การสืบค้นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพด้วยเทคนิค cDNA-AFLP ในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ที่สัมผัส 17β-estradiol

ณัฐกานต์ โพไพจิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2555
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ณัฐกานต์ โพไพจิตร ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. ประทีป วรรณิสสร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ดร.วันศุกร์ เสนานาญ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)
วันที่ 25 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม
พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี
ประจำปีการศึกษา 2552

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ประกาศคุณูปการ

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยงานต่าง ๆ โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาผู้จุดประกายให้ข้าพเจ้าสนใจงานทางด้านชีววิทยาโมเลกุล และเปิดโอกาสการศึกษาในระดับปริญญาโทแก่ข้าพเจ้า โดยให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ทั้งการเรียน การทำวิจัย การจัดทำรายงานนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ ตลอดจนการใช้ชีวิตประจำวัน ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. ประทีป วรรณิสสร ประธานคณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ จากภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ ดร.วันศุกร์ เสนานาญ คณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาร่วมพิจารณาและให้คำแนะนำในการแก้ไขรายงานให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี ที่มอบทุนการศึกษาและทุนวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ เจ้าของงานวิจัยที่ใช้อ้างอิงตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่

ขอขอบคุณ สมาชิกทุกคนของห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

คุณค่าและประโยชน์ทางวิชาการของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตเวทิตา แด่คณาจารย์ผู้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ณัฐกานต์ โพไพจิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

52910154: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: หอยเจดีย์/ 17β-estradiol/ *Cerithidea cingulata*/ 217_AFLP

ณัฐกานต์ โพไพจิตร: การสืบค้นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพด้วยเทคนิค cDNA-AFLP ในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ที่สัมผัส 17β-estradiol (cDNA-AFLP IDENTIFICATION OF A BIOMARKER IN HORN SNAIL (*Cerithidea cingulata*) EXPOSED TO 17β-ESTRADIOL). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph. D., ถนอมศักดิ์ บุญภักดี, D.Agr.Sc. 65 หน้า. ปี พ.ศ. 2555.

ทำการสืบค้นเครื่องหมายทางชีวภาพเพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำด้วยเทคนิค cDNA-AFLP กับหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ตัวเต็มวัยที่ได้รับสาร 17β-estradiol (E_2) โดยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 100 ng/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร E_2 สามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่ปรากฏในกลุ่มที่ได้รับสาร E_2 คือ "217_AFLP" เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank ณ เดือนมีนาคม 2555 พบว่ามีความเหมือนสูงสุด (46% Identities; 32/70) กับยีน transposase ของปู Marbled crab (*Pachygrapsus marmoratus*) (GenBank accession no. CAJ76996) และเมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อนและตัวเต็มวัยในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR ที่ใช้ยีนควบคุมภายใน 28S *rRNA* พบว่าเมื่อหอยเจดีย์วัยอ่อนได้รับสาร E_2 ที่ความเข้มข้น 10 ng/L เป็นเวลานาน 3 วัน E_2 มีผลชักนำการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.15±0.10 แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.98±0.01) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และเมื่อได้รับ E_2 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทดสอบคือ 1 ng/L เป็นเวลานาน 14 วัน พบว่ามีผลชักนำการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 2.19±0.16 แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.51±0.14) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อศึกษาในเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย พบว่าในหอยเจดีย์เพศเมียและเพศผู้ที่ได้รับสาร E_2 ที่ความเข้มข้น 10 ng/L เป็นเวลานาน 7 วัน E_2 มีผลชักนำการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.45±0.06 และ 1.27±0.18 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.45±0.01 และ 0.61±0.06 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP สามารถใช้ติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

52910154: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M. Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: HORN SNAIL, 17β -ESTRADIOL, *Cerithidea cingulata*, 217_AFLP

NUTTAKAN POPIJIT: cDNA-AFLP IDENTIFICATION OF A BIOMARKER IN HORN SNAIL (*Cerithidea cingulata*) EXPOSED TO 17β-ESTRADIOL. ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph. D., THANOMSAK BOONPHAKDEE, D.Agr.Sc. 65 P. 2012.

