



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

โครงสร้างจุลกายวิภาคของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการวิเคราะห์โปรตีโอม
ของอสุจิในหอยนางรมปากจีบ (ปีที่ 2)

(Ultrastructure of spermatogenesis and sperm proteome analysis
in the Cupped oyster)

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง
คณะผู้วิจัย: ดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์
นางสาวดารณี ไชคชัยชำนาญกิจ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 387517
สัญญาเลขที่ 11/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

โครงสร้างจุลกายวิภาคของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการวิเคราะห์โปรตีโอมของ
อสุจิในหอยนางรมปากจیب (ปีที่ 2)

(Ultrastructure of spermatogenesis and sperm proteome analysis in
the Cupped oyster)

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง¹
¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

คณะผู้วิจัย: ดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์²
นางสาวดารณี โชคชัยชำนาญกิจ²
²ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
ถ.วิภาวดี เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ 10210

ตุลาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 11/2560

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและเทคโนโลยีด้านการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวกุลนิษฐ์ ถนอมจิตร และสมาชิกห้องปฏิบัติการหอยนางรมทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และร่วมมือกันทำงานจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กุมภาพันธ์ 2562

คณะผู้วิจัย

โครงสร้างจุลกายวิภาคของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการวิเคราะห์โปรตีโอมของอสุจิในหอยนางรมปากจีบ (โครงการวิจัยปีที่ 2)

บทคัดย่อ

หอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* เป็นหอยเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงในภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งมีการเพาะเลี้ยงแบบปล่อยตัวอ่อนจากธรรมชาติ ปัจจุบันได้มีการใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบผสมเทียมตัวอ่อนหอยนางรมในหลายประเทศ โดยใช้วิธีการเก็บตัวอย่างจากพ่อแม่พันธุ์ ในการเก็บตัวอ่อนนั้นทำได้ทั้งแบบกรีดเอาเซลล์สืบพันธุ์จากพ่อแม่พันธุ์หรือกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา อย่างไรก็ตามการผสมเทียมอาจมีความเสี่ยงต่อการประสบปัญหาเรื่องคุณภาพของตัวอ่อน ซึ่งเกิดได้จากความสมบูรณ์พันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์และคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งกลไกดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน โครงการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรืออสุจิของหอยนางรมปากจีบในระดับจุลกายวิภาค และศึกษาโปรตีโอมหรือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบเพื่อต้องการระบุโปรตีนทั้งหมดที่พบในเซลล์อสุจิ โดยเก็บตัวอย่างเซลล์อสุจิจากหอยนางรมเพศผู้สองวิธี ทั้งแบบกรีดเอาเซลล์สืบพันธุ์และแบบกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา จากนั้นนำมาสกัดโปรตีนเพื่อศึกษาด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์โดยทำการแยกโปรตีนในเจลสองมิติ ทำการตัดจุดโปรตีน ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และระบุชนิดด้วย LC-MS/MS ร่วมกับชีวสารสนเทศศาสตร์ ผลการศึกษาจุลกายวิภาคพบว่าเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบประกอบด้วยอะโครโซมทางด้านหน้าและพบ subacosomal space ขนาดใหญ่ นิวเคลียส ค่อยข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาดประมาณ 1.8 μm ส่วนคอปไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่ 4 อัน ส่วนทางมีโครงสร้าง axoneme แบบ 9+2 ผลการศึกษาโปรตีโอมพบว่าสามารถระบุโปรตีนได้ 188 จุด จาก 206 จุด (91.26%) แบ่งเป็นโปรตีนกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มที่พบใน acrosome, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, nucleus, cytoplasm, mitochondria, cytoskeleton and flagellum และ extra cellular region และได้สร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีนขึ้นมาสำหรับโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เพิ่มความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับองค์ประกอบเชิงโปรตีนและหน้าที่ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมเป็นอย่างมาก และยังสามารถระบุโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเซลล์อสุจิและคุณภาพของเซลล์อสุจิอีกด้วย นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการระบุคุณภาพน้ำเชื้อ การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ การเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพื่อใช้สำหรับการปฏิสนธิ เพื่อพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหอยนางรมต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : หอยนางรม, การเพาะเลี้ยง, โปรตีโอม, เซลล์อสุจิ, การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

Ultrastructure of spermatogenesis and sperm proteome analysis in the Cupped oyster (2nd year of the research project)

Abstract

The Hooded oyster, *Saccostrea cucullata* is economically important animal and has been cultured in Thailand. Recently, artificial fertilizations are being used in oyster cultures in many countries by either stripping or spawning methods in order to collect gametes from brood stocks. However, reproductive success and embryo quality of hatcheries remains inconsistent. This may due to gamete maturation and quality of sperm in this species are not well addressed. Thus, the purposes of this research project were to study untrastrculture of the Hooded sperm and to analyze sperm proteome of the Hooded oyster in order to reveal protein profile and identify all proteins found in oyster sperm. Sperms were collected from male oysters by spawning and stripping method. 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 ultrastructure results showed that sperm of the Hooded oyster composed of anteriorly acrosome with a large subacrosomal space. The nucleus is dense and round whith 1.8 μm in diameter. Foure larg mitochondria were found at the middle part of sperm. At the posterior side, long flagellum with 9+2 microtubules axoneme were obsereved. The proteome results showed that 188 out of 206 protein spots were identified (91.26%) in sperm. These classified as acrosome, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, nucleus, cytoplasm, mitochondria, cytoskeleton and flagellum and extra cellular region. 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 brood stock conditioning, gamete collection and artificial fertilization in order to improve hatchery system for this species.

Keywords: hatchery, oyster, proteome, sperm, spermatogenesis

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 หอยนางรมปากจีบ (<i>Saccostrea cucullata</i>)	4
2.2 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรม	4
2.3 การผสมเทียม	8
2.4 โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้	8
2.5 การศึกษาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในกลุ่มหอยสองฝา	9
2.6 การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	12
3.1 ตัวอย่างหอยนางรมและการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ	12
3.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพลาสติกเพื่อศึกษาด้วย LM และ TEM	12
3.3 การศึกษาโปรตีนโอมของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์	14
3.4 การระบุชนิดของโปรตีน	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	17
4.1 โครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ	17
4.2 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ	21
4.3 โปรตีนโอมของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบ	24
4.4 แผนที่ย่างอิงโปรตีนสำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ	27
4.5 การวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ	45
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผล	56
5.1 โครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ	56
5.2 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ	56
5.3 แผนที่ย่างอิงโปรตีนสำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ	59
5.4 การวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ	60

สารบัญ (ต่อ)

สรุปผลการวิจัย	63
ข้อเสนอแนะที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในขั้นต่อไป	64
ผลผลิต (Output)	65
บรรณานุกรม	66
ประวัตินักวิจัย	73

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเซลล์อสุจิของหอยนางรม <i>Saccostrea forskali</i> ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	7
2-2 ระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรม <i>Crassostrea gigas</i>	7
2-3 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยเซลล์ (<i>Pecten maximus</i>)	9
2-4 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยแมลงภู (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	10
3-1 การกำหนดค่า search parameter ในโปรแกรม mascot	16
4-1 ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (H&E)	18
4-2 ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ของหอยนางรมปากจีบในระยะต้น (methylene blue)	19
4-3 ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ของหอยนางรมปากจีบในระยะเจริญ (methylene blue)	20
4-4 เซลล์อสุจิที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี ศึกษาด้วยกล้อง TEM	22
4.5 โครงสร้างจุลกายวิภาคเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบศึกษาด้วยกล้อง TEM	23
4-6 การแยกโปรตีนของอสุจิหอยนางรมด้วยเทคนิค 2-DE ของเซลล์อสุจิ	25
4-7 การเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์อสุจิหอยนางรมที่เก็บตัวอย่าง 2 วิธี	26
4-8 Reference map ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ	27
4-9 ตัวอย่างการระบุโปรตีน spot number 59 จาก Reference map ในภาพที่ 4-8	29
4-10 ตัวอย่าง Peptide view แสดงรายละเอียดของ peptide sequence	30
4-11 Protein view แสดงรายละเอียดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้จากภาพที่ 4-9	31
4-12 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ (Gene ontology)	45
5-1 แผนที่อ้างอิงโปรตีน (proteome map) สำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ	60

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4-1 การระบุชนิดของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบตามภาพที่ 4-5	32
4-2 กลุ่มของโปรตีนแบ่งตาม Gene ontology (subcellular localization)	45
4-3 รายละเอียดของโปรตีนที่พบในกลุ่มต่างๆ ตามตารางที่ 4-2	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยจะใช้วิธีการเก็บหอยตัวอ่อนจากธรรมชาติ ซึ่งมีความแปรปรวนสูง ขึ้นอยู่กับสภาพธรรมชาติในปีนั้นๆ และอาจได้รับผลกระทบเพิ่มขึ้นในอนาคตจากสภาวะมลพิษปนเปื้อนทางทะเล ดังนั้นความพยายามที่จะผสมเทียมเพาะพันธุ์ตัวอ่อนหอยนางรมจึงได้เริ่มนำมาใช้สำหรับประเทศไทยได้มีการทดลองผสมเทียม แต่การนำมาใช้งานจริงยังมีข้อจำกัดอยู่มาก อาจเนื่องมาจากปัญหาหลายประการ ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งคือ มาจากความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความพยายามที่จะศึกษาลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในระบบเพาะเลี้ยงหอยนางรมต่อไป โดยในระยะแรกจะเริ่มทำการศึกษาในเพศผู้ ถึงกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และทำการศึกษาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อต้องการทราบชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งอาจนำไปสู่การหาโปรตีนที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ เพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดีต่อไปในอนาคต ซึ่งในระยะยาวจะเป็นการสร้างประโยชน์ให้เกษตรกรในชุมชนที่ทำอาชีพเพาะเลี้ยงหอยนางรม เป็นการสนับสนุนการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพอย่างมั่นคงและยั่งยืนโดยใช้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อตอบโจทย์ระดับชุมชน

การศึกษาหาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เพื่อให้ทราบถึงกลไกการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ มีการศึกษาในสัตว์หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงมนุษย์ งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะในมนุษย์เป็นการศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เพื่ออธิบายถึงกลไกการทำงานและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อค้นหาโปรตีนจำเพาะสำหรับบ่งชี้ภาวะเป็นหมันในเพศผู้ รวมถึงบ่งชี้ความปกติและผิดปกติของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ และทำให้ทราบถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานสำหรับใช้ภายในเซลล์ การแบ่งเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ การลำเลียงเซลล์ออกจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โครงร่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงกลไกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ไข่ในขั้นตอนการปฏิสนธิ ทั้งนี้การศึกษาโปรตีนโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ สามารถอธิบายได้ถึงกลไกการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และสามารถประยุกต์ใช้ในเรื่องการคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ หรือใช้ในทางการแพทย์เพื่อนำไปพัฒนาเทคโนโลยีการรักษาภาวะเป็นหมันในเพศชายได้

สำหรับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังยังพบการศึกษาได้น้อย เช่น ในกลุ่มหอยสองฝา พบรายงานการศึกษารองค์ประกอบของโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เช่นกัน เนื่องจากการศึกษาในกลุ่มหอยสองฝามีวัตถุประสงค์เกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำเชื้อ จึงมุ่งเน้นศึกษาเพื่อหาโปรตีนเพื่อใช้บ่งบอกคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์โดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีด้านโปรตีโอมิกส์ เช่น การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระหว่างโปรตีโอมของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่พร้อมปฏิสนธิ (mature) และที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิในหอยเซลล์ (*Pecten maximus*) และหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) (นอกจากนี้ยังพบการศึกษาในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) เป็น

การศึกษาถึงกลไกการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งการศึกษาในกลุ่มหอยสองฝาเป็นการศึกษาเพื่อนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดี สำหรับใช้ในระบบเพาะเลี้ยง เนื่องจากหอยสองฝาเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงในเขตชายฝั่งทั่วโลก แต่ข้อมูลเชิงคุณภาพสำหรับบ่งชี้คุณภาพน้ำเชื้อมีความสำคัญในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงหอยเศรษฐกิจให้มีคุณภาพสูง และพัฒนาไปสู่การเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรม ดังนั้นการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อที่ดีจึงมีความจำเป็นอย่างมาก

สำหรับการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในบางประเทศมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยง โดยการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์และทำการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพื่อผสมเทียมให้ได้ตัวอ่อน และการอนุบาลตัวอ่อนในโรงเพาะเพื่อให้ได้ตัวอ่อนระยะลงเกาะและสามารถนำไปเลี้ยงต่อไป ซึ่งในขั้นตอนของการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์จากพ่อแม่พันธุ์นั้น ทำได้สองวิธีหลักๆ ได้แก่ วิธีแรก เป็นการกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เอง โดยอาจกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความเค็มของน้ำทะเลที่เหมาะสมกับการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนหอยได้ (spawning method) วิธีที่สอง เป็นการใช้เทคนิคการรีดน้ำเชื้อ (stripping method) ทั้งสองวิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการผสมเทียมหอยนางรมในระบบเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ตัวอ่อนที่ได้จากการเก็บน้ำเชื้อทั้งสองแบบนี้อาจมีคุณภาพที่แตกต่างกันและอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของตัวอ่อน

สำหรับในประเทศไทย การศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของน้ำเชื้อในสัตว์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงพบได้น้อยมากโดยเฉพาะในกลุ่มหอยนางรม การศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อศึกษาคุณลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย เนื่องจากในปัจจุบันการเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทย อาศัยตัวอ่อนจากธรรมชาติเป็นหลัก ซึ่งอาจประสบปัญหาตัวอ่อนขาดแคลน เนื่องจากตัวอ่อนในธรรมชาติมีจำนวนลดลงอาจมีผลมาจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น สภาพอากาศแปรปรวน ทำให้น้ำทะเลมีอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปจากปกติ ค่าความเป็นกรด ด่าง และความเค็มของน้ำทะเลเปลี่ยนแปลงไป ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ที่ปล่อยออกมาเพื่อปฏิสนธิในน้ำนั้นได้รับผลกระทบโดยตรงและไม่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของตัวอ่อน (Barros, Sobral et al. 2013) เพื่อแก้ไขปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้น ผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหอยนางรมปากจیبในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มต้นจากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจیب เพื่อเป็นข้อมูลด้านชีววิทยาสำหรับหอยนางรมชนิดนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะต่างภายในโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gonad) ของหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*)
2. ระบุระยะของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่พบในหอยนางรมปากจیبและรายละเอียดของออร์แกเนลล์
3. วิเคราะห์โปรตีนของเซลล์อสุจิโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์เพื่อระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีน
4. สร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีนสำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจیب

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

กลุ่มผู้วิจัยจะทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* จากถิ่นอาศัยในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาเนื้อเยื่อในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบเพศผู้ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เก็บตัวอย่างเซลล์อสุจิจากอวัยวะสืบพันธุ์หอยนางรมเพศผู้เพื่อสกัดโปรตีนและวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์อสุจิโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ และวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบโดยใช้วิธีการทางชีวสารสนเทศศาสตร์

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยได้รับผลกระทบจากปัญหาสิ่งแวดล้อม และการปนเปื้อนของสารเคมีในแหล่งน้ำ ทำให้ผลผลิตลดลงและทำให้ระบบการเพาะเลี้ยงยากขึ้น ในบางพื้นที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์เองได้ ต้องนำเข้าจากต่างพื้นที่ ดังนั้นการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีสายพันธุ์มีคุณภาพน้ำเชื้อหรือเซลล์สืบพันธุ์ดี ย่อมส่งผลดีต่อระบบการเพาะเลี้ยงหอยนางรมและเพิ่มประสิทธิภาพในการการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยได้ เพื่อให้ได้มาซึ่งพ่อแม่พันธุ์ที่สามารถให้เซลล์สืบพันธุ์ที่ดีจึงจำเป็นต้องเข้าใจกลไกการผลิตเซลล์สืบพันธุ์อย่างลึกซึ้ง ตลอดจนกลไกการปฏิสนธิและความสำเร็จของการสร้างตัวอ่อน และต้องสร้างวิธีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีน้ำเชื้อดี เพื่อศึกษาตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับพ่อแม่พันธุ์ดี ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงต้องการค้นหาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรม เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ด้านคุณภาพสำหรับการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อระบบการเพาะเลี้ยงหอยนางรมต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) จัดเป็นหอยเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นอาหารทะเลที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายและเป็นอาหารที่จัดได้ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง ลักษณะทั่วไปของหอยนางรม เป็นหอยทะเลกาบ 2 ฝา มีกาบหนาแข็ง ซึ่งฝาทั้งสองมีขนาดไม่เท่ากันกาบบนจะใหญ่และแบนกว่ากาบล่าง ส่วนกาบล่างที่มีลักษณะโค้งเว้า และเป็นด้านที่ยึดติดกับวัตถุแข็ง เช่น ก้อนหิน ไม้หลัก หรือเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล มักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ตั้งแต่ชายฝั่งถึงระดับน้ำลึก 5 เมตร เปลือกซ้ายหรือเปลือกล่างยึดติดกับหินหรือวัสดุยึดเกาะมีลักษณะสีลงเป็นแฉ่ง เปลือกขวาแบนและยาวขนานไปกับเปลือกล่าง มีกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ (adductor muscle) ทำหน้าที่ยึดเปลือกทั้งสองให้ยึดแน่นติดกัน หากชำบกรบริเวณกล้ามเนื้อนี้ออกจะเห็นเป็นรอยกล้ามเนื้อ (muscle scar) มีรูปร่างคล้ายไตและปรากฏแถบสีน้ำตาลสลับเหลือง ซึ่งลักษณะของรอยกล้ามเนื้อนี้มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด จึงใช้ประกอบการจำแนกสปีชีส์หอยนางรมได้อีกทางหนึ่ง ที่ชอบเปลือกด้านในจะพบลักษณะปุ่มเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือก ส่วนเปลือกอีกด้านหนึ่งจะพบแฉ่งเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือกเช่นกัน เมื่อหอยปิดเปลือกปุ่มเล็ก ๆ เหล่านี้จะประกบเข้ากับแฉ่งเล็ก ๆ พอดีทำให้หอยปิดฝาเปลือกได้แข็งแรงมากขึ้น เมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 5-7 ซม. หอยชนิดนี้มีถิ่นอาศัยกระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลประเทศไทย (Yoosukh and Duangdee, 1999) และเป็นหอยที่มีการปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี (Kingtong *et al.*, 2007) นอกจากนี้หอยนางรมปากจีบยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในเขตชายฝั่งภาคตะวันออกอีกด้วย เนื่องจากเป็นชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย

ในปัจจุบันการศึกษาวิจัยในหอยนางรมไม่เพียงแต่ให้ความสำคัญในด้านการเพาะเลี้ยงเท่านั้น ยังมีการใช้หอยนางรมและหอยสองฝาอื่น ๆ เป็นต้นแบบการศึกษาด้านพิษวิทยาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย เนื่องจากหอยนางรมมีความทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ดี และพบถิ่นอาศัยกว้างกระจายอยู่ทั่วไปทุกภูมิภาคของโลก และเก็บตัวอย่างได้ง่าย (Goldberg, 1986; Kingtong *et al.*, 2007; Kingtong *et al.*, 2011)

2.2 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรม

หอยนางรมเป็นหอยที่มีเพศแยก เพศผู้และเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์แยกกัน แต่ในช่วงชีวิตอาจเกิดการเปลี่ยนเพศได้ โดยมากมักจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ก่อนและเมื่อหอยนางรมมีขนาดใหญ่ขึ้น มีพลังงานสำรองจากอาหารสะสมมากขึ้นมักมีแนวโน้มในการสร้างไข่หรือเปลี่ยนเป็นเพศเมียมากขึ้น ซึ่งกลไกการเปลี่ยนเพศยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด หอยนางรมเป็นหอยที่ไม่สามารถระบุเพศได้จากภายนอก เนื่องจากในเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ซึ่งจะต่างจากหอยสองฝาบางชนิดที่สีของเซลล์สืบพันธุ์แตกต่างกันทำให้อวัยวะสืบพันธุ์มีสีและสามารถบอกเพศได้โดยสังเกตจากสีของอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น หอยแมลงภู่ เป็นต้น ดังนั้นการระบุเพศของหอยนางรมสามารถทำได้โดยการผ่าตัดเพื่อตรวจสอบเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังพัฒนาในอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อสังเกตดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เท่านั้น หอยนางรมเป็นสัตว์ที่ไม่มีอวัยวะสืบพันธุ์ที่เด่นชัด เนื่องจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเกิดขึ้นที่บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่าง

เนื้อเยื่อชั้นนอกหรือแมนเทิล (Mantle) กับเนื้อเยื่อของต่อมย่อยอาหาร (Digestive glands) โดยจะเริ่มเห็นเซลล์ต้นกำเนิดมีการแบ่งตัวในบริเวณนี้ และเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่มีการแบ่งตัว จนเกิดเป็นท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal tubules) ในช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จึงจะสามารถแยกเพศได้ แต่ในช่วงที่ไม่มี การสืบพันธุ์จะไม่สามารถแยกเพศได้

2.2.1 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย (Oogenesis)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย (Oogenesis) เป็นกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย เกิดขึ้นภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad) ในหอยนางรมอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีตำแหน่งอยู่ ระหว่างเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล (Mantle) กับต่อมสร้างน้ำย่อย (Digestive glands) ซึ่งในสภาวะปกติเซลล์บริเวณนี้จะประกอบด้วยเซลล์พื้นฐาน หรือ Connective tissue เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เซลล์ที่อยู่ใน Connective tissue จะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ โดยจะเริ่มจากการพัฒนากลุ่มเซลล์ขึ้นมาแล้วเกิดเป็นท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal tubules) ภายในพบการสร้างและพัฒนาของเซลล์ไข่ในระยะต่างๆ โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ไข่ หรือ Oogonium ซึ่งมีโครโมโซมสองชุด (2n) อยู่ติดกับฐานของท่อจะแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนกลายเป็น Primary oocyte (2n) จากนั้น Primary oocyte จะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) ครั้งที่ 1 กลายเป็น Secondary oocyte (n) จากนั้น Secondary oocyte จะแบ่งเซลล์แบบ Meiosis ครั้งที่ 2 เพื่อให้ได้เซลล์ไข่ 4 เซลล์ (Fukazawa *et al.*, 2007) ในสัตว์บางชนิดเช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เซลล์ไข่ทั้ง 4 เซลล์จะมีขนาดไม่เท่ากัน จะมีเซลล์ไข่ 1 ใบที่มีขนาดใหญ่ และพัฒนาไปเป็นไข่ที่สมบูรณ์ แต่ในหอยสองฝาเซลล์ไข่ทุกใบที่ได้จากการแบ่งเซลล์จะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ (Mature oocyte) พร้อมทั้งจะปล่อยออกสู่ภายนอกเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิได้ โดยจะมีการสะสมอาหาร (Yolk) ไว้ภายในไซโทพลาซึมมากขึ้น ทำให้ขนาดของเซลล์ไข่ใหญ่ขึ้นตามลำดับ (Galtsoff, 1964; Lango-Reynoso *et al.*, 2000)

2.2.2 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้ (Spermatogenesis)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมเพศผู้จะมีลักษณะเริ่มต้นคล้ายที่พบในเพศเมีย กล่าวคือ เซลล์สืบพันธุ์จะผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างแมนเทิลและต่อมย่อยอาหาร (Digestive gland) เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เซลล์ที่อยู่ใน Connective tissue โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์จะเริ่มแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์ จากนั้นจะขยายขนาดขึ้นเกิดเป็นท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubules) ภายในพบการสร้างและพัฒนาของเซลล์ไข่ในระยะต่างๆ โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์อสุจิ หรือ Spermatogonium ซึ่งมีโครโมโซมสองชุด (2n) อยู่ติดกับฐานของท่อจะแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนกลายเป็น Primary spermatocyte (2n) จากนั้น Primary spermatocyte จะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) ครั้งที่ 1 กลายเป็น Secondary spermatocyte (n) จากนั้น Secondary spermatocyte จะแบ่งเซลล์แบบ Meiosis ครั้งที่ 2 เพื่อให้ได้ Spermatid 4 เซลล์ ซึ่ง Spermatid จะพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยการลดขนาดไซโทพลาซึมลงและสร้างหางยาว (Flagellum) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ส่วนหัวประกอบด้วย Acrosome ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงบรรจุเอนไซม์สำหรับย่อยส่วนหุ้มของเซลล์ไข่ในขณะปฏิสนธิ

ปัจจุบันมีข้อมูลรายงานลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเซลล์อสุจิในหอยนางรมเพียง 5 ชนิด จากสมาชิกทั้งหมด 40 ชนิด ในแฟมิลี *Osteridae* ซึ่งได้แก่ *Saccostrea commercialis* (Healy and Lester, 1991), *Ostrea edulis* (Sousa and Oliveira, 1994), *Crassostrea virginica* (Daniels *et al.*, 1971; Eckelbarger and Davis, 1996), *Crassostrea angulata* (Sousa and Oliveira,

1994), *Crassostrea gigas* (Bozzo *et al.*, 1993; Bozzo *et al.*, 2008; Komaru *et al.*, 1994; Gwo *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2005; Drozdov *et al.*, 2009; Yurchenko *et al.*, 2010) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ลักษณะของอสุจิที่พบในหอยนางรมแต่ละชนิดจะค่อนข้างแตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหอยนางรมชนิดนั้น ๆ ดังนั้นลักษณะโครงสร้างของเซลล์อสุจิ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกชนิดได้อีกด้วย

อย่างไรก็ดี ยังไม่มีข้อมูลรายงานถึงกลไกและกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมปากจیب อีกทั้งในสัตว์กลุ่มนี้ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาโปรตีนทั้งหมดที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจ ทำการศึกษาองค์ประกอบของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ของหอยนางรมในระดับจุลภาค เพื่อให้เข้าใจกลไกด้านชีววิทยาของระบบสืบพันธุ์ของหอยนางรมมากขึ้น และเพื่อจะได้เป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ของหอยนางรมในระบบเพาะเลี้ยงต่อไปในอนาคต เนื่องจากเป็นหอยนางรมชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออก

