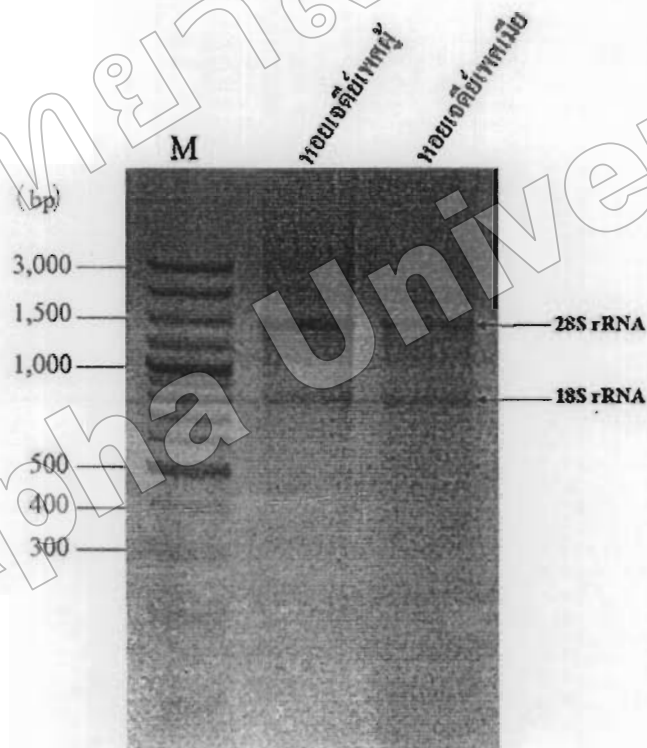


บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างหอยเจดีย์

เมื่อทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากปมประสาทส่วนเท้าและสมองของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมีย โดยใช้ Trizol reagent แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (ช่อง M) พบว่าสามารถเตรียมอาร์เอ็นเอได้พิจารณาจากแถบอาร์เอ็นเอจำนวน 2 แถบ โดยที่ความเข้มของยีน 28S *rRNA* มากกว่าเป็น 2 เท่าของแถบอาร์เอ็นเอ 18S *rRNA* ดังแสดงในรูปที่ 4-1 (แสดงเฉพาะอาร์เอ็นเอที่สกัดมาจากส่วนเท้า)



ภาพที่ 4-1 แถบอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร 17 β -estradiol 100 ng/L เป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธีการแช่หลังจากตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus)

