่างเซลล์ในวิธีที่ 2 คือ การเก็บตัวอย่างเซลล์แบบ spawning อีกทั้งขนาดเซลล์ที่พบในภาพ 4-4 มีทั้งเซลล์ขนาดใหญ่และเซลล์ขนาดเล็ก ซึ่งบ่งบอกถึงการเจริญของเซลล์ในแต่ละระยะ โดย

ในการเก็บตัวอย่างเซลล์แบบ spawning ในภาพ 4-5 นั้น พบว่า เซลล์สืบพันธุ์มีความสมบูรณ์ของเซลล์มากขึ้น เนื่องจากพบส่วนหาง (flagellum) ซึ่งเป็นส่วนที่พัฒนามาเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่และสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีการเจริญสมบูรณ์แล้วเท่านั้น โดยเรียกกระบวนการเจริญนี้ว่า spermatozoa

4.3 แผนที่อ้างอิงโปรตีน (Reference map) ที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

การศึกษาโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบโดยสร้างจากโปรตีนที่พบจากการเก็บตัวอย่างแบบ spawning ผู้วิจัยใช้เทคนิค 2-DE electrophoresis ในการแยกโปรตีนเพื่อนำผลที่ได้ไปจัดทำแผนที่อ้างอิงโปรตีน (ภาพที่ 4-6) เพื่อระบุ protein spot สำหรับใช้ในการตัดเพื่อนำไปย่อยและระบุชนิดโปรตีนที่สามารถจำแนกได้เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลของสิ่งมีชีวิต ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดจำนวน 206 spots โดยใช้เกณฑ์ในการตัดสินใจในการศึกษา คือ สามารถ detect ได้จากโปรแกรม Delta-2D (DECODON) และสามารถตัดได้จากการมองเห็นด้วยตาเปล่า (P-value<0.05) และนำโปรตีนไปย่อยด้วย trypsin ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS (LC; Water corporation Milford, nanoACQUITY system, USA, MS/MS; AmaZon™ speed ETD mass spectrometer, Bruker Billerica, USA) จากนั้นใช้โปรแกรม Mascot และ Uniprot เพื่อระบุชนิดโปรตีนที่สามารถจำแนกได้ ซึ่งได้ผลการศึกษา (ภาพที่ 4-6)

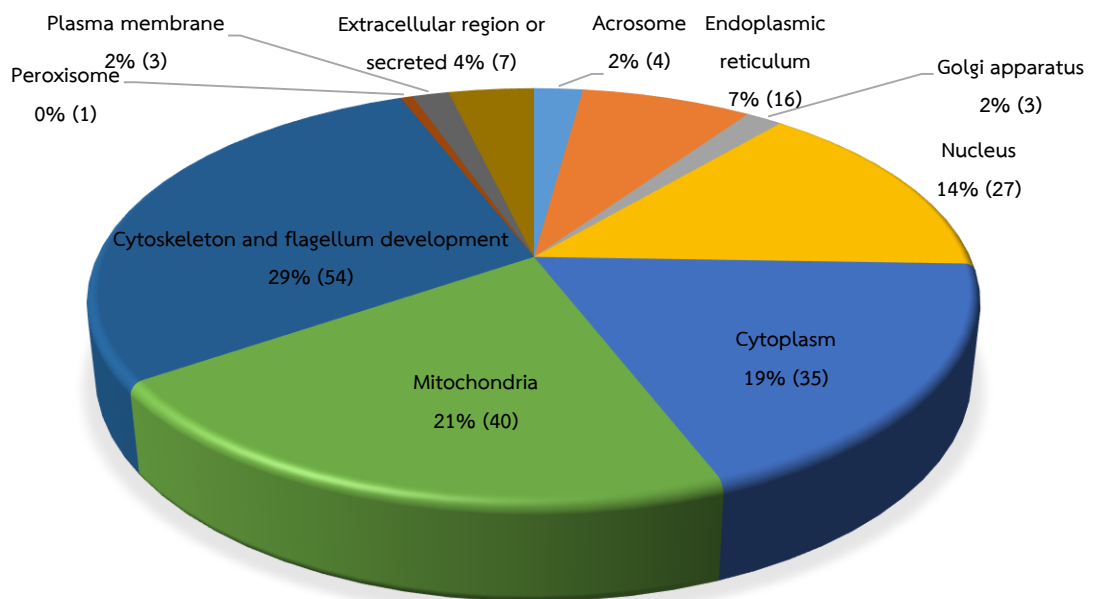


ภาพที่ 4-6. แผนที่อ้างอิงโปรตีน (Reference map) ที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) จากการเก็บตัวอย่างแบบ spawning (100 µg, pH3-10 NL IPG, 12.5% SDS-PAGE)

4.4 การจำแนกชนิดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

เมื่อผู้วิจัยได้จุดโปรตีนที่สนใจแล้วจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS จำนวน 206 จุด เมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และใช้ฐานข้อมูล SwissProt โดยใช้โปรแกรม mascot (<http://www.matrixscience.com>) ในการระบุชนิดโปรตีน สามารถระบุโปรตีนได้ทั้งหมด 188 จุด โดยเป็นโปรตีนทั้งหมด 112 ชนิด จากนั้นใช้โปรแกรม Uniprot ในการจัดกลุ่มโปรตีนตาม Gene ontology (Cellular component) ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม ตามตำแหน่งที่พบ

คือ กลุ่มที่ 1. Acrosome (4, 2%) กลุ่มที่ 2. Endoplasmic reticulum (16, 7%) กลุ่มที่ 3. Golgi apparatus (3, 2%) กลุ่มที่ 4. Nucleus (27, 14%) กลุ่มที่ 5. Cytoplasm (35, 19%) กลุ่มที่ 6. Mitochondria (40, 21%) กลุ่มที่ 7. Cytoskeleton and flagellum development (54, 29%) กลุ่มที่ 8. Peroxisome (1, 0%) กลุ่มที่ 9. Plasma membrane (3, 2%) กลุ่มที่ 10. Extracellular region or secreted (7, 4%) (ภาพที่ 4-7) และแสดงรายละเอียดต่าง ๆ ของโปรตีนที่พบพร้อมระบุหน้าที่ของโปรตีน (ตารางที่ 4-1) (โปรตีนแต่ละกลุ่มจัดเรียงตามค่า spot volume)



ภาพที่ 4-7 กราฟการแบ่งกลุ่มของโปรตีนทั้งหมด 188 จุด ตามแหล่งที่พบโปรตีน

ตารางที่ 4-1 การระบุชนิดโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
กลุ่มที่ 1 Acrosome							
53, 107, 116	P41339	Actin, acrosomal process isoform	ATP binding	1.0036	41748	5.36	<i>Limulus polyphemus</i>
121	P68002	Voltage-dependent anion-selective channel protein	binding of sperm to zona pellucida , signaling pathway	0.9525	31600	7.48	<i>Bos taurus</i>
กลุ่มที่ 2 Endoplasmic reticulum							
2, 23, 26, 50, 54, 78, 80	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	-	2.6725	842	9.62	<i>Chionoecetes opilio</i>
66	P52193	Calreticulin	protein folding	0.3527	48009	4.31	<i>Bos taurus</i>
88	P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	fatty acid beta-oxidation	0.2292	51262	9.45	<i>Homo sapiens</i>

Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
158	P80311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	protein refolding	0.1324	23729	9.33	<i>Bos taurus</i>
12	Q91883	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	protein folding	0.0798	72591	4.96	<i>Xenopus laevis</i>
8	P08110	Endoplasmin	protein folding	0.0486	91498	4.83	<i>Gallus gallus</i>
74	P00450	Ceruloplasmin	post-translational protein modification	0.0332	122128	5.44	<i>Homo sapiens</i>
205	P19208	Heat shock 70 kDa protein	cellular response to unfolded protein, chaperone cofactor-dependent protein refolding	0.0272	72901	5.00	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
กลุ่มที่ 3 Golgi apparatus							
103	P02663	AlphaS2casein	defense response to bacterium,	0.2635	26002	8.54	<i>Bos taurus</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
102, 190	P02666	Betacasein	response to progesterone	0.1046	25091	5.26	<i>Bos taurus</i>
กลุ่มที่ 4 Nucleus							
25, 131, 153, 154, 155, 156, 157, 177, 179, 182, 183	P84048	Histone H4	nucleosome assembly	4.0023	11374	11.36	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
152	Q24JY1	60S ribosomal protein L23a	ribosomal large subunit assembly, translation	1.5925	17684	10.44	<i>Bos taurus</i>
60	O42587	26S proteasome regulatory subunit 6A-A	protein catabolic process	1.0542	45202	5.2	<i>Xenopus laevis</i>
159	Q569M3	Histone H3-like centromeric protein A	DNA binding	1.0412	17332	11.55	<i>Xenopus laevis</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
146, 176	Q96QV6	Histone H2A type 1-A	chromatin organization	0.9132	14225	10.86	<i>Homo sapiens</i>
128	Q8K586	GTP-binding nuclear protein Ran, testis-specific isoform	protein binding	0.8017	24436	6.6	<i>Rattus norvegicus</i>
162	Q27442	Histone H2B	nucleosome assembly	0.5673	13751	10.34	<i>Anopheles gambiae</i>
111, 113	P92177	14-3-3 protein epsilon	positive regulation of Ras protein signal transduction	0.5407	29780	4.68	<i>Drosophila melanogaster</i>
49	Q5E9F9	26S proteasome regulatory subunit	RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly	0.3466	48603	5.71	<i>Bos taurus</i>