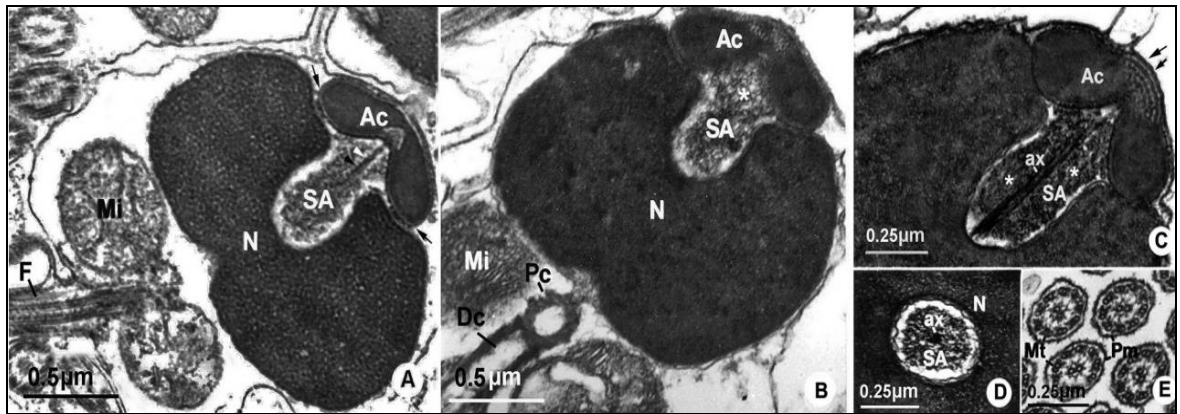
2.2.3 เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Sperm)

เซลล์อสุจิในหอยนางรมมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 2-3 μm เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไข่ ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ๆ คือ ส่วนหัว ประกอบด้วย nucleus และ acrosome ซึ่งภายในบรรจุเอนไซม์ที่ใช้อยู่ vitelline membrane ส่วนตัวประกอบด้วย mitochondrial body ที่ใช้เป็นแหล่งให้พลังงานของเซลล์อสุจิโดยจะอยู่ล้อมรอบ centriole และ ส่วนหาง ที่ช่วยในการเคลื่อนที่ (Franco *et al.*, 2008; Nuurai *et al.*, 2016) ดังแสดงในภาพที่ 2-1

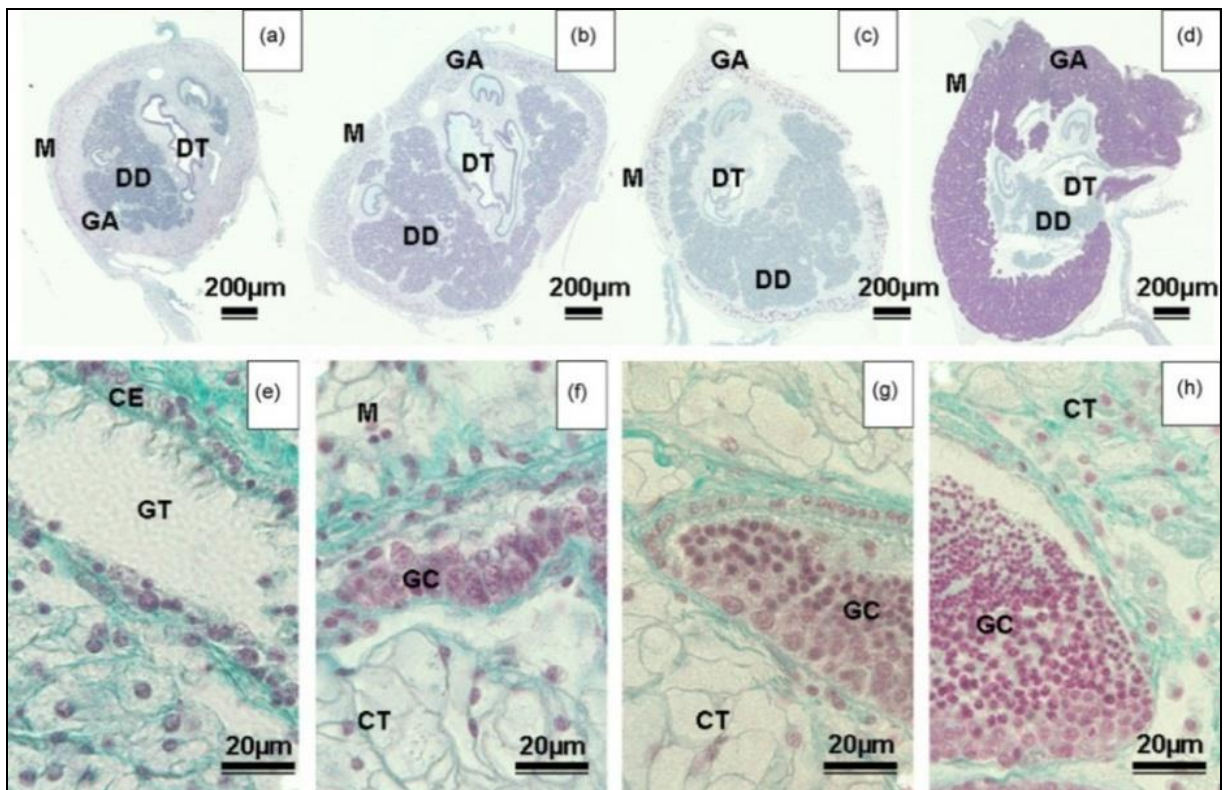
ในหอยนางรมพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เช่นเดียวกับที่พบในสัตว์กลุ่มมีกระดูกสันหลัง แต่พบโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต่างกันเล็กน้อย โดยพบไมโทคอนเดรียรวมกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ 4-5 ไมโทคอนเดรีย (Yurchenko, 2012) เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้น และมีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต่อไป และเมื่อถึงระยะที่พร้อมปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้วนั้น หอยจะเริ่มปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา

โดยในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สามารถแบ่งการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ออกเป็น 4 ระยะ ดังแสดงในภาพที่ 2-2 ซึ่งประกอบด้วย

1. ระยะที่ 0 เป็นระยะพักตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ เซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังไม่มีการพัฒนา ทำให้ไม่สามารถแยกเพศหอยได้ เนื่องจากไม่พบเซลล์ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad)
2. ระยะที่ 1 เป็นระยะที่เริ่มมีพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์โดยมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมาก
3. ระยะที่ 2 เป็นระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมากอยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์
4. ระยะที่ 3 เป็นระยะสุดท้ายของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังจะปล่อย จะพบเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาเกือบสมบูรณ์และพัฒนาสมบูรณ์แล้วภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Franco *et al.*, 2008)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเซลล์อสุจิของหอยนางรม *Saccostrea forskali* ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (Boonmee, Heude Berthelin et al. 2016)
สัญลักษณ์ acrosome (Ac), axial rod (ax), flagella (F), microtubule (Mt), Mitochondria (Mi), nucleus (N), plasma membrane (Pm) และ Subacrosomal space (SA)



ภาพที่ 2-2 ระยะเวลาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรม *Crassostrea gigas* (Franco et al., 2008) (a and e) ระยะที่ 0, (b and f) ระยะที่ 1, (c and g) ระยะที่ 2, (d and h) ระยะที่ 3
สัญลักษณ์ (Mantle (M), gonadal area (GA) connective tissue (CT), digestive diverticula (DD), digestive tract (DT), gonadal tubule (GT), ciliated epithelium (CE), germ cells (GC)

2.3 การผสมเทียม

ในระบบการเพาะเลี้ยงหอยนางรมนิยมใช้เทคนิคในการผสมเทียมอยู่ 2 วิธีหลักๆ 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, Pommier et al. 2002) เช่น ในระบบเพาะเลี้ยงหอยในแถบยุโรป หรือการฉีดฮอร์โมน serotonin เข้าไปในตัวหอยนางรม (Braley 1985) เพื่อกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา

2.4 โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

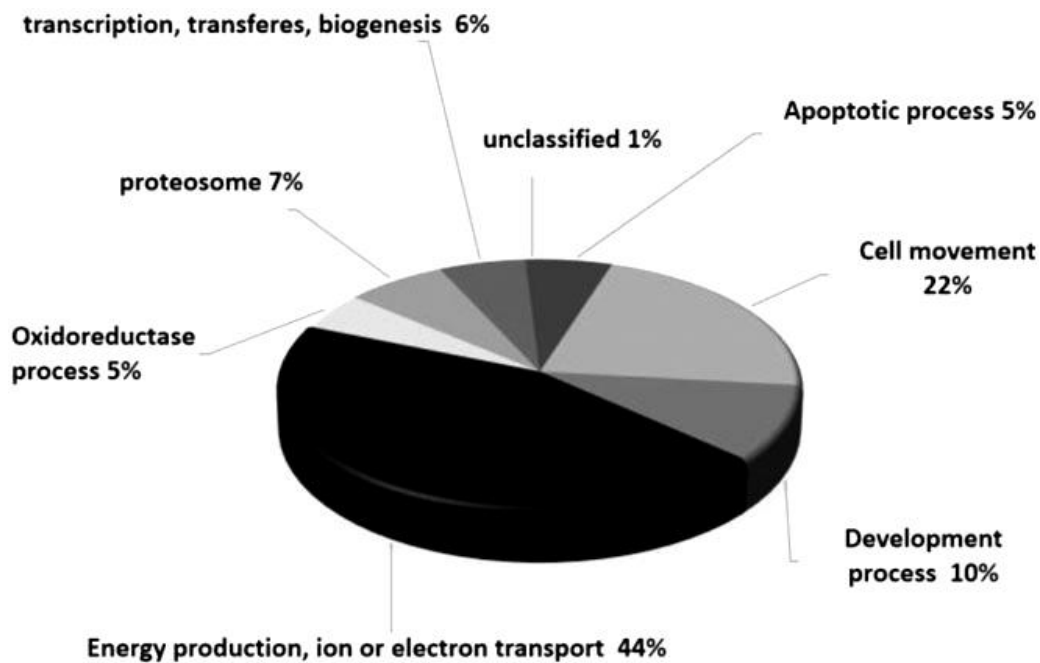
การศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ส่วนใหญ่มีการศึกษากันในสัตว์หลายชนิด ทั้งในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ในหนู (Skerget, Rosenow et al. 2015) มีการศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีนที่พบในแฟลเจลลัมในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ พบโปรตีนกลุ่ม Tektins ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในแฟลเจลลัม (Cao, Gerton et al. 2006) (Baker, Hetherington et al. 2008) ในวัว (Peddinti, Nanduri et al. 2008) ในลิง (Sheri Skerget, Matthew Rosenow et al. 2013) รวมทั้งในมนุษย์ (Johnston, Wooters et al. 2005) (Martinez-Heredia, Estanyol et al. 2006) (Wang, Guo et al. 2013) ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เป็นการศึกษาถึงโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เพื่ออธิบายถึงกลไกการทำงานและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อตรวจสอบภาวะเป็นหมัน โดยโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัด (Biomarker) ถึงความปกติและผิดปกติของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ เนื่องจากพบโปรตีนต่างชนิดกัน ทำให้ทราบถึงโปรตีนที่เป็นตัวกำหนดและควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เช่น ในการศึกษาของ (Li, Wang et al. 2016) ศึกษาถึงโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในมนุษย์ เพื่อนำไปพัฒนาเทคโนโลยีเกี่ยวกับการรักษาภาวะเป็นหมัน ซึ่งพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทั่วไปใน sperm เช่น Tubulin, Acrosin, mitochondrial proteins หรือ cytoskeletal proteins และพบโปรตีนที่ควบคุมภาวะเจริญพันธุ์ คือ P25b ซึ่งสามารถบอกถึงคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ โดยถ้าระดับ P25b ต่ำลงทำให้ความสมบูรณ์ในเซลล์สืบพันธุ์ลดลงด้วยเช่นกัน (Parent, Lefievre et al. 1999) เป็นต้น

โดยทั่วไปโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างพลังงานที่ใช้ภายในเซลล์ การแบ่งเซลล์ในท่อสืบพันธุ์ เช่น HSPA2 (Heat shock-related 70 kDa protein 2) ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์แบบ meiosis เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเซลล์ เช่น CDK5 (Cyclin dependent kinase 5) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างของเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น ACTB, ARPM2, TEKT2 (Tektin 2), TUBB (Tubulin beta subunit) หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงเซลล์ออกจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Martinez-Heredia, Estanyol et al. 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงกลไกของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ไซโตพลาซึมในขั้นตอนการปฏิสนธิ (Dorus, Wasbrough et al. 2010) ซึ่งพบโปรตีน เช่น CRISP2 (Cysteine rich secretory protein 2) , ROPN1 (AKAP-binding sperm

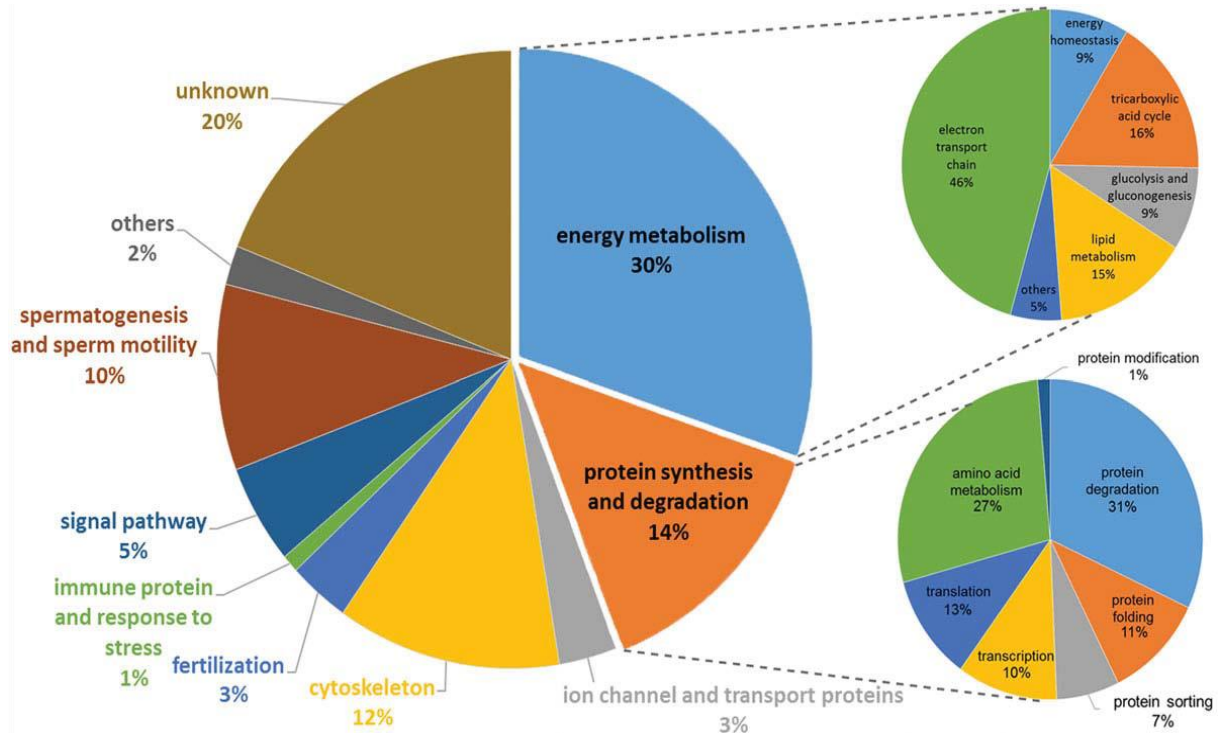
protein ropporin), SPACA (Sperm acrosome associated) เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษาโปรตีนโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ สามารถอธิบายได้ถึงกลไกการทำงานของโปรตีนที่ควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และสามารถประยุกต์ใช้ในเรื่องการคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ หรือใช้ในทางการแพทย์เพื่อนำไปพัฒนาเทคโนโลยีการรักษาภาวะเป็นหมันในเพศชายได้ (Kwon, Oh et al. 2015)

2.5 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 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงานเพื่อใช้ในเซลล์ เช่น Isocitrate dehydrogenase, ATP synthase subunit D โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์ เช่น Heat shock 70 kDa protein A (Kingtong, Kellner et al. 2013) (Boonmee, Heude Berthelin et al. 2016) ดังภาพที่ 2-3 หรือการศึกษาและระบุชนิดโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยแมลงภู (Zhang, Mu et al. 2015) ซึ่งพบโปรตีนที่แบ่งกลุ่มได้ ดังภาพที่ 2-4 รวมทั้งมีการศึกษาถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารระหว่างเซลล์ด้วยเช่นกัน (Xiaohong, Baozhong et al. 2015)



ภาพที่ 2-3 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยเซลล์ (*Pecten maximus*)
ที่มา: (Boonmee, Heude Berthelin et al. 2016)



ภาพที่ 2-4 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยแมลงภู (Mytilus galloprovincialis) ที่มา: (Zhang, Mu et al. 2015)

2.6 การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

ปัจจุบันเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) ได้เข้ามามีบทบาทต่อการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากการศึกษาโดยใช้โปรตีโอมิกส์ทำให้ศึกษาโปรตีนในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้จำนวนมากในคราวเดียว ทำให้มองภาพรวมกลไกการทำงานของเซลล์ในระดับโปรตีนได้ โดยการแสดงออกของโปรตีนขึ้นอยู่กับปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม ระดับฮอร์โมน และปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อมและสารเคมีที่สิ่งมีชีวิตได้รับ ปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการทำงานของยีนซึ่งมีการแสดงออกผ่านโปรตีน เพื่อตอบสนองต่อปัจจัยหรือสภาพแวดล้อมหนึ่ง ๆ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์อีกด้วย ซึ่งถือเป็นการวิจัยยุคหลังจากที่มีข้อมูลจีโนมเพื่อให้เข้าใจหน้าที่ของยีนมากขึ้น (Post-genomics era) (Aebersold and Mann, 2003)

การศึกษาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์นี้จะทำให้เราทราบถึงชนิดและปริมาณของโปรตีนที่สร้างขึ้นจากจีโนมและเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งโปรตีนทำหน้าที่หลากหลายภายในเซลล์ นอกจากจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างที่สำคัญในเซลล์แล้ว ยังทำหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์อีกด้วย นอกจากนี้โปรตีนอีกหลายชนิดยังทำหน้าที่จับจำเพาะ เช่น ในกรณีของเซลล์สืบพันธุ์จะสร้างโปรตีนชนิดจำเพาะขึ้นที่ผิวของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และในเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะทำหน้าที่จดจำเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ทำให้สามารถผสมพันธุ์กันได้ไม่หลงเผ่าพันธุ์ หรือโปรตีนบางชนิดอาจเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์ได้ ดังนั้นหากทราบชนิดและหน้าที่ของโปรตีนที่พบในเซลล์สืบพันธุ์ก็จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการค้นหาตัวบ่งชี้คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระดับโปรตีนได้

การศึกษาโปรตีโอมของหอยนางรมโดยเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ประกอบด้วยขั้นตอน การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อ จการวัดปริมาณโปรตีนให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการ แล้วแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ

(Two-dimensional gel electrophoresis) บนเจลพอลิอะคริลาไมด์ มิติที่หนึ่ง (First dimension) แยกโปรตีนตามประจุสุทธิ (pI) มิติที่สอง (second dimension) นำโปรตีนที่แยกได้จากมิติที่หนึ่งมาแยกตามขนาดของโปรตีนหรือมวลโมเลกุล แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมสีเพื่อให้เห็นโปรตีนที่ถูกแยกบนเจล จากนั้นทำการวิเคราะห์รูปภาพโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เช่น SameSpot Analysis Program ซึ่งจะทำหน้าที่เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งจะช่วยให้เราทราบว่าโปรตีนทั้งหมดเท่าใด และมีโปรตีนใดบ้างที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อสัมผัสกับสารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเราจะเลือกโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพื่อไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินให้ได้เปปไทด์ขนาดที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยใช้เครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS ข้อมูลโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์จะถูกแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโนที่ได้นี้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนหรือดีเอ็นเอในระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอหรือโปรตีนโดยใช้เทคนิคด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) ซึ่งจะช่วยให้เราระบุชนิดของโปรตีนที่กำลังศึกษาได้ (Anderson and Anderson, 1998; Aebersold and Mann, 2003) ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านโปรตีโอมิกส์มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการพัฒนาของเครื่องมือวิเคราะห์ เทคนิคการสกัดและแยกโปรตีน โปรแกรมวิเคราะห์ และฐานข้อมูลจีโนมที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา

เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์สำหรับการศึกษาเซลล์อสุจิในหอยนางรมชนิด *Crassostrea gigas* ทำให้ทราบชนิดและปริมาณของโปรตีนที่มีการแสดงออกในเซลล์อสุจิที่เจริญสมบูรณ์แล้ว (Kingtong *et al.*, 2013) รายงานฉบับนี้ยังชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการค้นหาโปรตีนที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพสำหรับหอยนางรมชนิดดังกล่าว อย่างไรก็ตามในรายงานฉบับดังกล่าวมีการระบุชนิดของโปรตีนเพียงไม่กี่ชนิด โดยเลือกเฉพาะชนิดของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจในภาพรวมมากขึ้น คณะผู้วิจัยจึงต้องการระบุชนิดของโปรตีนทั้งหมดที่พบในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ โดยจะใช้เทคนิคการแยกโปรตีนแบบ 2D gel electrophoresis ร่วมกับการระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้ LC-MS/MS ร่วมกับเทคโนโลยีสารสนเทศศาสตร์ เพื่อเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนที่พบกับฐานข้อมูลจีโนมและโปรตีโอม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างหอยนางรมและการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจیب *Saccostrea cucullata* ที่มีถิ่นอาศัยในเขตชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงใต้แก่ ชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี โดยจะสุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมตัวเต็มวัยที่มีขนาดประมาณ 5-7 ซม. หอยทั้งหมดนำกลับมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อทำการผ่าตัดเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาระดับจุลกายวิภาคต่อไป และส่วนหนึ่งจะเลี้ยงไว้เพื่อเก็บตัวอย่างเซลล์อสุจิสำหรับศึกษาในระดับโปรตีน โดยนำหอยนางรมมาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการในน้ำทะเล ให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. และ *Isochysis* sp. ที่ความเข้มข้น 1% v/v ของแพลงตอนหัวเชื้อ 2×10^7 cells/ml. (Kingtong et al., 2007)

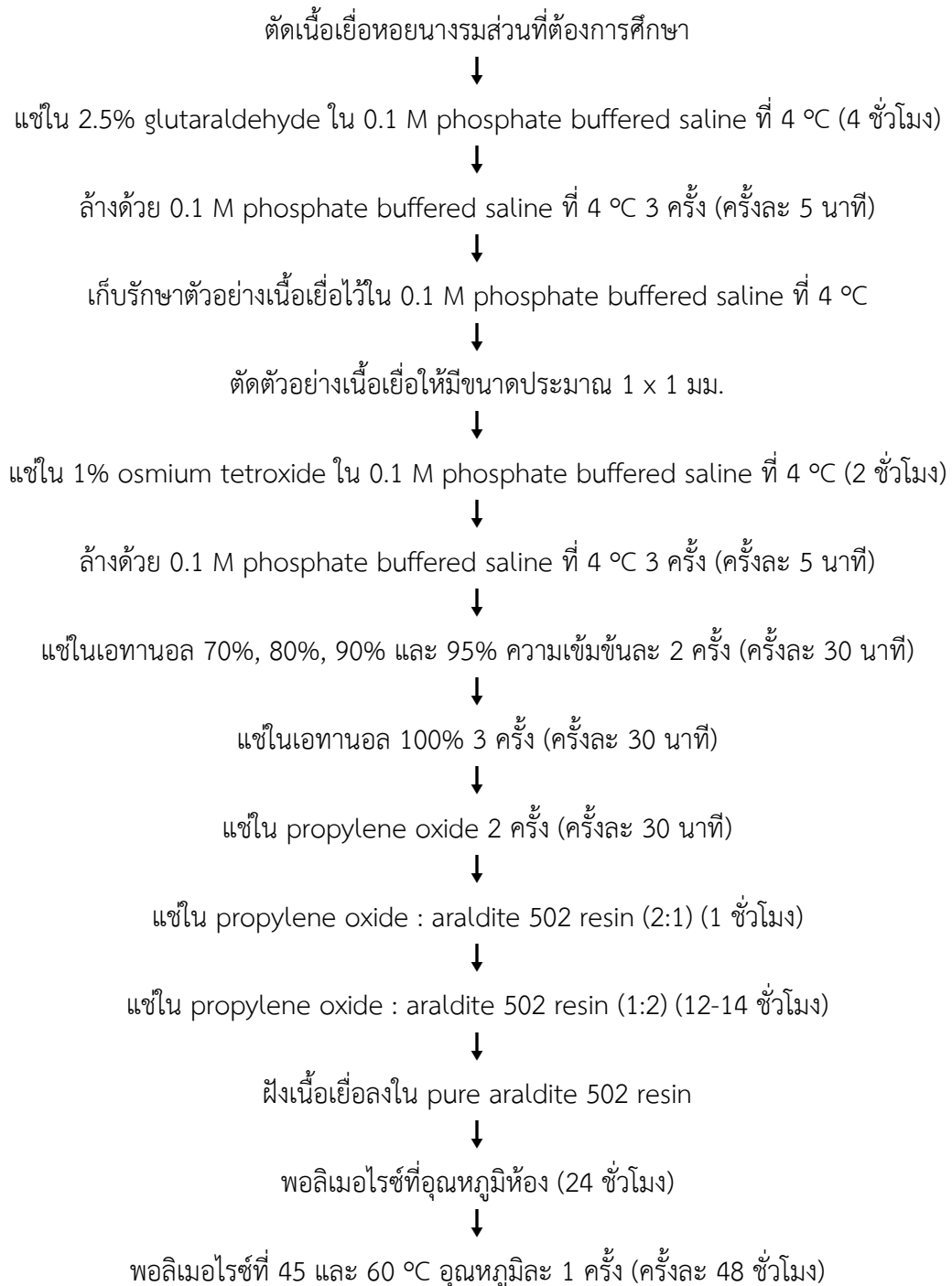
การคัดเลือกเพศหอยนางรม หอยนางรมเป็นหอยที่มีเพศแยก เพศผู้และเพศเมียมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แยกกัน เมื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สมบูรณ์แล้ว หอยจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ผ่านช่องปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (gonophore) ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ด้านข้างของลำตัว เซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมไม่มีสี ดังนั้นการแยกเพศของหอยนางรมจึงทำได้ยากมาก ไม่สามารถจำแนกได้จากลักษณะภายนอก ต้องทำการสุ่มตัดเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เพื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อดูว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย โดยเพศผู้จะพบอสุจิภายใน ส่วนเพศเมียจะพบไข่ (oocyte) ดังนั้นวิธีการตรวจสอบต้องใช้เทคนิคการตรวจสอบเซลล์สืบพันธุ์โดยตรงเท่านั้น คัดเลือกเฉพาะเพศผู้ซึ่งจะเห็นเซลล์อสุจิที่เคลื่อนที่เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป เมื่อตรวจเพศหอยนางรมด้วยวิธี stripping method โดยใช้เข็มเย็บที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการผ่าตัดเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยตัดส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ แบ่งเนื้อเยื่อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งเพื่อเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน และกลุ่มที่สองเพื่อเตรียมตัวอย่างในบล็อกพลาสติกสำหรับศึกษาด้วย TEM