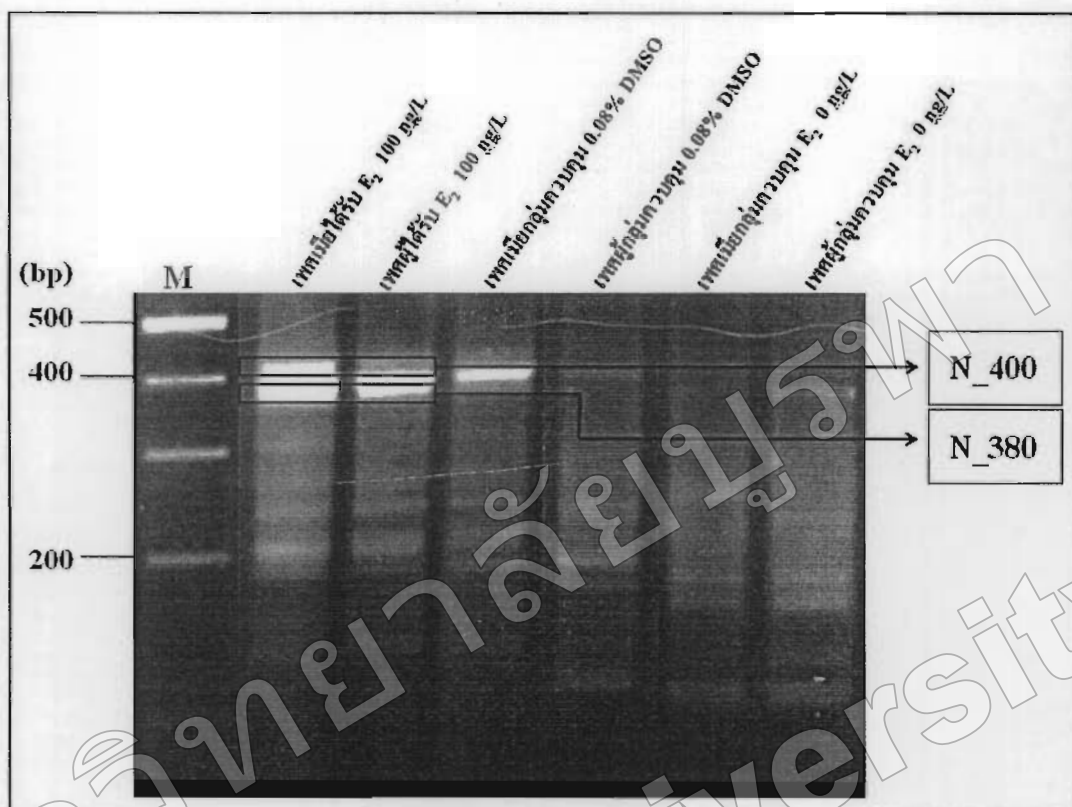
4.2 การค้นหายีนด้วยเทคนิค cDNA-AFLP

4.2.1 การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอ

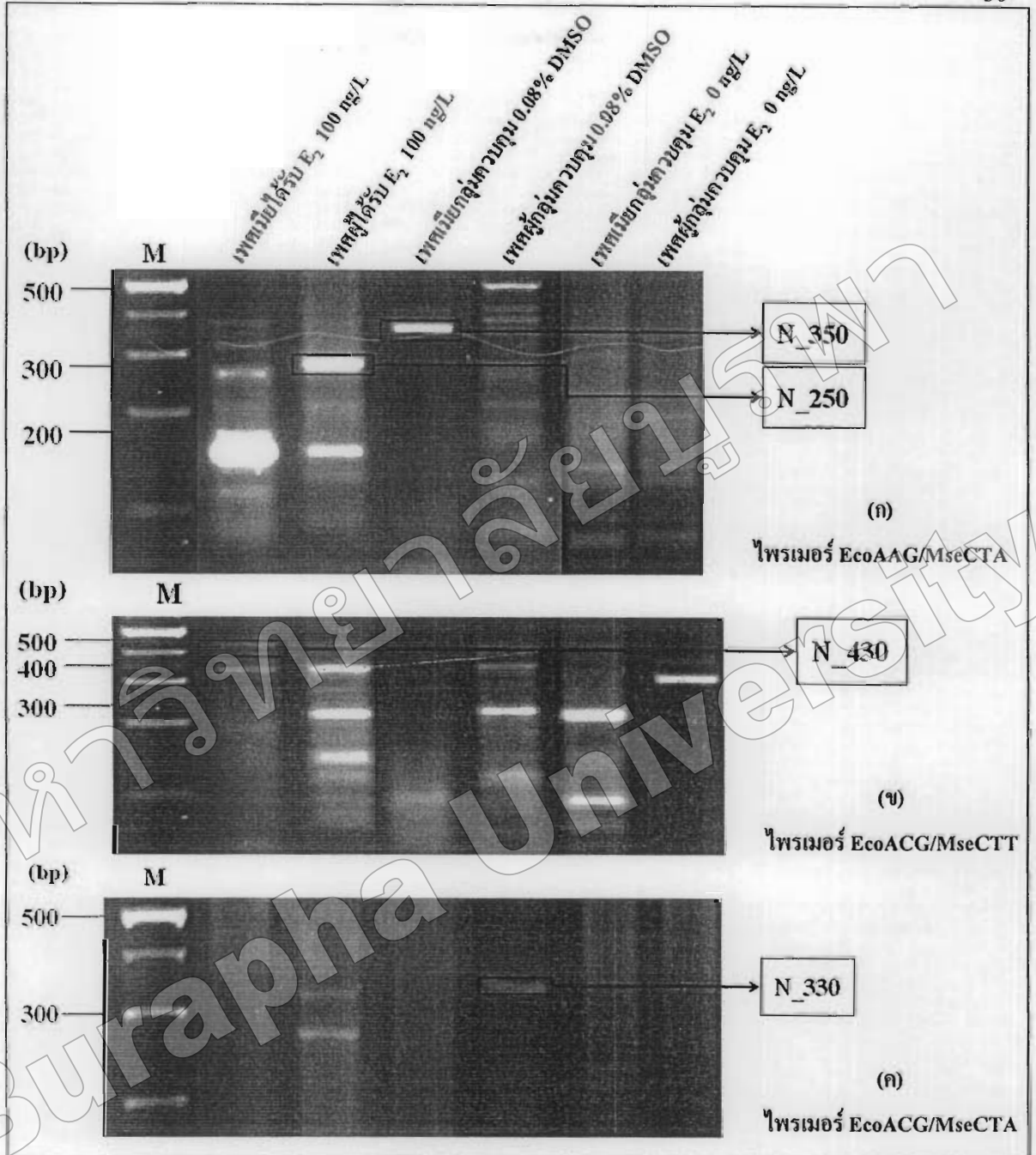
เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่สกัดทั้งจากกลุ่มหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2 และกลุ่มควบคุม (E_2 0 ng/L และ ใน 0.08% DMSO) ทั้งเพศผู้และเพศเมียมาถอดรหัสแบบย้อนกลับสร้างเป็นซีดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *MseI* แล้วเชื่อมต่อกับ adapter จากนั้นเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adapter จำนวน 4 คู่ (ตารางที่ 4-1) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่มาจากหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร E_2 และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร E_2 สามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือคู่ไพรเมอร์ EcoACT/MseCTA ได้แถบ N_380 และ N_400 ที่มีขนาดเท่ากับ 380 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4-2) และคู่ไพรเมอร์ EcoAAG/MseCTA ได้แถบ N_250 และ N_350 ที่มีขนาดเท่ากับ 250 และ 350 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4-3 (ก)) ส่วนไพรเมอร์ EcoACG/MseCTA และ EcoACG/MseCTT ได้แถบดีเอ็นเออย่างละ 1 แถบ คือ N_330 และ N_430 ที่มีขนาดเท่ากับ 330 และ 430 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4-3 (ข) และ (ค) ตามลำดับ)

ตารางที่ 4-1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค cDNA-AFLP

ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')
EcoACT/MseCTA	EcoACT	GACTGCGTACCAATTCACT
	MseCTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
EcoAAG/MseCTA	EcoAAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
	MseCTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
EcoACG/MseCTA	EcoACG	GACTGCGTACCAATTCACG
	MseCTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
EcoACG/MseCTT	EcoACG	GACTGCGTACCAATTCACG
	MseCTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT



ภาพที่ 4-2 แอปลิเอนเอที่ได้จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2 100 ng/L เพศเมียและเพศผู้โดยใช้ไพรเมอร์ EcoACT/MseCTA ตรวจสอบด้วย 1% อะกาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus)



ภาพที่ 4-3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2 100 ng/L เพศเมียและเพศผู้ โดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่าง ๆ ตรวจสอบด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus)

- (ก) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP โดยคู่ไพรเมอร์ EcoAAG/MseCTA
 (ข) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP โดยคู่ไพรเมอร์ EcoACG/MseCTT
 (ค) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP โดยคู่ไพรเมอร์ EcoACG/MseCT

4.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากตัดแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โคลน อ่านลำดับ นิวคลีโอไทด์ พบว่าแถบดีเอ็นเอ N_400 และ N_380 (ภาพที่ 4.2) ที่ได้มาจากการใช้ไพรเมอร์ EcoACT/MseCTA มีขนาดเท่ากับ 365 และ 265 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน กับฐานข้อมูล GenBank ณ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555 ด้วยโปรแกรม Blastx พบว่ามีความ เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของยีน transposase ของปู Marbled crab (*Pachygrapsus marmoratus*) accession no: CAJ76996 (% Identities เท่ากับ 46 (32/70) และ 44 (45/102) ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 4-4 ส่วนแถบดีเอ็นเอ N_330, N_350 และ N_430 (ภาพที่ 4-3) มี ขนาดเท่ากับ 330, 350 และ 430 คู่เบส ตามลำดับ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ AFLP marker mRNA sequence ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) accession no: DQ132955 (100% Identities; 35/35) (ภาพที่ ผก-3ข), AFLP marker mRNA sequence กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) accession no: DQ132955 (100% Identities; 36/36) (ภาพที่ ผก-1ค) และ humen clone RP11-709L9 from 4 ของมนุษย์ accession no: AC023150 (96% Identities; 121/121) (ภาพที่ ผก-2ข) ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) และแถบดีเอ็นเอ N_250 เมื่อเปลี่ยน ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนแล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ putative glycosyl transferase ของ *Achromobacter xylosoxidans* accession no: EGP46290 (28% Identities; 18/64) (ภาพที่ ผก-1ข)