491486753

Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
90	B0R061	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A	ATP-dependent chromatin remodeling	0.3281	110276	6.22	<i>Danio rerio</i>
161	P52010	Peptidylprolyl cis-trans isomerase	protein refolding	0.3219	18523	8.23	<i>Caenorhabditis elegans</i>
76	Q75DS1	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	transcription by RNA polymerase I	0.1796	134200	6.78	<i>Ashbya gossypii</i>
134	Q5E9B8	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7	transcription by RNA polymerase II	0.1772	19282	5.33	<i>Bos taurus</i>
181	Q32LA7	Histone H2A.V	chromatin organization	0.1056	13501	10.58	<i>Bos taurus</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
185	P08106	Heat shock 70 kDa protein	cellular response to unfolded protein , chaperone cofactor-dependent protein refolding	0.1029	69708	5.53	<i>Gallus gallus</i>
191	P11147	Heat shock 70 kDa protein cognate 4	protein refolding	0.0327	71087	5.36	<i>Drosophila melanogaster</i>
กลุ่มที่ 5 Cytoplasm							
82, 83, 93, 94	O15990	Arginine kinase	glycolytic process	5.6733	39077	7.12	<i>Liolophura japonica</i>
99, 101, 119	P51544	Arginine kinase	glycolytic process	1.9596	39789	5.73	<i>Haliotis madaka</i>
164, 165	P69310	Ubiquitin	Cell cycle	1.9504	8520	6.56	<i>Avena sativa</i>
148	O61219	N-alpha-acetyltransferase daf-31	regulation of DNA- binding transcription factor activity	1.5081	21149	7.74	<i>Caenorhabditis elegans</i>
28, 30, 31, 92, 95, 96, 186	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	glycolytic process	1.4680	39531	8.61	<i>Salmo salar</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
141	P02595	Calmodulin	calcium ion binding	1.0085	16802	4.04	<i>Patinopecten</i> sp.
170	Q76181	40S ribosomal protein S12	translation	0.9771	14505	6.81	<i>Bos taurus</i>
132	Q1RMH8	Sorting nexin-3	endosome transport	0.6740	18751	8.71	<i>Bos taurus</i>
163	P25867	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	chromosome organization	0.6061	16667	6.81	<i>Drosophila melanogaster</i>
184	Q2KJE5	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase, testis specific	glycolytic process	0.4530	43260	8.32	<i>Bos taurus</i>
130	Q3SYR7	60S ribosomal protein L9	cytoplasmic translation	0.4522	21863	9.96	<i>Bos taurus</i>
136	Q3T0F5	Ras-related protein Rab-7a	Rab protein signal transduction	0.3979	23529	6.40	<i>Bos taurus</i>
175	P63099	Calcineurin subunit B type 1	calcium ion binding	0.3644	19288	4.64	<i>Bos taurus</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
45	P42894	Enolase	glycolytic process	0.3265	46988	5.49	<i>Neocallimastix frontalis</i>
72	P23232	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	signal transduction	0.2886	37299	5.76	<i>Loligo forbesi</i>
14	Q9W6Y1	Heat shock cognate 71 kDa protein	protein refolding	0.2540	76121	5.8	<i>Oryzias latipes</i>
38	P01023	Alpha2macroglobulin	regulation of small GTPase mediated signal transduction, stem cell differentiation	0.2341	163159	6.13	<i>Pongo abelii</i>
104	Q589R5	Triosephosphate isomerase	phosphate biosynthetic process and glycolytic process	0.1710	27095	4.77	<i>Oryzias latipes</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
10	Q3ZBT1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	protein catabolic process, mitotic spindle disassembly	0.1240	89274	5.13	<i>Bos taurus</i>
201	Q5R5F6	Haptoglobin	immune system process	0.1014	38471	6.79	<i>Pongo abelii</i>
204	Q94738	97 kDa heat shock protein	ATP binding	0.0893	98385	5.24	<i>Strongylocentrotus franciscanu.</i>
17	P09446	Heat shock 70 kDa protein A	vesicle-mediated transport	0.0245	69680	5.44	<i>Caenorhabditis elegans</i>
กลุ่มที่ 6 Mitochondria							
59, 61, 68, 106, 143, 206	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP synthesis coupled proton transport	4.2454	54074	5.14	<i>Drosophila melanogaster</i>
33, 35, 36, 87, 89, 200	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha	ATP metabolic process	2.1145	57752	8.98	<i>Caenorhabditis elegans</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
97, 98	O02640	Probable malate dehydrogenase	malate metabolic process	1.6255	35098	9.39	<i>Caenorhabditis elegans</i>
126	Q61425	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	positive regulation of cold-induced thermogenesis	1.3795	34442	8.76	<i>Mus musculus</i>
123, 124	Q2HU97	Prohibitin-2	negative regulation of DNA-binding transcription factor activity	1.2198	33337	9.85	<i>Bos taurus</i>
168	Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	chaperone cofactor-dependent protein refolding	0.7928	10925	7.93	<i>Bos taurus</i>
125	P79891	40S ribosomal protein S3	cell cycle	0.4542	27730	9.68	<i>Ambystoma mexicanum</i>
57	Q9VMN5	60 kDa heat shock protein homolog 2	protein folding	0.4259	61548	6.75	<i>Drosophila melanogaster</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
122	B0BM36	Succinate dehydrogenase[ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	electron transport chain	0.4143	32066	8.66	<i>Xenopus tropicalis</i>
145	P04178	Superoxide dismutase [CuZn]	regulation of protein kinase activity	0.3967	15882	6.03	<i>Sus scrofa</i>
189	Q6NVU2	Serine/threonine-protein phosphatase P1gamma catalytic subunit	cell division	0.3152	36932	6.13	<i>Xenopus tropicalis</i>
84	Q17GM7	Probable citrate synthase 1	carbohydrate metabolic process	0.3078	51624	8.91	<i>Aedes aegypti</i>
105	Q9BKU4	Mitochondrial prohibitin complex protein	gonad development	0.2828	29970	6.93	<i>Caenorhabditis elegans</i>
118	O96347	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	-	0.2641	24511	6.71	<i>Charybdis feriata</i>

Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
196	Q3SZI8	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	catabolic process	0.2548	46468	7.1	<i>Bos taurus</i>
64	O94230	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2, mitochondrial	tricarboxylic acid cycle	0.2422	39555	7.71	<i>Kluyveromyces lactis</i>
108	Q3T165	Prohibitin	negative regulation of androgen receptor signaling pathway	0.2270	29786	5.77	<i>Bos taurus</i>
11	P29685	ATP synthase subunit beta	ATP synthesis	0.1502	60221	5.95	<i>Hevea brasiliensis</i>
19, 20, 21	D4AT77	Aconitate hydratase	tricarboxylic acid cycle	0.1332	84006	6.14	<i>Arthroderma benhamiae</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
86	Q55F21	Aspartate Aminotransferase	aspartate biosynthetic process	0.1322	47255	8.84	<i>Dictyostelium discoideum</i>
85	O14254	Probable isocitrate dehydrogenase [NADP]	isocitrate metabolic process	0.1137	49447	9.07	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
32	P25708	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	cellular respiration, mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	0.0947	50620	8.37	<i>Bos taurus</i>
34	P82264	Glutamate dehydrogenase	glutamine metabolic process	0.0694	55359	7.34	<i>Chaenoccephalus aceratus</i>
39	Q11190	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	respiratory electron transport chain	0.0689	65294	6.27	<i>Caenorhabditis elegans</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
115	P42028	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	mitochondrial electron transport	0.0612	23881	6.45	<i>Bos taurus</i>
43	Q60H10	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	long-chain fatty acid catabolic process	0.0423	47807	7.24	<i>Macaca fascicularis</i>
กลุ่มที่ 7 Cytoskeleton and flagellum development							
41, 42, 48, 55, 58, 69, 70, 71, 75, 112	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule-based process	2.6130	49829	4.78	<i>Gallus gallus</i>
63, 195	P84336	Actin, cytoplasmic 1	microtubule-based process	1.0789	41775	5.3	<i>Camelus dromedarius</i>
29	Q2TA38	Tektin-4	flagellated sperm motility	1.0609	51913	6.02	<i>Bos taurus</i>
109	Q9EQ00	Ropporin-1-like protein	flagellated sperm motility	1.0173	24500	5.97	<i>Mus musculus</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
22, 137	P24789	Vimentin-1/2	-	0.6585	1089.512	5.16	<i>Xenopus laevis</i>
44, 52	P68371	Tubulin beta4B chain	microtubule-based process	0.6577	49799	4.79	<i>Homo sapiens</i>
51	Q99JD2	Tektin-1	flagellated sperm motility	0.6433	48561	5.61	<i>Rattus norvegicus</i>
67	Q6VTH5	Radial spoke head 1 homolog	cell differentiation	0.6168	24551	5.09	<i>Cyprinus carpio</i>
40, 46, 56, 65, 180	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	microtubule-based process	0.5958	49894	4.97	<i>Bos taurus</i>
120	Q9DAK2	Parkin coregulated gene protein homolog	spermatid development	0.5337	27708	8.85	<i>Mus musculus</i>
37, 142	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	microtubule-based process	0.4741	49962	4.97	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
24, 27	B2RW38	Cilia- and flagella-associated protein	-	0.4043	103460	8.15	<i>Mus musculus</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pI	Organism
188, 197	Q3MHM5	Tubulin beta4B chain	microtubule-based process	0.3756	49799	4.79	<i>Bos taurus</i>
47	Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	microtubule-based process	0.3531	49799	4.79	<i>Bos taurus</i>
135, 193	O75602	Sperm-associated antigen	spermatid development	0.3498	55441	6.37	<i>Bos taurus</i>
1, 5, 6, 73, 77, 110	P11833	Tubulin beta chain	microtubule-based process	0.3241	50019	4.73	<i>Paracentrotus lividus</i>
133	Q2TBW6	ADP-ribosylation factor-like protein 3	cilium assembly	0.2828	20492	6.74	<i>Bos taurus</i>
7	Q9UI46	Dynein intermediate chain 1, axonemal	flagellated sperm motility	0.2753	79233	6.4	<i>Homo sapiens</i>
62	P90689	Actin	cell motility	0.2548	41683	5.3	<i>Brugia malayi</i>
13, 15	P54652	Heat shock-related 70 kDa protein	male meiosis I, spermatogenesis	0.1788	69978	5.56	<i>Homo sapiens</i>