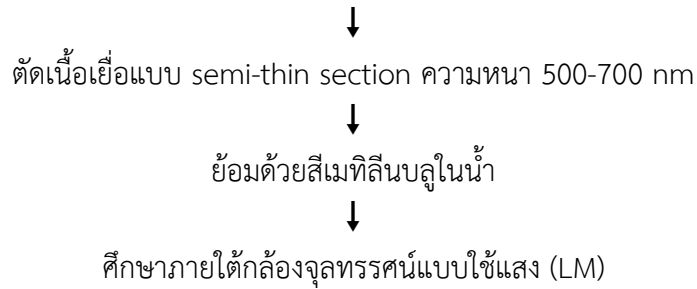
3.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพลาสติกเพื่อศึกษาด้วย LM และ TEM

เนื้อเยื่อกลุ่มที่สองแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเนื้อเยื่อที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1x1 มิลลิเมตร แช่ใน 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นแช่ในเอทานอล 70%, 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาทีตามลำดับ แล้วแช่ในเอทานอล 100% 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที จากนั้นแช่ใน propylene oxide 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที แช่ใน propylene oxide : araldite 502 resin (2:1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแช่ใน propylene oxide : araldite 502 resin (1:2) เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นฝังเนื้อเยื่อใน pure araldite 502 resin พอลิเมอไรซ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา

24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 1 ครั้ง ๆ ละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ตัดเนื้อเยื่อแบบ semi-thin section ให้มีความหนา 500-700 นาโนเมตร ย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูในน้ำ แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope; LM) และตัดเนื้อเยื่อแบบ ultra-thin section ให้มีความหนา 60-90 นาโนเมตร วางเนื้อเยื่อลงบน copper grid ที่งอไว้ให้แห้ง แล้วย้อมด้วย saturated uranyl acetate ในเมทานอล 70% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 0.1% lead citrate ในน้ำ เป็นเวลา 15 นาที ที่งอไว้ให้แห้ง แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

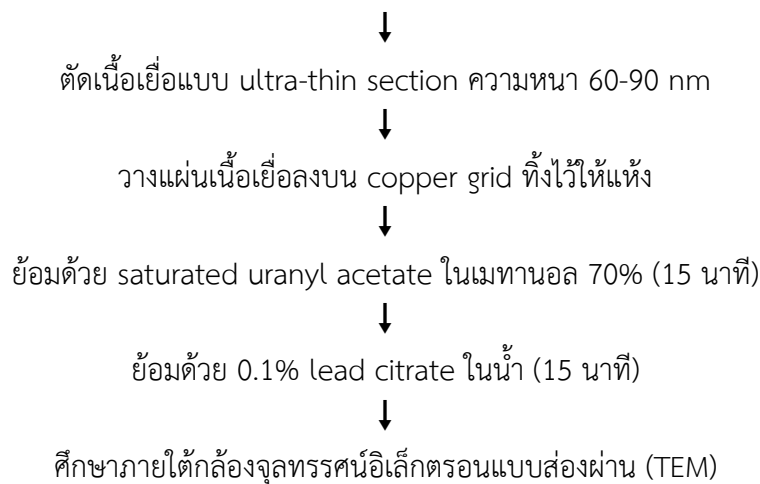
3.2.1 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)





3.2.2 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ภายหลังจากตัดเนื้อเยื่อแบบ semi-thin section ความหนา 500-700 nm เพื่อย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู ตามขั้นตอนข้างบนแล้ว หากตัวอย่างใดมีความน่าสนใจและต้องการศึกษาต่อด้วยกล้อง TEM ให้นำชิ้นตัวอย่างดังกล่าวมาตัดให้บางลง



3.3 การศึกษาโปรตีนของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจیبด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

3.3.1 การสกัดโปรตีน

การสกัดโปรตีนจากเซลล์อสุจิทำได้โดยนำตัวอย่างมาบดด้วยเครื่องบดในสารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2 containing 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 1mM EDTA and 1 mM cocktail protease inhibitor) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เศษเซลล์หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันตกตะกอน แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BioRad protein DC assay (BioRad, Herts, UK) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็น standard protein เนื่องจากตัวอย่างน้ำเชื้ออาจมีน้ำทะเลติดมาด้วย อาจมีผลต่อการแยกโปรตีนในขั้นต่อไป เพื่อกำจัดปัญหาดังกล่าวจึงต้องเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ขั้นต่อไป โดยใช้ 2D-clean up kit (GE Healthcare Life Science) เพื่อช่วยให้ตัวอย่างโปรตีนบริสุทธิ์ขึ้น

3.3.2 การแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค Two-dimensional gel electrophoresis

คำนวณโปรตีนให้ได้ 100 µg ต่อตัวอย่าง ผสมกับ rehydration buffer ที่ประกอบด้วยยูเรีย 7 M DTT 0.1 M CHAPS 4% IPG buffer 0.2% แล้วโหลดลงใน Isoelectric focusing gel (IEF) strip pH3-10, non-linear ขนาด 7 ซม. (GE Healthcare Life Science) IEF strip ที่ไว้ข้ามคืนเพื่อให้สารละลายทั้งหมดซึมเข้าไปในเจล เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วให้ทำการโฟกัสโปรตีนตามคู่มือการใช้ หลังจากนั้นนำ IEF strip ที่โฟกัสโปรตีนเรียบร้อยแล้วมาแช่ในสารละลาย equilibration buffer 1 (6 M urea, 50 mM Tris (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 1% (w/v) DTT) เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย equilibration buffer 2 (6 M urea, 50 mM Tris (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 2.5 % (w/v) iodoacetamide เป็นเวลา 15 นาที ทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Two-dimensional gel electrophoresis โดยมีที่หนึ่งจะแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าตามค่า Isoelectric focusing ของโปรตีน เครื่องมือที่ใช้คือ IPGPhor3 จากนั้นในมิติที่สองจะแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุลโดยใช้ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 2 D well) หลังจากกระบวนการ electrophoresis จะนำเจลที่ได้ย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 และ ล้างสีด้วย Destained solution

3.3.3 การวิเคราะห์ภาพถ่ายเจล

นำแผ่นเจล SDS-PAGE ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วไปสแกนด้วยเครื่อง Silver fast® 8 Expression 11000XL เพื่อสร้างแผนที่อ้างอิง (Reference map) สำหรับข้อมูลโปรตีนในเซลล์ของหอยนางรมปากจีบ โดยแผนที่นี้จะระบุตำแหน่งของ pI และ Molecular weight บนเจล และกำหนดหมายเลขของจุดโปรตีน (protein spot) ลงบนเจล จากนั้นเลือกตัดโปรตีนแต่ละจุดตามหมายเลขที่กำหนดไว้ เพื่อนำโปรตีนไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ต่อไป แผนที่โปรตีนที่ได้นี้จะใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบต่อไป

3.4 การระบุชนิดของโปรตีน

3.4.1 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน

นำแผ่นเจล SDS-PAGE ที่มีความแตกต่างของโปรตีนมาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน โดยตัดจุดของโปรตีน (protein spots) ออกจากแผ่นเจล แล้วจึงนำเจลไปล้างด้วย สารละลาย 50% acetonitrile (ACN), 25 mM ammonium bicarbonate (NH₄ HCO₃) 2 ครั้ง ๆ ละ 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเติม 100% acetonitrile 200 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าเจลจะมีสีขาวแล้วจึงดูดสารละลายออก หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเพื่อให้ได้สายเปปไทด์ โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซินที่เจือจางอัตราส่วน 0.006 µg/µl ปริมาณ 10-15 ไมโครลิตร ลงในหลอดต่างๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ทริปซินมีคุณสมบัติ คือ สามารถจดจำตำแหน่งและเข้าไปตัดกรดอะมิโนหลังตำแหน่ง arginine และ lysine ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS

3.4.2 การระบุชนิดของโปรตีน

การระบุชนิดของโปรตีนนั้นทำได้โดยนำเปปไทด์ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)

(AmaZon™ speed ETD mass spectrometer) ที่ประกอบด้วย ส่วนของ liquid chromatography และ ส่วนของ electrospray ionization (ESI)/ ion trap mass spectrometer ซึ่งผลที่ได้จะเป็น Chromatogram และนำผลที่ได้นี้ไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาชนิดของโปรตีนโดยการสืบค้นในฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ เช่น Mascot (www.matrixscience.com) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ (parameters) ค่า peptide tolerant คือ ± 1.2 Da ค่า MS/MS tolerant คือ ± 0.6 Da เลือกเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT หรือฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ดังแสดงในภาพที่ 3-1

The screenshot shows the Mascot MS/MS Ions Search interface. The search parameters are as follows:

- Database(s):** contaminants (AA)
- Taxonomy:** All entries
- Enzyme:** Trypsin
- Allow up to:** 1 missed cleavages
- Quantitation:** None
- Fixed modifications:** --- none selected ---
- Variable modifications:** --- none selected ---
- Peptide tol. \pm :** 1.2 Da
- MS/MS tol. \pm :** 0.6 Da
- Peptide charge:** 2+
- Monoisotopic:** Average
- Data file:** Choose File (No file chosen)
- Data format:** Mascot generic
- Instrument:** Default
- Decoy:**
- Precursor:** m/z
- Error tolerant:**
- Report top:** AUTO hits

Callouts on the right side of the image point to specific settings:

- เลือกฐานข้อมูล SwissProt (points to Database(s))
- Taxonomy เลือก All entries (points to Taxonomy)
- Enzyme ที่ใช้ย่อยเลือกเป็น Trypsin (points to Enzyme)
- Peptide tol. เลือก 1.2 (points to Peptide tol. \pm)
- Peptide charge เลือกเป็น 1+ 2+ and 3+ (points to Peptide charge)
- เลือกไฟล์ที่ต้องการ search (.mgf) (points to Data file)
- Data format เลือก Mascot generic (points to Data format)
- Instrument เลือก ESI-TRAP (points to Instrument)

ภาพที่ 3-1 การกำหนดค่า search parameter ในโปรแกรม mascot

บทที่ 4

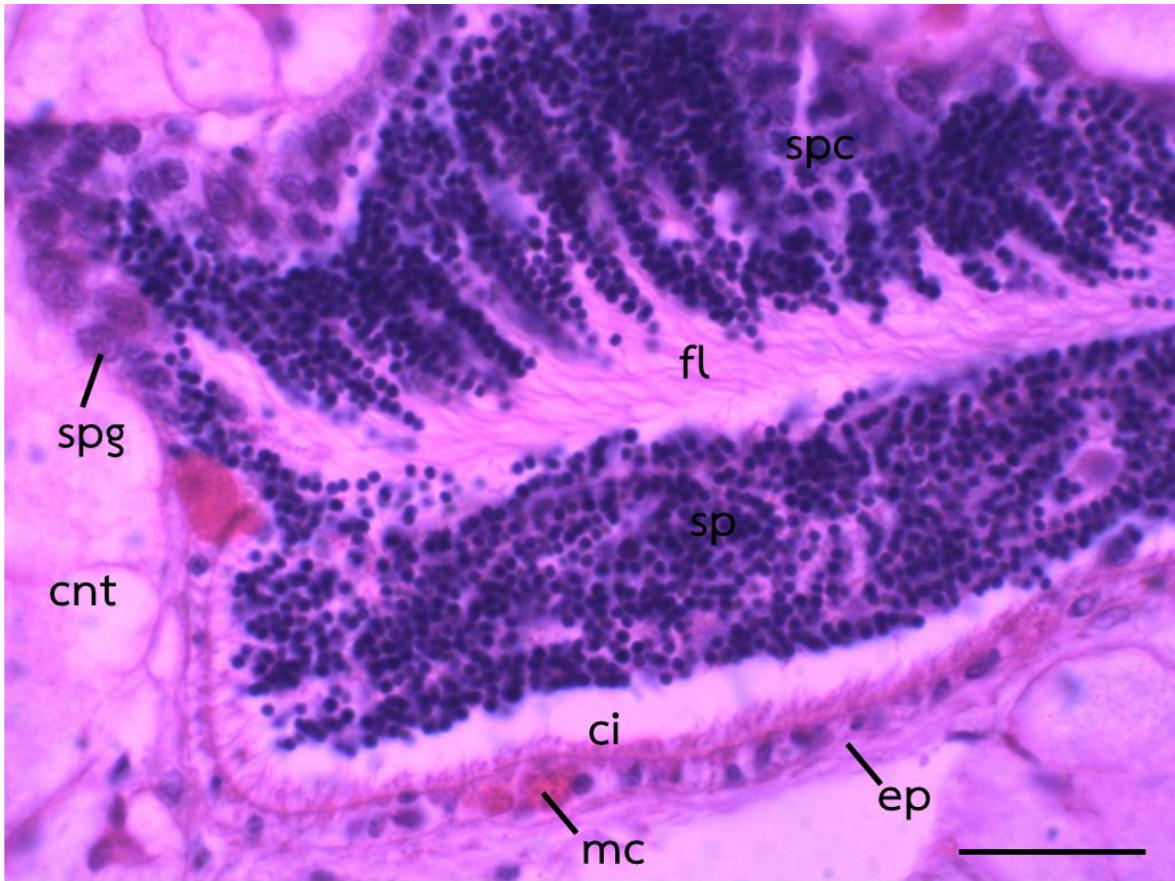
ผลการศึกษา

4.1 โครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

ภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบพบท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubules) กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพที่ 4-1) ภายในท่อจะพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ ประกอบด้วยสเปอร์มาโทโกเนียม (spermatogonium; spg) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ อยู่ใกล้กับฐานของท่อนิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม และอาจพบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน ถัดจากสเปอร์มาโทโกเนียมจะพบสเปอร์มาโทไซต์ (spermatocyte; spc) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าสเปอร์มาโทโกเนียมเล็กน้อย นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีค่อนข้างเข้ม ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์จะพบสเปอร์มาทิด (spermatid; spt) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีเข้ม และถัดจากสเปอร์มาทิดจะพบเซลล์อสุจิหรือสเปอร์มาโทซัว (sperm or spermatozoa) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีม่วงเข้มของฮีมาทอกโซลิน เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์แล้วจะมาเรียงตัวภายในบริเวณลูเมน (lumen) สเปอร์มาโทซัวที่สมบูรณ์ โดยมีแฟลเจลลัม (flagellum; fl) ช่วยในการเคลื่อนที่ ซึ่งการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อจะเริ่มจากด้านฐานของท่อเข้าสู่บริเวณลูเมน สเปอร์มาโทซัวที่สมบูรณ์จะหันด้านหัวเข้าสู่กลางท่อ ส่วนด้านหลังจะหันเข้าสู่ลูเมน

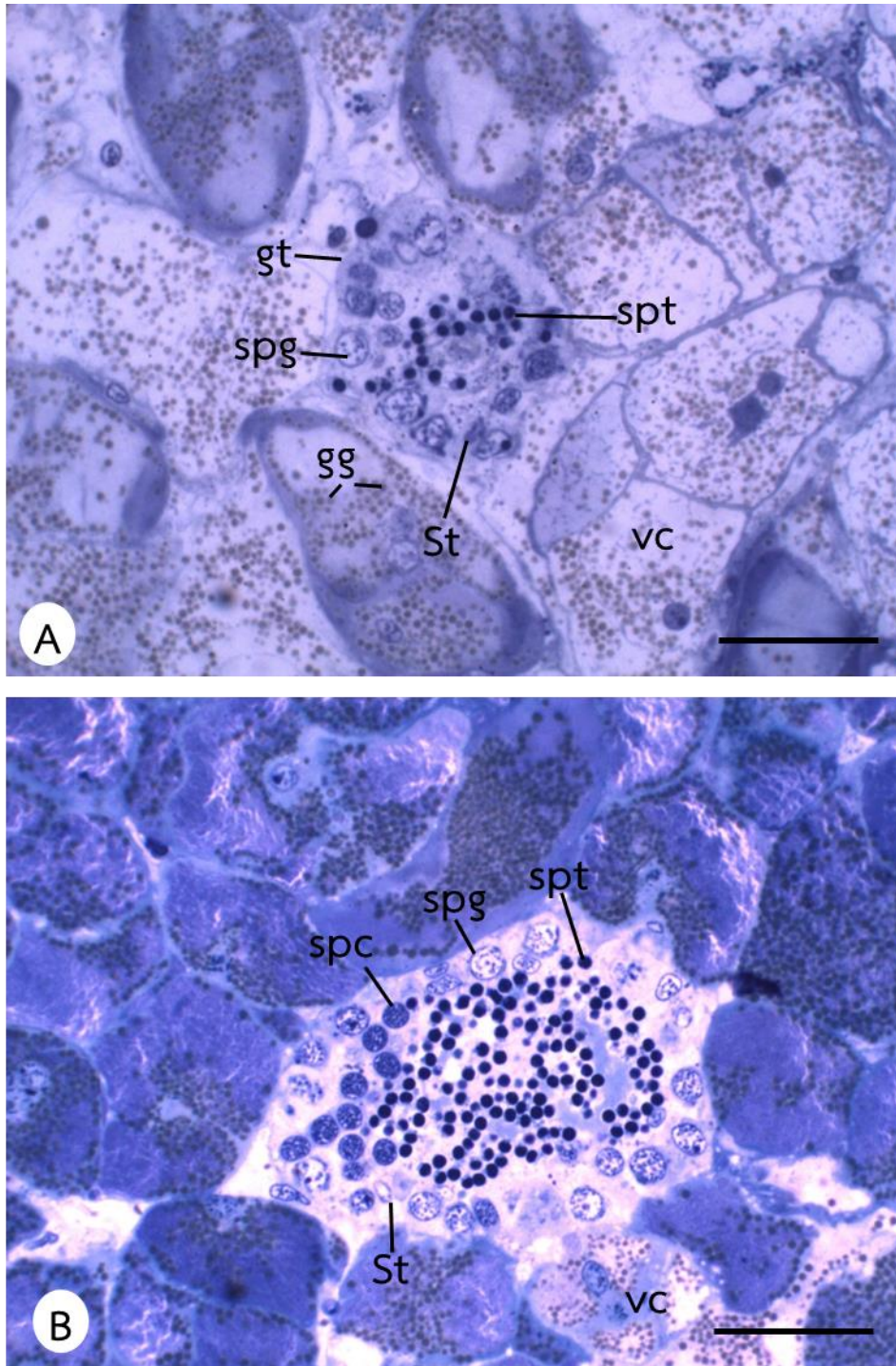
เมื่อทำการศึกษาท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมเพศผู้ใน semithin section ย้อมด้วยสี meythylene blue พบลักษณะท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เริ่มมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (early stage of spermatogenesis) ดังภาพที่ 4-2 เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์เริ่มมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ในระยะนี้จะพบการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะต่าง ๆ พบเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ในระยะนี้จะพบว่าเซลล์ที่ติดกับด้านฐานของท่อจะมีขนาดใหญ่ซึ่งเป็นเซลล์ spermatogonium ที่แบ่งเซลล์เพื่อสร้าง spermatocyte จากนั้น spermatocyte จะเริ่มแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสจนได้เซลล์ spermatid ซึ่งมีขนาดเล็กลง และพบได้ในฝั่งตรงข้ามของ spermatogonium ในระยะนี้ยังสามารถสังเกตเห็นเซลล์ร่างกายที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ที่ปรากฏในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เรียกว่า Sertoli cell (ภาพที่ 4-2B)

เมื่อท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เจริญมากขึ้นจะพบท่อขนาดใหญ่ขึ้นและพบเซลล์อสุจิมากขึ้น (ภาพที่ 4-3) ซึ่งพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ developing stage (ภาพที่ 4-3A) จนถึงระยะ mature stage (ภาพที่ 4-3B) เป็นระยะที่พบเซลล์อสุจิได้จำนวนมาก เนื่องจากในระยะนี้ เกิด spermiogenesis มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์จาก spermatid ไปเป็น spermatozoa ที่มี flagellum หันออกสู่ lumen แต่หัวส่วนของเซลล์ spermatozoa ยังหันเข้าหาด้านที่ติดกับผนังของท่อ เมื่อการสร้างเซลล์อสุจิสมบูรณ์ก็พร้อมที่จะปล่อยออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ต่อไป ซึ่งในการศึกษาค้างนี้มีการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์จากตำแหน่งอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาค และศึกษาโปรตีนของเซลล์อสุจิด้วย ซึ่งจะกลับถึงในลำดับถัดไป



ภาพที่ 4-1 ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (H&E)

สัญลักษณ์ ci=cilia, cnt=connective tissue, ep=epithelium, fl=flagellum,
mc=mucous cell, sp=spermatozoa, spg=spermatogonium, spc=spermatocyte,
scale bare=25 μ m



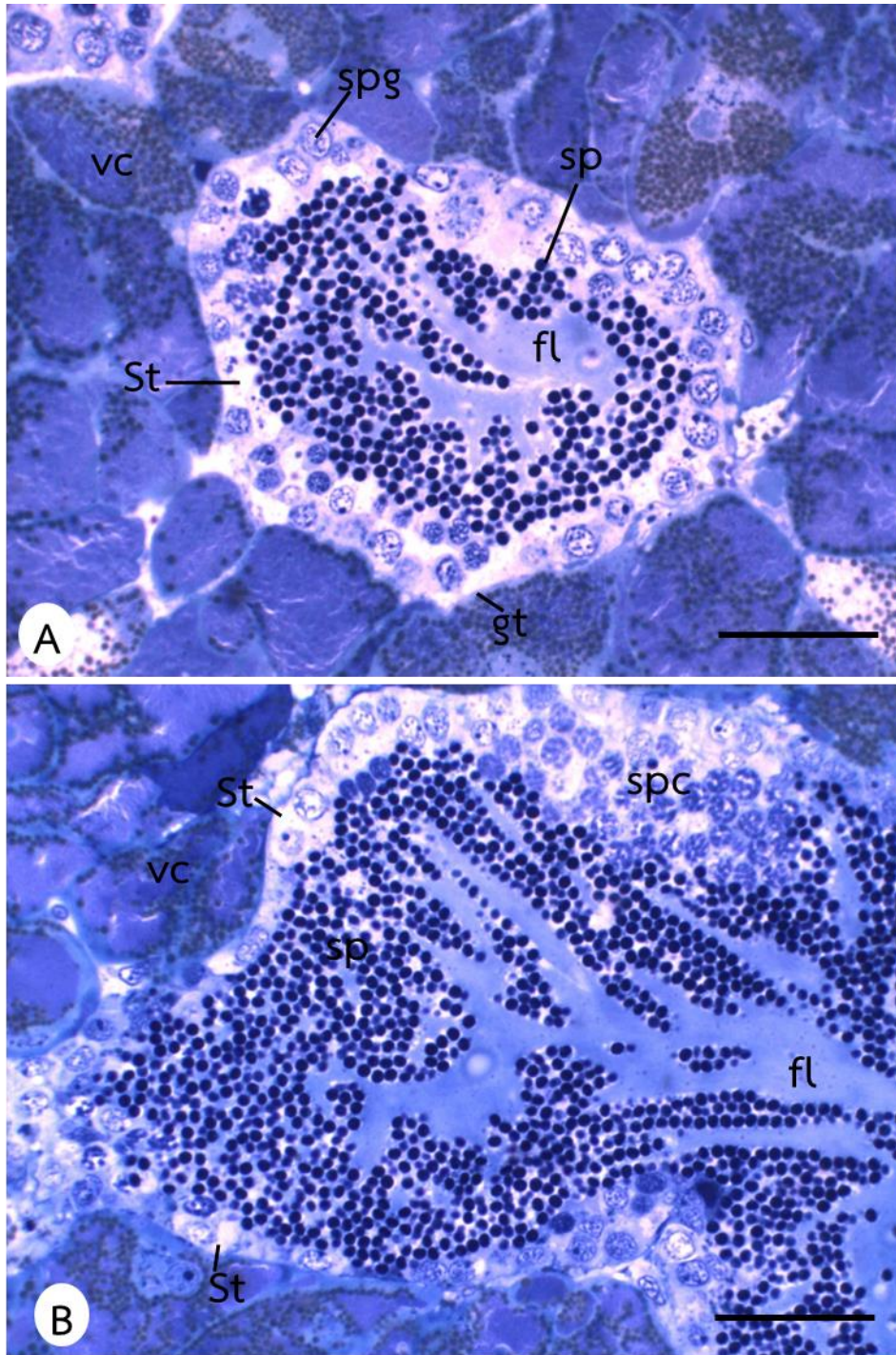
ภาพที่ 4-2 ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ของหอยนางรมปากจีบในระยะต้น (methylene blue)

A. Early stage of spermatogenesis

B. Developing stage of spermatogenesis

สัญลักษณ์ ci=cilia, cnt=connective tissue, ep=epithelium, fl=flagellum,

sp=spermatozoa, spg=spermatogonium, spc=spermatocyte, scale bare=25 μ m



ภาพที่ 4-3 ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ของหอยนางรมปากจีบในระยะเยเริญ (methylene blue)