ในการทดลองนี้เลือกเฉพาะแถบดีเอ็นเอ N_400 เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ได้คือ 217L_transposase และ 217R_transposase ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์คาดว่าจะมีขนาดเท่ากับ 217 คู่เบส จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอของตัวอย่างหอยเจดีย์เพชรผู้ที่ได้รับสาร E₂ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 2X mastermix จำนวน 10 ไมโครลิตร, ซีดีเอ็นเอ จำนวน 1.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ โดยมีขั้นตอน denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 60°C นาน 40 วินาที, extension ที่ 72°C นาน 30 วินาที และ final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วย 1% อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าผลผลิต PCR มีขนาด เท่ากับ 217 คู่เบส ดังที่คาดการณ์ไว้ (ภาพที่ 4-5) ในการทดลองนี้ให้ชื่อเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ คัดเลือกได้ว่า “217_AFLP”

```

Score = 75.1 bits (183), Expect = 2e-14
Identities = 32/70 (46%) Positives = 46/70 (66%), Gaps = 0/70 (0%)
Frame = 2

N_400 264 VIKAVQEQHPTTGTRNSMILHDNAAAHKSRATTQFLADEKLPVLLHTPYSPDLSPCDYWL 85
      V++ + PT ++ HDNA+ HK+R T QFL + + +L H PYSPDL+PCD+WL
CAJ76996 234 VLEHQAKSAPTRRRSRLLHHDNASPHKARLTVQFLEQQGITLLPHPPYSPDLAPCDFWL 293

N_400 84 FPLIKARLAG 55
      FP +K +AG
CAJ76996 294 FPKIKGAIAG 303

```

(ก)

```

>emb|CAJ76996.1| transposase [Pachygrapsus marmoratus]
Length=353

Score = 107 bits (268), Expect = 1e-25
Identities = 45/102 (44%) Positives = 69/102 (68%), Gaps = 0/102 (0%)
Frame = 3

N_380 360 VISNYAGFLVVDILPEKRTMTSAHYTNTVLPNVIKAVQEQHPTTGTRNSMILHDNAAAHK 181
      + W GP+ VD++P++ T+T+ +YT+ VLP V++ + PT ++ HDNA+ HK
CAJ76996 202 IFENSQGPMPVDVMPQQSTITAQYYTDQVLPQVLEHQAKSAPTRRRSRLLHHDNASPHK 261

N_380 180 SRATTQFLADEKLPVLLHTPYSPDLSPCDYWLFPPLIKARLAG 55
      +R T QFL + + +L H PYSPDL+PCD+WLEP +K +AG
CAJ76996 262 ARITVQFLEQQGITLLPHPPYSPDLAPCDFWLEPKIKGAIAG 303

```

(ข)

ภาพที่ 4-4 การเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม blastx ของแถบดีเอ็นเอ N_400 (ก)

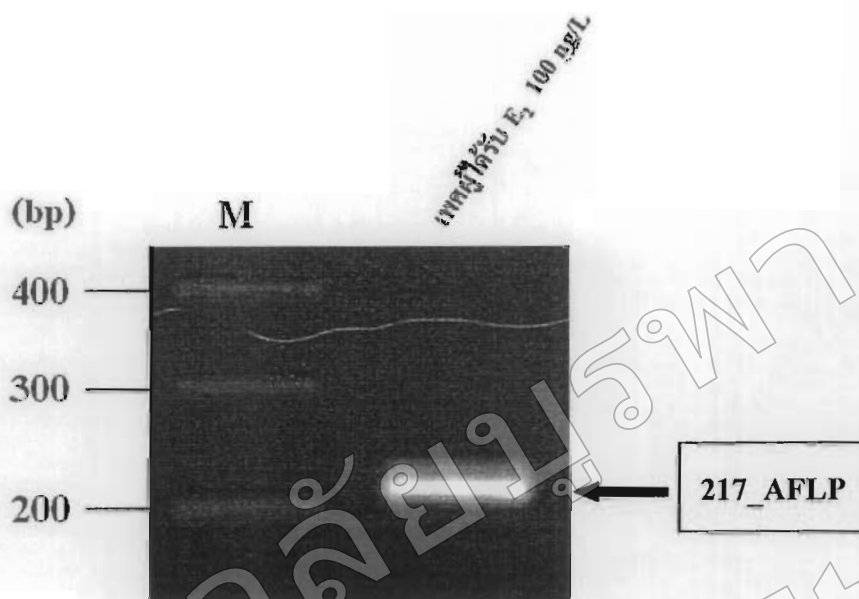
และแถบดีเอ็นเอ N_380 (ข) กับลำดับกรดอะมิโนของยีน transposase ของปู Marbled

crab (*Pachygrapsus marmoratus*) GenBank accession no: CAJ76996

หมายเหตุ วงรีแสดงจำนวนลำดับกรดอะมิโนที่เทียบเคียงได้และ % ความเหมือน (Identity)

ตารางที่ 4-2 รายละเอียดของแถบดีเอ็นเอที่คัดลอกได้ด้วยวิธี cDNA-AFLP

ไพรเมอร์	รหัสแถบ ดีเอ็นเอ	ขนาด แถบดีเอ็นเอ (bp)	การเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank	
			รายชื่อ	% Identities (จำนวนเบสที่เทียบเคียง)
EcoACT/MseCTA	N_380	265	CAJ76996	transposase [<i>Pachygrapsus marmoratus</i>] 44 (45/102)
	N_400	365	CAJ76996	transposase [<i>Pachygrapsus marmoratus</i>] 46 (32/70)
EcoACG/MseCTA	N_330	330	DQ132955	Penaeus monodon clone 078 AFLP marker mRNA sequence 100 (35/35)
EcoACG/MseCTT	N_430	134	AC023150	Homo sapiens BAC clone RP11-709L9 from 4, complete sequence 100 (121/121)
EcoAAG/MseCTA	N_250	265	EGP46290	putative glycosyl transferase [<i>Achromobacter xylosoxidans</i> AXX-A] 28 (18/64)
	N_350	629	DQ132955	Penaeus monodon clone 078 AFLP marker mRNA sequence 100 (36/36)