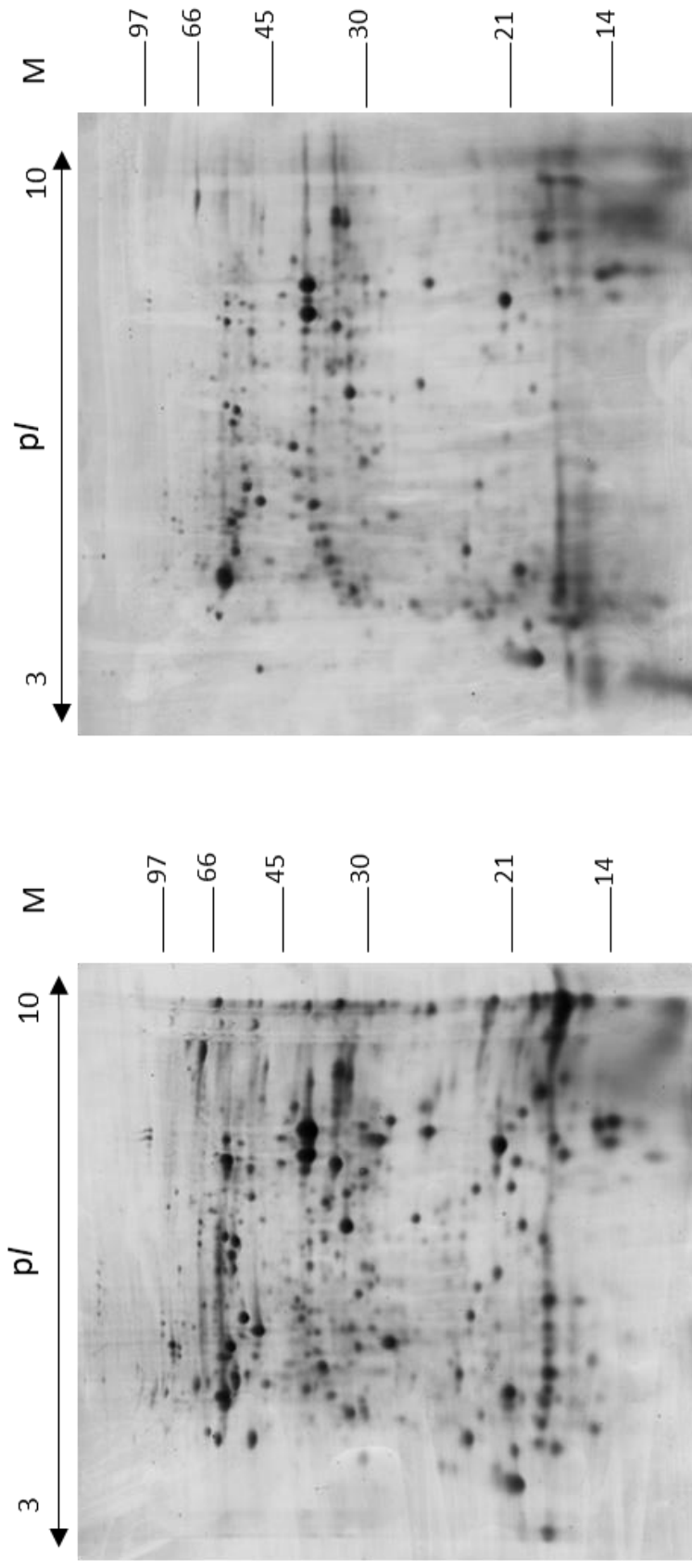
Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pl	Organism
3	Q56A40	Coiled-coil domain-containing protein 40	axonemal dynein complex assembly	0.1546	109425	5.7	<i>Danio rerio</i>
194, 203	P02554	Tubulin beta chain	microtubule-based process	0.1428	49829	4.78	<i>Sus scrofa</i>
192	P23330	Tubulin gamma1 chain	microtubule-based process	0.0997	51136	5.89	<i>Xenopus laevis</i>
79	P60709	Actin, cytoplasmic	cell motility	0.0873	41710	5.29	<i>Homo sapiens</i>
187	Q0PGG4	Actin, cytoplasmic	cell motility	0.0853	41722	5.22	<i>Bos grunniens</i>
198, 199	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	microtubule-based process	0.0356	49962	4.97	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
193	O75602	Sperm-associated antigen 6	spermatid development	0.0293	55441	6.37	<i>Homo sapiens</i>
กลุ่มที่ 8 Extracellular region or secreted							
138, 147, 149, 150, 169, 172	P02754	Beta-lactoglobulin	identical protein binding	2.9917	19870	4.93	<i>Bos taurus</i>
91	G3QY98	Apolipoprotein AI	endocytic vesicle	0.5484	30759	5.56	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>



Spot No.	AC	Protein name	Function	% Spot volume	MW(Da.)	pl	Organism
114	P81605	Dermcidin	killing of cells of other organism	0.0859	11277	6.08	Homo sapiens
กลุ่มที่ 9 Peroxisome							
202	P17336	Catalase	Aging	0.2126	57113	8.39	Drosophila melanogaster
กลุ่มที่ 10 Plasma membrane							
100	Q6TEQ7	Annexin A2	Angiogenesis, positive regulation of calcium ion transport	1.0460	38630	6.92	Canis lupus familiaris
139	Q39222	Ras-related protein RABA1b	Rab protein signal transduction	0.1140	24005	5.59	Arabidopsis thaliana
81	P01834	Immunoglobulin kappa constant	phagocytosis, recognition	0.0088	11758	6.11	Homo sapiens

4.5 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจิบ โดยใช้เทคนิคการรีดน้ำเชื้อ (Stripping method) และเซลล์สืบพันธุ์ปล่อยออกมาตามธรรมชาติ (spawning method)

ผู้วิจัยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยวิธี stripping method คือวิธีที่ให้น้ำเชื้อออกมาจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยตรง และวิธีที่สองคือ วิธี spawning method คือวิธีที่หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาเองตามธรรมชาติในสภาวะที่เหมาะสม โดยผู้วิจัยใช้เทคนิค 2D gel electrophoresis ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนที่พบในการเก็บตัวอย่าง ซึ่งได้ภาพถ่ายเจล (ภาพที่ 4-8) จากนั้นผู้วิจัยใช้โปรแกรม Delta 2D ในการทำ normalization และวิเคราะห์ภาพถ่ายเจล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ spot โดยผู้วิจัยใช้กลุ่ม Spawning method เป็น control group ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อ sperm สมบูรณ์พันธุ์ (mature sperm) มีโปรตีนใดบ้างที่เพิ่มหรือลดการแสดงออก พบโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่าง ว่า มีโปรตีนกลุ่มที่เพิ่มขึ้น (Upregulated) ทั้งหมด 26 จุด ซึ่งเป็นโปรตีนทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ 1. voltage-dependent anion-selective channel protein 2. Ras-related protein Rab-7a 3. Probable citrate synthase 1, mitochondrial 4. Mitochondrial prohibitin complex protein 5. Superoxide dismutase, mitochondrial 6. 26S proteasome regulatory subunit 7. 14-3-3 protein epsilon 8. Actin, acrosomal process isoform 9. ATP synthase subunit beta, mitochondrial 10. Tubulin (alpha, beta chain) ดังตารางที่ 4-1 และมีโปรตีนกลุ่มที่ลดลง (Downregulated) ทั้งหมด 47 spots ซึ่งเป็นโปรตีนทั้งหมด 30 ชนิด คือ 1. 40S ribosomal protein S12 2. 60S ribosomal protein L9 3. Arginine kinase 4. Calmodulin 5. Enolase 6. Fructose-bisphosphate aldolase A 7. Haptoglobin 8. Heat shock 70 kDa protein 9. Heat shock cognate 71 kDa 10. Actin, cytoplasmic 11. Cilia- and flagella-associated protein 58 12. Heat shock-related 70 kDa protein 13. Radial spoke head 1 homolog 14. Ropporin-1-like protein 15. Tektin-4 16. Calreticulin 17. Heat shock 70 kDa protein 18. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) 19. Trifunctional enzyme subunit beta 20. Beta-lactoglobulin 21. Aconitate hydratase 22. Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase 23. Glutamate dehydrogenase 24. Prohibitin 25. DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2 26. DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7 27. Heat shock 70 kDa protein cognate 4 28. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 29. Histone 30. Ras-related protein RABA1b (ตารางที่ 4-2)



Stripping method

Spawning method

ภาพที่ 4-8 ภาพถ่ายผลจากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี (pH3-10 NL IPG, 12.5% SDS-PAGE (75 µg)



ตารางที่ 4-2 การแสดงออกของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ที่เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

No.	Spot ID	Gene ontology	Protein name	% volume	MW. (Da.)	pI.	Fold change	T-Test
Up-regulation								
1	121	Acrosome	Voltage-dependent anion-selective channel protein	0.9525	31600	7.48	1.356	0.036
2	53, 116	Acrosome	Actin, acrosomal process isoform	0.6789	41748	5.36	1.082	0.008
3	60	Nucleus	26S proteasome regulatory subunit 6A-A	1.0542	45202	5.20	1.187	0.009
4	111	Nucleus	14-3-3 protein epsilon	0.5138	29780	4.68	1.748	0.001
5	136	Cytoplasm	Ras-related protein Rab-7a	0.3979	23529	6.40	1.474	0.004
6	33,35, 59,61, 106	Mitochondria	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4.1603	57752, 54074	8.98, 5.14	1.019	0.009
7	84	Mitochondria	Probable citrate synthase 1, mitochondrial	0.3078	51624	8.91	1.471	0.048
8	105	Mitochondria	Mitochondrial prohibitin complex protein	0.2828	29970	6.93	1.707	0.019

No.	Spot ID	Gene ontology	Protein name	% volume	MW. (Da.)	pI.	Fold change	T-Test
9	118	Mitochondria	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	0.2641	24511	6.71	1.528	0.001
10	42, 44, 47, 52, 69, 71, 188,194	Cytoskeleton and flagellum development	Tubulin beta-chain	2.5561	50019	4.73	1.367	0.004
11	37, 40, 65, 180, 198	Cytoskeleton and flagellum development	Tubulin alpha-3 chain	0.4510	49829	4.78	1.445	0.014
Down-regulation								
1	66	Endoplasmic reticulum	Calreticulin	0.3527	48009	4.31	0.686	0.025
2	88	Endoplasmic reticulum	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0.3474	51262	9.45	0.141	0.006
3	26	Endoplasmic reticulum	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	0.2243	842	9.62	0.121	0.000
4	205	Endoplasmic reticulum	Heat shock 70 kDa protein	0.0272	72901	5.00	0.456	0.015

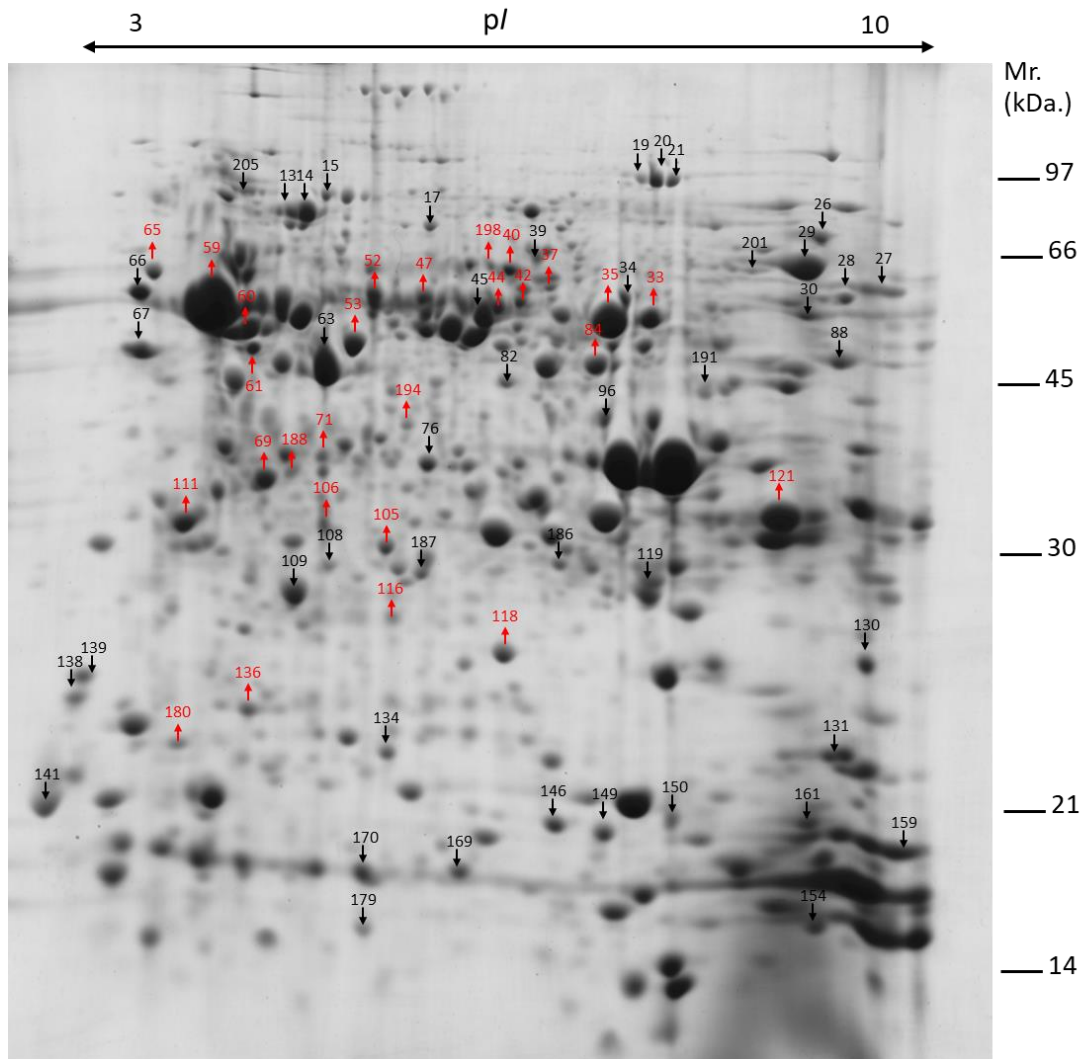
No.	Spot ID	Gene ontology	Protein name	% volume	MW. (Da.)	pI.	Fold change	T-Test
5	131, 146, 154, 159, 179	Nucleus	Histone	3.0007	11374	11.36	0.620	0.016
6	161	Nucleus	Pept8idyprolyl cis- trans isomerase	0.3219	18523	8.23	0.337	0.018
7	76	Nucleus	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	0.1796	134200	6.78	0.657	0.020
8	134	Nucleus	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7	0.1772	19282	5.33	0.292	0.004
9	191	Nucleus	Heat shock 70 kDa protein co gnate 4	0.0327	71087	5.36	0.253	0.003
10	82, 119	Cytoplasm	Arginine kinase	1.2503	39077,	7.12,	0.242	0.003
11	141	Cytoplasm	Calmodulin	1.0084	16802	4.04	0.634	0.003
12	170	Cytoplasm	40S ribosomal protein S12	0.9771	14505	6.81	0.628	0.013
13	28, 30, 96, 186	Cytoplasm	Fructose-bisphosphate aldolase A	0.7376	39531	8.61	0.332	0.013
14	130	Cytoplasm	60S ribosomal protein L9	0.4522	21863	9.96	0.213	0.003