A. Developing stage of spermatogenesis

B. Mature stage of spermatogenesis

สัญลักษณ์ ci=cilia, cnt=connective tissue, ep=epithelium, fl=flagellum,

sp=spermatozoa, spg=spermatogonium, spc=spermatocyte, scale bare=25 μ m

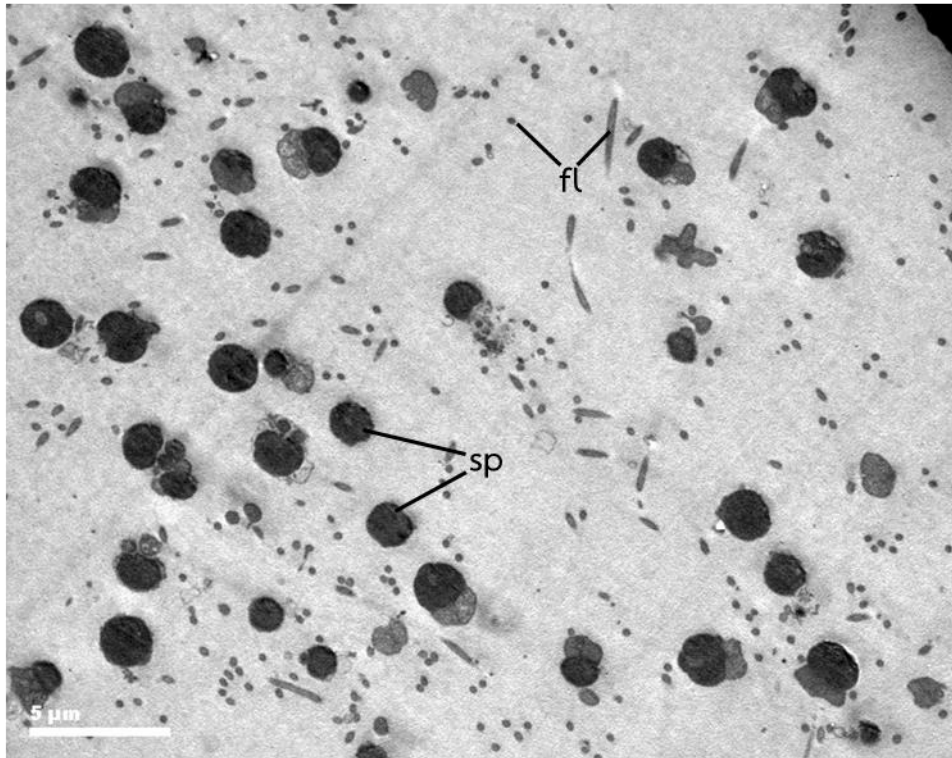
4.2 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

การศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบในครั้งนี้นำการเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์ 2 วิธี ได้แก่ วิธี spawning method คือการกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เอง และวิธี stripping method คือการกรีดเอาตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์จากบริเวณ gonad โดยตรง ซึ่งวิธีการหลังนี้เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการผสมเทียมในหอยนางรมโดยทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกและสามารถเก็บเซลล์สืบพันธุ์ได้จำนวนมากจากเพศผู้และเพศเมีย

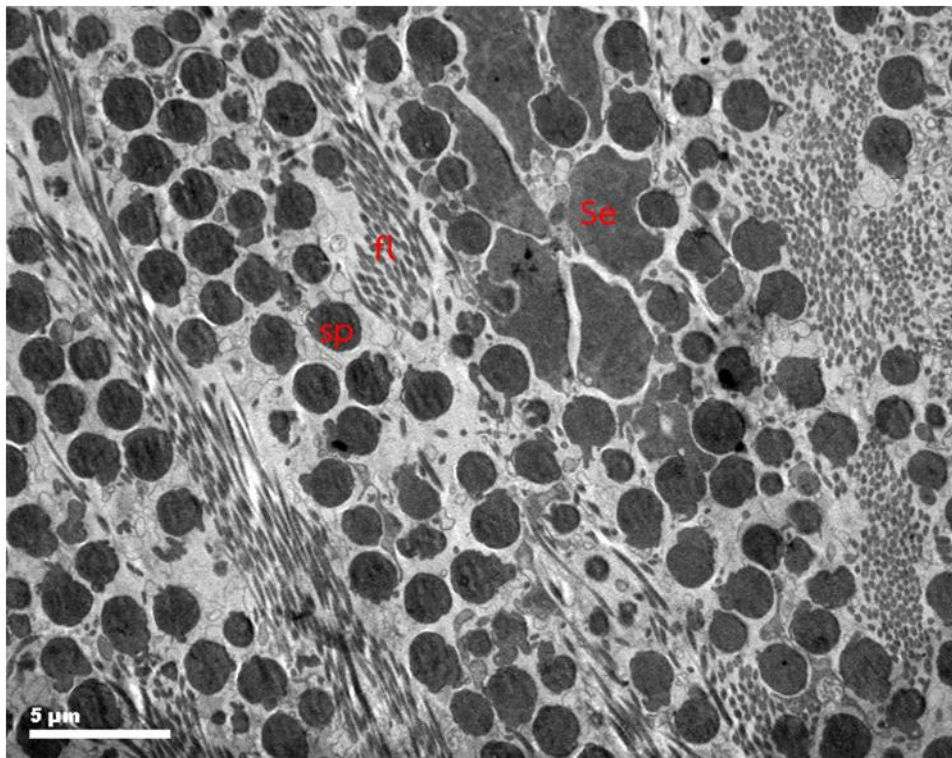
เมื่อเปรียบเทียบเซลล์สืบพันธุ์จากวิธีการเก็บตัวอย่างทั้ง 2 วิธี พบตัวอย่างดังภาพที่ 4-4 ทั้งสองวิธีสามารถเก็บตัวอย่างเซลล์อสุจิได้ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดเล็กประมาณ 1-2 μm พบ flagellum 1 อัน มีข้อสังเกตว่ากรณีที่เก็บตัวอย่างโดยวิธี stripping method อาจพบเซลล์ชนิดอื่นที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์หลุดติดมาด้วย เซลล์ดังกล่าวได้แก่ Sertoli cell (ภาพที่ 4-4B) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เลี้ยง (supporting cell) ที่พบภายในท่อ gonadal tubules อย่างไรก็ตามเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับประชากรส่วนใหญ่

เมื่อพิจารณาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิ (ภาพที่ 4-5A) พบว่าด้านหน้าของเซลล์อสุจิประกอบด้วยอะโครโซม มีรูปร่างแบบ cup-shaped ในเซลล์อสุจิที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วจะสามารถสังเกตเห็น transverse band ที่ปลายด้านหน้าประมาณ 3-4 ชั้น (ภาพที่ 4-5B) ใต้อะโครโซมจะพบ subacrosomal space และ axial rod ถัดจากอะโครโซมพบนิวเคลียสรูปทรง barrel-shaped พบโครโมโซมหดตัวแน่นบรรจุอยู่ในนิวเคลียสที่บริเวณส่วนหัวทำให้เห็นลักษณะนิวเคลียสทึบ นิวเคลียสมีความกว้างประมาณ 1.8 μm (ภาพที่ 4-5C) ถัดจากนิวเคลียสคือส่วนคอ (middle piece) เมื่อเซลล์อสุจิพัฒนาสมบูรณ์แล้วจะพบไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่จำนวน 4 อัน (ภาพที่ 4-5D) มีการพัฒนาส่วนหางหรือแฟลเจลลัมซึ่งประกอบด้วยไมโครทิวบูลที่มีการเรียงตัวแบบ 9+2 (axonem) และมีเยื่อหุ้ม (plasma membrane) ล้อมรอบ (ภาพที่ 4-1E) โดยส่วนฐานของ flagellum นั้นประกอบด้วยเซ็นทริโอล (9+0) ทั้งแบบ distal centriole คือเซ็นทริโอที่อยู่ติดกับ flagellum และ proximal centriole คือ เซ็นทริโอที่เป็นส่วนฐานหรือ basal body ของ flagellum

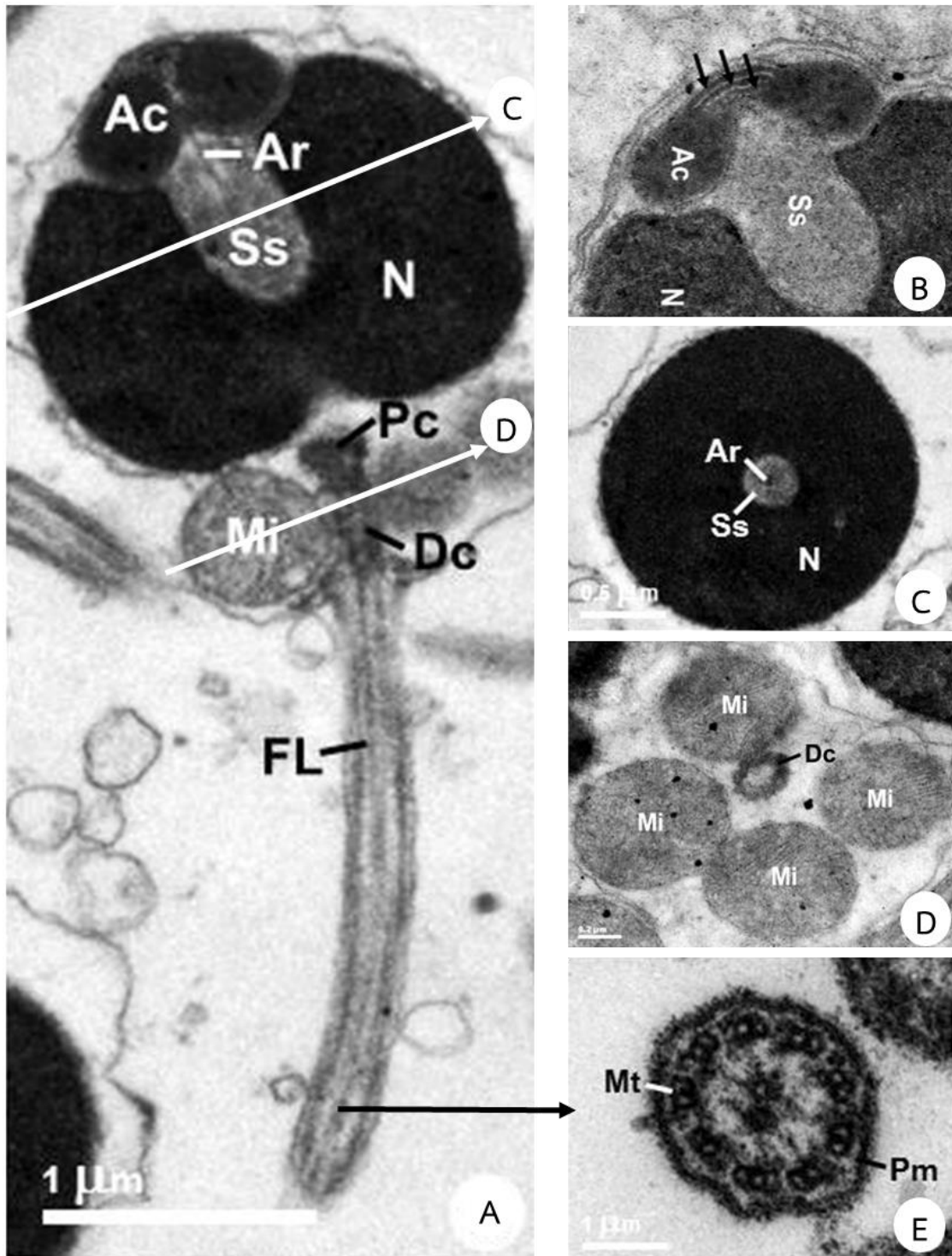
A.



B.



ภาพที่ 4-4 เซลล์สุงิที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง 2 วิธี ศึกษาด้วยกล้อง TEM
A. เก็บตัวอย่างด้วยวิธี spawning mentod
B. เก็บตัวอย่างด้วยวิธี stripping mentod
(fl=flagellum, sp=sperm, Sertoli cell)



ภาพที่ 4.5 โครงสร้างจุลกายวิภาคเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจیبศึกษาด้วยกล้อง TEM

A) เซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจیب B) acrosome and subacrosomal space C) cross section of nucleus D) cross section of mitochondria region E) axoneme

สัญลักษณ์ Ac=acrosome; Ar=axial rod; Dc=distal centriole; FL=flagellum; Mi=mitochondria; Mt=microtubule; N=nucleus; Pc=proximal centriole; Pm=plasma membrane; Ss=subacrosomal, space arrow=transverse band

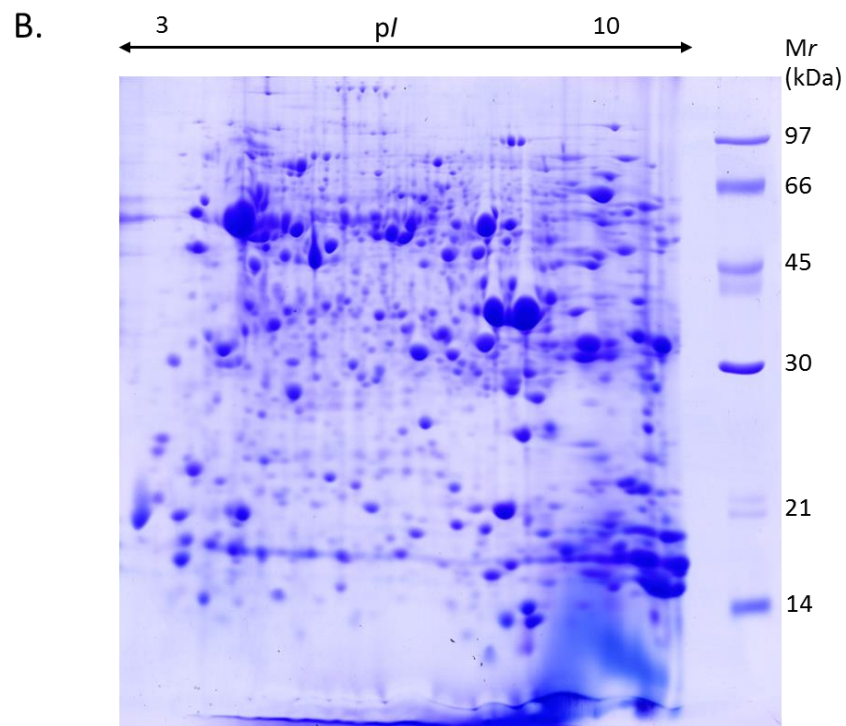
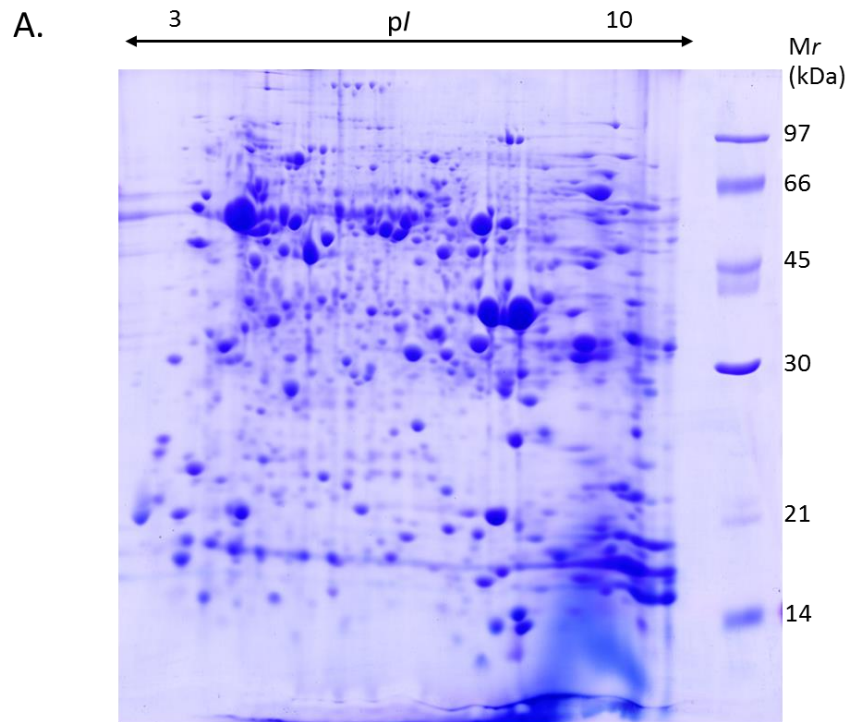
4.3 โปรตีโอมของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมปากจีบ

การแยกโปรตีนจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเซลล์สุจิของหอยนางรมปากจีบในครั้งนี้ได้ทำการแยกโปรตีนจากประชากร 2 ตัวอย่าง ตามวิธีการเก็บตัวอย่าง วิธี ได้แก่ วิธี spawning method คือการกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เอง และวิธี stripping method คือการกรีดเอาตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์จากบริเวณ gonad โดยตรง ดังที่กล่าวไปแล้วในหัวข้อ 4.1 โดยได้ทำการแยกโปรตีนของสุจิหอยนางรมด้วยเทคนิค 2-DE โดยใช้ปริมาณโปรตีน 100 µg/gel การแยกในมิติที่ 1 ใช้ IEF stip pH3-10, NL การแยกในมิติที่สองใช้ SDS-PAGE 12.5% หลังจากนั้นทำการย้อมด้วยสี Coomassie Blue G-250 ได้ผลดังภาพที่ 4-6 ซึ่งแสดง proteome profile ของ sperm จากตัวแทนของกลุ่ม Striping method (ภาพที่ 4-6A) และ Spawn method (ภาพที่ 4-6B) ตามลำดับ

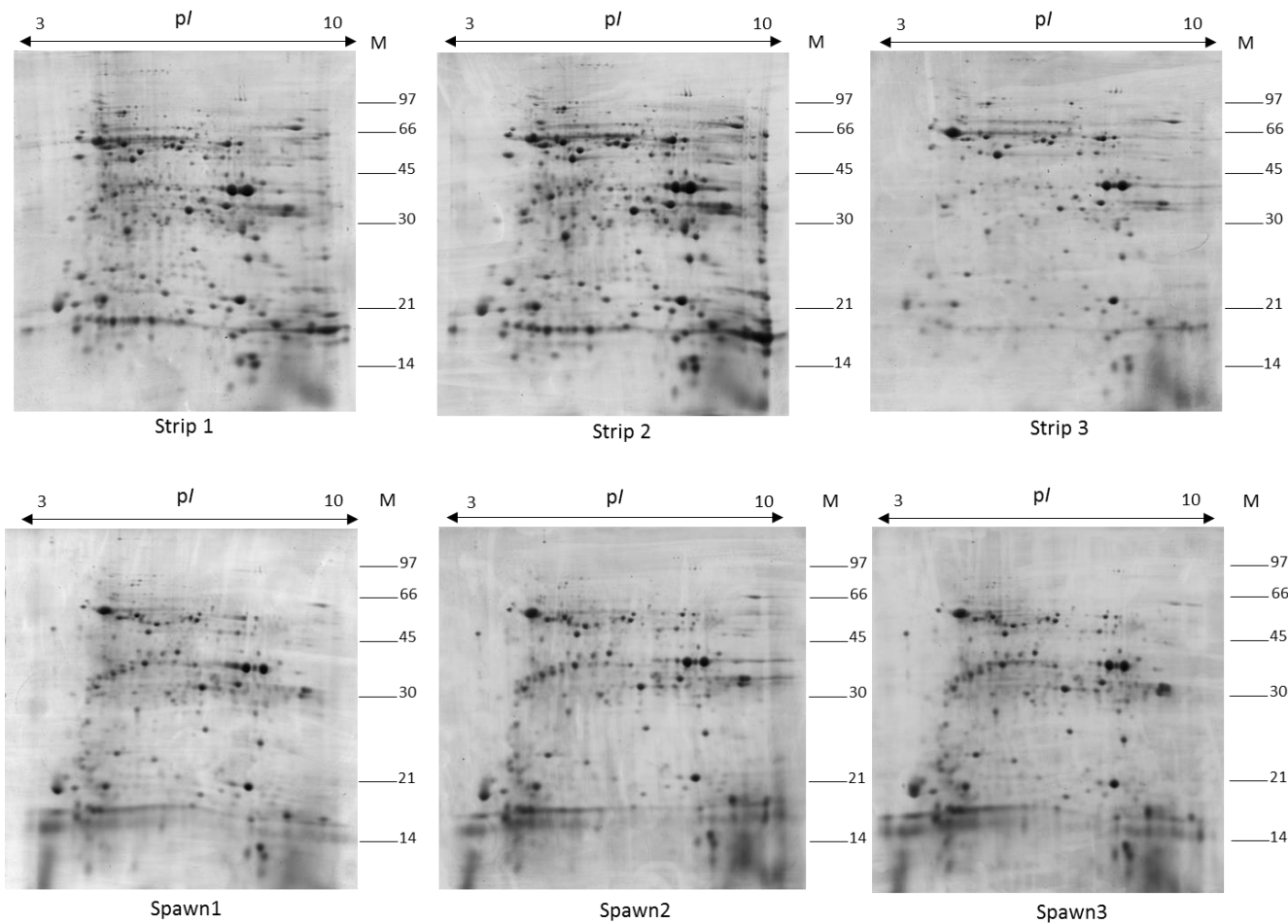
ภาพที่ 4-7 พบว่าเมื่อโหลดโปรตีนปริมาณ 100 µg/gel จะได้ปริมาณโปรตีนค่อนข้างมาก แลพบบางตำแหน่งยังมีการแยกได้ไม่ดีเนื่องจากปริมาณโปรตีนที่มากเกินไป ทำให้เกิด streak ขึ้นได้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการลดปริมาณโปรตีนที่ลงให้เหลือ 75 µg/gel พบว่าสามารถแยกโปรตีนได้ดีขึ้น (ภาพที่ 4-7)

ผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายเจลโดยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย Image Master™ 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Sweden) พบ protein spot ในทั้งกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มประมาณ 500 spots เมื่อพิจารณา proteome profile ของทั้งสองกลุ่มพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลจุลกายวิภาคในหัวข้อ 4.1 ที่พบว่าตัวอย่างของทั้ง 2 ประชากรประกอบด้วยเซลล์สุจิที่สมบูรณ์แล้ว จึงทำให้ proteome profile คล้ายกัน

หลังจากวิเคราะห์ภาพถ่ายแล้ว ได้ทำการกำหนดหมายเลขของ protein spot บนแผ่นเจลเพื่อเป็นหมายเลขอ้างอิงสำหรับการสร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีน (reference map) ของเซลล์สุจิในหอยนางรมปากจีบ เพื่อใช้สำหรับตัดจุดโปรตีนดังกล่าวเพื่อนำไประบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ต่อไป



ภาพที่ 4-6 การแยกโปรตีนของอสุจิหอยนางรมด้วยเทคนิค 2-DE ของเซลล์อสุจิโดยใช้ปริมาณโปรตีน 100 μ g/gel การแยกในมิติที่ 1 ใช้ IEF strip pH3-10, NL การแยกในมิติที่สองใช้ SDS-PAGE 12.5% ย้อมด้วยสี Coomassie Blue G-250
A. Strip sperm proteome B. Spawn sperm proteome

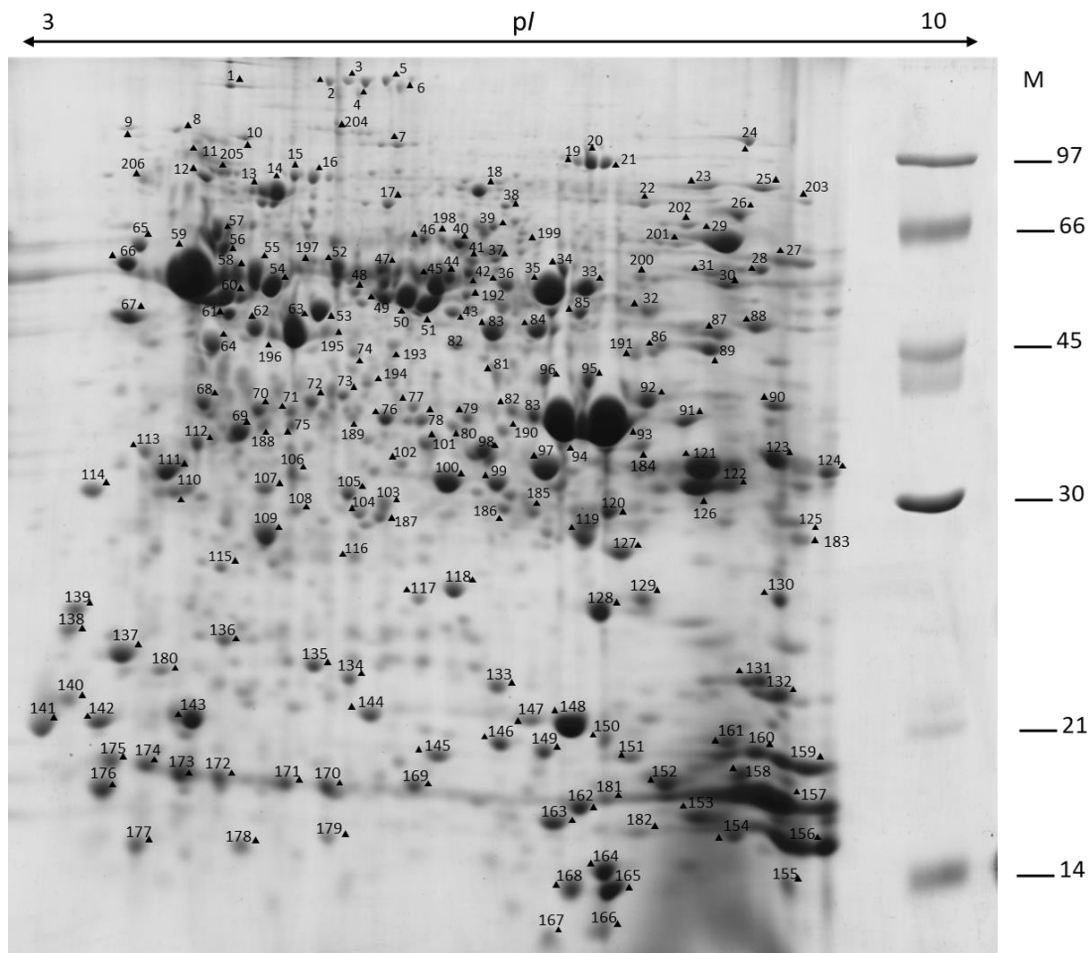


ภาพที่ 4-7 การเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์อสุจิหอยนางรมที่เก็บตัวอย่าง 2 วิธี โดยใช้เทคนิค 2-DE-based proteomics การแยกโปรตีนในมิติที่ 1 ใช้ IEF strip pH3-10, NL การแยกในมิติที่สองใช้เจล SDS-PAGE 12.5% ย้อมด้วยสี Coomassie Blue G-250 แถวบนเป็นตัวอย่างจากเซลล์อสุจิที่เตรียมจากวิธี stripping method (3 เจล) แถวล่างเป็นตัวอย่างจากเซลล์อสุจิที่เตรียมจากวิธี spawning method (3 เจล) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในแผ่นเจลใช้โปรแกรม Image Master™ 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Sweden)

4.4 แผนที่อ้างอิงโปรตีนสำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ

4.4.1 การสร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีน (reference map)

ในการสร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีน (reference map) สำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบนั้น หลักการที่ใช้ในการระบุหมายเลขโปรตีนบนแผ่นเจลเพื่อทำการตัดโปรตีนจุดนั้นๆ ไประบุชนิดของโปรตีน ใน การศึกษาครั้งนี้ใช้ด้วยเกณฑ์ดังนี้ คือ protein spot นั้นๆ นอกจากจะสามารถ detect ได้ด้วยโปรแกรม วิเคราะห์ภาพถ่าย Image Master™ 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Sweden) แล้ว จะต้องเป็น protein spot ที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ เพื่อให้ผู้วิจัยสามารถตัดจุดดังกล่าวได้ (manual pick up) ซึ่งภายใต้หลักเกณฑ์ดังกล่าวนี้ ผู้วิจัยสามารถระบุหมายเลขอ้างอิงได้ทั้งหมด 206 spots ดังภาพที่ 4-8 จากนั้นทำการตัดโปรตีนทั้ง 206 จุดเพื่อระบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค LC-MS/MS ร่วมกับชีวสารสนเทศ ศาสตร์ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 3.4 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งสิ้นจำนวน 188 จุด จากทั้งหมด 206 จุด คิดเป็น 91.26% รายละเอียดของโปรตีนที่สามารถระบุชนิดได้แสดงในตารางที่ 4-1



ภาพที่ 4-8 Reference map ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ โดยทำการตัด protein spot ทั้งหมด 206 จุด เพื่อทำการระบุโปรตีนโดยการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ร่วมกับการสืบค้นใน ฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Mascot (www.matrixscience.com) และสามารถระบุชนิดของ โปรตีนได้ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-1

4.4.2 การระบุชนิดของโปรตีน

การระบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค LC-MS/MS ร่วมกับชีวสารสนเทศศาสตร์ ในการศึกษาคั้งนี้ สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 188 protein spots จากทั้งหมด 206 protein spots

ในการระบุชนิดของโปรตีนนั้นจะใช้ไฟล์ .mfg ที่ได้จากเครื่อง LC-MS/MS ค้นหาในฐานข้อมูล SwissProt โดยใช้โปรแกรม mascot (in-house) (<http://www.matrixscience.com>) หากสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้จะแสดงผลดังตัวอย่างในภาพที่ 4-9 ถึง ภาพที่ 4-11 ซึ่งเป็นตัวอย่างการระบุจุดโปรตีน หมายเลข 57 จากภาพที่ 4-8 โปรตีนที่ระบุได้คือ ATP synthase subunit beta

ภาพที่ 4-9 แสดงตัวอย่างการระบุโปรตีน spot number 59 จาก Reference map ในภาพที่ 4-8 ซึ่งประกอบด้วย Mascot search result แสดงชนิดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ (protein hits) ในภาพที่ 4-8A พบว่า protein hits ประกอบด้วย list ของโปรตีนหลายชนิด โดยเรียงลำดับจาก mascot score มากที่สุดไว้ด้านบน ในตัวอย่างนี้จะเห็นว่าโปรตีนที่มีคะแนนสูงสุดคือ ATP synthase subunit beta ซึ่งเราสามารถแสดงรายละเอียดของแต่ละ protein hits ได้ ดังภาพที่ 4-8B ในกรณีที่สามารถระบุโปรตีนได้หลายชนิด ผู้วิจัยสามารถพิจารณาความเป็นไปได้ของการระบุชนิดของโปรตีนชนิดนั้นๆ ต่อไป

ทั้งนี้ผู้วิจัยสามารถตรวจสอบผลการวิเคราะห์ peptide sequence จากโปรแกรม mascot ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4-10 ซึ่งแสดง Peptide view ที่แสดงรายละเอียดของ MS/MS spectra และ peptide sequence (ภาพที่ 4-10A) และ รายละเอียดของ peptide sequence จาก fragmentation แสดง b-ion และ y-ion (ภาพที่ 4-10B)

ในภาพที่ 4-11 Protein view แสดงรายละเอียดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ ประกอบด้วยข้อมูลของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ตามฐานข้อมูล SwissProt และแสดง protein sequence coverage ไว้อีกด้วย

จากการระบุโปรตีนในการศึกษาคั้งนี้พบว่าสามารถระบุโปรตีนในระบบ 2D gel ได้ถึง 188 protein spots จากจำนวน 206 protein spots คิดเป็น 91.26% ดังรายละเอียดที่ระบุในตารางที่ 4-1

A.