ภาพที่ 4-5 ผลผลิตพีซีอาร์ของหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับสาร E_2 100 ng/L จากไพรมอร์
217L_transposase และ 217R_transposase (M คือ คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA
ladder plus)

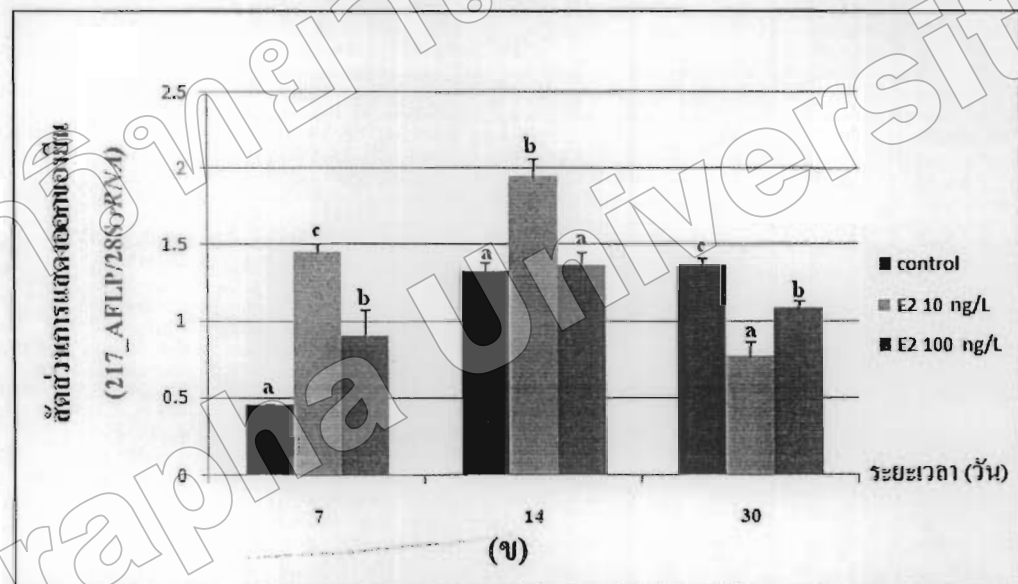
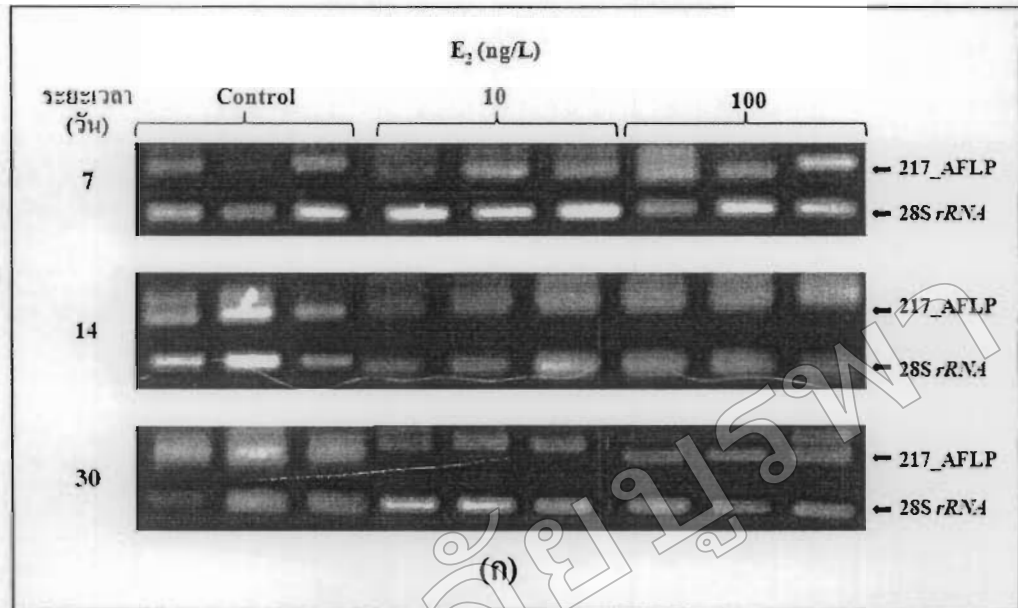
4.3 การศึกษาผลของสาร 17 β -estradiol ต่อระดับการแสดงออกของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP ในหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย

a) เนื้อเยื่อเท้า

เมื่อทำการทดสอบให้หอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียได้รับสาร E_2 แตกต่างกัน 4 กลุ่ม ความเข้มข้นคือ 0.08% DMSO ในน้ำทะเล (control), 0 (control), 10 และ 100 ng/L E_2 ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 7, 14 และ 30 วัน ทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เทียบเคียงกับยีน 28S *rRNA* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าในกลุ่มควบคุมทั้ง 2 กลุ่ม (0.08% DMSO ในน้ำทะเล และ 0 ng/L ในน้ำทะเล) ในเพศเมียและเพศผู้ นั้นระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นในการวัดระดับการแสดงออกของ 217_AFLP จึงทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำทะเลที่มี 0.08% DMSO เพียงอย่างเดียว โดยพบว่าในหอยเพศเมียที่ได้รับสาร E_2 เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า E_2 มีผลชักนำในระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L (1.45 ± 0.06 และ 0.9 ± 0.18 ตามลำดับ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.45 ± 0.01) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และที่ระยะเวลานาน 14 วัน พบว่า E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L ชักนำระดับการแสดงออกของ