No.	Spot ID	Gene ontology	Protein name	% volume	MW. (Da.)	pI.	Fold change	T-Test
15	45	Cytoplasm	Enolase	0.4410	46988	5.49	0.634	0.005
16	14	Cytoplasm	Heat shock cognate 71 kDa	0.2540	76121	5.80	0.122	0.000
17	201	Cytoplasm	Haptoglobin	0.1014	38471	6.79	0.132	0.008
18	17	Cytoplasm	Heat shock 70 kDa protein	0.0245	69680	5.44	0.096	0.003
19	108	Mitochondria	Prohibitin	0.2270	29786	5.77	0.410	0.003
20	19, 20, 21	Mitochondria	Aconitate hydratase, mitochondrial	0.1332	84006	6.14	0.174	0.009
21	34	Mitochondria	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial	0.0694	55359	7.34	0.190	0.000
22	39	Mitochondria	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	0.0689	65294	6.27	0.316	0.018
23	63, 187	Cytoskeleton and flagellum development	Actin, cytoplasmic	1.1130	41775	5.30	0.610	0.031



No.	Spot ID	Gene ontology	Protein name	% volume	MW. (Da.)	pI.	Fold change	T-Test
24	29	Cytoskeleton and flagellum development	Tektin-4	1.0609	51913	6.02	0.354	0.001
25	109	Cytoskeleton and flagellum development	Ropporin-1-like protein	1.0173	24500	5.97	0.509	0.001
26	67	Cytoskeleton and flagellum development	Radial spoke head 1 homolog	0.6168	24551	5.09	0.223	0.000
27	27	Cytoskeleton and flagellum development	Cilia- and flagella-associated protein 58	0.3923	103460	8.15	0.259	0.034
28	13, 15	Cytoskeleton and flagellum development	Heat shock-related 70 kDa protein	0.1788	69978	5.56	0.310	0.015
29	139	Plasma membrane	Ras-related protein RABA1b	0.1140	24005	5.59	0.173	0.004

No.	Spot ID	Gene ontology	Protein name	% volume	MW. (Da.)	pI.	Fold change	T-Test
30	138,149,1	Extracellular	Beta-lactoglobulin	1.5370	19870	4.93	0.435	0.018
	50,169	region or secreted						



ภาพที่ 4-9 การแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น (↑) และลดลง (↓) เมื่อเทียบกับวิธีการเก็บตัวอย่างแบบ Spawning

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ความแตกต่างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) จากการเก็บตัวอย่างแบบ stripping และ spawning

จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจیبโดยใช้ TEM ในการศึกษาพบว่า โครงสร้างเซลล์ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนหัว กลางตัว และ ส่วนหาง เช่นเดียวกับ sperm ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ในมนุษย์ (Kannan, 2017) วัว (Saacke and Almquist, 1964) ปลา (Mattei, 1988) และในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ในหอยแมลงภู่ (Reunov *et al.*, 1999) แต่จะพบความหลากหลายของโครงสร้างในแต่ละส่วนของ sperm แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ซึ่งความหลากหลายของโครงสร้างในส่วนต่าง ๆ ที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นแสดงถึงความจำเพาะของ sperm แต่ละชนิดเพื่อใช้ในการปฏิสนธิที่มีความจำเพาะกับเซลล์ไข่ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเมื่อ sperm ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน

สำหรับโครงสร้าง sperm ที่พบในหอยนางรมปากจیب สามารถแบ่งโครงสร้างออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 ส่วนหัว (head) ประกอบด้วยส่วน acrosome (Ac) (ภาพที่ 4-2A) ซึ่งภายในบรรจุ enzyme ที่ใช้ในการย่อยชั้น zona pellucida ของเซลล์ไข่ในขั้นตอน acrosomal reaction และ Nucleus ซึ่งบรรจุสารพันธุกรรม (DNA) ไว้ โดยบริเวณกลางนิวเคลียสมีแกนตรงกลางเรียกว่า Axial rod (AR) (ภาพที่ 4-2A) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับขนาดที่พบใน sperm ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

ส่วนที่ 2 ส่วนกลางตัว พบ Mitochondria (Mi) โดย sperm ใช้ mitochondria เป็นแหล่งผลิตพลังงานที่สะสมภายในเซลล์ เพื่อใช้เป็นพลังงานในการเจริญและพัฒนาของเซลล์และใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพื่อปฏิสนธิ ใน sperm ของ *S. Cucullata* พบ mitochondria 4 ก้อน (ภาพที่ 4-2B) โดยในภาพ 4-2B เป็นภาพตัดตามขวางของ mitochondria เมื่อเปรียบเทียบกับหอยสองฝาชนิดอื่น เช่น ในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) (Reunov *et al.*, 1999) และในหอยแครง (*Anadara granosa*) (Suwanjarat, 1999) พบ mitochondria 5 ก้อน โดยลักษณะเช่นนี้จัดเป็น primitive-classical spermatozoa (Reunov *et al.*, 1999) ดังนั้นผู้วิจัยสามารถสรุปได้ว่า ในหอยนางรมพบ mitochondria ถึง 4 ก้อน แสดงว่าภายในเซลล์ต้องมีการสร้างพลังงานจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อ sperm ถูกปล่อยออกจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้ว sperm ผู้วิจัยทำการตรวจสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ในห้องปฏิบัติการ พบว่า sperm สามารถเคลื่อนที่ได้อยู่ได้ถึง 2-3 วัน ซึ่งสอดคล้องกับพบ mitochondria ในเซลล์จำนวนมาก



491486753

BUU_1Thesiss_59910212_thesiss / recv : 29082563 12:06:53 / seq : 23

ส่วนที่ 3 ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนของ flagellum (FL) ที่ sperm ใช้ในการเคลื่อนที่เมื่ออยู่นอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เมื่อ cross section บริเวณหางพบ axoneme ที่เป็นส่วนของ microtubule (MT) เรียงตัวกันแบบ 9+2 (ภาพที่ 4-2C) โดนในส่วนโคนหางเรียกว่า distal centriole (DC) เช่นเดียวกับ sperm ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

จากการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) ของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* ทั้ง 2 วิธี คือ 1. Stripping method ซึ่งเป็นวิธีที่นำน้ำเชื้อออกมาจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยตรง กับวิธีที่ 2 คือ Spawning method ซึ่งเป็นวิธีที่กระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เองตามสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม จากนั้นผู้วิจัยทำการศึกษาถึงความแตกต่างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เก็บตัวอย่างจาก 2 วิธีผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) พบว่า

วิธีที่ 1 stripping method พบ Sertoli cell ติดมากับ sperm ด้วย (ภาพที่ 4-4) ซึ่ง Sertoli cell ที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal tubule) มีหน้าที่เก็บสะสมพลังงานซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองภายในเซลล์ที่กำลังพัฒนาอยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Franco *et al.*, 2008a) ที่ทำการศึกษาระบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatogenesis) ในหอยนางรม *Crassostrea gigas* ที่กำลังพัฒนาอยู่ใน Gonadal tubule พบ Sertoli cell ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เช่นกัน ดังนั้นเมื่อทำการรีดน้ำเชื้อออกมาจาก Gonadal tubule โดยตรง sperm ที่กำลังพัฒนาอยู่ใน Gonadal tubule นั้นอาจมีส่วนของ Sertoli cell หลุดออกมาด้วยได้ และนอกจากนั้นผู้วิจัยยังทำการศึกษารูปแบบของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่พบใน gonadal tubule ด้วย (ภาพที่ 4-1A) พบว่าใน gonadal tubule มีเซลล์ที่กำลังเจริญและพัฒนาอยู่ภายในท่อ โดยเซลล์เริ่มต้นที่กำลังจะพัฒนาเป็น sperm เรียกว่า primary spermatocyte เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่พัฒนาแล้ว โดยจะเป็นเซลล์ที่ติดอยู่กับขอบ gonadal tubule บริเวณ basement membrane จากนั้นเซลล์จะมีการเจริญและพัฒนาภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เรื่อย ๆ จนกระทั่งพบการเจริญของ sperm ที่พัฒนาเซลล์เกือบสมบูรณ์ที่พร้อมปล่อยออกนอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ กล่าวคือ พบส่วนของ flagellum ที่ sperm ใช้ในการเคลื่อนที่ โดยเซลล์ในลักษณะนี้สามารถพบได้บริเวณกลางท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เรียกกระบวนการเจริญนี้ว่า spermatozoa ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างแบบ stripping method sperm ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในวิธีนี้ต้องพบเซลล์ที่กำลังพัฒนาอยู่และเซลล์ที่สมบูรณ์แล้วหลุดออกมาพร้อมกัน เนื่องจากใน gonadal tubule นั้นยังมีเซลล์ที่เจริญในระยะที่ต่าง ๆ กัน ต่างจากการเก็บตัวอย่าง sperm ในวิธีที่ 2 ที่ใช้การเก็บแบบ spawning method