MASCOT SEARCH RESULTS

User : kullanist
 Email : kim_kullanist@hotmail.com
 Search title : SP
 MS data file : BuU_SP-59_55min_40C_1-C_1_01_3230.mgf
 Database : SwissProt 2019_01 (559077 sequences; 200828568 residues)
 Timestamp : 17 Feb 2019 at 06:30:00 GMT

Protein hits :

- ATPB_DROME** ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=ATPSynbeta PE=1 SV=3
- TBB4B_BOVIN** Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=TUBB4B PE=2 SV=1
- TBB_PIG** Tubulin beta chain OS=Sus scrofa OX=9923 PE=1 SV=1
- ATPB_SPHAL** ATP synthase subunit beta OS=Sphingopyxis askersensis (strain DSM 13593 / LMG 18877 / RB2256) OX=317655 GN=atpD PE=3 SV=1
- ATPB_CAEEL** ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=atp-2 PE=1 SV=2
- TBB4_CAEEL** Tubulin beta-4 chain OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=tbb-4 PE=3 SV=1
- ATPB_AZOCES** ATP synthase subunit beta OS=Azorhizobium caulinodans (strain ATCC 43989 / DSM 5975 / JCM 20966 / NBRC 14845 / NCIMB 13405 / ORS 571) OX=438753 GN=atpD PE=3 SV=1
- TBB1_CHICK** Tubulin beta-1 chain OS=Gallus gallus OX=9031 PE=2 SV=1
- TBB2_XENLA** Tubulin beta-2 chain OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=tubb2 PE=2 SV=1
- ATPB_BRUAB** ATP synthase subunit beta OS=Brucella abortus biovar 1 (strain 9-941) OX=262698 GN=atpD PE=3 SV=1
- ATPB1_MYCPU** ATP synthase subunit beta 1 OS=Mycoplasma pulmonis (strain UAB CTIP) OX=272635 GN=atpD1 PE=3 SV=1
- TBB1_PHYPO** Tubulin beta-1 chain OS=Physarum polycephalum OX=5791 GN=BETA PE=1 SV=4
- ATPB_DICDI** ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Dicyostelium discoidium OX=44689 GN=atp5f1b PE=1 SV=1
- ATPB2_CHLTE** ATP synthase subunit beta 2 OS=Chlorobaculum tepidum (strain ATCC 49652 / DSM 12025 / NBRC 103806 / TLS) OX=194439 GN=atpD2 PE=3 SV=1
- ATPB_CHLBP** ATP synthase subunit beta OS=Chlorobium phaeobacteroides (strain BS1) OX=331678 GN=atpD PE=3 SV=1
- ATPB2_MYCPU** ATP synthase subunit beta 2 OS=Mycoplasma pulmonis (strain UAB CTIP) OX=272635 GN=atpD2 PE=3 SV=1
- ATPB_BRACM** ATP synthase subunit beta, chloroplastic (Fragments) OS=Brassica campestris OX=3711 GN=atpB PE=1 SV=1
- ATPB_HELHP** ATP synthase subunit beta OS=Helicobacter hepaticus (strain ATCC 51449 / 381) OX=235279 GN=atpD PE=3 SV=1
- ATPB_THEYD** ATP synthase subunit beta OS=Thermodesulfobivrio yellowstonii (strain ATCC 51303 / DSM 11347 / YP87) OX=289376 GN=atpD PE=3 SV=1
- TBB_HORVU** Tubulin beta chain OS=Hordeum vulgare OX=4513 GN=TUBB PE=2 SV=1
- TBB1_ELEIN** Tubulin beta-1 chain OS=Eleusine indica OX=29674 GN=TUBB1 PE=2 SV=1
- TBB1_DAUCA** Tubulin beta-1 chain (Fragment) OS=Daucus carota OX=4039 GN=TUBB1 PE=1 SV=2
- TBB1_PEA** Tubulin beta-1 chain OS=Pisum sativum OX=3808 GN=TUBB1 PE=3 SV=1
- G3P_AJEGA** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Agelomyces capsulatus OX=5037 GN=GPD PE=2 SV=1
- TBB_CICAR** Tubulin beta chain OS=Cicer arietinum OX=3827 GN=TUBB PE=2 SV=1
- TBB1_ARATH** Tubulin beta-1 chain OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=TUBB1 PE=2 SV=1
- TBB3_ANEHP** Tubulin beta-3 chain (Fragment) OS=Anemia phyllitidis OX=12940 GN=TUBB3 PE=2 SV=1
- TBB_CANAX** Tubulin beta chain OS=Candida albicans OX=5476 GN=TUB2 PE=3 SV=1
- PSTA_MYCGE** Phosphate transport system permease protein PstA homolog OS=Mycoplasma genitalium (strain ATCC 33530 / G-37 / NCTC 10195) OX=243273 GN=psta PE=3 SV=1

B.

1. **ATPB_DROME** Mass: 54074 Score: 696 Matches: 17(17) Sequences: 5(5) emPAI: 0.38
 ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=ATPSynbeta PE=1 SV=3
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
✓ 164	488.1860	974.3574	974.5549	-0.1975	0	90	3.6e-06	1	1	K.IGLFGGAGVGK.T
✓ 165	488.1900	974.3654	974.5549	-0.1895	0	(75)	0.00011	1	1	K.IGLFGGAGVGK.T
✓ 167	488.2590	974.5034	974.5549	-0.0515	0	(60)	0.0032	1	1	K.IGLFGGAGVGK.T
✓ 168	488.2670	974.5194	974.5549	-0.0355	0	(90)	3.8e-06	1	1	K.IGLFGGAGVGK.T
✓ 330	631.3520	1260.6894	1261.6336	-0.9442	0	(63)	0.0013	1	U	R.TIAMDGTEGLVR.G
✓ 331	631.7690	1261.5114	1261.6336	-0.1222	0	(84)	1e-05	1	U	R.TIAMDGTEGLVR.G
✓ 332	631.8360	1261.6574	1261.6336	0.0238	0	(101)	1.9e-07	1	U	R.TIAMDGTEGLVR.G
✓ 333	631.8560	1261.6974	1261.6336	0.0638	0	102	1.7e-07	1	U	R.TIAMDGTEGLVR.G
✓ 449	684.3310	1366.6474	1366.7456	-0.0982	0	(83)	1.1e-05	1	U	R.IINVIGEPIDER.G
✓ 450	684.3360	1366.6574	1366.7456	-0.0882	0	(79)	2.8e-05	1	U	R.IINVIGEPIDER.G
✓ 451	684.3420	1366.6694	1366.7456	-0.0762	0	93	1.2e-06	1	U	R.IINVIGEPIDER.G
✓ 452	684.4820	1366.9494	1366.7456	0.2038	0	(59)	0.0038	1	U	R.IINVIGEPIDER.G
✓ 485	469.5750	1405.7032	1405.6739	0.0293	0	(53)	0.013	1	1	K.AHGGYSVFAGVGER.T
✓ 486	703.8590	1405.7034	1405.6739	0.0296	0	82	1.6e-05	1	1	K.AHGGYSVFAGVGER.T
✓ 494	718.3350	1434.6554	1434.7467	-0.0912	0	110	2.2e-08	1	1	R.FTQAGSEVSALLGR.I
✓ 495	718.3530	1434.6914	1434.7467	-0.0552	0	(73)	0.00012	1	1	R.FTQAGSEVSALLGR.I
✓ 496	718.3690	1434.7234	1434.7467	-0.0232	0	(107)	4.8e-08	1	1	R.FTQAGSEVSALLGR.I

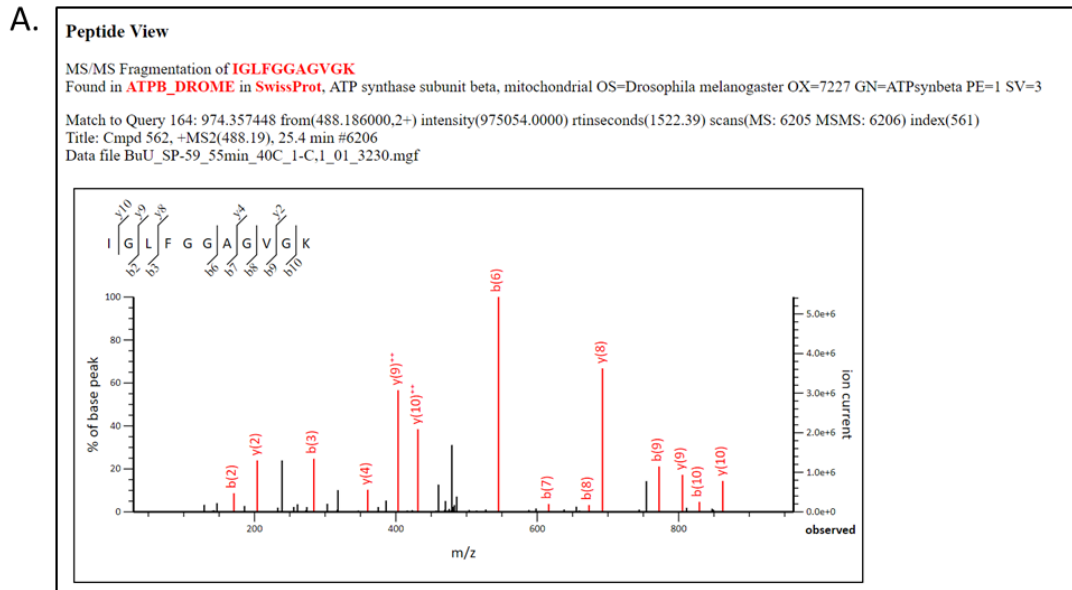
2. **TBB4B_BOVIN** Mass: 49799 Score: 696 Matches: 33(33) Sequences: 10(10) emPAI: 1.00
 Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus OX=9913 GN=TUBB4B PE=2 SV=1
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
✓ 186	514.2360	1027.4574	1027.5121	-1.0546	0	(55)	0.0078	1	1	K.TAVCDIPPR.G + Carbamidomethyl (C)
✓ 191	514.7740	1027.5334	1027.5121	0.0214	0	(53)	0.014	1	1	K.TAVCDIPPR.G + Carbamidomethyl (C)
✓ 193	514.7980	1027.5814	1027.5121	0.0694	0	(59)	0.0037	1	1	K.TAVCDIPPR.G + Carbamidomethyl (C)
✓ 194	514.8010	1027.5874	1027.5121	0.0754	0	(59)	0.0036	1	1	K.TAVCDIPPR.G + Carbamidomethyl (C)
✓ 195	514.8120	1027.6094	1027.5121	0.0974	0	(59)	0.0034	1	1	K.TAVCDIPPR.G + Carbamidomethyl (C)
✓ 196	514.8190	1027.6234	1027.5121	0.1114	0	(61)	0.0021	1	1	K.TAVCDIPPR.G + Carbamidomethyl (C)

ภาพที่ 4-9 ตัวอย่างการระบุโปรตีน spot number 59 จาก Reference map ในภาพที่ 4-8

A. Mascot search result แสดงชนิดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ (protein hits)

B. รายละเอียดของ protein hits แสดง mascot score จำนวน peptide matches และ sequence ที่ match กับโปรตีนชนิดดังกล่าว ในตัวอย่างนี้จะเห็นว่าโปรตีนที่มีคะแนนสูงสุดคือ ATP synthase subunit beta



B.

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 974.5549
Ions Score: 90 Expect: 3.6e-06
Matches : 17/60 fragment ions using 16 most intense peaks ([help](#))

#	b	b ⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y*	y ^{*++}	#
1	114.0913	57.5493	I					11
2	171.1128	86.0600	G	862.4781	431.7427	845.4516	423.2294	10
3	284.1969	142.6021	L	805.4567	403.2320	788.4301	394.7187	9
4	431.2653	216.1363	F	692.3726	346.6899	675.3461	338.1767	8
5	488.2867	244.6470	G	545.3042	273.1557	528.2776	264.6425	7
6	545.3082	273.1577	G	488.2827	244.6450	471.2562	236.1317	6
7	616.3453	308.6763	A	431.2613	216.1343	414.2347	207.6210	5
8	673.3668	337.1870	G	360.2241	180.6157	343.1976	172.1024	4
9	772.4352	386.7212	V	303.2027	152.1050	286.1761	143.5917	3
10	829.4567	415.2320	G	204.1343	102.5708	187.1077	94.0575	2
11			K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468	1

ภาพที่ 4-10 ตัวอย่าง Peptide view แสดงรายละเอียดของ peptide sequence ที่ระบุได้ในภาพที่ 4-9B

- A. รายละเอียดของ MS/MS spectra และ peptide sequence
- B. รายละเอียดของ peptide sequence จาก fragmentation แสดง b-ion และ y-ion

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: ATPB_DROME

ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=ATPsynbeta PE=1 SV=3

Database: SwissProt
Score: 696
Monoisotopic mass (M_r): 54074
Calculated pI: 5.14
Taxonomy: [Drosophila melanogaster](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of ATPB_DROME against nr](#).

Search parameters

MS data file: BuU_SP-59_55min_40C_1-C_1_01_3230.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Variable modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)