217_AFLP เท่ากับ 1.94 ± 0.12 แตกต่างจากกลุ่มควบคุม 1.32 ± 0.06 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/L พบว่า E_2 ชักนำให้หอยเจดีย์เพศเมียมีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.36 ± 0.09 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) และที่ระยะเวลานาน 30 วัน พบว่า E_2 ยับยั้งระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L การแสดงออกมีค่าเท่ากับ 0.77 ± 0.10 และ 1.08 ± 0.05 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.36 ± 0.05) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4-6 และตารางที่ 4-3)

ผลการทดสอบในเพศผู้พบว่าหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L เป็นระยะเวลานาน 7 วัน มีผลทำให้การแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.27 ± 0.18 และ 1.75 ± 0.16 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.61 ± 0.06) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อได้รับ E_2 เป็นระยะเวลานาน 14 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L พบว่า E_2 ยับยั้งการแสดงออกของ 217_AFLP มีค่าเท่ากับ 1.30 ± 0.14 และ 1.11 ± 0.11 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (2.61 ± 0.34) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และที่ระยะเวลานาน 30 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L และ 100 ng/L E_2 ยับยั้งการแสดงออกของ 217_AFLP (0.68 ± 0.03 และ 0.81 ± 0.02 ตามลำดับ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.12 ± 0.01) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4-7 และตารางที่ 4-3)

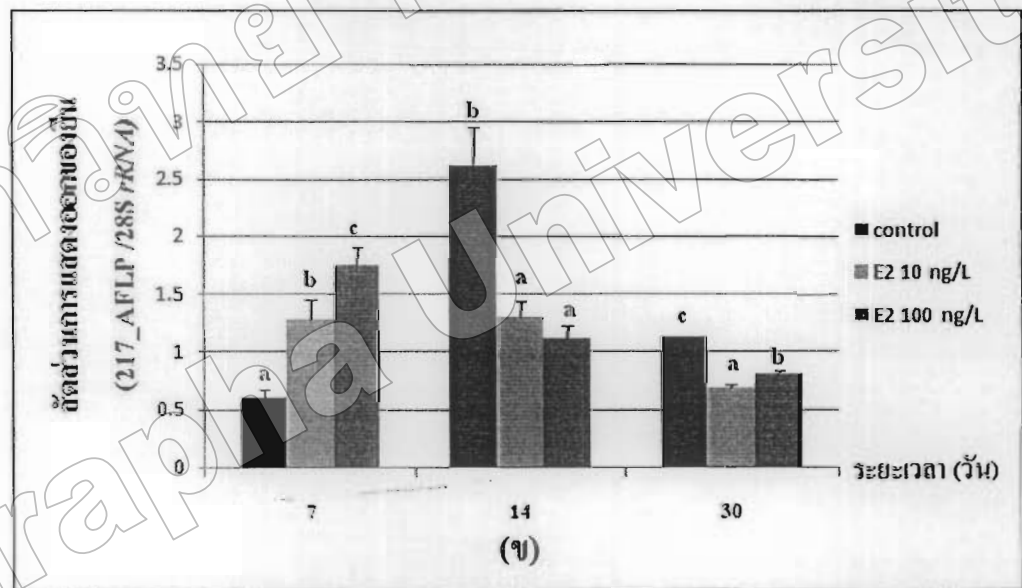
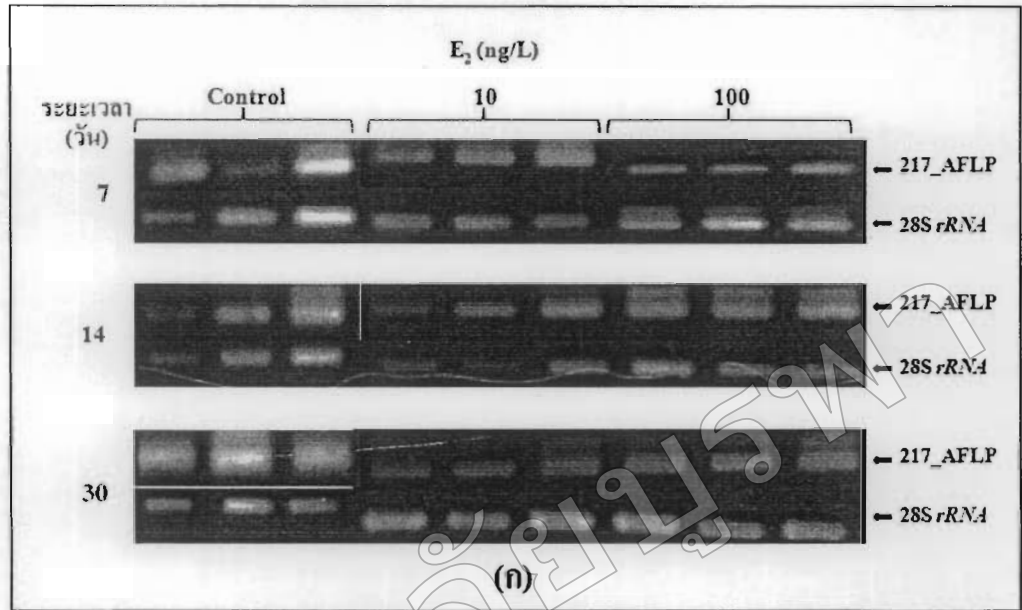


ภาพที่ 4-6 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์เทศเมียที่ได้รับสาร E₂ แตกต่างกัน 3 ระดับความเข้มข้นคือ control (0.08% DMSO), 10 และ 100 ng/L ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลานาน 7, 14 และ 30 วัน

(ก) ตัดส่วนการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ยีน 28S rRNA

(ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ระยะเวลาที่หอยเจดีย์ได้รับสาร E₂ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-7 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับสาร E₂ แตกต่างกัน 3 ระดับความเข้มข้นคือ control (0.08% DMSO), 10 และ 100 ng/L ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลานาน 7, 14 และ 30 วัน

(ก) สัดส่วนการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ยีน 28S rRNA

(ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ระยะเวลาที่หอยเจดีย์ได้รับสาร E₂ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่ระยะเวลาดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4-3 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อเท้าของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยที่
ได้รับสาร E₂ ระดับความเข้มข้น control (0.08% DMSO), 10 และ 100 ng/L เป็น
ระยะเวลานาน 7, 14 และ 30 วัน