491486753

BUU-IThesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

วิธีที่ 2 spawning method เป็นวิธีที่ให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาเองตามธรรมชาติในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เมื่อศึกษาเซลล์ด้วย TEM พบว่า sperm มีขนาดของเซลล์ที่เกือบจะเท่ากันในทุกเซลล์ (ภาพที่ 4-5) เนื่องจากเซลล์ที่ปล่อยออกมาเองตามธรรมชาติจะเป็นเซลล์ที่มีความสมบูรณ์แล้วเท่านั้น และมีการพัฒนาของส่วนหาง (flagellum) ซึ่งเป็นส่วนของ microtubule ที่สมบูรณ์มากกว่าการเก็บตัวอย่างในวิธีที่ 1 และไม่พบ Sertoli cell หลุดติด cell ออกมาด้วย โดยเรียกกระบวนการเจริญนี้ว่า spermatozoa ดังนั้นผู้วิจัยสามารถสรุปได้ว่า การเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธีนี้สามารถบอกถึงภาวะสมบูรณ์พันธุ์ (maturity) ของ sperm ได้ กล่าวคือ ในการเก็บตัวอย่างวิธีที่ 2 นั้น sperm ที่ได้จะมีความสมบูรณ์พันธุ์มากกว่าเซลล์ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างวิธีที่ 1 ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาต่อโดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนที่พบจากการเก็บตัวอย่าง sperm ทั้ง 2 วิธีว่ามีโปรตีนกลุ่มใดบ้างที่เพิ่มหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพื่ออธิบายถึงภาวะสมบูรณ์พันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

5.2 โปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*

เมื่อทำการศึกษาถึงความแตกต่างของ sperm จากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธีแล้วนั้น ผู้วิจัยทำการศึกษาถึงโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ โดยใช้วิธีการแยกโปรตีนแบบสองมิติในการศึกษา (2-Dimension gel electrophoresis) พบโปรตีนทั้งหมด 112 ชนิด ซึ่งทำการจัดกลุ่มตามแหล่งที่พบ (locations) ได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นโปรตีนที่จัดในกลุ่ม Acrosome ซึ่งเป็นส่วนที่บรรจุเอนไซม์ในการใช้ย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ไข่เมื่อเกิดการปฏิสนธิ ซึ่งโปรตีนที่พบในกลุ่มนี้จะเป็นพวก Actin acrosomal process isoform ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างในการสร้างส่วน acrosome เช่นเดียวกับที่พวกในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Romarowski *et al.*, 2016) และพบ Voltage-dependent anion-selective channel protein ซึ่งเป็นช่องทางเลือกผ่านของไอออนต่างๆ ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหลั่งสารออกนอกเซลล์และในกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis

กลุ่มที่ 2 เป็นโปรตีนที่จัดในกลุ่ม Endoplasmic reticulum ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการสังเคราะห์โปรตีน สำหรับโปรตีนที่พบจะเป็นกลุ่ม Sarcoplasmic calcium-binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในกล้ามเนื้อของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพวก mollusks และ annelids เช่นเดียวกับในการศึกษาโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิในปูหิมะ (*Chionoectes opilio*) (Abdel Rahman *et al.*, 2011) พบ Endoplasmin ที่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น chaperone ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งโปรตีน เช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง



491486753

BUU 1Thesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

กลุ่มที่ 3 เป็นโปรตีนกลุ่ม Golgi apparatus ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ในรูปแบบ vesicle ซึ่งโปรตีนที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ casein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งแคลเซียมในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Signorile *et al.*, 2001)

กลุ่มที่ 4 เป็นโปรตีนที่พบใน Nucleus โปรตีน histone เป็นโปรตีนพื้นฐานที่พบได้ใน nucleus โดยโปรตีน histone เป็นหน่วยย่อยของนิวคลีโอโซมและทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการม้วนตัวของ DNA การแสดงออกของ gene Histone มีทั้งหมด 5 ชนิด คือ H1, H2A, H2B, H3 และ H4 ซึ่งในงานวิจัยนี้พบทั้ง H2A, H2B, H3 และ H4 สำหรับใน sperm ของกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น มนุษย์ พบ histone ถูกแทนที่ด้วย protamine ในกระบวนการเจริญและพัฒนาของ sperm (spermatogenesis) (Braun, 2001; Yoshida *et al.*, 2018) โดย protamine ทำหน้าที่เช่นเดียวกับ histone คือ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการม้วนตัวของ DNA นอกจากนี้ยังพบ Heat shock 70 kDa protein (HSP70) ที่พบทั้งใน cytoplasm nucleus และใน plasma membrane ที่ทำหน้าที่เป็น chaperone (Naaby-Hansen and Herr, 2010) ซึ่งต้องมีความแตกต่างกันในเซลล์อสุจิของสัตว์แต่ละชนิด (Radons, 2016) HSP70 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเซลล์ที่มีการตอบสนองในขณะที่เซลล์ได้รับความเครียด (stress response) มีการศึกษา HSP70 ในกลุ่มหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) เพื่อระบุตำแหน่งที่พบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้เนื่องจากพบ HSP70 ทั้งใน cytoplasm nucleus และใน plasma membrane (Huang *et al.*, 2015) นอกจากนี้ HSP ยังเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานที่ใช้ภายในเซลล์อีกด้วย ซึ่งผู้วิจัยพบ HSP60 ในกลุ่ม Mitochondria เนื่องจากเซลล์อสุจิในหอยนางรมมีขนาด mitochondria ขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์และในการเจริญของเซลล์อสุจินั้นต้องอาศัยพลังงานในการเจริญเป็นจำนวนมาก ทำให้พบโปรตีนกลุ่ม HSP เป็นจำนวนมากในงานวิจัยนี้ สำหรับ Heat shock protein ที่พบมากในเซลล์อสุจิแหล่งที่พบที่สำคัญอีกแหล่งคือ ในกลุ่ม cytoskeleton พบ HSP70 ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ (spermatogenesis) พบใน spindle fiber ในการสร้าง male germ cell ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ในภาวะสมบูรณ์พันธุ์พันธุ์ในหนู (Eddy, 1999) ที่พบ HSP70 เช่นกัน นอกจากนี้ในกลุ่ม nucleus ยังพบ 26S proteasome regulatory subunit, DNA-directed RNA polymerase I และ DNA-directed RNA polymerase II ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในการขนส่ง phosphate ในขั้นตอนการสร้าง flagellum ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเซลล์

กลุ่มที่ 5 เป็นโปรตีนในกลุ่ม Cytoplasm ส่วนใหญ่โปรตีนที่พบเป็น Arginine kinase ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่พบใน sperm ในการศึกษาโปรตีนนี้พบ Arginine kinase ในปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับแรกจากค่า spot volume คิดเป็น 7.63% โปรตีนนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในการขนส่ง phosphate ในขั้นตอนการสร้าง flagellum ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเซลล์



491486753

BUU-IThesis 59910212 thesis / recv: 29082563 12:06:53 / seq: 23

สืบทอดเพศผู้โดยตรง (spermatogenesis) (Strong and Ellington, 1993) สามารถพบโปรตีนชนิดนี้ใน sperm ของสัตว์หลาย ๆ ชนิดทั้งในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเนื่องจากเป็นกลุ่มโปรตีนหลักที่ต้องพบใน sperm เช่นเดียวกับ Fructose bisphosphate aldolase A ที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ด้วยเช่นกันซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในการพัฒนาเซลล์ สืบทอดเพศเช่นเดียวกับ Arginine kinase นอกจากนี้ยังพบ Calmodulin และ Ubiquitin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ calcium ion binding ที่เกี่ยวข้องในเรื่องการเคลื่อนไหวของ sperm ซึ่งสามารถพบได้ในส่วน cytoplasm ที่เกี่ยวกับการสร้าง flagellum รวมไปถึงในเรื่อง cell cycle และ spermatogenesis ด้วยเช่นกัน (Schlingmann *et al.*, 2007)

กลุ่มที่ 6 เป็นโปรตีนในกลุ่ม Mitochondria ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน โดยโปรตีนในกลุ่มนี้เป็นโปรตีนกลุ่มหลักที่พบ sperm เนื่องจาก sperm ต้องใช้พลังงานจำนวนมากในหลายเรื่อง เช่น spermatogenesis, cell cycle และ cell motility ล้วนต้องใช้พลังงานเป็นจำนวนมาก ดังนั้นโปรตีนในกลุ่มนี้ พบ ATP synthase เป็นโปรตีนหลักและพบในปริมาณมากใน sperm จากค่า spot volume คิดเป็น 6.51% ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ sperm หอยนางรมที่พบ mitochondria ถึง 4 ก้อนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในโครงสร้างของเซลล์ด้วย ATP synthase เป็นโปรตีนหลักที่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงานที่ใช้ภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบกลุ่ม dehydrogenase หลายตัว เช่น NADH dehydrogenase, Glutamate dehydrogenase, Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, Isocitrate dehydrogenase, Probable isocitrate dehydrogenase, Probable malate dehydrogenase, Isovaleryl-CoA dehydrogenase และ Succinate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ทั้งหมดในการเร่งปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ที่ใช้ในการผลิตพลังงานในการเจริญและพัฒนาของ sperm

กลุ่มที่ 7 เป็นโปรตีนในกลุ่ม Cytoskeleton and flagellum development ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่พบมากที่สุด ใน sperm เนื่องจากเกี่ยวข้องกับโครงร่างของเซลล์และการพัฒนาส่วนหางของ sperm ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการเคลื่อนที่ โปรตีนที่พบในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่จะเป็น Tubulin ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่พบในส่วน microtubule ซึ่งพบได้ในส่วน flagellum ผู้วิจัยพบ Tubulin ในหลาย isoform เช่น beta (3, 4B), alpha-3 และ gamma-1 พบ Actin, Dynein intermediate chain 1 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการสร้าง axoneme ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในส่วน flagellum พบ Vimentin-1/2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบใน intermediate filament และยังมีพบ Cilia- and flagella-associated protein, Tektin-4, Tektin-1, Ropporin-1-like protein, Parkin coregulated gene protein และ Sperm-associated antigen ที่เกี่ยวข้องโดยตรงในการสร้างส่วน flagellum นอกจากนี้ยังพบ Radial spoke head 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ



491486753

BUU 1Thesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

กระบวนการ spermatogenesis ในขั้นตอน meiosis และเป็นโปรตีนที่พบได้ในส่วน axoneme เช่นเดียวกับ Dynein ที่จะฟอร์มตัวกันเป็นส่วนหางของ sperm

กลุ่มที่ 8 Extracellular region or secreted เป็นโปรตีนที่พบนอกเซลล์ กล่าวคือ มีการหลั่งโปรตีนส่วนนี้ออกมานอกเซลล์ พบ Apolipoprotein A-I, Dermcidin, Beta-lactoglobulin