Protein sequence coverage: 12%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1 MFALRAASKA DKNLLPFLGQ LSRSHAAKAA KAAAAANGKI VAVIGAVVDV
51 QFDDNLPFIL NALEVDNRSP RLVLEVAQHL GENTVRTIAM DGTEGLVRGQ
101 KVLDTGYPIR IPVGAETLGR IINVIGEPID ERGPIDTDKT AAHAEAPEF
151 VQMSVEQEIL VTGIRVVDLL APYAKGGKIG LFGGAGVGKT VLIMELINNV
201 AKAHGGYSVF AGVGERTREG NDLYNEMIEG GVISLKDKTS KVALVYGQMN
251 EPPGARARVA LTGLTVAEYF RDQEGQDVLL FIDNIFRFTQ AGSEVSALLG
301 RIPSAVGYQP TLATDMGSMQ ERITTTKKS ITSVMQAIYVP ADDLTPAPA
351 TTFALHDATT VLSRAIAELG IYPAVDPLDS TSRIMDPNII GQEHYNVARG
401 VQKILQDYKS LQDIITAILGM DELSEEDKLT VARARKIQRF LSQPFQVAEV
451 FTGHAGKLVF LEQTIKGFSA ILAGDYDHLF EVAFYVMVGPI EEVVEKADRL
501 AKEAA
```

ภาพที่ 4-11 Protein view แสดงรายละเอียดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้จากภาพที่ 4-9 ประกอบด้วยข้อมูลของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ตามฐานข้อมูล SwissProt และ protein sequence coverage

ตารางที่ 4-1 การระบุชนิดของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบตามภาพที่ 4-5

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
1	P11833	Tubulin beta chain	60	1	50019	4.73	2	<i>Paracentrotus lividus (sea urchin)</i>
2	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	70	2	842	9.62	100	<i>Chionoecetes opilio (snow crab)</i>
3	Q56A40	Coiled-coil domain-containing protein 40	58	1	109425	5.7	1	<i>Danio rerio (zebrafish)</i>
4		Unidentify						
5	P11832	Tubulin beta chain	74	1	50019	4.73	2	<i>Paracentrotus lividus (sea urchin)</i>
6	P11833	Tubulin beta chain	76	1	50019	4.73	2	<i>Paracentrotus lividus (sea urchin)</i>
7	Q9UI46	Dynein intermediate chain 1, axonemal	291	8	79233	6.4	5	<i>Homo sapiens</i>
8	P08110	Endoplasmin	270	8	91498	4.83	3	<i>Gallus gallus</i>
9		Unidentify						
10	Q3ZBT1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	499	19	89274	5.13	11	<i>Bos taurus (cow)</i>
11	P29685	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	132	3	60221	5.95	4	<i>Hevea brasiliensis</i>
12	Q91883	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	331	15	72591	4.96	7	<i>Xenopus laevis (frog)</i>
13	P54652	Heat shock-related 70 kDa protein	769	39	69978	5.56	14	<i>Homo sapiens</i>
14	Q9W6Y1	Heat shock cognate 71 kDa protein	719	24	76121	5.8	13	<i>Oryzias latipes (rice fish)</i>
15	P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	258	26	69978	5.56	12	<i>Homo sapiens</i>
16		Unidentify						
17	P09446	Heat shock 70 kDa protein A	370	13	69680	5.44	6	<i>Caenorhabditis elegans</i>
18		Unidentify						

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
19	D4AT77	Aconitate hydratase, mitochondrial	492	9	84006	6.14	3	<i>Arthroderma benhamiae</i>
20	D4AT77	Aconitate hydratase, mitochondrial	376	9	84006	6.14	3	<i>Arthroderma benhamiae</i> (fungus)
21	D4AT77	Aconitate hydratase, mitochondrial	278	5	84006	6.14	3	<i>Arthroderma benhamiae</i> (fungus)
22	P24789	Vimentin-1/2	52	1	1089.51	5.16	1	<i>Xenopus laevis</i> (frog)
23	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	58	2	842	9.62	100	<i>Chionoecetes opilio</i> (snow crab)
24	B2RW38	Cilia- and flagella-associated protein	360	11	103460	8.15	4	<i>Mus musculus</i> (mouse)
25	P84048	Histone H4	59	1	11374	11.36	9	<i>Acrolepiopsis assectella</i> (leek moth)
26	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	73	3	842	9.62	100	<i>Chionoecetes opilio</i> (snow crab)
27	B2RW38	Cilia- and flagella-associated protein 58	97	3	103460	8.15	2	<i>Mus musculus</i> (mouse)
28	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	76	1	39531	8.61	3	<i>Salmo salar</i> (salmon)
29	Q2TA38	Tektin-4	63	2	51913	6.02	2	<i>Bos taurus</i> (cow)
30	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	62	1	39531	8.61	3	<i>Salmo salar</i> (salmon)
31	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase	115	2	39531	8.61	3	<i>Salmo salar</i> (salmon)
32	P25708	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	275	7	50620	8.37	4	<i>Bos taurus</i> (cow)
33	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	320	12	57752	8.98	11	<i>Caenorhabditis elegans</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
34	P82264	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial	108	4	55359	7.34	4	<i>Chaenocephalus aceratus (blackfin)</i>
35	Q9XXX1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	880	35	57752	8.98	13	<i>Caenorhabditis elegans</i>
36	Q9XXX1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	699	32	57752	8.98	17	<i>Caenorhabditis elegans</i>
37	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	128	2	49962	4.97	4	<i>Oncorhynchus mykiss (rainbow trout)</i>
38	P01023	Alpha2macroglobulin	152	14	163159	6.13	8	<i>Pongo abelii (orangutan)</i>
39	Q11190	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	121	3	65294	6.27	2	<i>Caenorhabditis elegans</i>
40	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	317	13	49894	4.97	18	<i>Bos taurus (cow)</i>
41	P09206	Tubulin beta-3 chain	231	9	49829	4.78	16	<i>Gallus gallus</i>
42	P09206	Tubulin beta-3 chain	390	14	49829	4.78	23	<i>Gallus gallus</i>
43	Q60HI0	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	153	2	47807	7.24	3	<i>Macaca fascicularis</i>
44	P68371	Tubulin beta4B chain	1242	81	49799	4.79	31	<i>Homo sapiens</i>
45	P42894	Enolase	517	7	46988	5.49	5	<i>Neocallimastix frontalis</i>
46	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	272	12	49894	4.97	21	<i>Bos taurus</i>
47	Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	684	29	49799	4.79	27	<i>Bos taurus</i>
48	P09206	Tubulin beta-3 chain	763	36	49829	4.78	21	<i>Gallus gallus</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
49	Q5E9F9	26S proteasome regulatory subunit	88	4	48603	5.71	10	<i>Bos taurus</i>
50	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	53	1	842	9.62	100	<i>Chionoectes opilio</i>
51	Q99JD2	Tektin-1	56	2	48561	5.61	2	<i>Rattus norvegicus</i>
52	P68371	Tubulin beta4B chain	2100	124	49799	4.79	43	<i>Homo sapiens</i>
53	P41339	Actin, acrosomal process isoform	73	1	41748	5.36	2	<i>Limulus polyphemus</i>
54	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	67	2	842	9.62	100	<i>Chionoectes opilio</i>
55	P09206	Tubulin beta-3 chain	169	6	49829	4.78	21	<i>Gallus gallus</i>
56	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	235	12	49894	4.97	21	<i>Bos taurus</i>
57	Q9VMN5	60 kDa heat shock protein homolog 2, mitochondrial	158	4	61548	6.75	3	<i>Drosophila melanogaster</i>
58	P09206	Tubulin beta-3 chain	598	27	49829	4.78	21	<i>Gallus gallus</i>
59	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	696	17	54074	5.14	12	<i>Drosophila melanogaster</i>
60	O42587	26S proteasome regulatory subunit 6A-A	79	2	45202	5.2	7	<i>Xenopus laevis</i>
61	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	138	3	54074	5.14	12	<i>Drosophila melanogaster</i>
62	P90689	Actin	541	24	41683	5.3	26	<i>Brugia malayi</i>
63	P84336	Actin, cytoplasmic 1	563	23	41775	5.3	21	<i>Camelus dromedarius</i>
64	O94230	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2, mitochondrial	56	1	39555	7.71	2	<i>Kluyveromyces lactis</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
65	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	77	3	49894	4.97	21	<i>Bos taurus</i>
66	P52193	Calreticulin	50	1	48009	4.31	2	<i>Bos taurus</i>
67	Q6VTH5	Radial spoke head 1 homolog	136	4	24551	5.09	4	<i>Cyprinus carpio</i>
68	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	314	8	54074	5.14	12	<i>Drosophila melanogaster</i>
69	P09206	Tubulin beta-3 chain	281	12	49829	4.78	21	<i>Gallus gallus</i>
70	P09206	Tubulin beta-3 chain	136	6	49829	4.78	21	<i>Gallus gallus</i>
71	P09206	Tubulin beta-3 chain	414	15	49829	4.78	21	<i>Gallus gallus</i>
72	P23232	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	289	10	37299	5.76	12	<i>Loligo forbesi</i>
73	P11833	Tubulin beta chain	96	2	50019	4.73	2	<i>Paracentrotus lividus</i>
74	P00450	Ceruloplasmin	178	5	122128	5.44	5	<i>Homo sapiens</i>
75	P09206	Tubulin beta-3 chain	453	18	49829	4.78	16	<i>Gallus gallus</i>
76	Q75DS1	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	61	3	134200	6.78	0	<i>Ashbya gossypii</i>
77	P11833	Tubulin beta chain	72	1	50019	4.73	2	<i>Paracentrotus lividus</i>
78	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	66	2	842	9.62	100	<i>Chionoectes opilio</i>
79	P60709	Actin, cytoplasmic	162	9	41710	5.29	17	<i>Homo sapiens</i>
80	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	85	3	842	9.62	100	<i>Chionoectes opilio</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
81	P01834	Immunoglobulin kappa constant	146	3	11758	6.11	48	<i>Homo sapiens</i>
82	O15990	Arginine kinase	96	4	39077	7.12	4	<i>Liolophura japonica</i>
83	P51544	Arginine kinase	283	22	39077	5.73	7	<i>Liolophura japonica</i>
84	Q17GM7	Probable citrate synthase 1, mitochondrial	450	21	51624	8.91	5	<i>Aedes aegypti</i>
85	O14254	Probable isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	206	17	49447	9.07	9	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
86	Q55F21	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	131	8	47255	8.84	3	<i>Dictyostelium discoideum</i>
87	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	295	22	57752	8.98	14	<i>Caenorhabditis elegans</i>
88	P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	205	7	51262	9.45	1	<i>Homo sapiens</i>
89	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	177	5	57752	8.98	8	<i>Caenorhabditis elegans</i>
90	B0R061	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A	70	1	110276	6.22	1	<i>Danio rerio</i>
91	G3QY98	Apolipoprotein AI	131	3	30759	5.56	9	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>
92	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	285	15	39531	8.61	4	<i>Salmo salar</i>
93	O15990	Arginine kinase	501	15	39077	7.12	10	<i>Liolophura japonica</i>
94	O15991	Arginine kinase	723	17	39077	7.12	10	<i>Liolophura japonica</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
95	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	162	3	39531	8.61	4	<i>Salmo salar</i>
96	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	121	3	39531	8.61	4	<i>Salmo salar</i>
97	O02640	Probable malate dehydrogenase, mitochondrial	456	12	35098	9.39	3	<i>Caenorhabditis elegans</i>
98	O02640	Probable malate dehydrogenase, mitochondrial	132	3	35098	9.39	3	<i>Caenorhabditis elegans</i>
99	P51544	Arginine kinase	72	1	39789	5.73	2	<i>Haliotis madaka</i> (gastropod)
100	Q6TEQ7	Annexin A2	216	14	38630	6.92	30	<i>Canis lupus familiaris</i>
101	P51544	Arginine kinase	117	3	39789	5.73	7	<i>Haliotis madaka</i>
102	P02666	Betacasein	68	1	25091	5.26	7	<i>Bos taurus</i>
103	P02663	AlphaS2casein	64	7	26002	8.54	19	<i>Bos taurus</i>
104	Q589R5	Triosephosphate isomerase	86	2	27095	4.77	5	<i>Oryzias latipes</i>
105	Q9BKU4	Mitochondrial prohibitin complex protein	166	23	29970	6.93	13	<i>Caenorhabditis elegans</i>
106	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	147	9	54074	5.14	9	<i>Bos mutus grunniens</i>
107	P41339	Actin, acrosomal process isoform	76	1	41748	5.36	2	<i>Limulus polyphemus</i> (horseshoe)
108	Q3T165	Prohibitin	52	1	29786	5.77	3	<i>Bos taurus</i>
109	Q9EQ00	Ropporin-1-like protein	66	1	24500	5.97	4	<i>Mus musculus</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
110	P11833	Tubulin beta chain	75	1	50019	4.73	2	<i>Paracentrotus lividus</i>
111	P92177	14-3-3 protein epsilon	85	5	29780	4.68	12	<i>Drosophila melanogaster</i>
112	P09206	Tubulin beta-3 chain	480	17	49829	4.78	11	<i>Gallus gallus</i>
113	P92177	14-3-3 protein epsilon	155	6	29780	4.68	6	<i>Drosophila melanogaster</i>
114	P81605	Dermcidin	69	1	11277	6.08	10	<i>Homo sapiens</i>
115	P42028	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	63	2	23881	6.45	5	<i>Bos taurus</i>
116	P41339	Actin, acrosomal process isoform	70	1	41748	5.36	2	<i>Limulus polyphemus</i>
117		Unidentify						
118	O96347	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	81	2	24511	6.71	6	<i>Charybdis feriata</i>
119	P51544	Arginine kinase	193	6	39789	5.73	7	<i>Halotis madaka</i>
120	Q9DAK2	Parkin coregulated gene protein homolog	116	7	27708	8.85	9	<i>Mus musculus</i>
121	P68002	Voltage-dependent anion-selective channel protein	231	6	31600	7.48	3	<i>Bos taurus</i>
122	B0BM36	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mt	706	62	32066	8.66	10	<i>Xenopus tropicalis</i>
123	Q2HJ97	Prohibitin-2	193	6	33337	9.85	6	<i>Bos taurus</i>
124	Q2HJ97	Prohibitin-2	136	7	33337	9.85	6	<i>Bos taurus</i>
125	P79891	40S ribosomal protein S3	206	7	27730	9.68	11	<i>Ambystoma mexicanum</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
126	Q61425	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	108	59	34442	8.76	11	<i>Mus musculus</i>
127		Unidentify						
128	Q8K586	GTP-binding nuclear protein Ran, testis-specific isoform	202	7	24436	6.6	11	<i>Rattus norvegicus</i>
129		Unidentify						
130	Q3SYR7	60S ribosomal protein L9	50	1	21863	9.96	5	<i>Bos taurus</i>
131	P84048	Histone H4	106	2	11374	11.36	17	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
132	Q1RMH8	Sorting nexin-3	67	1	18751	8.71	4	<i>Bos taurus</i>
133	Q2TBW6	ADP-ribosylation factor-like protein 3	75	2	20492	6.74	11	<i>Bos taurus</i>
134	Q5E9B8	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7	90	2	19282	5.33	6	<i>Bos taurus</i>
135	O75602	Sperm associated antigen	94	2	55441	6.37	4	<i>Bos taurus</i>
136	Q3T0F5	Ras-related protein Rab-7a	79	2	23529	6.4	10	<i>Bos taurus</i>
137	P24789	Vimentin-1/2	99	2	52812	5.16	4	<i>Xenopus laevis</i>
138	P02754	Beta-lactoglobulin	49	1	19870	4.93	6	<i>Bos taurus</i>
139	Q39222	Ras-related protein RABA1b	53	1	24005	5.59	4	<i>Arabidopsis thaliana</i>
140		Unidentify						
141	P02595	Calmodulin	167	3	16802	4.04	19	<i>Patinopecten sp</i>
142	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	72	1	49962	4.97	2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
143	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	155	2	54074	5.14	4	<i>Drosophila melanogaster</i>
144		Unidentify						
145	P04178	Superoxide dismutase [CuZn]	80	4	15882	6.03	6	<i>Sus scrofa</i>
146	Q96QV6	Histone H2A type 1-A	57	1	14225	10.86	6	<i>Homo sapiens</i>
147	P02754	Beta-lactoglobulin	58	1	19870	4.93	6	<i>Bos taurus</i>
148	O61219	N-alpha-acetyltransferase daf-31	60	1	21149	7.74	6	<i>Caenorhabditis elegans</i>
149	P02754	Beta-lactoglobulin	51	2	19870	4.93	6	<i>Bos taurus</i>
150	P02754	Beta-lactoglobulin	59	1	19870	4.93	6	<i>Bos taurus</i>
151		Unidentify						
152	Q24JY1	60S ribosomal protein L23a	49	1	17684	10.44	8	<i>Bos taurus</i>
153	P84048	Histone H4	380	11	11374	11.36	50	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
154	P84048	Histone H4	623	22	11374	11.36	50	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
155	P84049	Histone H4	151	7	11374	11.36	50	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
156	P84048	Histone H4	590	23	11374	11.36	51	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
157		Unidentify						
158	P80311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	163	5	23729	9.33	4	<i>Bos taurus</i>
159	Q569M3	Histone H3-like centromeric protein A	104	5	17332	11.55	4	<i>Xenopus laevis</i>
160		Unidentify						
161	P52010	Peptidylprolyl cis-trans isomerase	164	9	18523	8.23	8	<i>Caenorhabditis elegans</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
162	Q27442	Histone H2B	120	10	13751	10.34	37	<i>Anopheles gambiae</i>
163	P25867	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	73	1	16667	6.81	7	<i>Drosophila melanogaster</i>
164	P69310	Ubiquitin	52	1	8520	6.56	11	<i>Avena sativa</i>
165	Q865C5	Ubiquitin	130	2	8560	6.56	23	<i>Camelus dromedarius</i>
166		Unidentify						
167		Unidentify						
168	Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	56	1	10925	7.93	21	<i>Bos taurus</i>
169	P02754	Beta-lactoglobulin	67	1	19870	4.93	6	<i>Bos taurus</i>
170	Q76181	40S ribosomal protein S12	55	1	14505	6.81	7	<i>Bos taurus</i>
171		Unidentify						
172	P02754	Beta-lactoglobulin	87	1	19870	4.93	6	<i>Bos taurus</i>
173		Unidentify						
174		Unidentify						
175	P63099	Calcineurin subunit B type 1	103	4	19288	4.64	10	<i>Bos taurus</i>
176	Q96QV6	Histone H2A type 1-A	73	2	14225	10.86	6	<i>Homo sapiens</i>
177	P84048	Histone H4	66	1	11374	11.36	9	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
178		Unidentify						
179	P84048	Histone H4	331	10	11374	11.36	50	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
180	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	192	4	49894	4.97	8	<i>Bos taurus</i>
181	Q32LA7	Histone H2A.V	72	21	13501	10.58	20	<i>Bos taurus</i>
182	P27996	Histone H4	365	17	11378	10.2	40	<i>Solaster stimpsoni</i>

Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
183/s14	P84048	Histone H4	81	4	11374	11.36	40	<i>Acrolepiopsis assectella</i>
184/s22	Q2KJE5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	366	26	43260	8.32	12	<i>Bos taurus</i>
185/s28	P08106	Heat shock 70 kDa protein	90	2	69708	5.53	4	<i>Gallus gallus</i>
186/s30	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	64	1	39531	8.61	3	<i>Salmo salar</i>
187/s33	Q0PGG4	Actin, cytoplasmic	75	5	41722	5.22	12	<i>Bos mutus grunniens</i>
188/s57	Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	623	58	49799	4.79	19	<i>Bos taurus</i>
189/s59	Q6NVU2	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	117	3	36932	6.13	9	<i>Xenopus tropicalis</i>
190/s62	P02666	Beta-casein	115	3	25091	5.26	7	<i>Bos taurus</i>
191/s71	P11147	Heat shock 70 kDa protein cognate 4	123	5	71087	5.36	9	<i>Drosophila melanogaster</i>
s73	P23330	Tubulin gamma-1 chain	93	5	51136	5.89	9	<i>Xenopus laevis</i>
192/s74	O75602	Sperm-associated antigen 6	102	3	55441	6.37	2	<i>Homo sapiens</i>
194/s75	P02554	Tubulin beta chain	532	74	49829	4.78	33	<i>Sus scrofa</i>
195/s76	P84336	Actin, cytoplasmic 1	320	28	41775	5.3	37	<i>Camelus dromedarius</i>
196/s79	Q3SZI8	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	129	6	46468	7.1	5	<i>Bos taurus</i>
197/s80	Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	856	114	49799	4.79	36	<i>Bos taurus</i>
198/s85	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	324	50	49962	4.97	40	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

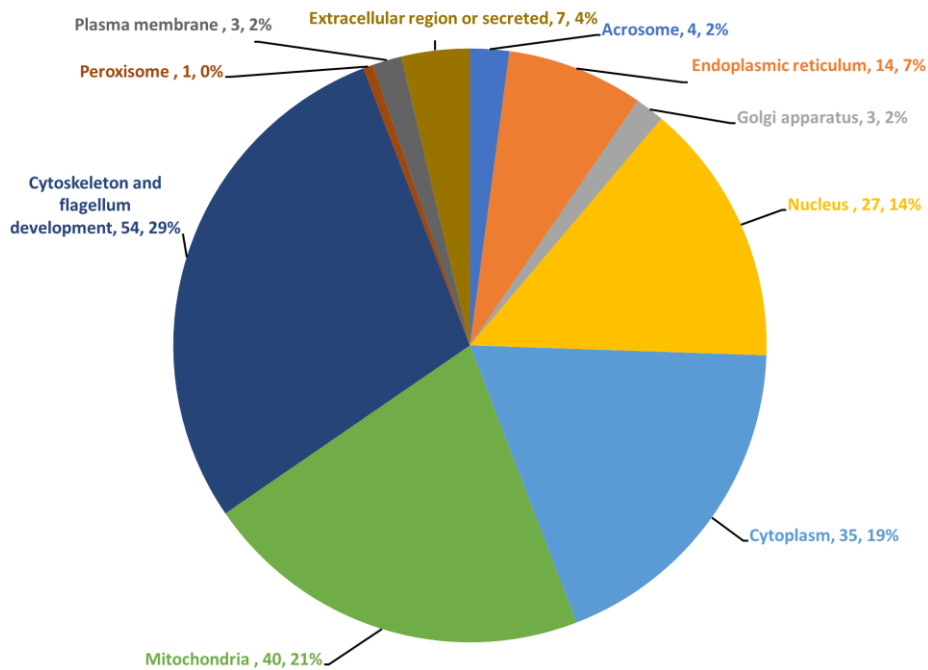
Spot No.	AC	Protein name	Mascot Score	# Match sequence	MW (Da)	pI	% Cover.	Organism
199/s88	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	152	19	49962	4.97	19	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
200/s92	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	220	13	57752	8.98	11	<i>Caenorhabditis elegans</i>
201/s93	Q5R5F6	Haptoglobin	94	5	38471	6.79	15	<i>Pongo abelii</i>
202/s94	P17336	Catalase	65	1	57113	8.39	2	<i>Drosophila melanogaster</i>
203/s96	P02554	Tubulin beta chain	101	9	49829	4.78	18	<i>Sus scrofa</i>
204/s97	Q94738	97 kDa heat shock protein	106	6	98385	5.24	3	<i>Strongylocentrotus franciscanus</i>
205/s98	P19208	Heat shock 70 kDa protein	121	10	72901	5	10	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
206/s99	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	234	12	54074	5.14	13	<i>Drosophila melanogaster</i>

4.5 การวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ

ภายหลังการระบุชนิดของโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการจัดกลุ่มโปรตีนโดยการ Retrieve ข้อมูลโปรตีนใน <https://www.uniprot.org/> ซึ่งสามารถเปรียบเทียบข้อมูล Gene ontology และการศึกษาเพิ่มเติมจากงานวิจัยอื่น ๆ ทำให้สามารถจัดโปรตีนออกเป็นกลุ่มต่างๆ โดยยึดตามโครงสร้างของเซลล์ (cellular component) ได้ดังตารางที่ 4-2 และรายละเอียดดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-2 กลุ่มของโปรตีนแบ่งตาม Gene ontology (subcellular localization)

กลุ่มที่	Gene ontology (โครงสร้างของเซลล์)	จำนวน protein spot ที่ระบุชนิดได้
1	Acrosome	4
2	Endoplasmic reticulum	14
3	Golgi apparatus	3
4	Nucleus	27
5	Cytoplasm	35
6	Mitochondria	40
7	Cytoskeleton and flagellum development	54
8	Peroxisome	1
9	Plasma membrane	3
10	Extracellular region or secreted	7
	รวม	188



ภาพที่ 4-12 องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ (Gene ontology)

ตารางที่ 4-3 รายละเอียดของโปรตีนที่พบในกลุ่มต่างๆ ตามตารางที่ 4-2

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
1. Acrosome			
sp53	P41339	Actin, acrosomal process isoform	cytoskeleton [GO:0005856]; ATP binding [GO:0005524]
sp107	P41339	Actin, acrosomal process isoform	cytoskeleton [GO:0005856]; ATP binding [GO:0005524]
sp116	P41339	Actin, acrosomal process isoform	cytoskeleton [GO:0005856]; ATP binding [GO:0005524]
sp121	P68002	Voltage-dependent anion-selective channel protein	acrosomal vesicle [GO:0001669]
2. Endoplasmic reticulum			
sp8	P08110	Endoplasmin	endoplasmic reticulum [GO:0005783]
sp12	Q91883	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	endoplasmic reticulum lumen [GO:0005788]
sp74	P00450	Ceruloplasmin	endoplasmic reticulum lumen [GO:0005788]
sp88	P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	endoplasmic reticulum [GO:0005783]
sp66	P52193	Calreticulin	sarcoplasmic reticulum lumen [GO:0033018]
sp2	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	
sp23	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	
sp26	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	
sp50	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	
sp54	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	
sp78	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	
sp80	P86909	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
sp158	P80311	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	endoplasmic reticulum chaperone complex [GO:0034663]
s98	P19208	Heat shock 70 kDa protein	endoplasmic reticulum lumen [GO:0005788]
3. Golgi apparatus			
sp102	P02666	Betacasein	Golgi apparatus [GO:0005794]
sp103	P02663	AlphaS2casein	Golgi apparatus [GO:0005794]
s62	P02666	Betacasein	Golgi apparatus [GO:0005794]
4. Nucleus			
sp25	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]
sp49	Q5E9F9	26S proteasome regulatory subunit	nucleus [GO:0005634]
sp60	O42587	26S proteasome regulatory subunit 6A-A	nucleus [GO:0005634]
sp90	B0R061	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A	nucleus [GO:0005634]
sp111	P92177	14-3-3 protein epsilon	nucleus [GO:0005634]
sp113	P92177	14-3-3 protein epsilon	nucleus [GO:0005634]
sp128	Q8K586	GTP-binding nuclear protein Ran, testis-specific isoform	nucleus [GO:0005634]; GTP binding [GO:0005525]
sp131	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]
sp134	Q5E9B8	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7	nucleus [GO:0005634]
sp146	Q96QV6	Histone H2A type 1-A	nucleus [GO:0005634]
sp152	Q24JY1	60S ribosomal protein L23a	nucleus [GO:0005634]
sp153	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634];
sp154	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634];
sp156	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634];
sp159	Q569M3	Histone H3-like centromeric protein A	nucleus [GO:0005634]

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
sp161	P52010	Peptidylprolyl cis-trans isomerase (spindle)	nucleus [GO:0005634]
sp176	Q96QV6	Histone H2A type 1-A	nucleus [GO:0005634]
sp177	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]
sp179	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]
s14	P84048	Histone H4	nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]
sp181	Q32LA7	Histone H2A.V	DNA binding [GO:0003677]
sp182	P27996	Histone H4	DNA binding [GO:0003677]
sp155	P84049	Histone H4	DNA binding [GO:0003677]
sp162	Q27442	Histone H2B	DNA binding [GO:0003677]
sp76	Q75DS1	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	DNA binding [GO:0003677]
s28	P08106	Heat shock 70 kDa protein	nucleus [GO:0005634]
s71	P11147	Heat shock 70 kDa protein cognate 4	nucleus [GO:0005634]
5. Cytoplasm			
sp10	Q3ZBT1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	cytoplasm [GO:0005737]
sp14	Q9W6Y1	Heat shock cognate 71 kDa protein	cytoplasm [GO:0005737]
sp17	P09446	Heat shock 70 kDa protein A	cytoplasm [GO:0005737]
sp38	P01023	Alpha2macroglobulin	cytosol [GO:0005829]
sp72	P23232	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	cytosol [GO:0005829]
sp104	Q589R5	Triosephosphate isomerase	cytosol [GO:0005829]
sp136	Q3T0F5	Ras-related protein Rab-7a	cytosol [GO:0005829]
sp141	P02595	Calmodulin	cytoplasm [GO:0005737]; calcium ion binding [GO:0005509]
sp163	P25867	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	cytosol [GO:0005829]
sp164	P69310	Ubiquitin	cytoplasm [GO:0005737]
sp165	Q865C5	Ubiquitin	cytoplasm [GO:0005737]

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
sp170	Q76I81	40S ribosomal protein S12	cytosolic small ribosomal subunit [GO:0022627]
sp175	P63099	Calcineurin subunit B type 1	cytosol [GO:0005829]
s22	Q2KJE5	Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	cytosol [GO:0005829]
sp28	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	glycolytic process [GO:0006096]
sp30	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	glycolytic process [GO:0006096]
sp31	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase	glycolytic process [GO:0006096]
sp45	P42894	Enolase	glycolytic process [GO:0006096]
sp92	B5DGM7	Fructosebisphosphate aldolase A	glycolytic process [GO:0006096]
sp95	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	glycolytic process [GO:0006096]
sp96	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	glycolytic process [GO:0006096]
sp130	Q3SYR7	60S ribosomal protein L9	rRNA binding [GO:0019843]
s93	Q5R5F6	Haptoglobin	immune system process [GO:0002376]
s97	Q94738	97 kDa heat shock protein	cytoplasm [GO:0005737]
s30	B5DGM7	Fructosebisphosphate aldolase A	glycolytic process [GO:0006096]
sp132	Q1RMH8	Sorting nexin-3	early endosome [GO:0005769]; early phagosome [GO:0032009]
sp91	G3QY98	Apolipoprotein AI	endocytic vesicle [GO:0030139]
sp82	O15990	Arginine kinase	cytoplasm [GO:0005737]
sp83	P51544	Arginine kinase	cytoplasm [GO:0005737]
sp93	O15990	Arginine kinase	cytoplasm [GO:0005737]
sp94	O15991	Arginine kinase	cytoplasm [GO:0005737]
sp99	P51544	Arginine kinase	cytoplasm [GO:0005737]
sp101	P51544	Arginine kinase	cytoplasm [GO:0005737]
sp119	P51544	Arginine kinase	cytoplasm [GO:0005737]