หอยเจดีย์ ตัวเต็มวัย	ระยะเวลารับสาร E ₂ (วัน)	ระดับความเข้มข้นของ E ₂ (ng/L)		
		control	10	100
เพศเมีย	7	0.45±0.01 ^a	1.45±0.06 ^c	0.9±0.18 ^b
	14	1.32±0.06 ^a	1.94±0.12 ^b	1.36±0.09 ^a
	30	1.36±0.05 ^c	0.77±0.10 ^a	1.08±0.05 ^b
เพศผู้	7	0.61±0.06 ^a	1.27±0.18 ^b	1.75±0.16 ^c
	14	2.61±0.34 ^b	1.30±0.14 ^a	1.11±0.11 ^a
	30	1.12±0.01 ^c	0.68±0.03 ^a	0.81±0.02 ^b

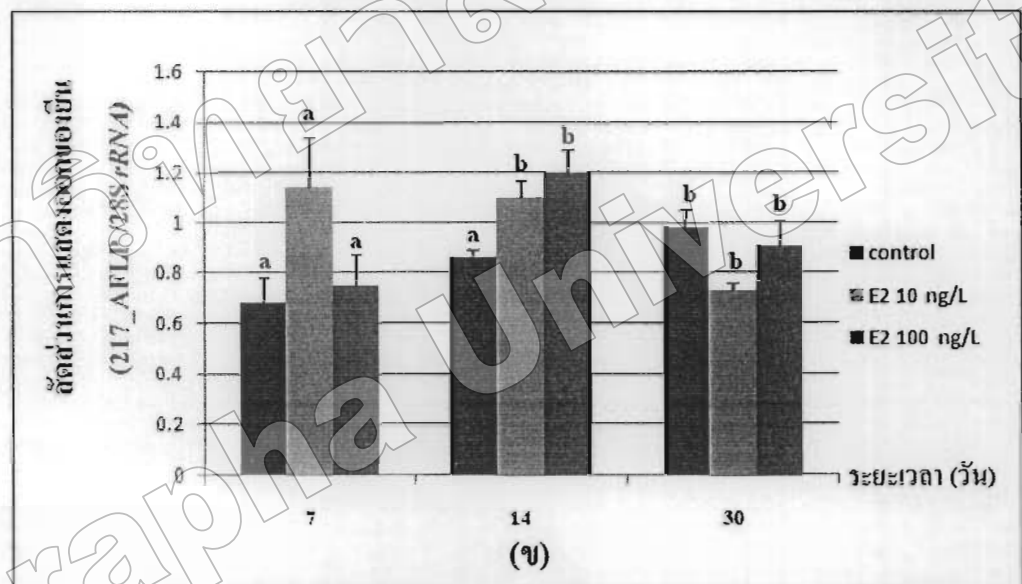
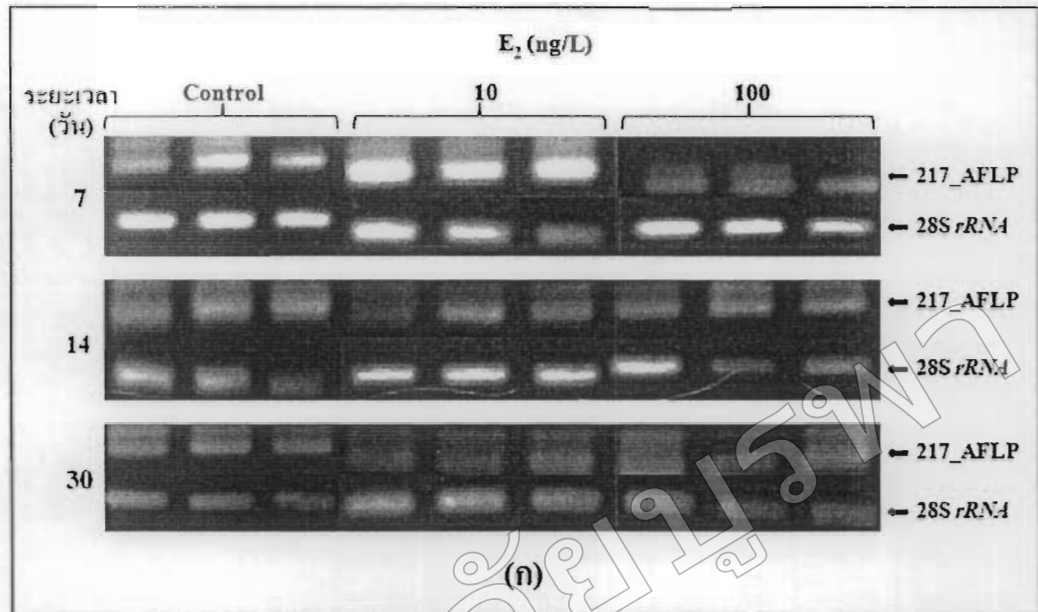
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ (p<0.05)

4.3 การศึกษาผลของสาร 17 β -estradiol ต่อระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ใน หอยเจดีย์ตัวเต็มวัย

b) เนื้อเยื่อสมอง

หอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียเมื่อได้รับสาร E₂ เช่นเดียวกับที่มีการทดสอบในส่วนเท้า พบว่าในเพศเมียที่ได้รับสาร E₂ เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L (1.14 $\pm$ 0.20 และ 0.75 $\pm$ 0.12 ตามลำดับ) 217_AFLP มีระดับการแสดงออกไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (0.68 $\pm$ 0.10) ($p>0.05$) แต่เมื่อได้รับ E₂ ติดต่อกันนาน 14 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L พบว่า E₂ ชักนำระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.10 $\pm$ 0.07 และ 1.20 $\pm$ 0.09 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.86 $\pm$ 0.03) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และ E₂ ที่ระยะเวลา 30 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L (0.73 $\pm$ 0.03 และ 0.91 $\pm$ 0.10 ตามลำดับ) มีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (0.98 $\pm$ 0.07) ($p>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4-8