กลุ่มที่ 9 Peroxisome ซึ่งเป็น organelle ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ metabolism ในเซลล์ พบ Catalase ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ chemical stress อธิบายได้ว่า เมื่อมีการปล่อย sperm ออกมานอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ sperm ต้องมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ sperm ในการป้องกันตัวเอง เมื่อถูกปล่อยออกมาภายนอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์

กลุ่มที่ 10 เป็นโปรตีนที่พบใน Plasma membrane พบ Annexin A2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ exocytosis ใน cell cycle ที่พบได้ในบริเวณ plasma membrane (Kirshner *et al.*, 2003)

5.3 ความแตกต่างของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیبจากการเก็บตัวอย่างแบบ stripping และ spawning

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนในที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) ของหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) ที่เลือกเก็บตัวอย่าง 2 รูปแบบ คือ 1. Stripping method ที่เป็นการรีดน้ำเชื้อของหอยนางรมเพศผู้ออกมาโดยตรงจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad) และ 2. Spawning method ซึ่งเป็นวิธีที่หอยนางรมสมบูรณ์เพศปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เองในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง 2 รูปแบบ มาศึกษาหาความแตกต่างของโปรตีนที่พบโดยใช้เทคนิค 2D-gel electrophoresis พบว่า โปรตีนที่สามารถระบุชนิดได้มีทั้งหมด 112 ชนิด (ตารางที่ 4-1) และสามารถจัดกลุ่มโปรตีนนี้ตามแหล่งที่พบได้เป็น 10 กลุ่ม เมื่อนำโปรตีนทั้งหมดที่ระบุชนิดได้ มาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ใช้ค่า spot volume ในการพิจารณา ซึ่งได้ผลการศึกษาสอดคล้องกันในตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม พบ Arginine kinase (7.63% spot volume) มีค่ามากที่สุดเป็นอันดับแรก ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในเซลล์ อันดับที่สอง คือ ATP synthase (6.51% spot volume) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในเซลล์เช่นกัน จึงสามารถสรุปได้ว่า โปรตีนที่พบภายใน sperm ของหอยนางรม ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน เนื่องจากผู้วิจัยทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า sperm ของหอยนางรมเมื่ออยู่ภายนอกท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สามารถเคลื่อนที่อยู่ได้ถึง 2-3 วัน แสดงว่า sperm ต้องมีการผลิตพลังงานที่มากพอเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่

โปรตีนทั้งหมดที่พบสามารถอธิบายได้ว่า โปรตีนที่พบมากที่สุดสอดคล้องกับโครงสร้างของ sperm (ภาพที่ 4-2A) เป็นอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาโครงสร้างของ sperm ของหอย



491486753

นางรม (*Crassostrea gigas*) จากการศึกษาด้วย Electron microscope ด้วยเช่นกัน (Franco et al., 2008b) กล่าวคือ โนโครงสร้างของ sperm องค์ประกอบหลักที่พบ คือ acrosome ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่พบในส่วนหัวของ sperm มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในการเริ่มปฏิสนธิ โดยในการศึกษานี้พบ actin acrosomal process ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างในการสร้างส่วน acrosome ในขั้นต้น ส่วนประกอบของ sperm อีก 1 ส่วน คือ nucleus ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่และสำคัญที่สุดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม โดยภายในบรรจุสารพันธุกรรม (DNA) ไว้ ทำให้พบโปรตีนหลายชนิดที่สำคัญใน nucleus เช่น Histone, Heat shock protein 70 KDa และ 26S proteasome regulatory subunit

สำหรับความแตกต่างของโปรตีนจากทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างนี้ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Delta 2D ซึ่งเป็นโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของ spot จากกลุ่มตัวอย่างได้ ซึ่งใช้กลุ่ม stripping เป็น treatment และกลุ่ม spawning เป็น control กล่าวคือ เมื่อได้ผลจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมแล้วมีโปรตีนที่พบใน mature sperm ชนิดใดบ้างที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม stripping โดยใช้เกณฑ์การวิเคราะห์คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ค่าสถิติ T-test ($P\text{-value} < 0.05$) และค่า fold change ในการพิจารณาความแตกต่าง หลังจากวิเคราะห์แล้วสามารถแบ่งความแตกต่างของ spot ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ค่า spot volume เพิ่มขึ้น (up regulation) (fold change > 1) สามารถแบ่งตามแหล่งที่พบโปรตีน (gene ontology) ได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ acrosome, cytoplasm, mitochondria, nucleus, cytoskeleton and flagellum development ทั้งหมด 11 โปรตีน อธิบายได้ว่า เมื่อ sperm มีความสมบูรณ์พันธุ์มากขึ้น (maturity) สามารถพบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มนี้มากขึ้น

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่อยู่ในภาวะเจริญพันธุ์สามารถพบโครงสร้างหลัก ๆ คือ ส่วนหัวพบ acrosome ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิในขั้นตอนเจาะผนังเซลล์ไข่เพื่อปล่อยสารพันธุกรรม โดยในบริเวณ acrosome จะมี enzyme ในการย่อยผนังของเซลล์ไข่ ซึ่งมีความจำเพาะกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในหอยนางรมพบโปรตีนที่แสดงออกมากในกลุ่มนี้ คือ actin, acrosomal process isoform ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญที่สามารถพบได้ใน acrosome โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ acrosome ซึ่งแน่นอนว่าในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่กำลังอยู่ในช่วงเจริญพันธุ์นั้นย่อมมีการพัฒนาบริเวณ acrosome ที่เป็นบริเวณสำคัญของ sperm ในขั้นตอนการปฏิสนธิ และโปรตีนอีก 1 ตัวที่มีการแสดงออกมากในกลุ่ม acrosome คือ voltage-dependent anion-selective channel protein เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น protein channel ที่เป็นทางผ่านของ ion ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง ATP เพื่อสร้างพลังงานที่ใช้ในเซลล์ เช่นเดียวกันกับที่พบใน



491486753

BUU-1Thesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq : 23

กลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Hinsch *et al.*, 2004) นอกจากนี้บริเวณส่วนหัวของ sperm ยังพบ nucleus และ cytoplasm พบโปรตีนทั้งหมด 3 ชนิด คือ Ras-related protein Rab-7a และ 26S proteasome regulatory subunit เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย ATP ซึ่งพบได้ใน lysosome เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในวัยเจริญพันธุ์ต้องใช้พลังงานเป็นจำนวนมากในการเคลื่อนที่ ดังนั้นพลังงานที่ถูกใช้ไปในรูป ATP จึงถูกย่อยสลายภายใน lysosome จึงพบโปรตีนเหล่านี้มากใน mature sperm นอกจากนี้ยังพบ 14-3-3 protein epsilon มีค่า fold change สูงถึง 1.748 หมายความว่า มีการแสดงออกของโปรตีนนี้มากใน mature sperm เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของเซลล์เนื่องจาก sperm ที่กำลังพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ต้องมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงมีการใช้พลังงานเป็นจำนวนมากและนอกจากหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมแล้วโปรตีนนี้ยังทำหน้าที่เป็น signaling อีกด้วย และกลุ่มโปรตีนที่สำคัญที่พบการแสดงออกมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม stripping คือ กลุ่ม mitochondria เนื่องจากในโครงสร้างของ sperm ของหอยนางรมปากจีบ พบ mitochondria เป็นก้อนขนาดใหญ่ถึง 4 ก้อน ซึ่งถือว่ามีความใหญ่มากกว่า sperm ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ อีกทั้งการมี mitochondria ขนาดใหญ่เช่นนี้ แสดงถึง sperm ของหอยนางรมต้องใช้พลังงานเป็นจำนวนมาก ทั้งในเรื่องการเคลื่อนที่ และการสร้างพลังงานที่จำเป็นต้องใช้ภายในเซลล์ ทำให้การศึกษาโปรตีนในครั้งนี้ พบ ATP synthase subunit beta เป็นจำนวนมากซึ่งถือว่าเป็นโปรตีนหลักที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากมี spot volume สูงเป็นอันดับที่ 2 (6.51%) โปรตีนนี้เป็นโปรตีนที่จำเป็นในการสร้าง ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของ sperm นอกจากนี้ยังพบโปรตีนอื่นที่เป็นโปรตีนใน mitochondria เช่น Probable citrate synthase และ Mitochondrial prohibitin complex อีกด้วย

นอกจากนี้ยังพบโปรตีนในกลุ่ม cytoskeleton and flagellum development ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่พบในส่วน flagellum ที่เป็นส่วนสำคัญของ sperm อีกหนึ่งส่วนที่ช่วยในการเคลื่อนที่ ทำให้พบโปรตีนตัวหลัก ๆ ที่มีการแสดงออกอย่างมากเมื่อเทียบกับกลุ่ม stripping คือ Tubulin ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบทั้ง alpha และ beta chain ที่พบได้ใน microtubule ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของส่วน flagellum

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ค่า spot volume ลดลง (down regulation) (fold change <1) สามารถแบ่งตามแหล่งที่พบโปรตีน (gene ontology) ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ cytoplasm, mitochondria, nucleus, endoplasmic reticulum, cytoskeleton and flagellum development, plasma membrane และ extracellular region ทั้งหมด 30 โปรตีน ซึ่งถือว่าพบโปรตีนในกลุ่มนี้มีมากกว่า



491486753

BUU_1Thesis_59910212_thesis / rev: 29082563 12:06:53 / seq: 23

กลุ่มที่ 1 สามารถอธิบายได้ว่า เมื่อ sperm มีความสมบูรณ์พันธุ์มากขึ้น (maturity) สามารถพบการ แสดงออกของโปรตีนในกลุ่มนี้น้อยลง

ในขณะที่ sperm กำลังเจริญและพัฒนาอยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เซลล์จะมี nucleus ขนาดใหญ่กว่า sperm ที่สมบูรณ์พันธุ์แล้ว (ภาพที่ 4-1) เนื่องจากภายในเซลล์กำลังมีการแบ่งเซลล์ เพื่อเจริญและพัฒนาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ ทำให้ในการศึกษาโปรตีนนี้ พบโปรตีนในกลุ่ม cytoplasm และ nucleus มีการแสดงออกลดลงใน sperm ที่สมบูรณ์พันธุ์แล้ว เนื่องจากโปรตีนในกลุ่มเหล่านี้จะมีบทบาทมากในขั้นตอนการแบ่งเซลล์ในระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงแรก เช่น Calmodulin, enolase, HSP70, HSP71 ที่ทำงานร่วมกันเกี่ยวกับการพัฒนาการสร้างส่วนหางในขั้นต้น ซึ่งมี รายงานใน sperm ของสัตว์มีกระดูกสันหลังด้วยเช่นกัน