To search the putative biomarker of exposure for the detection of estrogenic-Endocrine Disrupting Chemicals (e-EDCs) contaminated in aquatic environments, cDNA-AFLP method in horn snail (*Cerithidea cingulata*) was undertaken in this study. DNA banding differences between the mature horn snails exposed to 100 ng/L 17β-estradiol (E_2) and the control group (no E_2) were screened. A cDNA-AFLP fragment designed "217_AFLP" appeared in the E_2-treated animals was then selected. The deduced amino acid sequences of 217_AFLP showed highly similarity (46% identities; 32/70) with *transposase* gene of Marbled crab (*Pachygrapsus marmorats*) (GenBank accession no: CAJ76996). Semi-quantitative RT-PCR of the 217_AFLP from both juvenile and mature horn snails using 28S *rRNA* as a comparative control was analyzed. The results showed that the 217_AFLP mRNA expression level of juvenile exposed to E_2 at 10 ng/L for 3 days was 1.15±0.10, significantly higher than that of the control group (0.98±0.01, $p<0.05$) and E_2 at 1 ng/L for 14 days was 2.19±0.16, significantly higher than that of the control group (1.51±0.14, $p<0.05$). The 217_AFLP mRNA expresstion levels from foot tissue of mature female and male exposed to E_2 at 10 ng/L for 7 days were 1.45±0.06 and 1.27±0.18, respectively, which were significantly higher than those of the control group (0.45±0.01 and 0.61±0.06, respectively, $p<0.05$). Therefore, 217_AFLP and horn snails both juvenile and mature can be used as a sensitive biomarker of exposure for detecting E_2 comtamination of the aquatic environments.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
อนุกรมวิธานและชีววิทยาของหอยเจดีย์	4
วงจรชีวิตของหอยเจดีย์	6
17β-estradiol	6
ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker)	8
เทคนิค cDNA-AFLP	11
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
วัสดุและอุปกรณ์	16
สารเคมี	16
ตัวอย่างหอยเจดีย์ที่ใช้ในการค้นหายีนบ่งชี้ทางชีวภาพ	17

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การสกัดอาร์เอ็น	18
	การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอโดยการถอดรหัสย้อนกลับ (Reverse Transcription)	19
	การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP	19
	การวิเคราะห์ AFLP	21
	การทำแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกให้บริสุทธิ์	22
	การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดเวกเตอร์และการทรานสฟอร์ม	22
	การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมและการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	23
	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	23
	การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ	23
	การยืนยันการใช้งานและการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางชีวภาพ	24
	ตัวอย่างหอยเจดีย์ที่ใช้ในการศึกษา	24
	การวัดระดับการแสดงออกของยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ	26
4	ผลการวิจัย	27
	การเตรียมอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างหอยเจดีย์	27
	การค้นหายีนด้วยเทคนิค cDNA-AFLP	28
	การศึกษาผลของสาร 17β-estradiol ต่อระดับการแสดงออกของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP ในหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย	34
	การศึกษาผลของสาร 17β-estradiol ต่อระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อน	43
5	อภิปรายและสรุปผล	46
	อภิปรายผลการวิจัย	46
	สรุปผลการวิจัย	49
	ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม		51

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่

ภาคผนวก..... 54

ภาคผนวก ก ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ทางสถิติ..... 55

ภาคผนวก ข สารเคมี และวิธีการเตรียม..... 62

ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 65

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4-1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค cDNA-AFLP.....	28
4-2	รายละเอียดของแถบดีเอ็นเอที่ที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี cDNA-AFLP.....	33
4-3	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อเท้าของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย.....	38
4-4	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อสมองของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย.....	42
4-5	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อน.....	45
ผก-4	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยต่อระดับการแสดงออกของ ของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อเท้าของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย.....	59
ผก-5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยต่อระดับการแสดงออกของ ของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อสมองของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย.....	60
ผก-6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยต่อระดับการแสดงออกของ ของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อน.....	61

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*).....	5
2-2	ลักษณะ ovipositor ในหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมีย.....	5
2-3	โครงสร้างทางเคมีของสาร 17β-estradiol.....	7
2-4	กลไกการสร้างฮอร์โมน 17β-estradiol ในกลุ่มปลากระดูกแข็ง.....	8
2-5	กลไกการทำงานของกระบวนการ transposition หรือ transposable elements.....	10
2-6	ขั้นตอนการสร้างสายซีดีเอ็นเอจากเอ็มอาร์เอ็นเอ.....	11
2-7	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)	13
3-1	การคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะจากเทคนิค cDNA-AFLP.....	21
4-1	แถบอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร 17β-estradiol.....	27
4-2	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ EcoACT/MseCTA..	29
4-3	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP โดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ.....	30
4-4	การเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม blastx ของแถบดีเอ็นเอ N_380 และแถบดีเอ็นเอ N_400.....	32
4-5	ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ 217L_transposase และ 217R_transposase.....	34
4-6	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อเท้าของหอยเจดีย์เพศเมีย.....	36
4-7	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อเท้าของหอยเจดีย์เพศผู้.....	37
4-8	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อสมองของหอยเจดีย์เพศเมีย.	40
4-9	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อสมองของหอยเจดีย์เพศผู้..	41
4-10	ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อน.....	44
ผก-1	ผลจากไพรเมอร์ EcoAAG/MseCTA	56
ผก-2	ผลจากไพรเมอร์ EcoACG/MseCTT.....	57
ผก-3	ผลจากไพรเมอร์ EcoACG/MseCTA.....	58
ผข	Physical Map ของ pGEM®-T Easy Vector.....	64

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University