บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของหอยเจดีย์

Cerithidea (Cerithideosilla) cingulata มีชื่อสามัญคือ หอยเจดีย์ (girdled horn shell) เปลือกมีลักษณะบิดเป็นเกลียวยาวคล้ายเจดีย์ มีฝาปิดปากเปลือก ถูกจัดลำดับอนุกรมวิธาน (Gmelin, 1971) ไว้ดังนี้

Phylum Mollusca

Class Gastropoda

Subclass Orthogastropoda

Superorder Caenogastropoda

Order Sorbeoconcha

Superfamily Cerithioidea

Family Potamididae

Genus *Certhidea*

Subgenus *Cerithideopsilla*

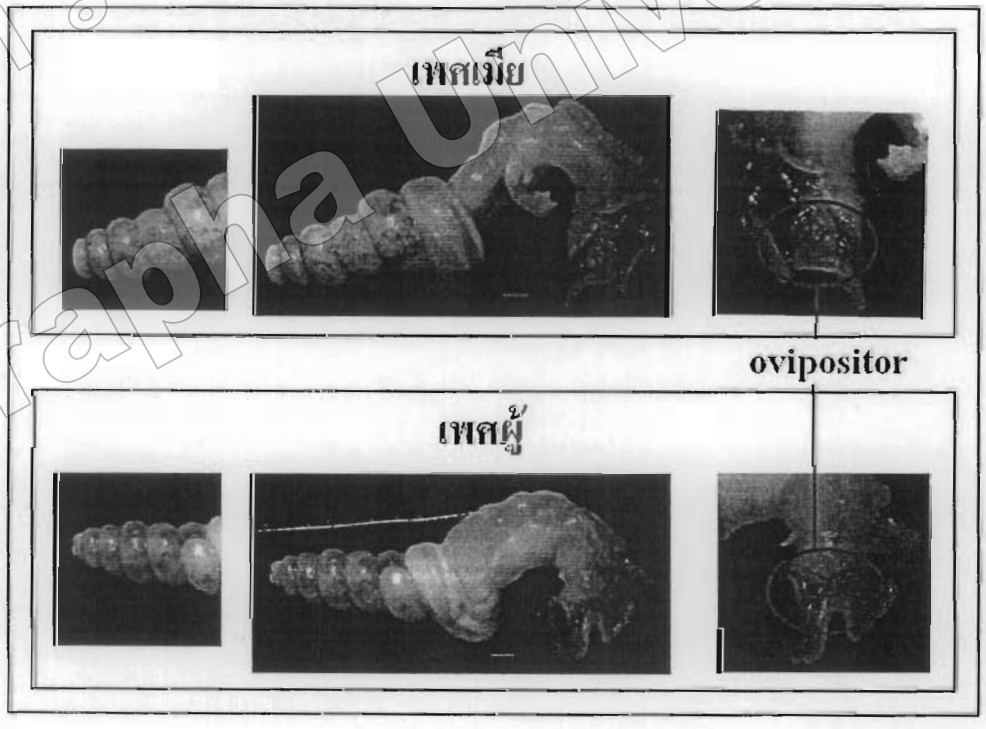
Species *C. (Cerithideopsilla) cingulata*