สำหรับ Arginine kinase (AK) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ พบในปริมาณมากเป็นอันดับ 2 ใน reference map และพบหลาย isoform โปรตีนนี้ทำหน้าที่ เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานในขั้นตอนการสร้าง flagellum ในกระบวนการ phosphorylation ซึ่ง เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยตรง (spermatogenesis) แต่สำหรับ spot ที่มีปริมาณมาก (#93, #94) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ใน spot (#82, #119) ซึ่งมี spot volume น้อยกว่ากลับมีการแสดงออกน้อยลงใน mature sperm โดยใน spot นี้ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางโปรตีนพบว่า อยู่ใน database ของ *Liolophura japonica* (ลิ่นทะเล) ซึ่งเป็นกลุ่ม Mollusca เช่นเดียวกับหอยนางรม สามารถสรุปได้ว่า โปรตีนชนิดเดียวกัน แต่มีหลาย isoform ซึ่งแต่ละ isoform สามารถทำหน้าที่ในการควบคุมลักษณะ ต่าง ๆ ที่แตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำให้โปรตีนชนิดเดียวกันแต่ละ isoform มีหน้าที่ แตกต่างกันไป

Arginine kinase เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างส่วน flagellum ในช่วงต้น โปรตีนนี้พบ ได้ใน cytoplasm ใน sperm พบงานวิจัย ที่พบ AK ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการสร้างหางของ sperm ด้วยเช่นกัน เช่น การศึกษาในแมงดาทะเล (Strong and Ellington, 1993) และในมดคันไฟ (Wang *et al.*, 2009) พบ AK ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ phosphorylation ซึ่งเป็นกระบวนการ สังเคราะห์สารพลังงานสูง (ATP) ซึ่งเป็นสารที่ sperm ที่กำลังพัฒนาต้องการใช้พลังงานในปริมาณ มากเพื่อพัฒนาเซลล์ให้สมบูรณ์ ผู้วิจัยคิดว่าโปรตีนนี้อาจจะทำงานร่วมกับ protein kinase A (PKA) และ protein kinase C (PKC) ในกระบวนการสร้างหางของ sperm เนื่องจากพบงานวิจัยที่ ศึกษาถึงกลไก capacitation in human sperm โดยกระบวนการนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เพื่อกระตุ้นให้ sperm สามารถเคลื่อนที่ได้ กล่าวคือ การพัฒนาส่วนหางให้สมบูรณ์พร้อมใช้ในการ เคลื่อนที่ไปเจาะเซลล์ไข่เพื่อเกิดกระบวนการ acrosomal reaction ในการย่อยสลายผนังเซลล์ไข่ และปล่อยสารพันธุกรรมในขั้นตอนการปฏิสนธิต่อไป โดยอาศัยการทำงานของ PKA โดย PKA ถูก



491486753

BUU-IThesis 59910212 thesis / recv: 29082563 12:06:53 / seq: 23

กระตุ้น ทำให้ PKA อยู่ในรูป active จากนั้น PKA ไปกระตุ้นให้ G- actin polymerize เป็น F- actin เพื่อสร้างส่วน flagellum ให้สมบูรณ์ขึ้น ซึ่ง PKC จะอยู่ในรูป inactive จากนั้นเมื่อมีโปรตีนมากระตุ้น PKC ให้อยู่ในรูป active sperm จึงเริ่มเข้าสู่กระบวนการ capacitation (Ickowicz *et al.*, 2012) ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า AK มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ capacitation ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการพัฒนาส่วนหางให้สมบูรณ์ที่พร้อมใช้ในการเคลื่อนที่ แต่ในหอยนางรม AK กลับพบการแสดงออกที่ลดลงเมื่อ sperm เข้าสู่ระยะการพัฒนาของเซลล์ที่สมบูรณ์มากขึ้น เนื่องจาก sperm ของหอยนางรม พบ AK ในส่วน cytoplasm เมื่อ sperm พัฒนาเซลล์อย่างสมบูรณ์แล้วจะกำจัดส่วน residual body ทิ้งไปเพื่อพัฒนาเป็น mature sperm ทำให้ AK หายไปพร้อมกับส่วน residual body

นอกจากนี้ยังพบโปรตีน histone ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในงานวิจัยนี้ และเป็นโปรตีนพื้นฐานที่ต้องพบใน nucleus มีการแสดงออกลดลงเช่นกันใน mature sperm เนื่องจากใน imature sperm ยังต้องมีการพัฒนาของเซลล์อยู่ นอกจากนี้โปรตีนที่พบใน nucleus ที่มีการแสดงออกน้อยลงใน mature sperm ชนิดอื่น ๆ เช่น DNA polymerase I และ II ที่ใช้ในขั้นตอน transcription ต่างมีบทบาทใน immature sperm มากกว่า เนื่องจากเซลล์ต้องสร้างและแปรรหัสสารพันธุกรรม ซึ่งถือเป็นหัวใจของเซลล์สืบพันธุ์ สำหรับในกลุ่มโปรตีนที่พบใน mitochondria บางตัวก็ลดบทบาทลงใน mature sperm เช่น Aconitate hydratase, Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, Glutamate dehydrogenase และ Prohibitin ซึ่งโปรตีนเหล่านี้พบมากในเซลล์ที่กำลังพัฒนาเนื่องจากในการเจริญและพัฒนาของเซลล์ต้องมีการผลิตพลังงานสูงมากในการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ และอีกกลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อยลงใน mature sperm ด้วยเช่นกัน คือ โปรตีนในกลุ่ม cytoskeleton and flagellum development โปรตีนในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างส่วนหางของ sperm ซึ่งเป็นส่วนอีกส่วนหนึ่งที่สำคัญของโครงสร้าง sperm ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ตามชื่อของกลุ่มโปรตีนคนส่วนใหญ่มักเข้าใจว่าต้องมีการแสดงออกมากใน mature sperm แต่มีโปรตีนบางชนิดในกลุ่มนี้กลับลดบทบาทการทำงานลง เช่น Actin, Cilia- and flagella-associated protein, Ropporin-1-like protein และ Tektin-4 ล้วนเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหางทั้งสิ้น แต่จะมีการแสดงออกมาในระยะการเจริญขึ้นต้นของ sperm มากกว่า เช่น ใน Tektin ที่พบใน sperm ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดจะมีหลาย isoforms ซึ่งแต่ละ isoform สามารถเจอในสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันออกไป เช่น tektin-2 และ tektin-4 ที่พบในมนุษย์มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างส่วน axoneme ซึ่งเป็นส่วนที่พบใน tubulin โดยโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ทำงานร่วมกันในการสร้างส่วนหางของ sperm แต่ใน tektin-4 ใน rodent (สัตว์ฟันแทะ; หนู) พบ tektin-4 ใน outer dense fibers ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ล้อมรอบ microtubule แต่ไม่พบใน microtubule ซึ่งพบ tektin-4 ในตำแหน่งที่แตกต่างจากมนุษย์ โดยโปรตีนนี้ทำงานเกี่ยวข้องกับ



491486753

BUU 1Thesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

การเจริญและพัฒนาของ sperm (spermatogenesis) ในระยะเริ่มต้น (Iida *et al.*, 2006) ดังนั้น tektin-4 ที่ลดการแสดงออกลงใน mature sperm ของหอยนางรมนั้นสามารถสันนิษฐานได้ว่า tektin-4 อาจจะมีการแสดงออกในขั้นตอนการพัฒนาส่วนหางของ sperm ในช่วงเริ่มต้น เช่นเดียวกับที่พบใน rodent และอาจลดบทบาทลงเมื่อ sperm เข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ ดังนั้น โปรตีนในกลุ่ม tektin จึงไม่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ เนื่องจาก tektin แต่ละชนิด มีบทบาทและหน้าที่ที่แตกต่างกันออกไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

เมื่อทำการทดสอบความสำเร็จของการปฏิสนธิของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ จากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เก็บตัวอย่างเซลล์ทั้ง 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การเก็บตัวอย่างแบบ stripping จากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยตรง และจากการเก็บตัวอย่างในวิธีที่ 2 การเก็บตัวอย่างแบบ spawning ซึ่งเป็นวิธีที่หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เองตามธรรมชาติ เมื่อนำน้ำเชื้อจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธีนี้ นำมาปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ ผลการทดลองพบว่า น้ำเชื้อจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธีสามารถปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ได้ โดยสังเกตจากการพบ polar body และตัวอ่อนสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนที่สามารถว่ายน้ำได้ในระยะ D-larva ภายใน 24 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ โดยน้ำเชื้อจากการเก็บตัวอย่างแบบ spawning ให้อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิมากกว่าน้ำเชื้อที่ได้จากการเก็บตัวอย่างแบบ stripping เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างในวิธีนี้นั้น มีเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์หลุดติดออกมาด้วย ทำให้ในวิธีการเก็บตัวอย่างลักษณะนี้พบเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์พันธุ์น้อยกว่าการเก็บตัวอย่างแบบ spawning ที่หอยปล่อยเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์พันธุ์ออกมาเพื่อปฏิสนธิเท่านั้น

สรุปผลการทดลอง

1. งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงโปรตีนทั้งหมดที่พบในน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) โดยสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 188 จุดเป็นโปรตีนทั้งหมด 112 ชนิด
2. จัดทำ reference map ซึ่งเป็นโปรตีนทั้งหมดที่พบในน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)
3. ทราบถึงโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่พบใน sperm ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์จากการเก็บตัวอย่างแบบ spawning เพื่อใช้โปรตีนที่พบเป็น biomarker ร่วมกับการเปรียบเทียบจากการศึกษาโครงสร้างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ที่ใช้อธิบายถึงโครงสร้างที่พบใน sperm ที่กำลังเจริญและพัฒนา (imature sperm) และ sperm ที่สมบูรณ์พันธุ์ (mature sperm) เพื่อช่วยในการอธิบายหน้าที่ของโปรตีนที่ระบุชนิดได้



491486753

BUU_1Thesis_59910212_thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq : 23

4. จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์และการศึกษาโปรตีนที่พบใน sperm จากการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธี สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่แข็งแรงในการเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป เนื่องจากทราบแล้วว่า ถ้าพบโปรตีนกลุ่มนี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน sperm และมีลักษณะเซลล์ที่สมบูรณ์เมื่อศึกษาใต้กล้องสามารถอนุมานได้ว่า sperm มีความสมบูรณ์และมีความพร้อมในการสืบพันธุ์

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการวิจัยที่ได้ สามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของ sperm จากการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อทั้ง 2 วิธี คือ stripping และ spawning ไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโดยใช้วิธีผสมเทียมตัวอ่อนให้ประสบความสำเร็จต่อไป เพื่อลดปัญหาตัวอ่อนจากธรรมชาติไม่เพียงพอ

2. เมื่อพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสำเร็จ สามารถใช้ความรู้จากการศึกษาโปรตีนที่พบน้ำเชื้อที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นตัวชี้วัดในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมเทียมตัวอ่อนเพื่อให้ได้ตัวอ่อนคุณภาพดีต่อไป