sp148	O61219	N-alpha-acetyltransferase daf-31 (multicellular organism reproduction), (larval development)	cytoplasm [GO:0005737]

6. Mitochondria

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
sp11	P29685	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [GO:0000275]
sp19	D4AT77	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp20	D4AT77	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp21	D4AT77	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp32	P25708	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp33	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp34	P82264	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
sp35	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp36	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp39	Q11190	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp43	Q60HI0	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
sp59	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp61	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp64	O94230	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp68	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp84	Q17GM7	Probable citrate synthase 1, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
sp85	O14254	Probable isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp86	Q55F21	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	mitochondrial matrix

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
		rial	[GO:0005759]
sp87	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrional	mitochondrion [GO:0005739]
sp89	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp97	O02640	Probable malate dehydrogenase, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
sp98	O02640	Probable malate dehydrogenase, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
sp105	Q9BKU4	Mitochondrial prohibitin complex protein	mitochondrial membrane; gonad development [GO:0008406]
sp106	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrional	mitochondrion [GO:0005739]
sp108	Q3T165	Prohibitin	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]
sp115	P42028	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	mitochondrial respiratory chain complex I [GO:0005747]
sp118	O96347	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
sp122	B0BM36	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] ironsulfur subunit, mitochondrial	mitochondrial membrane [GO:0031966]
sp123	Q2HJ97	Prohibitin-2	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]
sp124	Q2HJ97	Prohibitin2	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]
sp125	P79891	40S ribosomal protein S3	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]
sp126	Q61425	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]
sp143	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp145	P04178	Superoxide dismutase [CuZn]	mitochondrion [GO:0005739]

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
s59	Q6NVU2	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	mitochondrion [GO:0005739]
s79	Q3SZI8	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
s92	Q9XXK1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
s99	Q05825	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondrion [GO:0005739]
sp57	Q9VMN5	60 kDa heat shock protein homolog 2, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]; spermatogenesis [GO:0007283]
sp168	Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	mitochondrial matrix [GO:0005759]
7. Cytoskeleton and flagellum development			
sp1	P11833	Tubulin beta chain	microtubule [GO:0005874]
sp6	P11833	Tubulin beta chain	microtubule [GO:0005874]
sp37	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	microtubule [GO:0005874]
sp40	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp41	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp42	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp44	P68371	Tubulin beta4B chain	cytoskeleton [GO:0005856]
sp46	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp47	Q3MHM5	Tubulin beta-4B chain	microtubule [GO:0005874]
sp48	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp52	P68371	Tubulin beta4B chain	cytoskeleton [GO:0005856]
sp55	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp56	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp58	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp62	P90689	Actin	cytoskeleton [GO:0005856]
sp63	P84336	Actin, cytoplasmic 1	actin cytoskeleton [GO:0015629]
sp65	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp69	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp70	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp71	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
sp73	P11833	Tubulin beta chain	microtubule [GO:0005874]
sp75	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp77	P11833	Tubulin beta chain	microtubule [GO:0005874]
sp79	P60709	Actin, cytoplasmic	actin cytoskeleton [GO:0015629]
sp110	P11833	Tubulin beta chain	microtubule [GO:0005874]
sp112	P09206	Tubulin beta-3 chain	microtubule [GO:0005874]
sp142	P18288	Tubulin alpha chain, testis-specific	microtubule [GO:0005874]
sp180	Q32KN8	Tubulin alpha-3 chain	microtubule [GO:0005874]
s33	Q0PGG4	Actin, cytoplasmic	actin cytoskeleton [GO:0015629]
s57	Q3MHM5	Tubulin beta4B chain	microtubule [GO:0005874]
s73	P23330	Tubulin gamma1 chain	polar microtubule [GO:0005827]; cytoplasmic microtubule organization [GO:0031122]
s75	P02554	Tubulin beta chain	microtubule [GO:0005874]0226]
s76	P84336	Actin, cytoplasmic 1	actin cytoskeleton [GO:0015629]
s80	Q3MHM5	Tubulin beta4B chain	microtubule [GO:0005874]
s85	P18288	Tubulin alpha chain, testisspecific	microtubule [GO:0005874]
s88	P18288	Tubulin alpha chain, testisspecific	microtubule [GO:0005874]
sp5	P11832	Tubulin beta chain	cytosol [GO:0005829]
s96	P02554	Tubulin beta chain	microtubule [GO:0005874]0226]
sp15	P54652	Heat shockrelated 70 kDa protein 2	cytoskeleton [GO:0005856] male germ cell nucleus [GO:0001673]
sp13	P54652	Heat shockrelated 70 kDa protein (spindle fiber spermatogenesis)	cytoskeleton [GO:0005856] male germ cell nucleus [GO:0001673]
sp3	Q56A40	Coiled-coil domain-containing protein 40	cilium [GO:0005929]
sp7	Q9UI46	Dynein intermediate chain 1, axonemal	cilium [GO:0005929]
sp22	P24789	Vimentin-1/2	intermediate filament [GO:0005882]
sp24	B2RW38	Cilia- and flagella-associated protein	cilium [GO:0005929]

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
sp27	B2RW38	Cilia- and flagella-associated protein 58	cilium [GO:0005929]
sp29	Q2TA38	Tektin-4	sperm flagellum [GO:0036126]; cilium assembly [GO:0060271]
sp51	Q99JD2	Tektin-1	microtubule [GO:0005874]; sperm flagellum [GO:0036126]
sp67	Q6VTH5	Radial spoke head 1 homolog	cytoskeleton [GO:0005856]; spermatogenesis [GO:0007283]
sp109	Q9EQ00	Ropporin-1-like protein	cilium [GO:0005929]; sperm capacitation [GO:0048240]
sp120	Q9DAK2	Parkin coregulated gene protein homolog	cilium [GO:0005929]
sp133	Q2TBW6	ADP-ribosylation factor-like protein 3	cilium [GO:0005929]
sp135	O75602	Spermassociated antigen	microtubule cytoskeleton [GO:0015630]
sp137	P24789	Vimentin-1/2	intermediate filament [GO:0005882]
s74	O75602	Spermassociated antigen 6	microtubule cytoskeleton [GO:0015630]
8. Peroxisome			
s94	P17336	Catalase	catalase activity [GO:0004096]
9. Plasma membrane			
sp81	P01834	Immunoglobulin kappa constant	plasma membrane [GO:0005886]
sp100	Q6TEQ7	Annexin A2	plasma membrane [GO:0005886]
sp139	Q39222	Ras-related protein RABA1b	plasma membrane [GO:0005886]
10. Extracellular region or secreted			
sp114	P81605	Dermcidin	RNA binding [GO:0003723]
sp147	P02754	Beta-lactoglobulin	identical protein binding [GO:0042802]
sp149	P02754	Beta-lactoglobulin	identical protein binding [GO:0042802]
sp150	P02754	Beta-lactoglobulin	identical protein binding [GO:0042802]
sp169	P02754	Beta-lactoglobulin	identical protein binding

Spot No.	AC	Protein name	Gene ontology
			[GO:0042802]
sp172	P02754	Beta-lactoglobulin	identical protein binding [GO:0042802]
sp138	P02754	Beta-lactoglobulin	identical protein binding [GO:0042802]

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

5.1 โครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

ผลการศึกษาพบว่าหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) มีการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเนื้อเยื่อต่อมสร้างน้ำย่อยและแมนเทิล โดยมีการพัฒนาของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ลักษณะดังกล่าวคล้ายกับที่พบในหอยนางรมชนิด *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964), *Crassostrea gigas* (Franco et al., 2008), *Saccostrea forskali* (Panasophonkul, 2000; Nuurai et al., 2016) ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ประกอบไปด้วยส่วนของผนังท่อ มีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ ประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างผนังของท่อ (myoepithelial cell) ซึ่งพบในหอยนางรมชนิดอื่น (Eckelbarger & Davis, 1996; Franco et al., 2008) และมีลักษณะคล้ายกับที่พบที่ผนังท่อ เซมินิเฟอร์สในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Gartner & Hiatt, 2014) ซึ่ง myoepithelial cell ที่พบนี้ สามารถพบ muscle fiber ภายในเซลล์ซึ่งคาดว่าทำหน้าที่ช่วยให้ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สามารถบีบหรือหดตัวได้ในช่วงที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ภายในท่อพบเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ นอกจากนี้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์สร้างเมือกแทรกอยู่บริเวณเนื้อเยื่อบุผิว โดยเซลล์สร้างเมือกทำหน้าที่หลั่งเมือก (mucous cell) เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเช่นเดียวกับที่พบในหอยนางรม *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964) บริเวณรอบท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะพบเซลล์ขนาดใหญ่ล้อมรอบอยู่เรียกเซลล์นี้ว่า vesicular connective tissue cells (VCTs) ภาพจุลกายวิภาคแสดงให้เห็นว่าภายในเซลล์ VCTs นี้พบแกรนูลที่มีลักษณะที่กระจายอยู่ทั่วเซลล์ แกรนูลชนิดนี้เกิดจากการการสะสมแป้งในรูปไกลโคเจน สำหรับใช้เป็นแหล่งพลังงานของร่างกาย (Eckelbarger & Davis, 1996)

5.2 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

5.2.1 เซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เผยให้เห็นรายละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์และเซลล์อื่น ๆ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ซึ่งมีรูปแบบเช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไว้ในหอยนางรมหลายชนิด เช่น *Crassostrea glomerata* (Dinamani, 1973), *Crassostrea angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964; Eckelbarger & Davis, 1996), *Crassostrea gigas* (Franco et al., 2008; Kim et al., 2010; Yurchenko et al., 2010), *Crassostrea gasar* (Paixão et al., 2013) และ *Saccostrea forskali* (Panasophonkul, 2000; Nuurai et al., 2016) กล่าวคือภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังแบ่งเซลล์ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์สเปอร์มาโทโกเนียม (spermatogonium), เซลล์สเปอร์มาโทไซตรระยะที่ 1 (primary spermatocyte) และ เซลล์สเปอร์มาโทไซตรระยะที่ 2 (secondary spermatocyte) เซลล์สเปอร์มาทิด (spermatid) และสเปอร์มาโทซัวหรือเซลล์อสุจิ (spermatozoa, sperm)

สเปอร์มาโทโกเนียม (spermatogonium; $2n$) เป็นเซลล์ที่อยู่ติดกับฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสเปอร์มาโทโกเนียมแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ (1) สเปอร์มาโทโกเนียมระยะที่หนึ่ง (primary spermatogonium) มีลักษณะฐานของเซลล์แบนติดกับฐานของท่อ และ (2) สเปอร์มาโทโกเนียมระยะที่สอง (secondary spermatogonium) จะอยู่ถัดจากสเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่งเข้ามาภายในท่อและมีขนาดเล็กกว่าสเปอร์มาโทโกเนียมระยะที่หนึ่ง สอดคล้องกับการรายงานของ Galtsoff (1964) และ Franco et al. (2008) ภายในไซโทพลาซึมสามารถ nuage สอดคล้องกับลักษณะที่พบในเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียมของหอยนางรมหลายชนิด แต่อาจมีการใช้ชื่อเรียก nuage แตกต่างกันไป เช่น granulo-fibrillar dense bodies (Sousa & Oliveira, 1994; Nuurai et al., 2016), nuage (Franco et al., 2008) และ nuage-like material (Yurchenko et al., 2010)

สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก (primary spermatocyte; $2n$) การศึกษาในระดับจุลกายวิภาคทำให้สามารถสังเกตเห็นสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกในระยะโพรเฟสซึ่งนิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม พบเส้นใยโครมาทินหดสั้นจนเห็นเป็นแท่งโครโมโซม เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มสลายตัว ในระยะแพคทีนจะพบ synaptonemal complex ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เชื่อมติดระหว่างโฮโมโลกัสโครโมโซม ทำให้โครโมโซมมีการเข้าคู่กันตลอดในระยะเมทาเฟสจะพบเซนทริโอล เส้นใยสปินเดิล และเยื่อหุ้มนิวเคลียสสลายตัว ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในหอยนางรม *Crassostrea gigas* (Franco et al., 2008; Kim et al., 2010; Yurchenko et al., 2010) และ *Saccostrea forskali* (Nuurai et al., 2016)

สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง (secondary spermatocyte; n) การศึกษาระดับจุลกายวิภาคพบว่าช่วงปลายของสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สองจะเริ่มมี proacrosomal vesicle ปรากฏขึ้น โครงสร้างของ proacrosomal vesicle ประกอบด้วย proacrosomal granule ซึ่งมีกอลจิ คอมเพล็กซ์ ล้อมรอบอยู่ แสดงให้เห็นว่า proacrosomal vesicle พัฒนามาจากกอลจิ คอมเพล็กซ์ นอกจากนี้ยังมีการสร้างแฟลเจลลัม ซึ่งสังเกตเห็นได้จากโครงสร้างของไมโครทิวบูลที่มีการเรียงตัวแบบ $9+2$ และไมโทคอนเดรียมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีการรายงานไว้ในหอยนางรม *Crassostrea virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996), *Crassostrea gigas* (Kim et al., 2010; Yurchenko et al., 2010) และ *Saccostrea forskali* (Nuurai et al., 2016)

สเปอร์มาทิด (spermatid; n) การศึกษาครั้งนี้พบว่าการพัฒนาของสเปอร์มาทิดสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ (1) ในช่วงต้นของสเปอร์มาทิดจะมี proacrosomal vesicle จำนวนมากอยู่ในไซโทพลาซึม (2) ในช่วงกลาง proacrosomal granule จะรวมกันเป็น acrosomal granule บรรจุอยู่ใน acrosomal vesicle และเคลื่อนไปติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส และ (3) ในช่วงท้ายของสเปอร์มาทิดจะพบ acrosomal vesicle อยู่บริเวณส่วนหน้าของนิวเคลียส ด้านตรงข้ามจะมีไมโทคอนเดรีย และสังเกตเห็น subacrosomal space ซึ่งการพัฒนาของสเปอร์มาทิดทั้ง 3 ระยะ สอดคล้องกับที่มีการอธิบายไว้ในการศึกษาในหอยนางรม *Crassostrea angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *Crassostrea gigas* (Yurchenko et al., 2010) และ *Saccostrea forskali* (Nuurai et al., 2016)

สเปอร์มาโทซัว (spermatozoa; n) หรืออสุจิ (sperm) เกิดจากการที่สเปอร์มาทิดมีการพัฒนาจนกระทั่งได้เป็นสเปอร์มาโทซัวที่สมบูรณ์ ในการศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของสเปอร์มาโทซัวของหอยนางรมปากจีบพบว่ามี 3 ส่วน ได้แก่ (1) ส่วนหัว มีนิวเคลียสเป็นรูปทรง barrel-shaped มีอะโครโซมรูปร่างแบบ cup-shaped โดยส่วนปลายสุดของอะโครโซมมี transverse band 3-4 ชั้น สามารถสังเกตเห็น subacrosomal space และ axial rod (2) ส่วนลำตัว ประกอบด้วยไมโทคอนเดรียจำนวน 4 อันอยู่ล้อมรอบ

เซนทริโอลส่วนต้น (proximal centriole) และส่วนปลาย (distal centriole) และ (3) ส่วนหางหรือแฟลเจลลัมเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า axoneme คือมีไมโครทิวบูลเรียงตัวแบบ 9+2 แสดงว่าสเปอร์มาโทซัวของหอยนางรมปากจีบมีความคล้ายคลึงกับหอยนางรมในวงศ์เดียวกันที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น *Crassostrea angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *Crassostrea virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996) *Crassostrea gigas* (Kim et al., 2010; Yurchenko, 2010) และ *Saccostrea forskali* (Nurai et al., 2016)

5.2.2 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (intra-gonadal somatic cells; ISCs หรือ Sertoli cell)

เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (intra-gonadal somatic cells; ISCs หรือ Sertoli cell) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอนและไม่กลมเหมือนกับนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ โดยพบ Sertoli cell ได้ตั้งแต่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เข้าไปจนถึงกลางท่อ สามารถพบ Sertoli cell ได้มากในระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

Sertoli cell พบได้มากที่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และพบการกระจายตัวเข้าไปจนถึงกลางท่อ โดยเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอน ภายในไซโทพลาซึม ประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย เอ็นโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิ คอมเพล็กซ์ เวสซิเคิล ไลโซโซม ฟาโกไลโซโซม และแกรนูลเล็ก ๆ จำนวนมาก การพบเอ็นโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิ คอมเพล็กซ์ และแกรนูลมากภายในเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ชนิดนี้ทำหน้าที่สร้างไลโซโซม เพื่อช่วยในการย่อย residual body ที่เหลือจากสเปอร์มาทิด โดยสังเกตได้จากการพบฟาโกไลโซโซมจำนวนมากภายในเซลล์ โดยเฉพาะบริเวณฐานของเซลล์ที่อยู่ติดกับท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และการศึกษาในหอยนางรมปากจีบครั้งนี้สามารถพบว่ามี residual body ของสเปอร์มาทิดหลุดเข้ามาในไซโทพลาซึมของ Sertoli cell แสดงให้เห็นว่า Sertoli cell ทำหน้าที่กำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อให้สเปอร์มาทิดลดขนาดและพัฒนาไปเป็นสเปอร์มาโทซัวที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวนี้สอดคล้องกับหน้าที่ของเซลล์เซอโทไลต์ที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Hess & Franca, 2005) พบรายงานการศึกษาเซลล์ที่มีลักษณะดังกล่าวในหอยสองฝาหลายชนิด เช่น พบว่า Sertoli cell เซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนแทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ที่บริเวณฐานของท่อเข้าสู่ด้านลูเมน มีนิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอนและอาจพบนิวคลีโอลัส 2-3 อัน มีไมโทคอนเดรีย เอ็นโดพลาสมิก เรติคูลัม กอลจิ คอมเพล็กซ์ ไรโบโซม ไมโครทิวบูล ฟาโกไลโซโซม เม็ดไกลโคเจน และเวสซิเคิลที่มีลักษณะคล้ายน้ำมัน (lipid vesicle) ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบ *Spisula subtruncata* (Erkan & Sousa, 2001), *Pitar rudis* และ *Chamelea gallina* (Erkan & Sousa, 2002) และหอยนางรม *Crassostrea gigas* (Franco et al., 2008; Kim et al., 2010) นอกจากนี้ตามการรายงานของ Franco et al. (2011) พบว่าในระยะที่ 0 (ระยะพักตัว) จนถึงระยะที่ 1 (ระยะเริ่มพัฒนาการ) จะพบฟาโกไลโซโซมจำนวนมากภายในไซโทพลาซึมของ Sertoli cell ซึ่งคาดว่าเซลล์ชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับการกำจัด residual body ที่มาจากสเปอร์มาทิด และยังช่วยกำจัดเซลล์สืบพันธุ์ที่มีลักษณะผิดปกติอีกด้วย

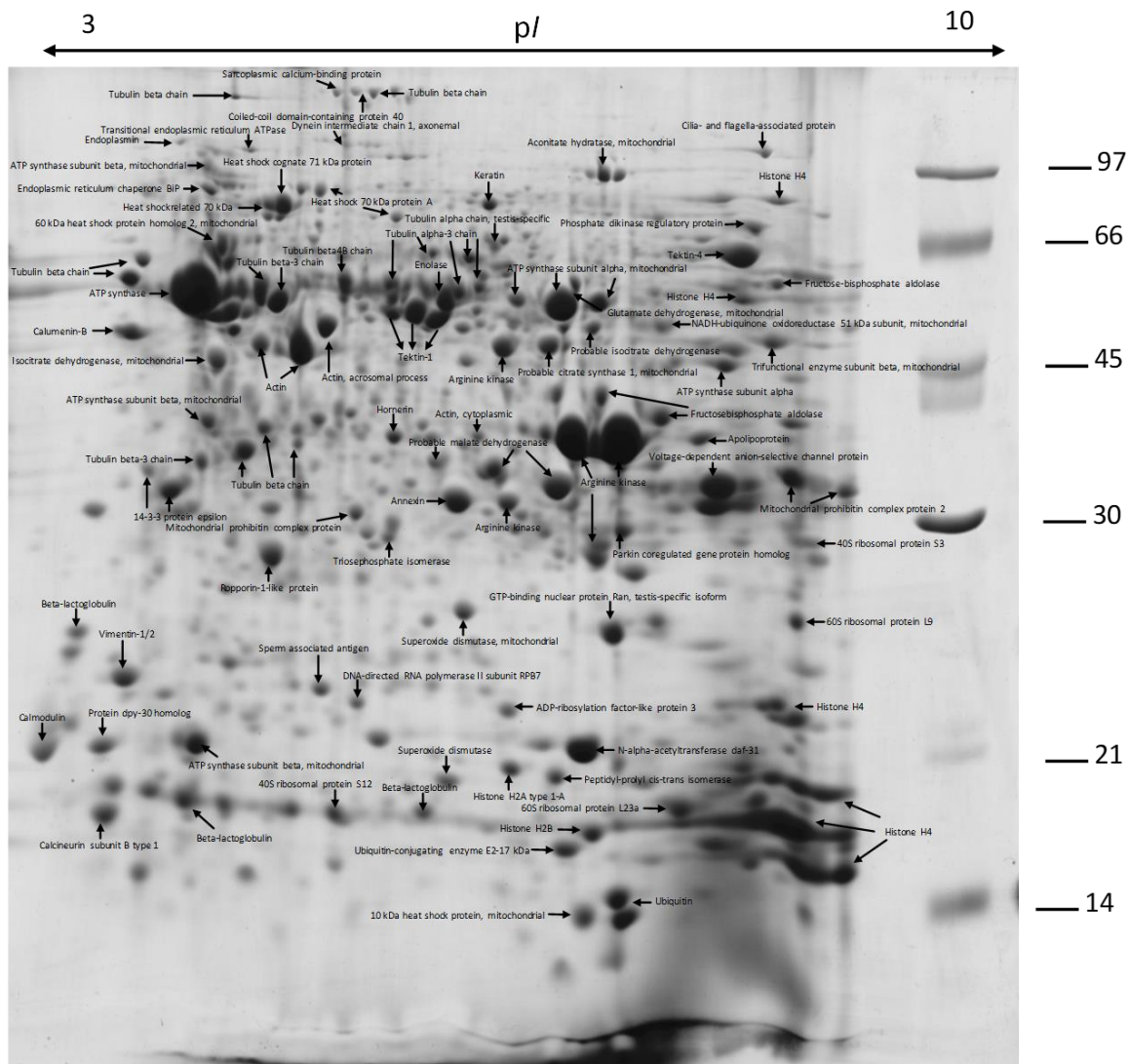
การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของสัตว์มีกระดูกสันหลังในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้มีการอธิบายกระบวนการ โครงสร้าง และหน้าที่ของเซลล์ร่างกายที่พบภายในท่อเซมินิเฟอร์รัสไว้อย่างชัดเจน โดยเซลล์เซอโทไลต์เป็นเซลล์ที่เลี้ยงทำหน้าที่สร้างและลำเลียงสารอาหารให้กับเซลล์สืบพันธุ์ กำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ และผลผลิตของเหลวเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ส่วนเซลล์เลย์ดิก

หรือเซลล์อินเตอร์สตีเซียลเป็นเซลล์ที่แทรกอยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอร์สทำหน้าที่สร้างและหลังสเตรอยด์ฮอร์โมน ได้แก่ เทสโทสเตอโรน ส่วนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังก็มีการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ร่างกายที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เรียกว่าเป็น somatic cell (Riesgo et al., 2008) ส่วนในกลุ่มหอยสองฝาที่มีข้อมูลเกี่ยวกับเซลล์ร่างกายที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เช่นกัน แต่ใช้ชื่อเรียกแต่ต่างกันไปเพื่อใช้อธิบายหน้าที่ของเซลล์ดังกล่าว เช่น sertoli-like cells (Dorange & Le Penneec, 1989); somatic cell (Johnson et al., 1996); sertoli cell (Erkan & Sousa, 2002); accessory cell (Kim et al., 2010); intragonadal somatic cell (Franco et al., 2011) cell junction ระหว่าง Sertoli cell กับเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบมีลักษณะคล้ายกับ zonula adheren หรือ adheren junction เป็นการยึดกันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยไกลโคโปรตีนในกลุ่ม cadherin ซึ่งต้องใช้แคลเซียมไอออนในการยึดติด ถ้าแคลเซียมไอออนไม่เพียงพอก็จะหลุดออกจากกันได้ (Hartssock & Nelson, 2008) ซึ่งเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะมีการเปลี่ยนรูปร่าง และเมื่อถึงระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สเปิร์มาโทซัวก็จะเคลื่อนที่ออกจากท่อ การเชื่อมติดกันระหว่าง Sertoli cell กับเซลล์สืบพันธุ์จึงเป็นการยึดเกาะแบบไม่เสถียร โดยการศึกษาในกลุ่มหอยสองฝาก่อนหน้านี้มีการรายงานว่าพบ desmosome-like junction ระหว่างเซลล์เซอโทไลกับสเปิร์มาโทโกเนียมและระหว่างเซลล์เซอโทไลกับสเปิร์มาโทไซต์ (Erkan & Sousa, 2002) ส่วนในหอยนางรม *Crassostrea gigas* พบว่ามี adhesive junction ระหว่างเซลล์เซอโทไลกับเซลล์เซอโทไล (Franco et al., 2011) แต่ก็ยังไม่มีการอธิบายหน้าที่ของ cell junction ที่พบดังกล่าวอย่างชัดเจน

5.3 แผนที่ย้ำอิงโปรตีนสำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ

การศึกษาแผนที่อ้างอิงโปรตีนสำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบโดยใช้การวิเคราะห์โปรตีนแบบ 2D-gel-based proteomics ในครั้งนี้ สามารถระบุโปรตีนได้ถึง 188 จุด และสามารถระบุชนิดของโปรตีนในแผนที่อ้างอิงได้ดังภาพที่ 5-1

การศึกษาโปรตีโอมสำหรับเซลล์อสุจิพบได้มากในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) อย่างไรก็ตามสำหรับข้อมูลการศึกษาในกลุ่ม Mollusk หรือ สัตว์กลุ่มหอยและหมีก ซึ่งจัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) พบข้อมูลน้อยมาก โดยพบการศึกษาในหอยแมลงภูชนิด *Mytilus edulis* ซึ่งใช้เทคนิค 2D-gel-based proteomics เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 77 ชนิด (Diz et al., 2012) เมื่อเทียบกับผลการระบุชนิดของโปรตีนในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผู้วิจัยสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้มากขึ้นกว่า 2 เท่า นอกจากนี้การศึกษา sperm proteome ในหอยนางรม *Crassostrea gigas* ซึ่งศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกมากในเซลล์อสุจิ สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ 36 spots (Huang et al., 2015) ซึ่งน้อยกว่าการศึกษานี้เช่นกัน



ภาพที่ 5-1 แผนที่อ้างอิงโปรตีน (proteome map) สำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ

5.4 การวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนในเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ

โปรตีนทั้ง 188 จุด ที่สามารถระบุได้ในครั้งนี้ สามารถสามารถจัดเป็นชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 112 โปรตีน เพราะบาง spots สามารถระบุเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสามารถระบุจำนวนชนิดของโปรตีนในเซลล์อสุจิได้มากที่สุดโนสัตว์กลุ่มหอยสองฝาซึ่งบพรายงานหอยแมลงภู่นชนิด *Mytilus edulis* (Diz et al., 2012) และหอยนางรม *Crassostrea gigas* (Huang et al., 2015)

เมื่อทำการแบ่งกลุ่มของโปรตีนแล้วสามารถแบ่งออกได้เป็น 10 กลุ่ม โดยใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศน์เพื่อจัดกลุ่มโปรตีนโดยยึดข้อมูล Gene ontology (subcellular location) ร่วมกับ literature review โดยสามารถแบ่งกลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน acrosome สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้จำนวน 4 protein spots โดยมีโปรตีนชนิดเด่น ได้แก่ Actin, acrosomal process isoform และ Voltage-dependent

anion-selective channel protein ซึ่ง Actin, acrosomal process isoform ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างในการสร้างส่วน acrosome เช่นเดียวกับที่พวกในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Romarowski, Luque et al. 2016) น่าจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ acrosome ส่วน Voltage-dependent anion-selective channel protein เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม ion ที่ผ่านเข้าออกจากเซลล์หรือออร์แกเนล คาดว่าโปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมปฏิกิริยาของ acrosome (acrosomal reaction) ในขั้นตอนการปฏิสนธิเพื่อให้เอนไซม์จาก acrosome ไปย่อยส่วนห่อหุ้มของเซลล์ไข่และนำไปสู่การปฏิสนธิในที่สุด

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน Endoplasmic reticulum สามารถระบุโปรตีนได้ 14 spots และ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน Golgi apparatus สามารถระบุโปรตีนได้ 3 spots โปรตีนที่ระบุชนิดได้ใน ER และ Golgi apparatus นี้ส่วนใหญ่คาดว่าจะโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตโปรตีนเพื่อสะสมบริเวณ acrosome โดยสามารถพบ Sarcoplasmic calcium-binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในกลุ่มเนื้อของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพวก mollusks และ annelids เช่นเดียวกับในการศึกษาโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิในปูหิมะ (*Chionoecetes opilio*) (Abdel Rahman, Kamath et al. 2011) และ casein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งแคลเซียมในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Signorile, Fiorilli et al. 2001)

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน Nucleus สามารถระบุโปรตีนได้ 27 spots โดยพบโปรตีน histone ต่าง ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขดตัวของ chromatin fiber ซึ่งตรงกับข้อมูลจุลกายวิภาคที่พบว่าภายในนิวเคลียสของเซลล์อสุจิพบการขดตัวของ chromatin fiber แน่นมากจนมีลักษณะที่บิ Histone มีทั้งหมด 5 ชนิด คือ H1, H2A, H2B, H3 และ H4 ซึ่งในงานวิจัยนี้พบทั้ง H2A, H2B และ H4 เช่นเดียวกับการศึกษาในเซลล์อสุจิของมนุษย์ (Eirin-Lopez and Ausio 2009) (Tanaka, Iguchi et al. 2005) นอกจากนี้ยังสามารถพบโปรตีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ transcription factor ได้เล็กน้อย

กลุ่มที่ 5 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน Cytoplasm สามารถระบุโปรตีนได้ 35 spots โดยพบโปรตีนชนิดเด่นได้แก่ กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ energy metabolism ของกลูโคส เช่น Fructose-bisphosphate aldolase A, Enolase, Fructose-bisphosphate aldolase, Triosephosphate isomerase Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific แสดงให้เห็นว่าเซลล์อสุจิเป็นเซลล์ที่ต้องใช้พลังงาน ATP มาก และมีการผลิตพลังงานตลอดเวลา อีกกลุ่มหนึ่งที่พบได้มากคือโปรตีนในกลุ่ม ribosome เช่น 40S ribosomal protein S12, 60S ribosomal protein L9 แสดงให้เห็นว่าภายในเซลล์อสุจิของหอยนางรมสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ มิได้ทำหน้าที่เพียงเป็นรถขนส่งสารพันธุกรรมเท่านั้น 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*) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้เนื่องจากพบ HSP70 ทั้งใน cytoplasm nucleus และใน plasma membrane (Huang, Liu 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) ซึ่งพบใน spindle fiber ในการสร้าง

male germ cell ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ในภาวะสมบูรณ์พันธุ์ในหนู (Eddy 1999) ที่พบ HSP70 เช่นกัน