หอยเจดีย์จัดเป็นหอยฝาเดียวที่มีขนาดเล็ก มีการแพร่กระจายทั่วไปในเขตร้อน(tropical) จนถึงแนวใกล้เขตร้อน (subtropical) และมีถิ่นอาศัยในบริเวณน้ำขึ้นน้ำลง ปากแม่น้ำ ป่าชายเลน นอกจากนี้ยังฝังตัวอยู่ในดินเลนอีกด้วย เปลือกเป็นลักษณะทรงสูงหรือทรงเจดีย์ (turret shell) ผิวเปลือกเป็นแบบปุ่ม (nodule) เมื่อหอยเจดีย์โตเต็มที่แล้วปากเปิดเปลือก (aperture) จะบานออกในตัวเมีย มีวงเปลือกมากกว่า 5 วงขึ้นไป เมื่อเจริญเต็มที่แล้วมักพบปลายยอดแรกเกิด (protoconch) กร่อน เนื่องจากหอยชนิดนี้อาศัยในพื้นที่ที่มีสารอินทรีย์สูง ขนาดของเปลือกจะมีขนาดแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปริมาณของสารอินทรีย์ในแหล่งที่อาศัย ความสูงของเปลือกในเพศเมียโดยเฉลี่ยสูงกว่าในเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Richard, 1984) ตัวเมียจะพบอวัยวะวางไข่ (ovipositor) ทางด้านขวาตอนใต้ของวง ยื่นออกมาเป็นตุ่มสีเหลืองซึ่งจะเชื่อมต่อกับร่องของซีเรีย (ciliated groove) ทำหน้าที่เป็นทางเดินของกลุ่มไข่ (egg mass) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นยาวเรียว เนื่องจากหอยในกลุ่มนี้จะมีการปฏิสนธิภายนอก ปากของหอยเจดีย์จะมีลักษณะเป็นงวง แรดูลา (radula) จะอยู่ทางด้านหน้าของงวง (Kim & Lee, 2009) ลักษณะสัณฐานวิทยาแสดงดังภาพที่ 2-1 สำหรับในการแยกเพศของหอย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เจดีย์นั้นดูจาก ovipositor โดยในหอยเจดีย์เพศเมียจะมีตุ่มสีเหลืองอยู่ตรงบริเวณ ovipositor แต่ในหอยเจดีย์เพศผู้จะไม่มีตุ่มสีเหลืองดังกล่าวดังแสดงในภาพที่ 2-2

ภาพที่ 2-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*)



ภาพที่ 2-2 ลักษณะ ovipositor ในหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมีย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 วงจรชีวิตของหอยเจดีย์

วงจรชีวิตของหอยเจดีย์เริ่มจากพฤติกรรมการจับคู่ในฤดูวางไข่จะอยู่ในช่วงเดือนมกราคม - เมษายน เมื่อหอยมีการจับคู่ผสมพันธุ์แล้วจะเริ่มวางไข่ ฝักของไข่จะมีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเส้นไหมสีขาวมีเมือกยึดติดไข่แต่ละฟองให้ติดกัน หอยเพศเมียสามารถวางไข่ได้ครั้งละ 1 ฝักต่อวัน หอยมักวางไข่ในช่วงเวลาที่มีแสงน้อยเช่นในเวลากลางคืน หรือในน้ำที่มีการเจริญของแพลงก์ตอนมาก ขนาดของฝักไข่ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของตัวแม่และความสมบูรณ์ของแหล่งน้ำที่อาศัย (กฤษณา รัตนอาภา, 2540)

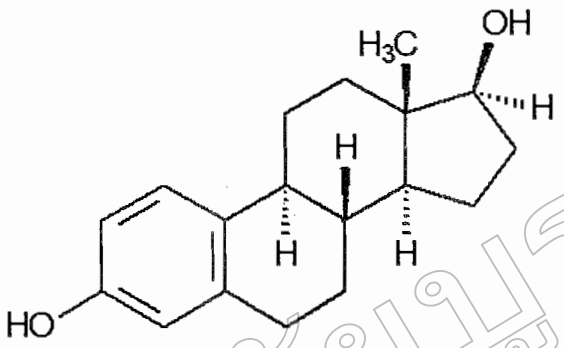
การพัฒนาของไข่หอยเจดีย์หลังจากแม่หอยวางไข่ พบว่าประมาณชั่วโมงที่ 2 ไข่ของหอยจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ cleavage จากนั้นจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastula ในชั่วโมงที่ 7 และเข้าสู่ระยะ gastrula ตัวอ่อนภายในเปลือกไข่มีการแบ่งเซลล์มากขึ้น ทำให้ระยะจากเปลือกไข่กับตัวอ่อนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด รวมถึงวุ้นที่หุ้มไข่มีความหนืดลดลงทำให้ไข่หลุดลอยไปตามกระแสน้ำได้ง่าย ไข่จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ trochophore ซึ่งยังอยู่ในเปลือกไข่ ตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายลูกข่าง เกิดขน (cilia) เป็นวงรอบตัวและมีกระจุกขนอยู่ปลายด้านบนและมีการเคลื่อนไหวของขน ประมาณชั่วโมงที่ 40 ตัวอ่อนของหอยเจดีย์จะเข้าสู่ระยะ veliger เริ่มมีเปลือกใสๆเกิดขึ้น รอยคอดของตัวชัดเจนขึ้น มีการแบ่งเซลล์ให้เห็น velum ชัดเจน เกิดลักษณะของเปลือกวัยอ่อน สามารถสังเกตเห็นอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ตับ และทางเดินอาหาร จากนั้นตัวอ่อนจะเริ่มใช้ velum เจาะเปลือกไข่ จนสามารถออกสู่ภายนอก ระยะเวลาการพัฒนาจากไข่จนเข้าสู่ระยะ veliger ใช้เวลาประมาณ 3 วัน ตัวอ่อนระยะ veliger จะพัฒนาเข้าสู่ระยะคืบคลาน ลูกหอยจะเริ่มลงสู่พื้นหรือหาวัสดุยึดเกาะ ใช้เวลาประมาณ 15 วัน velum จะหายไปเกิดเป็นแผ่นเนื้อแมนเทิล เริ่มคืบคลาน และกินอาหารประเภทแพลงก์ตอนเซลล์เดียว ลูกหอยจะเริ่มสร้างเปลือกที่แท้จริงและพัฒนาเท้าจนเหมือนกับระยะตัวเต็มวัย ระยะเวลาการพัฒนาจากระยะคืบคลานจนถึงเปลือกมี 5 เกลียวจะใช้เวลาประมาณ 1 เดือน ซึ่งเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย (กฤษณา รัตนอาภา, 2540)