สำหรับการทดสอบในเพศผู้เมื่อได้รับสาร E₂ ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/L เป็นระยะเวลานาน 7 วัน มีผลชักนำการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.29 $\pm$ 0.03 แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.61 $\pm$ 0.08) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L (0.93 $\pm$ 0.03) มีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) และเมื่อหอยเจดีย์เพศผู้ได้รับสาร E₂ ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L เป็นระยะเวลานาน 14 วัน พบว่าชักนำระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.86 $\pm$ 0.04 และ 1.84 $\pm$ 0.06 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.22 $\pm$ 0.03) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และที่ระยะเวลา 30 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L (0.86 $\pm$ 0.12 และ 1.31 $\pm$ 0.07) ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (1.14 $\pm$ 0.04) ($p>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4-9

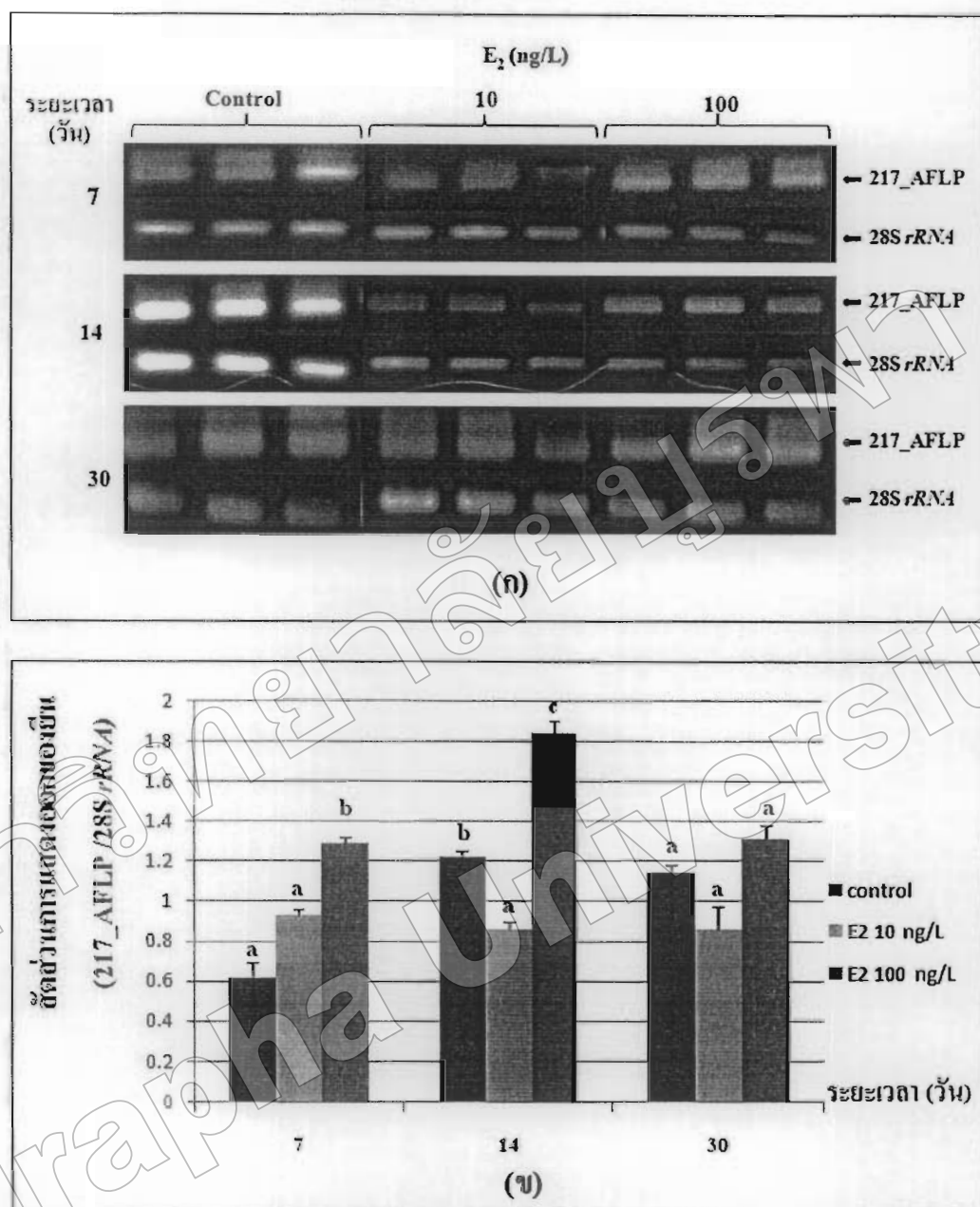


ภาพที่ 4-8 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อสมองของหอยเจดีย์เพศเมียที่ได้รับสาร E₂ แตกต่างกัน 3 ระดับความเข้มข้นคือ control (0.08% DMSO), 10 และ 100 ng/L ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลานาน 7, 14 และ 30 วัน

(ก) สัดส่วนการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ยีน 28S rRNA

(ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ระยะเวลาที่หอยเจดีย์ได้รับสาร E₂ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-9 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อสมองของหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับสาร E₂ แตกต่างกัน 3 ระดับความเข้มข้นคือ control (0.08% DMSO), 10 และ 100 ng/L ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลานาน 7, 14 และ 30 วัน

(ก) สัดส่วนการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ยีน 28S rRNA

(ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ระยะเวลาที่หอยเจดีย์ได้รับสาร E₂ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่ระยะเวลาดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4-4 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเนื้อเยื่อสมองของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย
ที่ได้รับสาร E₂ ระดับความเข้มข้น control (0.08% DMSO), 10 และ 100 ng/L เป็น
ระยะเวลานาน 7, 14 และ 30 วัน