กลุ่มที่ 6 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน mitochondria สามารถระบุโปรตีนได้ถึง 40 spots ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพลังงาน ATP เช่น ATP synthase subunit alpha, ATP synthase subunit beta, Aconitate hydratase, NADH dehydrogenase flavoprotein เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบมีความต้องการใช้พลังงานเป็นอย่างมาก ข้อมูลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาค ที่พบ mitochondria ขนาดใหญ่จำนวน 4 อัน บริเวณส่วนคอ (middle piece) ของเซลล์อสุจิ คล้ายกับที่พบในหอยนางรมชนิดอื่น ๆ (Franco *et al.*, 2008; Nuurai *et al.*, 2016; Yurchenko, 2012)

กลุ่มที่ 7 ได้แก่ โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Cytoskeleton and flagellum development สามารถระบุชนิดโปรตีนในกลุ่มนี้ได้ถึง 54 spots ซึ่งเป็นจำนวนมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ โปรตีนชนิดเด่นในกลุ่มนี้ได้แก่ tubulin, actin, radial spoke head, tektin เป็นต้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้สัมพันธ์กับข้อมูลจุลกายวิภาคของเซลล์ที่พบว่า เซลล์อสุจิประกอบส่วนส่วนหางที่ยาวมาก ภายใน axoneme มีโครงสร้าง microtubule แบบ 9+2 และมีโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่จำนวนมาก

กลุ่มที่ 8 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน Peroxisome พบโปรตีน 1 ชนิด คือ Catalase โดย catalase เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อ chemical stress แสดงให้เห็นว่าเซลล์อสุจิไม่เพียงแต่ทำหน้าที่หลักในการขนส่งสารพันธุกรรมไปยังเซลล์ไข่เพื่อการปฏิสนธิแล้ว ยังสามารถตอบสนองหรือป้องกันตัวเองและรักษาเสถียรภาพของเซลล์จากความเครียดจากสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อมภายนอกได้

กลุ่มที่ 9 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน Plasma membrane พบ 3 ชนิด ได้แก่ Immunoglobulin kappa constant, Annexin A2, Ras-related protein RABA1b โดยหน้าที่ของโปรตีนที่พบในกลุ่มนี้คาดว่า จะเกี่ยวข้องกับการ cellular signaling และ sperm-egg recognition

กลุ่มที่ 10 ได้แก่ โปรตีนที่มีตำแหน่งใน Extracellular region or secreted protein สามารถระบุได้ 7 protein spots โปรตีนในกลุ่มนี้เป็นโปรตีนที่พบได้ภายนอกเซลล์ ซึ่งมีการหลั่งจากเซลล์ ตัวอย่างของโปรตีนในกลุ่มนี้ได้แก่ Apolipoprotein A-I, Dermcidin และ Beta-lactoglobulin

เมื่อพิจารณาภาพรวมของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ในเซลล์อสุจิของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีการศึกษาแล้ว พบว่ามีความคล้ายคลึงกันในด้านชนิดของโปรตีนที่พบ เช่น ในหอยแมลงภู่นิวซีแลนด์ *Mytilus edulis* (Diz *et al.*, 2012), หอยนางรม *Crassostrea gigas* (Huang *et al.*, 2015) หนอนถั่ว *Echiuran Urechis unicinctus* (Qin, Zhang *et al.* 2018) รวมทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ไนไก่ (Ushiyama, Tajima *et al.* 2017) หนู (Skerget, Rosenow *et al.* 2015) วัว (Kasvandik, Sillaste *et al.* 2015) รวมทั้งมนุษย์ (Nixon, Dun *et al.* 2017) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์อสุจิ และมีหน้าที่คล้ายคลึงกันในเรื่องมีชีวิตต่างกัน อย่างไรก็ตามโปรตีนที่พบอาจมีความแตกต่างกัน เช่น โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ sperm-egg recognition ซึ่งโปรตีนดังกล่าวต้องมีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ เป็นกลไกป้องกันการปฏิสนธิข้ามชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิของสัตว์แต่ละประเภทอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชีววิทยาของเซลล์อสุจิในสัตว์นั้นๆ เช่น ในหอยนางรมพบว่าสามารถพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน (energy metabolism) สูงมาก เนื่องจากเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบสามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้นานมากกว่า 24 ชั่วโมงหลังการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งเป็นผลการทดสอบใน

ห้องปฏิบัติการ ในขณะที่เซลล์สุจิของสัตว์บางชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้เพียงไม่กี่นาที่หลังการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

สรุปผลการวิจัย

1. ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังแบ่งเซลล์ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์สเปอร์มาโทโกเนีย (spermatogonium), เซลล์สเปอร์มาโทไซตระยะที่ 1 (primary spermatocyte) และ เซลล์สเปอร์มาโทไซตระยะที่ 2 (secondary spermatocyte) เซลล์สเปอร์มาทิด (spermatid) และสเปอร์มาโทซัวหรือเซลล์อสุจิ (spermatozoa, sperm)

2. โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบพบว่ามี 3 ส่วน ได้แก่ (1) ส่วนหัว มีนิวเคลียสเป็นรูปทรง barrel-shaped ขนาดประมาณ 1.8 μm มีอะโครโซมรูปร่างแบบ cup-shaped ทางด้านหน้า พบ subacrosomal space และ axial rod (2) ส่วนคอหรือส่วนลำตัว ประกอบด้วยไมโทคอนเดรียจำนวน 4 อันอยู่ล้อมรอบ proximal centriole และ distal centriole และ (3) ส่วนหางหรือแฟลเจลลัมเป็นโครงสร้าง axoneme คือมีไมโครทิวบูลเรียงตัวแบบ 9+2

3. Sertoli cell ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอนและไม่กลมเหมือนกับนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ โดยพบได้ตั้งแต่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เข้าไปจนถึงกลางท่อ และ ได้มากในระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

4. โครงสร้างจุลกายวิภาคของ Sertoli cell ภายในไซโทพลาซึมประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย เยื่อเอ็นโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิจี คอมเพล็กซ์ เวสซิเคิล ไลโซโซม ฟาโกไลโซโซม และแกรนูลเล็ก ๆ จำนวนมาก

5. เซลล์อสุจิที่ได้จาก stripping method และ spawning method มีลักษณะประชากรคล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีเซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ โดยในตัวอย่างที่ได้จาก stripping method อาจพบเซลล์อื่น เช่น Sertoli cell ติดมาบ้างแต่ก็เป็นเพียงส่วนน้อยเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์อสุจิที่เตรียมได้จากทั้ง 2 วิธีนี้ มีแนวโน้มที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการเตรียมเซลล์สืบพันธุ์เพื่อใช้ในการผสมเทียมหอยนางรมได้

6. โปรตีนโอมของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบเมื่อทำการแยกด้วยเทคนิค 2-D gel electrophoresis และย้อมด้วยสี Coomassie Blue พบโปรตีนที่แยกได้ในเจลประมาณ 500 จุด

7. สร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีนสำหรับเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบโดยระบุโปรตีนได้ 188 จุด จาก 206 จุด คิดเป็น 91.26% คิดเป็นโปรตีนทั้งหมด 112 ชนิด ซึ่งถือเป็นการระบุชนิดของโปรตีนที่มีจำนวนมากที่สุดที่เคยมีรายงานในเซลล์อสุจิของหอยสองฝา

8. โปรตีนที่ระบุได้แบ่งเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่พบใน acrosome, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, nucleus, cytoplasm, mitochondria, cytoskeleton and flagellum และ extra cellular region โดยโปรตีนที่พบนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาด้านจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิอีกด้วย

9. ในหอยนางรมพบว่าสามารถพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน (energy metabolism) จำนวนมาก เนื่องจากเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบสามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้นานหลังจากที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

ข้อเสนอแนะที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

1. เป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการอธิบายกลไกการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝาได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบที่มีการเพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของไทย นอกจากนี้ยังทราบชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์อสุจิ และสามารถสร้างเป็นแผนที่โปรตีนเพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาโปรตีนในเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยเพื่อพัฒนาต่อยอดการเพิ่มผลผลิตการเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบต่อไปในอนาคต

2. ผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้จะช่วยส่งเสริมการหาพ่อแม่พันธุ์ที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์คุณภาพดีซึ่งมีความสำคัญต่อการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงหอยนางรม และจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงหอยนางรมโดยสามารถยกระดับการเพาะเลี้ยงโดยไม่ต้องอาศัยลูกอ่อนหอยนางรมจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว แต่สามารถเพาะเลี้ยงได้เอง ดังนั้นด้านนโยบายอาจจะส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะเลี้ยงลูกอ่อนหอยนางรมโดยทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่คุณภาพน้ำเชื้อดีต่อไป

3. ในขั้นตอนการกระตุ้นหอยให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning method) โดยวิธี heat-shock และใช้ความเค็มนั้น เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลค่อนข้างต่ำ และต้องทำในฤดูผสมพันธุ์จึงจะมีโอกาสปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นหากต้องการตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์จากวิธี spawning method ให้ตรวจสอบก่อนว่าพ่อแม่พันธุ์อยู่ในช่วงเจริญพันธุ์หรือไม่ วิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ง่ายคือ การเปิดเปลือกหอยเพื่อดูความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ซึ่งจะเห็นเป็นสีขาวนวลบริเวณกลางลำตัวหรือภายใต้แมนเทิลก่อนไปทางด้านหน้า หากพบว่าบริเวณนี้มีสีนวลและอวบเต่งก็มีแนวโน้มที่ดี อย่างไรก็ตามการกระตุ้นด้วยวิธี heat-shock และใช้ความเค็มนั้น ก็อาจมีความไม่แน่นอน ดังนั้นอาจใช้ฮอร์โมนชนิดกระตุ้น เช่น serotonin hormone ซึ่งอาจช่วยกระตุ้นให้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ดีขึ้น

4. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะใช้เป็นพื้นฐานการศึกษาเพื่อต่อยอดไปสู่วิธีตรวจสอบหาพ่อแม่พันธุ์ดีสำหรับการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในอนาคต นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาชีววิทยาของกลไกการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มหอยสองฝาที่ปฏิสนธิโดยการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่ภายนอก (spawner) อีกด้วย

5. ในการเก็บตัวอย่างเซลล์อสุจิหลายครั้งพบว่าจะมีเกลือจากน้ำทะเลปนเปื้อนมาด้วยเสมอ หากนำตัวอย่างมาสะกัดโปรตีนโดยตรงโปรตีนที่ได้จะมีเกลือผสมอยู่ด้วยและจะรบกวนการแยกโปรตีนในกระบวนการ 2-D gel electrophoresis เป็นอย่างมาก ดังนั้นต้องหาวิธีกำจัดเกลือจากน้ำทะเลก่อน

6. ในการศึกษาขั้นต่อไป สามารถนำผลการศึกษาไปหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะกับคุณภาพของน้ำเชื้อ เนื่องจากมีแผนที่โปรตีนอ้างอิงแล้ว จึงไม่ต้องทำการระบุชนิดโปรตีนอีก ดังนั้นผู้วิจัยสามารถศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้ออสุจิในแง่ของความสามารถในการปฏิสนธิและสกัดโปรตีนจากประชากรเซลล์อสุจิที่มีคุณภาพสูงเปรียบเทียบกับเซลล์อสุจิก่อนที่มีคุณภาพต่ำ ซึ่งจะนำไปสู่การระบุชนิดโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำเชื้อ (biomarker of quality) และนำไปสู่การพัฒนาวิธีตรวจสอบพ่อแม่พันธุ์ที่ดีก่อนการผสมเทียมได้

7. หากต้องการระบุชนิดของโปรตีนได้มากขึ้น ให้เพิ่มวิธีการศึกษาโปรตีนโดยใช้เทคนิค gel-free method (insoluble digestion) เพื่อเพิ่มโอกาสในการระบุชนิดของโปรตีน

ผลผลิต (Output)

1. ผลผลิตจากโครงการวิจัยดังกล่าวมีเป้าหมายเผยแพร่ผลการศึกษาดังนี้
 - 1.1 เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติในฐานข้อมูล ISI 1 เรื่อง ดังนี้
Proteome analysis of sperm in the Hooded oyster (*Saccostrea cucullata*) ในวารสาร
Proteomics โดยมีคณะผู้วิจัย ได้แก่ Kullanist Thanormjit, Chantragan Srisomsap,
Daranee Chokchaichamnankit, Jisnuson Svasti, Sutin Kingtong*
 - 1.2 เผยแพร่ในงานประชุมนานาชาติ 1 เรื่อง ในงานประชุม PROTEOMIC FORUM 2019 (XIII. Annual Congress of the European Proteomics Association: From Genes via Proteins and their Interactions to Functions March 24–28, 2019 • Potsdam, Germany)
เรื่องที่น่าสนใจคือ Oyster Sperm proteome analysis of the Hooded oyster
(Kullanist Thanormjit, Chantragan Srisomsap, Daranee Chokchaichamnankit, Jisnuson Svasti, Sutin Kingtong*) โดยนางสาวกุลนิษฐ์ ฅนอมจิตร จะได้รับเชิญให้เป็นผู้นำเสนอผลงานประเภทโปสเตอร์
2. ได้แผนที่อ้างอิงโปรตีน (proteome reference map) สำหรับการศึกษาดูเซลล์ของหอยนางรมปากจีบในอนาคต
3. ได้วิธีการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ

บรรณานุกรม

- Abdel Rahman, A. M., et al. (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.
- Akaishi, F. M., Silva de Assis, H. C., Jakobi, S. C., Eiras-Stofella, D. R., St-Jean, S. D., Courtenay, et al., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 46, 24-32.
- Allen, S. K. and D. Bushek (1992). "Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes." *Aquaculture* 103(3): 241-251.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19, 1853-1861.
- Baker, M. A., et al. (2008). "The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 8(11): 2312-2321.
- Baqueiro, C. E. R., Aldana, A. D., Sevilla, M. L., & Rodríguez, E. P. F. (2007). Variations in the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), Pueblo Viejo lagoon, Veracruz, Mexico. *Transitional Waters Bulletin*, 2, 37-46.
- Barros, P., et al. (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.
- Bertazzi, G. D., & Domínguez, F. G. (2005). Reproductive cycle of the Rock oyster *Hyotissa hyotis* (Linné, 1758) (Griphaeidae) at the La Ballena Island, Gulf of California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 987-993.
- Boonmee, A., et al. (2016). "Differential protein expression during sperm maturation and capacitation in an hermaphroditic bivalve, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Molluscan Studies* 82(4): 575-584.
- Bozzo, M.G., Poquet, M., Sagristà, E., Durfort, M., 2008. Ultraestructura dels espermatozoides de *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* and *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). *Treballs SCB* 59, 59–70.
- Bozzo, M.G., Ribes, E., Sagristà, E., Poquet, M., Durfort, M., 1993. Fine structure of the spermatozoa of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Mol. Reprod. Dev.* 34, 206–211.
- Braley, R. D. (1985). "Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). *Aquaculture* 47(4): 321-325.
- Cao, W. L., et al. (2006). "Proteomic profiling of accessory structures from the mouse sperm flagellum. *Molecular & Cellular Proteomics* 5(5): 801-810.

- Chávez-Villalba, J., et al. (2002). "Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214(1): 115-130.
- Choi, K. S. (2008). Oyster capture-based aquaculture in the Republic of Korea. In A. Lovatelli, & P. F. Holthus (Eds). *Capture-based aquaculture: Global overview* (pp. 271-278). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Chung, E. Y. (2008). Ultrastructure of germ cells, the leydig cells, and sertoli cells during spermatogenesis in *Boleophthalmus pectinirostris* (Teleostei, Perciformes, Gobiidae). *Tissue and Cell*, 40(3), 195-205.
- Coe, W. R. (1931). Spermatogenesis in the California oyster (*Ostrea lurida*). *Biological Bulletin*, 61(3), 300-315.
- Dangwatanakul, R. (1992). *Reproductive biology of the large oyster Crassostrea belcheri in Thailand*. Master's thesis, Technology of Environment Management, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
- Daniels, E.W., Longwell, A.C., Mcniff, J.M., 1971. Ultrastructure of spermatozoa from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 90, 275–282.
- Díaz, M. E., Pouvreau, S., Villalba, J. C., & Pennec, M. L. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17(5), 491-506.
- Dinamani, P. (1973). Reproductive cycle and Gonadal changes in the New Zealand Rock oyster *Crassostrea glomerata*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 8(1), 39-65.
- Dong, Q., Huan, G.C., Tiersch, T.R., 2005. Spermatozoal ultrastructure of diploid and tetraploid Pacific oysters. *Aquaculture* 249, 487–496.
- Dorange, G., & Le Pennec, M. (1989). Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Invertebrate Reproduction and Development*, 152, 109-117.
- Dorus, S., et al. (2010). "Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. *Mol Biol Evol* 27(6): 1235-1246.
- Drozdo, A.L., Sharina, S.N., Tyurin, S.A. (2009) Sperm ultrastructure in representatives of six bivalve families from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russ. J. Mar. Biol.* 35, 236–241.
- Eckelbarger, K. J., & Davis, C. V. (1996). Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. *Marine Biology*, 127, 89-96.
- Eddy, E. M. (1999). "Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 4(1): 23-30.

- Eirin-Lopez, J. M. and J. Ausio (2009). "Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *Bioessays* 31(10): 1062-1070.
- Erkan, M., & Sousa, M. (2001). Ultrastructure of spermatogenesis in *Cerastoderma glaucum* (Cardiacea) and *Spisula subtruncata* (Mactracea). *Invertebrate Reproduction and Development*, 40(2-3), 227-238.
- Erkan, M., & Sousa, M. (2002). Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae). *Tissue & Cell*, 34(4), 262-272.
- Franco, A., Berthelin, C. H., Goux, D., Sourdaire, 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.
- Franco, A., Kellner, K., Goux, D., Mathieu, M., & Berthelin, C. H. (2011). Intra-gonadal Somatic Cells (ISCs) in the male oyster *Crassostrea gigas*: Morphology and contribution in germinal epithelium structure. *Micron*, 42, 718-725.
- Galtsoff, P. S. (1964). *The American Oyster Crassostrea virginica Gmelin*. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.
- Fukazawa, H., Kawamura, T., Takami, H., Watanabe, Y., 2007. Oogenesis and relevant changes in egg quality of abalone *Haliotis discus* during a single spawning season *Aquaculture* 270, 265-275.
- Galtsoff, P.S., 1964. *The American Oyster Crassostrea virginica Gmelin*. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2014). *Color atlas and text of histology* (6th Ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Goldberg, E.D., 1986. TBT: an environmental dilemma. *Environment* 28, 17-44.
- Gomes, C. H. A. M., Silva, F. C., Lopes, G. R., & Melo, C. M. R. (2014). The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. *Brazilian Journal of Biology*, 74(4), 967-976.
- Gwo, J.C., Liou, C.H., Cheng, C.H., 1996. Ultrastructure of the spermatozoa of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia, Ostreidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 28, 395-400.
- Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the Actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), 660-669.
- Hayes, P. F., & Menzel, R. W. (1981). The reproductive cycle of early setting *Crassostrea Virginica* (Gmelin) in the Northern Gulf of Mexico, and its implication for population recruitment. *The Biological Bulletin*, 160, 80-88.
- Healy, I.M., Lester, R.J.G., 1991. Sperm ultrastructure in the Australian oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) (Bivalvia: Osteroidea). *J. Mollus. Stud.*, 57, 219-224.
- Hess, R. A., & França, L. R. (2005). Structure of the Sertoli cell. In M. K. Skinner, & M. D. Griswold (Eds.), *Sertoli Cell Biology* (pp. 19-40). London: Elsevier Academic Press.

- Huang, X., et al. (2015). "The sperm proteome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and immunolocalization of heat shock proteins. *Invertebrate Reproduction & Development* 59(3): 111-118.
- Jaramillo, C. R., Hurtado, M. A., Vivas, E. R., Ramírez, J. L., Manzano, M., & Palacios, E. (2008). Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research*, 27(5), 1129-1141.
- Johnston, D. S., et al. (2005). "Analysis of the human sperm proteome. *Ann N Y Acad Sci* 1061: 190-202.
- Johnson, M. J., Casse, N., & Le Pennec, M. (1996). Spermatogenesis in the Endosymbiont-bearing Bivalve *Loripes lucinalis* (Veneroida: Lucinidae). *Molecular Reproduction and Development*, 45, 476-484.
- Kang, S. G., Choi, K. S., Bulgakov, A. A., Kim, Y., & Kim, S. Y. (2003). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 282, 1-21.
- Kasvandik, S., et al. (2015). Bovine sperm plasma membrane proteomics through biotinylation and subcellular enrichment.
- Kim, J. H., Chung, E. Y., Choi, K. H., Lee, K. Y., & Choi, M. S. (2010). Ultrastructure of the testis and germ cell development during spermatogenesis in male *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) in Western Korea. *Korean J. Malacol*, 26(3), 235-244.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T., 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology* 85, 124-132.
- 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.
- Kwon, W.-S., et al. (2015). "Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Scientific Reports* 5(1).
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 190, 183-199.
- Li, Q., Liu, W., Shirasu, K., Chen, W., & Jiang, S. (2006). Reproductive cycle and biochemical composition of the Zhe oyster *Crassostrea plicatula* Gmelin in an eastern coastal bay of China. *Aquaculture*, 261, 752-759.
- Li, C.-j., et al. (2016). Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction Science*. 173: 1-7.

- Loor, A., & Sonnenholzner, S. (2014). Reproductive cycle of the rock oyster, *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) from two locations on the southern coast of Ecuador. *Aquaculture Research*, 1-11.
- Lorio, W. J., & Malone, S. (1994, October). The Cultivation of American Oysters (*Crassostrea virginica*). *SRAC Publication*, 432, 1-8.
- Martínez-Heredia, J., et al. (2006). "Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 6(15): 4356-4369.
- Mondol, M. R., Kim, C. W., Kim, B. K., Kang, C. K., & Choi, K. S. (2012). Early growth and reproduction of hatchery-produced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the southern coast of Korea. *The Japanese Society of Fisheries Science*, 78, 1285-1292.
- Naaby-Hansen, S. and J. C. Herr (2010). "Heat shock proteins on the human sperm surface. *Journal of reproductive immunology* 84(1): 32-40.
- Nabhitabhata, J. (2009). *Checklist of mollusca fauna in Thailand*. Bangkok: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning.
- Ngo, T. T. T., Kang, S. G., & Choi, K. S. (2002). Seasonal changes in reproductive condition of the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) from suspended culture in Gosung Bay, Korea. *Korean Journal of Environmental Biology*, 20, 268-275.
- Nixon, B., et al. (2017). Proteomic Analysis of Human Spermatozoa. *Immune Infertility: Impact of Immune Reactions on Human Fertility*. W. K. H. Krause and R. K. Naz. Cham, Springer International Publishing: 3-22.
- Nuurai, P., Panasophonkul, S., Tinikul, Y., Sobhon, P., & Wanichanon, R. (2016). Spermatogenesis in the Rock oyster, *Saccostrea forskali* (Gmelin, 1791). *Tissue and Cell*, 48, 43-48.
- Paixão, L., Ferreira, M. A., Nunes, Z., Sizo, F. F., & Rocha, R. (2013). Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. *Aquaculture*, 6(12), 380-383.
- Panasophonkul, S. (2000). *Spermatogenesis and chromatin condensation in the male germ cells of a marine oyster, Saccostrea forskali Gmelin*. Master's thesis, Anatomy, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
- Parent, S., et al. (1999). "Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Molecular reproduction and development* 52(1): 57-65.
- Peddinti, D., et al. (2008). "Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Systems Biology* 2(1): 19.

- Poutiers, J. M. (1998). Bivalves (Acephala, Lamellibranchia, Pelecypoda). In K. E. Carpenter, & V. H. Niem (Eds), *The living marine resource of the Western Central Pacific: Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods* (pp. 123-362). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Powell, E. N., Ormond, E. A. W., & Choi, K. S. (1993). Gonadal analysis - *Crassostrea virginica*. In G. G. Lauenstein, & A.Y. Cantillo (Eds.), *NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 71* (pp. 11.55-11.62). Silver Spring, MD: National Oceanic and Atmospheric Administration.
- Qin, Z., et al. (2018). "The Sperm Proteome of the Echiuran *Urechis unicinctus* (Annelida, Echiura). *Proteomics* 18(16): e1800107.
- Quayle, D. B., & Newkirk, G. F. (1989). *Farming bivalve molluscs: Methods for study and development*. Canada: The International Development Research Centre.
- Radons, J. (2016). "The human HSP70 family of chaperones: where do we stand. *Cell Stress Chaperones* 21(3): 379-404.
- Ren, J. S., Marsden, I. D., Ross, A. H., & Schiel, D. R. (2003). Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37, 171-182.
- Riesgo, A., Maldonado, M., & Durfort, M. (2008). Occurrence of somatic cells within the spermatid cysts of demosponges: A discussion of their role. *Tissue and Cell*, 40, 387-396.
- Romarowski, A., et al. (2016). Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. M. G. Buffone. Cham, Springer International Publishing: 129-144.
- Sheri Skerget, et al. (2013). The *Rhesus macaque* (*Macaca mulatta*) sperm proteome.
- Signorile, A., et al. (2001). "Casein Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells. *The Journal of Nutrition* 131(6): 1655-1661.
- Skerget, S., et al. (2015). Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLOS ONE* 10(11): e0140650.
- Sousa, M., & Oliveira, E. (1994). An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. *Marine Biology*, 120, 545-551.
- Sukumar, P., & Joseph, M. M. (1988) Annual reproductive cycle of the Rock oyster *Saccostrea cucullata* (von Born). In *Proceedings of the First Indian Fisheries Forum* (pp. 207-210). Mangalore, India: Asian Fisheries Society Indian Branch.
- Tanaka, H., et al. (2005). "HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol* 25(16): 7107-7119.
- Ushiyama, A., et al. (2017). "Characterization of the functions and proteomes associated with membrane rafts in chicken sperm. *PLOS ONE* 12(11): e0186482.

- Valtat, S. (2006). *Saccostrea cucullata* (Born, 1778). Retrieved from <http://www.valtat.org/bivalv/saccucull.html>.
- Wang, G., et al. (2013). "In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *J Proteomics* 79: 114-122.
- Xiaohong, H., et al. (2015). The sperm proteome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and immunolocalization of heat shock proteins.
- Yoosukh, W., & Duangdee, T. (1999). Living oyster in Thailand. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 19(2), 363-370.
- Yurchenko, O. V., Radashevsky, V. I., & Reunov, A. A. (2010). Ultrastructural study of spermatogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) from the Sea of Japan. *Invertebrate Zoology*, 7(1), 55-69.
- Yurchenko, O.V., Radashevsky, V.I., Reunov, A.A. 2010. Ultrastructural study of spermatogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia, Ostreidae) from the Sea of Japan. *Invertebr. Zool.* 7, 55–69.
- Zhang, Y., et al. (2015). Sperm proteome of *Mytilus galloprovincialis*: Insights into the evolution of fertilization proteins in marine mussels. *Proteomics* 15(23-24): 4175-4179.