2.3 17β-estradiol

17β-estradiol หรือ Estra-1,3,5(10)-triene-3,17β-diol (E_2) เป็นสารเอสโตรเจนในกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทางธรรมชาติมีความสำคัญต่อการพัฒนาการเจริญเติบโต และการสร้างระบบสืบพันธุ์ภายในเซลล์ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Curieux-Belfond, et al., 2005) โครงสร้างทางเคมีของ E_2 แสดงดังภาพที่ 2-3 ฮอร์โมนชนิดนี้พบว่ามีหน้าที่หลายประการและแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีหน้าที่เป็นสารสื่อกลางโดยมีตัวรับสัญญาณคือเอสโตรเจน รีเซปเตอร์ภายในเซลล์ (ERα และ ERβ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(Canesi et al., 2004) แต่ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังการสร้างของสเตียรอยด์และความสัมพันธ์กับระบบสืบพันธุ์นั้นยังไม่ชัดเจน



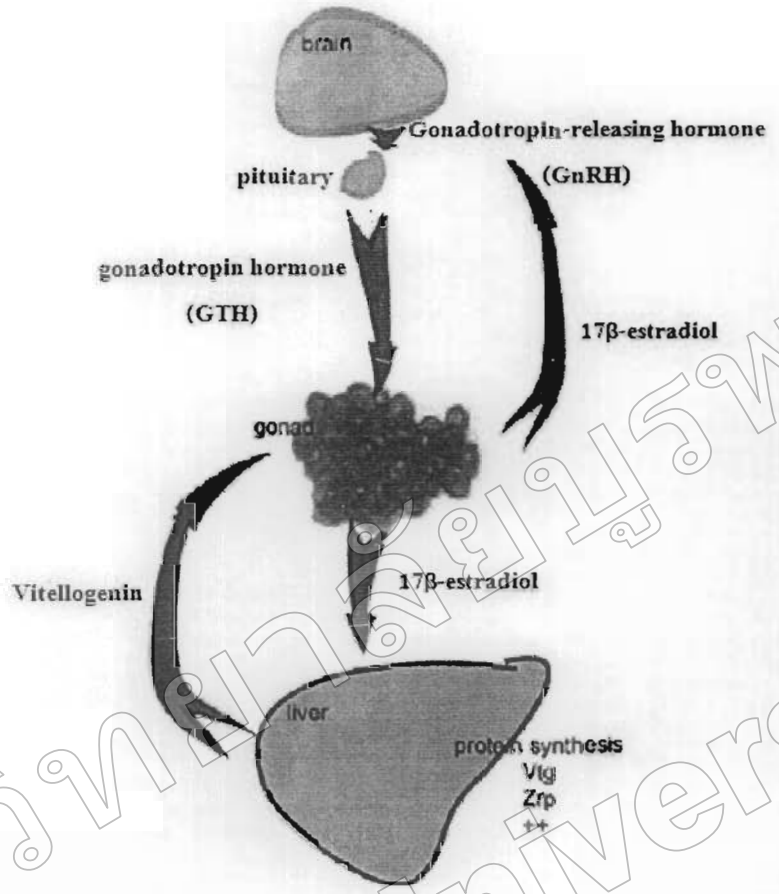
ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของสาร 17β-estradiol

