รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วัน ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)

[Construction of the recombinant Insulin-like growth factor-I protein of the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*)]

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 103147
สัญญาเลขที่ 35/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วัน ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)

Construction of the recombinant Insulin-like growth factor-I protein of the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 35/2558

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพรทิพย์ ทองบ่อ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัดสมุทรสาคร ที่ถ่ายทอดเทคโนโลยีการเลี้ยงปลาการ์ตูนในบ่อปูนด้วยระบบชีวภาพ คุณจีรนันท์ ธรรมณวโสพส คุณสันติ สวนลา และคุณเอกรัตน์ น้อยเพ็ง ที่ช่วยจัดการดูแลระบบการเลี้ยงและการทดสอบอาหารผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีนกับปลาการ์ตูนส้มขาวตลอดโครงการวิจัย ภาควิชาวาริชศาสตร์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสถานที่ทำการศึกษาและวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี
มิถุนายน 2559

บทคัดย่อ

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ของอินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วัน (Insulin-like growth factor-I; IGF-I) ซึ่งเป็นฮอร์โมนประเภทเปปไทด์ที่ส่วนใหญ่ผลิตออกมาจากตับเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโกรทฮอร์โมน โดยทำการโคลนยีน *IGF-I* จาก complementary DNA (cDNA) ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) ที่สามารถแปรรหัสได้เป็นโปรตีนสมบูรณ์โดยใช้ pETSUMO เป็นดีเอ็นเอพาหะ รีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I (rIGF-I) ที่ผลิตได้อยู่ในสภาพละลายง่ายและแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 เมื่อเจริญเซลล์ตั้งต้น 10 มิลลิลิตร เหนี่ยวนำด้วย isopropyl-β-D-thiogalactoside ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถผลิต rIGF-I ได้ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม เมื่อนำ rIGF-I ไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพโดยผสมกับอาหารในระดับ 1, 0.1 และ 0.01 µg/g bwt/day ให้ปลากินติดต่อกัน 4 สัปดาห์ วัดอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate; RGR) การเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency, FE) และระดับการแสดงออกของยีน *insulin-like growth factor-I (IGF-I)* และ *vitellogenin (VTG)* ด้วยวิธี quantitative SYBR® real-time PCR ผลการทดสอบพบว่า rIGF-I มีแนวโน้มเพิ่มอัตราการเจริญเติบเติบโตของปลาการ์ตูนส้มขาว และ rIGF-I ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/g bwt/day มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและมีประสิทธิภาพการใช้อาหารมากที่สุด แต่ระดับการแสดงออกของยีน *IGF-I* และ *VTG* ต่ำสุด

ABSTRACT

Construction of the recombinant protein of Insulin-like growth factor-I (IGF-I), a polypeptide hormone mainly produced by the liver in response to the endocrine growth hormone stimulus, was conducted. In this study, the clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) IGF-I complementary DNA (cDNA) encoding the mature protein was cloned in a pETSUMO expression vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 cells as a soluble protein upon induction with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside. The yield of the recombinant IGF-I (rIGF-I) after key steps in the overall purification process is approximately 0.5 mg /10 ml bacterial cells. The biological activity of the purified rIGF-I was assessed by oral administration on the 2- month old fish. Three doses of rIGF-I (1, 0.1 and 0.01 μg/g body weight (bwt)/day) and 0 μg/g rIGF-I was used as a control, were administered for over 4 weeks and continuing without feeding with rIGH-I for another 4 weeks. Fish growth performance was measured by relative growth rate (RGR), specific growth rate (SGR), feed conversion rate (FCR) and feed efficiency (FE). Quantitative expression analysis by SYBR® real-time PCR of the *IGF-I* and *vitellogenin* (*VTG*) genes was also investigated. The results showed the rIGF-I tend to enhance the growth of the clown anemonefish. The 1 μg/g of rIGF-I provided the highest feed conversion rate and feed efficiency but showed the lowest expression of *IGF-I* and *VTG* genes.