บรรณานุกรม

- กรมประมง. (2556). *สถิติการเลี้ยงหอยทะเล ประจำปี 2556 กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง*.
 คเชนทร เฉลิมวัฒน์. (2543). *การเพาะเลี้ยงหอย*. กรุงเทพฯ: ไร่เขียว.
- chner จารงนาวาสวัสดิ์ อีรพงศ์ ต้วงดี และ ณรงค์พล สิทธิทวีวัฒน์ (2551). *หอยทะเลไทย*. กรุงเทพฯ:
 สำนักงานพัฒนาการ วิจัยการเกษตร.
- บพิธ จารุพันธ์ และ นันทพร จารุพันธ์. (2555). *สัตววิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไพโรจน์ พรหมานนท์. (2526). *หลักการเลี้ยงหอยนางรม*. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ
 จังหวัดสงขลา กรมประมง.
- วันทนา อยู่สุข. (2543). *หอยทะเล*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abdel Rahman, A. M., S. D. Kamath, A. L. Lopata, J. J. Robinson and R. J. Helleur.
 (2011). Biomolecular characterization of allergenic proteins in snow crab
 (*Chionoecetes opilio*) and de novo sequencing of the second allergen arginine
 kinase using tandem mass spectrometry. *J Proteomics* 74(2): 231-241.
- Abdel Rahman, A.M., Kamath, S.D., Lopata, A.L., Robinson, J.J., Helleur, R.J. (2011).
 Biomolecular characterization of allergenic proteins in snow crab
 (*Chionoecetes opilio*) and de novo sequencing of the second allergen arginine
 kinase using tandem mass spectrometry. *J Proteomics* 74, 231-241.
- Aebersold, R., Mann, M. (2016). Mass-spectrometric exploration of proteome structure
 and function. *Nature* 537, 347-355.
- Allen, S.K., Bushek, D. (1992). Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea*
virginica (Gmelin), using stripped gametes. *Aquaculture* 103, 241-251.
- Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J.M., Balleca, J.L., Ramalho-Santos, J., Oliva, R.
 (2013). Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic
 pathways. *Mol Cell Proteomics* 12, 330-342.
- Baker, M.A., Hetherington, L., Reeves, G., Müller, J., Aitken, R.J. (2008). The rat sperm
 proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS
 identification. *Proteomics* 8, 2312-2321.

- Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chicharo, L., Matias, D. (2013). Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 440, 200-206.
- Boonmee, A., Heude Berthelin, C., Kingtong, S., Pauletto, M., Bernay, B., Adeline, B., Suquet, M., Sourdain, P., Kellner, K. (2016). Differential protein expression during sperm maturation and capacitation in an hermaphroditic bivalve, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Molluscan Studies* 82, 575-584.
- Braley, R.D. (1985). Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). *Aquaculture* 47, 321-325.
- Braun, R. E. Packaging paternal chromosomes with protamine. (2001). *Nat. Genet.* 28, 10-12
- Cao, W., Gerton, G.L., Moss, S.B. (2006). Proteomic profiling of accessory structures from the mouse sperm flagellum. *Mol Cell Proteomics* 5, 801-810.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.-C., Le Pennec, M. (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214, 115-130.
- Coppolino, M.G., Woodside, M.J., Demaurex, N., Grinstein, S., St-Arnaud, R., Dedhar, S. (1997). *Nature* 386, 843.
- Diz, A.P., Dudley, E., Skibinski, D.O. (2012). Identification and characterization of highly expressed proteins in sperm cells of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Proteomics* 12, 1949-1956.
- Dorus, S., Wasbrough, E.R., Busby, J., Wilkin, E.C., Karr, T.L. (2010). Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. *Mol Biol Evol* 27, 1235-1246.
- Eddy, E.M. (1999). Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 4, 23-30.
- Eirin-Lopez, J.M., Ausio, J. (2009). Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *Bioessays* 31, 1062-1070.
- Franco, A., Berthelin, C., Goux, D., Sourdain, P., Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell* 40, 251-260



491486753

BUTU :Thesis 59910212 thesis / recv : 29082563 12:06:53 / seq: 23

- Grintzalis, K., Papapostolou, I., Georgiou, C. (2009). Protocol for the quantification of protein ng quantities by a Coomassie Brilliant Blue G-250-based hydrophobic assay.
- Hinsch, K.D., De Pinto, V., Aires, V.A., Schneider, X., Messina, A., Hinsch, E. (2004). Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *The Journal of biological chemistry* 279, 15281-15288.
- Huang, X., Liu, B., Huan, P. (2015). The sperm proteome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and immunolocalization of heat shock proteins. *Invertebrate Reproduction & Development* 59, 111-118.
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 14, 816-821.
- Iida, H., Honda, Y., Matsuyama, T., Shibata, Y., Inai, T. (2006). Tektin 4 is located on outer dense fibers, not associated with axonemal tubulins of flagella in rodent spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 73, 929-936.
- Johnston, D.S., Wooters, J., Kopf, G.S., Qiu, Y., Roberts, K.P. (2005). Analysis of the human sperm proteome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1061, 190-202.
- Kannan, P. (2017). Ultrastructure of Human Spermatozoa, in: Gunasekaran, K., Pandiyan, N. (Eds.), *Male Infertility: A Clinical Approach*. Springer India, New Delhi, pp. 27-39.
- Khondee, P., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Svasti, J., Simpson, R.J., Kingtong, S. (2016). Histopathological effect and stress response of mantle proteome following TBT exposure in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata*. *Environmental Pollution* 218, 855-862.
- Kingtong, S., Kellner, K., Bernay, B., Goux, D., Sourdain, P., Berthelin, C.H. (2013). Proteomic identification of protein associated to mature spermatozoa in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics* 82, 81-91.

- Kirshner, J., Schumann, D., Shively, J.E. (2003). CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* 278, 50338-50345.
- Kwon, W.-S., Oh, S.-A., Kim, Y.-J., Rahman, M.S., Park, Y.-J., Pang, M.-G. (2015). Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Scientific Reports* 5.
- Li, C.-j., Wang, D., Zhou, X. (2016). Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction Science*, pp. 1-7.
- Martinez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., Oliva, R. (2006). Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 6, 4356-4369.
- Mattei, X. (1988). The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. *Biology of the Cell* 63, 151-158.
- Naaby-Hansen, S., Herr, J.C. (2010). Heat shock proteins on the human sperm surface. *Journal of reproductive immunology* 84, 32-40.
- Nuurai, Parinyaporn & Panasophonkul, Sasiporn & Tinikul, Yotsawan & Sobhon, Prasert & Wanichanon, Ratanasate. (2015). Spermatogenesis in the rock oyster, *Saccostrea forskali* (Gmelin, 1791). *Tissue and Cell*. 48.
- Nynca, J., Arnold, G.J., Frohlich, T., Otte, K., Ciereszko, A. (2014). Proteomic identification of rainbow trout sperm proteins. *Proteomics* 14, 1569-1573.
- Ozbay, G., Reckenbeil, B., Marenghi, F., Erbland, P. (2014). Eastern oyster (*crassostrea virginica*) aquaculture and diversity of associated species, pp. 1-58.
- Parent, S., Lefievre, L., Brindle, Y., Sullivan, R. (1999). Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Molecular Reproduction and Development* 52, 57-65.
- Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J.M., Burgess, S.C., Memili, E. (2008). Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Systems Biology* 2, 19.

- Qin, Z., Zhang, Y., Mu, H., Zhang, Z., Qiu, J.W. (2018). The Sperm Proteome of the Echiuran *Urechis unicinctus* (Annelida, Echiura). *Proteomics* 18, e1800107.
- Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand. *Cell Stress and Chaperones* 21, 379-404.
- Rahman, M.S., Lee, J.-S., Kwon, W.-S., Pang, M.-G. (2013). Sperm proteomics: road to male fertility and contraception. *International journal of endocrinology*, 360986-360986.
- Reunov, A., Au, D., Wu, R. (1999). Spermatogenesis of the green-lipped mussel *Perna viridis* with dual patterns of acrosome and tail development in spermatids. *Helgoland Marine Research* 53, 62-69.
- Richard K. Wallace, Phillip Waters, Rikard, F.S. (2008). Oyster Hatchery Techniques. *Southern Regional Aquaculture Center* 4302.
- Romarowski, A., Luque, G.M., La Spina, F.A., Krapf, D., Buffone, M.G. (2016). Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis, in: Buffone, M.G. (Ed.), *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Springer International Publishing, Cham, pp. 129-144.
- Saacke, R.G., Almquist, J.O. (1964). Ultrastructure of bovine spermatozoa. II. The neck and tail of normal, ejaculated sperm. *American Journal of Anatomy* 115, 163-183.
- Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protocols* 1, 16-22.
- Schlingmann, K., Michaut, M.A., McElwee, J.L., Wolff, C.A., Travis, A.J., Turner, R.M. (2007). Calmodulin and CaMKII in the Sperm Principal Piece: Evidence for a Motility-Related Calcium/Calmodulin Pathway. *Journal of Andrology* 28, 706-716.
- Sheri Skerget, Matthew Rosenow, Polpitiya, A., Petritis, K., Steve Dorus, Karrt, T.L. (2013). The Rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm proteome.
- Signorile, A., Fiorilli, A., Ferraretto, A., Gravaghi, C., Tettamanti, G. (2001). Casein Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells. *The Journal of Nutrition* 131, 1655-1661.
- Skerget, S., Rosenow, M.A., Petritis, K., Karr, T.L. (2015). Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLOS ONE* 10, e0140650.

- Strong, S.J., Ellington, W.R. (1993). Horseshoe crab sperm contain a unique isoform of arginine kinase that is present in midpiece and flagellum. *Journal of Experimental Zoology* 267, 563-571.
- Suwanjarat, J. (1999). Ultrastructure of the spermatogenesis of the cockle *Anadara granosa* L. (Bivalvia: Arcidae). *Helgoland Marine Research* 53, 85-91.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., Okabe, M., Nishimune, Y. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular Cell Biology* 25, 7107-7119.
- Wang, G., Guo, Y., Zhou, T., Shi, X., Yu, J., Yang, Y., Wu, Y., Wang, J., Liu, M., Chen, X., Tu, W., Zeng, Y., Jiang, M., Li, S., Zhang, P., Zhou, Q., Zheng, B., Yu, C., Zhou, Z., Guo, X., Sha, J. (2013). In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *Journal of proteomics* 79, 114-122.
- Wang, H., Zhang, L., Zhang, L., Lin, Q., Liu, N. (2009). Arginine kinase: differentiation of gene expression and protein activity in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Gene* 430, 38-43.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology Nature Publishing Company* 14, 61-65.
- Xiaohong, H., Baozhong, L., Pin, H. (2015). The sperm proteome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and immunolocalization of heat shock proteins.
- Yoshida, K., Muratani, M., Araki, H. Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa. (2018). *Nat Commun* 9, 3885
- Zhang, Y., Mu, H., Lau, S.C., Zhang, Z., Qiu, J.W. (2015). Sperm proteome of *Mytilus galloprovincialis*: Insights into the evolution of fertilization proteins in marine mussels. *Proteomics* 15, 4175-4179.

ต้นฉบับไม่ปรากฏ

ภาคผนวก