(ที่มา: http://medchem.rutgers.edu/MedChemII/steroid_nomenclature_2.shtml)

2.3.1 กลไกการสร้างฮอร์โมน 17β-estradiol

สาร 17β-estradiol เกิดจากฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin หรือ GTH) ที่หลั่งออกมาจากต่อมใต้สมอง ทำหน้าที่เสมือนเป็นฮอร์โมนหลัก ที่หลั่งออกมากระตุ้นเซลล์ไข่ให้ผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen หรือ 17β-estradiol) ออกมาควบคุมการสร้างไข่แดง ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตโดยรังไข่จะถูกลำเลียงเข้าไปในกระแสเลือด และไปออกฤทธิ์ที่ตับ โดยจะกระตุ้นเซลล์ตับให้ผลิตและหลั่งโปรตีนไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) ออกมา ซึ่งต่อมาจะถูกลำเลียงมาสะสมภายในไข่ ในกรณีที่ร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้นมีปริมาณ 17β-estradiol มากเกินไป ฮอร์โมน GTH จะยับยั้งการสังเคราะห์ฮอร์โมน 17β-estradiol กลไกการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 2-4 (Arukwe & Goksoyr, 2003) เมื่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำได้สัมผัสกับสารเคมีกลุ่มรบกวนการทำงานระบบต่อมไร้ท่อกลุ่มนี้นั้น ส่งผลกระทบในกลุ่มปลา เช่น ลดจำนวนอสุจิ การพัฒนาและอัตราการให้ลูกลดลง เพิ่มการสร้างไวเทลโลจีนิน (Santos, Reis-Henriques, Guillot, Lima, Franco-Duarte, Mendes, Queiros, & Castro, 2008)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-4 กลไกการสร้างฮอร์โมน 17β-estradiol ในกลุ่มปลากระดูกแข็ง
(ที่มา: Arukwe & Goksoyr, 2003)

2.4 ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers)

Biomarker หมายถึง ดัชนีชี้วัดความเป็นพิษที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ภายในตัวของสิ่งมีชีวิต หรือสารผลิตภัณฑ์ซึ่งถูกผลิตขึ้นจากสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Oriti-Zarragoitia & Cajaraville, 2006) สามารถนำมาใช้ประเมินสถานการณ์การปนเปื้อนสารของมลพิษในสิ่งแวดล้อม การประเมินความเสี่ยงต่อความปลอดภัยของประชากรสิ่งมีชีวิตจากการรับสัมผัส และบริโภคสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งปนเปื้อน รวมทั้งสามารถประเมินผลกระทบความเสียหายทางด้านระบบนิเวศได้ ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพนั้นเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการศึกษาสุขภาวะของระบบนิเวศทั้งบริเวณปากแม่น้ำและระบบนิเวศทางทะเล ดังนั้นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหลายชนิดจึงนำมาใช้เพื่อใช้ประเมินการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนมลพิษ ตัวบ่งชี้ชีวภาพอาจสามารถวัดจากปริมาณของเหลวในร่างกาย เซลล์หรือเนื้อเยื่อ ซึ่งบ่งชี้ปริมาณของชีวเคมีในระดับเซลล์อาจแสดงให้เห็นสิ่งที่ปนเปื้อนหรือการตอบสนองทางชีวเคมีที่สำคัญของ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สิ่งมีชีวิตต่อสิ่งปนเปื้อนเหล่านั้น (Livingstone, Chipman, Lowe, Minier, Mitchelmore, & Moore, 2000)

2.4.1 ชนิดของดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ

ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพสามารถจำแนกได้ 3 ประเภท (Livingstone et al., 2000) คือ

2.4.1.1 ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพในการรับสัมผัส (Biomarker of exposure)

หรืออาจเรียก Direct biomarker คือ สามารถกระทำได้ทั้งการตรวจหาสารเคมีโดยตรงหรือการตรวจหาสารในรูปเมทาบอไลต์นั้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิต สามารถวัดปริมาณของสารนั้นได้ เช่น เลือด ปัสสาวะ หรือสารคัดหลั่งอื่น ๆ เป็นต้น