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทที่ 1 บทนำ..... 1
2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 5
3 ผลการทดลอง..... 12
4 วิจารณ์..... 23
5 สรุปและข้อเสนอแนะ..... 25
เอกสารอ้างอิง..... 26

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 Sequences of the specific primers used for quantitative real-time PCR..... 10
3.1 การเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 2 เดือน (n=10; mean ± SD) ให้กินอาหารผสม rIGF-I นาน 4 สัปดาห์..... 21
3.2 การเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 2 เดือน (n=5; mean ± SD) ให้กินอาหารผสม rIGF-I นาน 4 สัปดาห์ และเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์..... 21
3.3 การแสดงออกของยีนของปลาการ์ตูนส้มขาวเริ่มต้นทดสอบอาหาร..... 21

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

3.1 ผลผลิต PCR ของยีน IGF-1ขนาดเท่ากับ 558 คู่เบส..... 12

3.2 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส IGF-I ของปลาการ์ตูนส้มขาวกับข้อมูล ของสิ่งมีชีวิตที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank..... 13

3.3 SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนของ rIGF-I ที่ผลิตจากเซลล์แบคทีเรีย..... 14

3.4 SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีน rIGF-I สกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ นาน 1 เดือน 14

3.5 SDS-PAGE ของ rIGF-I ภายหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ Protino® Ni-TED..... 15

3.6 ผลผลิต PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *IGF-I, VTG* และ *18s rRNA* ในปฏิกิริยา quantitative real-time PCR..... 16

3.7 Amplification plot..... 17

3.8 Melt curve analysis of *IGF-I*, *VTG* and 18S *rRNA* from SYBR® real-time PCR..... 17

3.9 อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Relative Growth Rate; RGR) ของ ปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 2 เดือน กินอาหารผสม rIGF-I นาน 4 สัปดาห์และ เลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์..... 18

3.10 การเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; SGR) ของปลาการ์ตูนส้มขาว อายุ 2 เดือนกินอาหารผสม rIGF-I นาน 4 สัปดาห์ และเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์. 18

3.11 ประสิทธิภาพอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate; FCR) ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 2 เดือน เมื่อกินอาหารผสม rIGF-I นาน 4 สัปดาห์ และที่เลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์..... 19

3.12 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency; FE) ของปลาการ์ตูนส้มขาว อายุ 2 เดือน กินอาหารผสม rIGF-I นาน 4 สัปดาห์ และที่เลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ 19

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

bp	= nucleotide base pair
BSA	= bovine serum albumin
bwt	= body weight
°C	= degree Celsius, Centigrade
cDNA	= complementary deoxyribonucleic acid
cm	= centimeter
Ct	= PCR cycle
DNA	= deoxyribonucleic acid
DNase	= deoxyribonuclease
dNTP	= deoxynucleoside triphosphate
E. coli	= *Escherichia coli*
EDTA	= ethylene diamine tetraacetic acid
g	= gram
HEPES	= N-(2-hydroxyethyl)peperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
IGF-I	= Insulin Like Growth Factor-I
IPTG	= Isopropyl-β-D-Thiogalactoside
kDa	= kiloDaldon
l	= liter
LB	= Luria Bertani media
ln	= natural logarithm, $\log_e$
mg	= milligram
µl	= microliter
ml	= milliliter
mM	= milimolar
mRNA	= messenger ribonucleic acid
MS-222	= ethyl 3-aminobenzoate
MWCO	= molecular weight cut off
OO	= ovarian tissue
PCR	= polymerase chain reaction
ppt	= parts per thousand
rIGF-I	= recombinant protein of Insulin Like Growth Factor-I
RGR	= relative growth rate
RNA	= ribonucleic acid
RNase	= ribonuclease
rRNA	= ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	= reverse transcription polymerase chain reaction