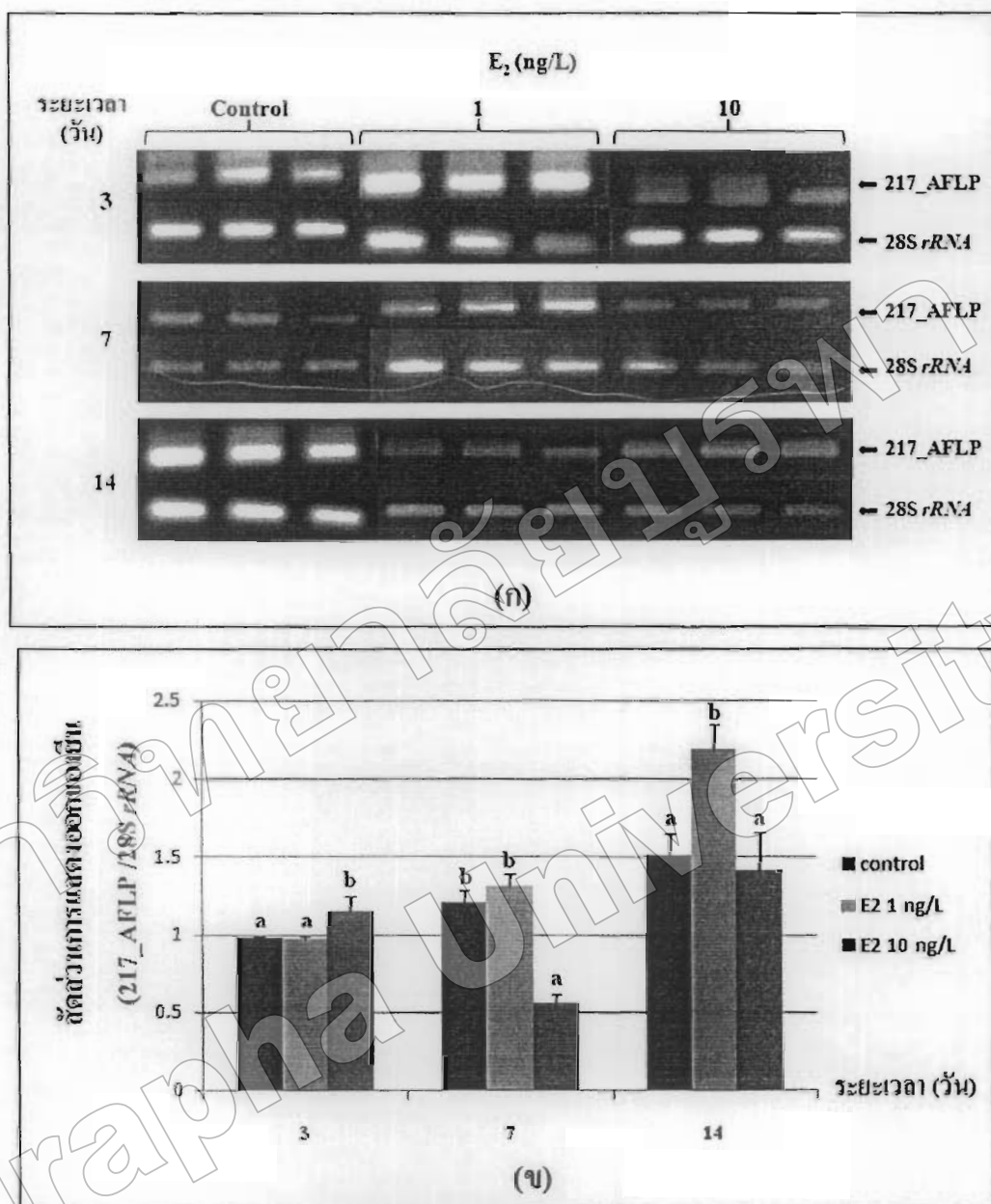
หอยเจดีย์ ตัวเต็มวัย	ระยะเวลารับสาร E ₂ (วัน)	ระดับความเข้มข้นของ E ₂ (ng/L)		
		control	10	100
เพศเมีย	7	0.68±0.10 ^a	1.14±0.20 ^a	0.75±0.12 ^a
	14	0.86±0.03 ^a	1.10±0.07 ^b	1.20±0.09 ^b
	30	0.98±0.07 ^a	0.73±0.03 ^a	0.91±0.10 ^a
เพศผู้	7	0.61±0.08 ^a	0.93±0.03 ^a	1.29±0.03 ^b
	14	1.22±0.03 ^b	0.86±0.04 ^a	1.84±0.06 ^c
	30	1.14±0.04 ^a	0.86±0.12 ^a	1.31±0.07 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ (p<0.05)

4.4 การศึกษาผลของสาร 17 β -estradiol ต่อระดับการแสดงออกของ 217_AFLP

ในหอยเจดีย์วัยอ่อน

เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ได้รับสาร E₂ แตกต่างกัน 3 ระดับคือ control (0.08% DMSO), 1 และ 10 ng/L ด้วยวิธีการแช่ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3, 7 และ 14 วัน ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าเมื่อได้รับสาร E₂ ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/L ระยะเวลา 3 วัน มีผลทำให้หอยเจดีย์วัยอ่อนมีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 0.97 ± 0.02 ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (0.98 ± 0.01) ($p > 0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L มีผลชักนำระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.15 ± 0.10 แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อได้รับสาร E₂ ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/L เป็นระยะเวลา 7 วัน มีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.31 ± 0.08 ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (1.21 ± 0.07) ($p > 0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L มีผลยับยั้งระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 0.56 ± 0.05 แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เมื่อได้รับสาร E₂ ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/L เป็นระยะเวลา 14 วัน มีผลชักนำการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 2.19 ± 0.16 แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (1.51 ± 0.14) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L (1.42 ± 0.24) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4-10 และตารางที่ 4-5



ภาพที่ 4-10 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ได้รับสาร E₂ แตกต่างกัน 3 ระดับความเข้มข้นคือ control (0.08% DMSO), 1 และ 10 ng/L ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลานาน 3, 7 และ 14 วัน

(ก) สัดส่วนของการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ปีน 28S rRNA

(ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของ 217_AFLP กับ ระยะเวลาที่หอยเจดีย์ได้รับสาร E₂ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4-5 ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ได้รับสาร E₂ ระดับความเข้มข้น control (0.08% DMSO), 1 และ 10 ng/L เป็นระยะเวลา 3, 7 และ 14 วัน

ระยะเวลาได้รับสาร E ₂ (วัน)	ระดับความเข้มข้นของ E ₂ (ng/L)		
	control	1	10
3	0.98±0.01 ^a	0.97±0.02 ^a	1.15±0.10 ^b
7	1.21±0.07 ^b	1.31±0.08 ^b	0.56±0.05 ^a
14	1.51±0.14 ^a	2.19±0.16 ^b	1.42±0.24 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)