2.4.1.2 ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของผลกระทบต่อร่างกาย (Biomarker of effect)

หรืออาจเรียก Indirect biomarker คือการตอบสนองของร่างกายสิ่งมีชีวิตต่อการสัมผัสสารเคมี ซึ่งสามารถตรวจสอบจากความเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี สรีรวิทยา พฤติกรรม หรืออื่น ๆ ที่จะเกิดขึ้นแก่ร่างกายเมื่อได้รับพิษจากสารเคมีนั้น ๆ

2.4.1.3 ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของความไว (Biomarker of susceptibility)

คือการตอบสนองของร่างกายเมื่อเกิดการปนเปื้อนทางสิ่งแวดล้อมโดยศึกษาในระดับทางพันธุกรรมที่มีการตอบสนองเมื่อได้รับพิษของสารเคมี ทำให้คาดคะเนได้ว่าสิ่งมีชีวิตที่ตรวจเมื่อได้รับสารพิษชนิดที่ระบุแล้วจะมีโอกาสเกิดพิษได้มากหรือน้อย

สำหรับการศึกษาโดยใช้ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่ทำการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลนั้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วแม้จะมีปริมาณสารเคมีที่ปนเปื้อนอยู่น้อย ดังนั้นการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลจึงเป็นวิธีที่เร็วที่สุดในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่รายงานถึงตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ตรวจสอบสาร 17β-estradiol ที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางทะเลทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลากหลายชนิด เช่น การศึกษาผลของสาร 17β-estradiol ที่มีผลต่อการสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ในหอยสองฝาครอบครัว Mytilidae และ Unionidae (Canesi, Borghi, Fabbri, Ciacci, Lorusso , Gallo, & Vergani, 2007) และในหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) โดยศึกษาจากการสะสมกระบวนการเมแทบอลิซึมของสาร 17β-estradiol (Curieux-Belfond et al., 2005) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ใช้กุ้งหลายชนิดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เช่น ใน kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) พบว่าผลของสาร 17β-estradiol ทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน Vitellogenin (VTG) ของเซลล์โอโอไซต์ในรังไข่ของกุ้งวัยอ่อน เป็นต้น (Yano & Hoshino, 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.4.2 การใช้ยีน Transposase เป็นดังบ่งชี้ทางชีวภาพ

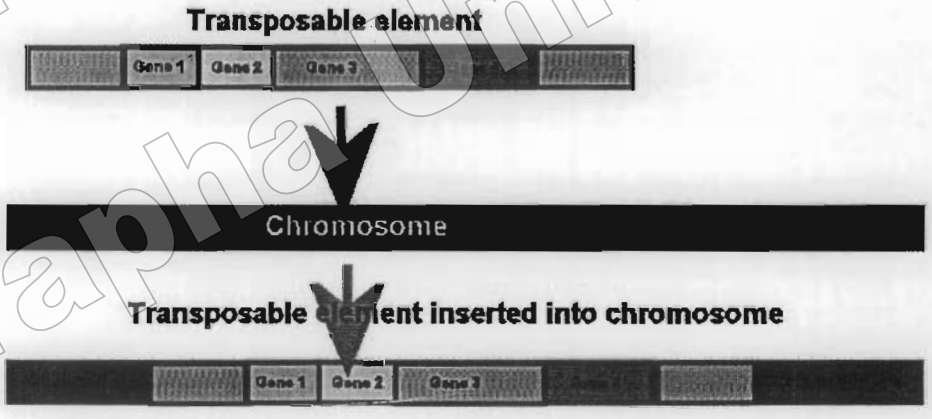
Transposase (Tnp) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการ transposition หรือ transposable elements เพิ่มจำนวน (replicate) แยกตัวเอง (excision) และเคลื่อนย้ายไปสอดแทรกอยู่ในตำแหน่งต่างๆในจีโนม (ภาพที่ 2-5) ซึ่งในกระบวนการนี้สามารถพบได้ทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต (Carpentier, Jaillet, Pflieger, Adet, Renault, & Auge-Gouillou, 2011) ใน transposable elements สามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภทคือ

2.4.2.1 Retrotransposons (Class I)

พบในพวกแบคทีเรีย และ พวก retroviruses ในกระบวนการนี้มี 2 ขั้นตอน คือขั้นแรกจะเกิดกระบวนการ transcription จากดีเอ็นเอเปลี่ยน ไปเป็นอาร์เอ็นเอ ขั้นที่สองคือ Reverse transcription เปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอไปเป็นดีเอ็นเออีกครั้ง จากนั้นดีเอ็นเอส่วนนี้จะเกิดการแทรกสอดเข้าไปในจีโนมในตำแหน่งใหม่ได้ (copy and paste) (Wicker, 2007)

2.4.2.2 DNA transposons (Class II)

พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตแต่ในกระบวนการนี้จะเป็นการตัดดีเอ็นเอจากนั้นนำไปแทรกที่ตำแหน่งใหม่ของจีโนม หรือที่เรียกว่า jumping gene



ภาพที่ 2-5 กลไกการทำงานของกระบวนการ transposition หรือ transposable elements (http://staff.jccc.net/pdecell/evolution/mutations/mutation.html#tranposons)

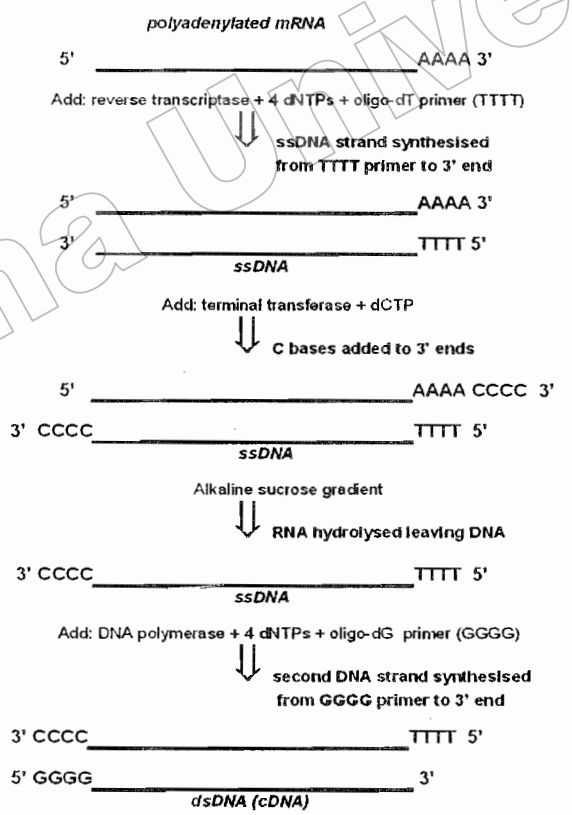
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.5 เทคนิค cDNA-AFLP

เทคนิค cDNA-AFLP เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง ใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.5.1 การสร้างสาย cDNA (complementary DNA)

ดีเอ็นเอที่ได้จากการลอกรหัสจากเอ็มอาร์เอ็นเอนี้เรียกว่า complementary DNA (cDNA) ซึ่งอาศัยเอนไซม์หลายชนิดดังแสดงในภาพที่ 2-6 การเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีนี้ได้มาจากเอ็มอาร์เอ็น-เอ (mRNA) ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนบางยีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาและในอวัยวะหนึ่ง โดยต้องศึกษาก่อนว่ายีนที่สนใจนั้นมีการแสดงออกในอวัยวะใด และในช่วงเวลาใด แล้วจึงทำการแยกสกัดเอ็มอาร์เอ็นเอออกมา ซึ่งในเซลล์ดังกล่าวนี้บางชนิดจะมีการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอสำหรับยีนตัวหนึ่งมากกว่ายีนอื่น ๆ ทำให้อัตราส่วนของเอ็มอาร์เอ็นเอชนิดนั้นมีอยู่ในอัตราสูง จึงเป็นข้อดีในกรณีที่ต้องการศึกษายีนสำหรับเอ็มอาร์เอ็นเอชนิดนั้น นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่ได้จากการถอดรหัสมาจากเอ็มอาร์เอ็นเอจะเป็นส่วนของยีนที่ไม่มีอินทรอน จึงมีขนาดเล็ก ง่ายต่อการศึกษาในขั้นต่อไป โดยเฉพาะทำการโคลนและศึกษาระดับการแสดงออก (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2548)