SDS-PAGE = sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SGR = specific growth rate
SUMO = small ubiquitin-related modifier
TAMRA = 6-carboxy-tetra-methyl-rhodomine
TB = Terrific broth
TBE = Tris borate EDTA buffer
TEMED = N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris = Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV = ultraviolet
VTG = Vitellogenin
X-gal = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร
(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วันของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) [Construction of the recombinant Insulin-like growth factor-I protein of the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*)]” รหัสโครงการ 103147 / สัญญาเลขที่ 35/2558 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,932,000 บาท (หนึ่งล้านเก้าแสนสามหมื่นสองพันบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 12 ปี 6 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2558-31 มีนาคม 2559) และขยายเวลาส่งรายงานวิจัย 3 เดือน (สิ้นสุด 30 มิถุนายน 2559)

บทคัดย่อ

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ของอินซูลินไลท์โกรทแฟคเตอร์วัน (Insulin-like growth factor-I; IGF-I) ซึ่งเป็นฮอร์โมนประเภทเปปไทด์ที่ส่วนใหญ่ผลิตออกมาจากตับเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโกรทฮอร์โมน โดยทำการโคลนยีน *IGF-I* จาก complementary DNA (cDNA) ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) ที่สามารถแปรรหัสได้เป็นโปรตีนสมบูรณ์โดยใช้ pETSUMO เป็นดีเอ็นเอพาหะ รีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I (rIGF-I) ที่ผลิตได้อยู่ในสภาพละลายง่ายและแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 เมื่อเจริญเซลล์ตั้งต้น 10 มิลลิลิตร เหนี่ยวนำด้วย isopropyl-β-D-thiogalactoside ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถผลิต rIGF-I ได้ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม เมื่อนำ rIGF-I ไปทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพโดยผสมกับอาหารในระดับ 1, 0.1 และ 0.01 µg/g bwt/day ให้ปลากินติดต่อกัน 4 สัปดาห์ วัดอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth rate; RGR) การเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency) และระดับการแสดงออกของยีน *insulin-like growth factor-I (IGF-I)* และ *vitellogenin (VTG)* ด้วยวิธี quantitative SYBR® real-time PCR ผลการทดสอบพบว่า rIGF-I มีแนวโน้มเพิ่มอัตราการเจริญเติบเติบโตของปลาการ์ตูนส้มขาว และ rIGF-I ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/g bwt/day มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและมีประสิทธิภาพการใช้อาหารมากที่สุด แต่ระดับการแสดงออกของยีน *IGF-I* และ *VTG* ต่ำสุด

ABSTRACT

Construction of the recombinant protein of Insulin-like growth factor-I (IGF-I), a polypeptide hormone mainly produced by the liver in response to the endocrine growth hormone stimulus, was conducted. In this study, the clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) IGF-I complementary DNA (cDNA) encoding the mature protein was cloned in a pETSUMO expression vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 cells as a soluble protein upon induction with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside. The yield of the recombinant IGF-I (rIGF-I) after key steps in the overall purification process is approximately 0.5 mg /10 ml bacterial cells. The biological activity of the purified rIGF-I was assessed by oral administration on the 2- month old fish. Three doses of rIGF-I (1, 0.1 and 0.01 μg/g body weight (bwt)/day) and 0 μg/g rIGF-I was used as a control, were administered for over 4 weeks and continuing without feeding with rIGH-I for another 4 weeks. Fish growth performance was measured by relative growth rate (RGR), specific growth rate (SGR), feed conversion rate (FCR) and feed efficiency (FE). Quantitative expression analysis by SYBR® real-time PCR of the *IGF-I* and *vitellogenin* (*VTG*) genes was also investigated. The results showed the rIGF-I tend to enhance the growth of the clown anemonefish. The 1 μg/g of rIGF-I provided the highest feed conversion rate and feed efficiency but showed the lowest expression of *IGF-I* and *VTG* genes.

สรุปผลสำเร็จของการวิจัย (Output/Outcome)

ปี พ.ศ.	รายละเอียดผลสำเร็จ	ประเภทผลสำเร็จ
2558	ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I ที่สามารถแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย (clude extracted protein)	I
2558	ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน IGF-I บริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการสำหรับทดลอง	G