ภาพที่ 2-6 ขั้นตอนการสร้างสายซีดีเอ็นเอจากเอ็มอาร์เอ็นเอ

(ที่มา: http://users.wmin.ac.uk/~redwayk/lectures/images/cDNA.gif)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.5.2 เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP) (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, 2545)

เอเอฟแอลพี (Amplified fragment length polymorphism) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของเอเอฟแอลพีคือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) แสดงขั้นตอนในภาพที่ 2-7

<u>หลักการทำเอเอฟแอลพี</u>

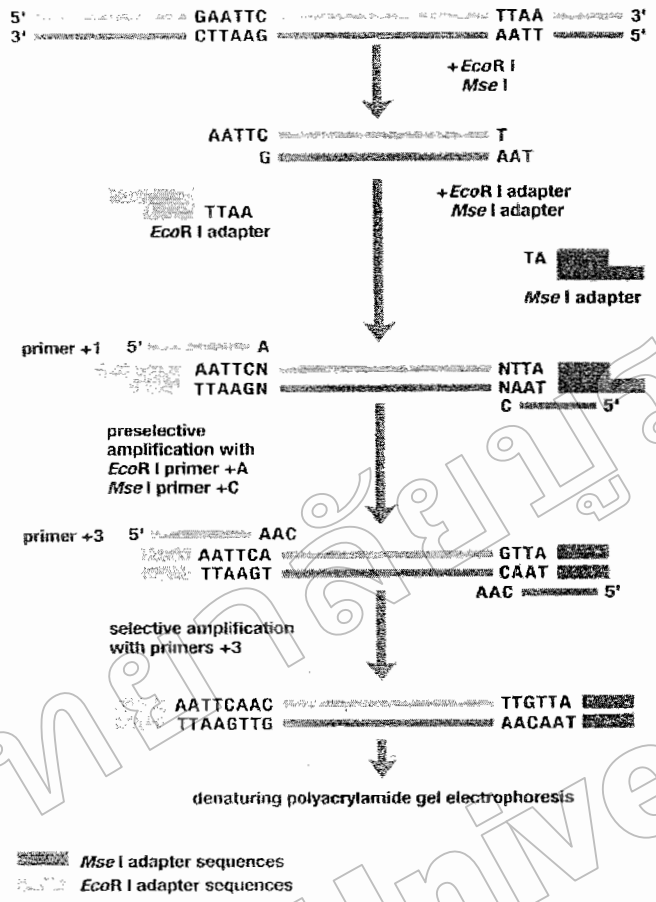
ขั้นแรก คือการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ที่ใช้ตัด เพื่อให้เป็นที่จับของเอนไซม์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นต่อไป ซึ่ง adapter ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้

ขั้นที่สอง คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีก การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification

การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ขั้น นอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นดำในลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย

ขั้นสุดท้าย คือการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50-100 แถบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-7 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)

(ที่มา: https://www.msu.edu/course/mmg/835/snapshot.afs/DNAmarkers/aflp.jpg.)

ข้อดีของเทคนิคเอเอฟแอลพี

1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ จึงทำได้อย่างกว้างขวาง

2. ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์จึงมีประสิทธิภาพสูง

3. ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน

4. ทำให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี

5. ใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกที่ส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ หรือใช้ดีเอ็นเอที่โคลนไว้ก็ได้

6. สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแบบไฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้โดยดูจากความเข้มข้นของแถบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะของเทคนิคเอเอฟแอลพี

1. ค่าใช้จ่ายในการทำเอเอฟแอลพีค่อนข้างสูง วัสดุหลายอย่างมีราคาแพง วิธีการที่ใช้ค่อนข้างซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอาร์เอพีดีหรือการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์

2. แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายแบบที่เป็น codominance

3. เนื่องจากการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้

4. เทคนิคเอเอฟแอลพีไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ คือมีลำดับเบสที่เหมือนกันต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้

5. สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมากก็ไม่เหมาะสมเช่นกันเพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย แม้ว่าในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากก็ตาม

2.6 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาผลกระทบต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำต่อสัตว์น้ำและมนุษย์นั้นกำลังเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากสารเอสโตรเจนนี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อในสิ่งมีชีวิต ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้นมีผู้ทำการศึกษามากมาย แต่ในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นมีรายงานของ Castro et al. (2007) ศึกษากลไกการทำงานของสารเอสโตรเจนในหอย *Nucella lapillus* ที่พบว่ามีการปนเปื้อนของสาร E_2 มาจากจากแหล่งชุมชนและแหล่งอุตสาหกรรมส่งผลต่อระดับการแสดงออกของ estrogen receptor ในหอยตัวเต็มวัย ปัจจุบันมีการศึกษาโดยจำลองสภาวะที่มีสารเอสโตรเจนปนเปื้อนหลายชนิดและพบว่าเป็นตัวชักนำให้เกิด imposex (ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเพศ) ซึ่งพบในหอยกลุ่ม neogastropod จำนวน 2 ชนิด Santos et al. (2008) จำลองสภาวะที่มีสารเอสโตรเจนปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ เพื่อศึกษากระบวนการเกิด imposex ในหอย dogwhelk (*Nucella lapillus*) และพบว่าสารในกลุ่มสเตียรอยด์ estradiol และ estrone นั้นมีผลต่อการพัฒนา imposex ไม่สมบูรณ์ แต่สาร tributyltin (TBT) นั้นมีผลต่อการพัฒนา imposex อย่างรุนแรง

สารในกลุ่มสเตียรอยด์และกลุ่มที่มีสารประกอบคล้ายสเตียรอยด์ เมื่อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้นจะเข้าไปรบกวนการทำงานของระบบต่าง ๆ ในหอยสองฝาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำดังกล่าวได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น ในหอยนางรม (*Saccostrea commercialis*) ที่อยู่ในแหล่งน้ำที่มีสาร

เอสโตรเจนปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้น 1.28 µg/L นั้นจะพบการหลั่งของฮอร์โมน β-sitosterol ที่บริเวณเหงือกของหอยนางรมและบ่งชี้ได้ว่ามีการปนเปื้อนของสารเอสโตรเจนจากน้ำเสียชุมชนในแหล่งน้ำ (Avery, Dunstan, & Nell, 1998) นอกจากนี้ Canesi et al. (2007) รายงานผลกระทบของสาร E_2 ที่มีต่อระบบย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) โดยวัดระดับการแสดงออกของยีนสังเคราะห์เอนไซม์ antioxidant enzyme catalase, metallothionein (MT20 และ MT10), p53-like protein และ lysosomal protease โดยเมื่อหอยได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 25 pmol ด้วยวิธีฉีด เมื่อครบ 24 ชั่วโมงทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค quantitative RT-PCR พบว่าระดับการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสาร E_2 สามารถชักนำให้สัตว์ในกลุ่มหอย มีการสร้าง vitellogenin-like proteins ซึ่งจะพบในหอยเพศเมียที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ดังที่ Matozzo and Marin (2008) ทำการชักนำให้หอย clam (*Tapes philippinarum*) ในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยสร้าง vitellogenin-like proteins เมื่อให้หอย clam เพศเมียได้รับสาร E_2 ที่ความเข้มข้น 50 ng เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีระดับการแสดงออกของ vitellogenin-like proteins เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับหอยเพศผู้ที่ได้รับสาร E_2 ความเข้มข้น 100 ng เป็นเวลา 14 วันที่พบว่ามีระดับการแสดงออกของ vitellogenin-like proteins มากขึ้น หรือจากกรณีที่ Li, Osada, Suzuki, and Mori (1998) ฉีดฮอร์โมน E_2 ความเข้มข้น 5 mg เข้าไปในบริเวณ gonads ของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) เพศเมีย พบว่าขนาดของโอโอไซต์เพิ่มขึ้นและระดับการแสดงออกของ vitellins (Vn) เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

นอกจากนี้สาร 17β-estradiol ที่ปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำและมนุษย์ที่อาศัยประโยชน์จากแหล่งน้ำดังกล่าว โดยเฉพาะมีผลต่อการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อที่สามารถทำให้จำนวนของสเปิร์มลดน้อยลง เพิ่มอัตราการเสี่ยงเป็นโรคมะเร็งและอวัยวะสืบพันธุ์เกิดความผิดปกติด้วย (Gagnaire, Gagne, Andre, Blaise, Abbaci, Budzinski, Devier, & Garric, 2009) เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University