สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ผลของ 17β-ESTRADIOL ต่อระดับการแสดงออกของยีนโกนาโดโทรปินรีลีซซิ่งฮอร์โมนและยีนไวเทลโลจีนินในปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) วัยอ่อน

ธนากร แสงสง่า

TH 00164 07

18 พ.ย. 2553
278026

เริ่มบริการ
11 ส.ค. 2554

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ตุลาคม 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ธนากร แสงสง่า ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กัมพล แก้วเกษ)

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุตารัตน์ สวนจิตร)

.....กรรมการ
(ดร. กาญจนา หริ่มเพ็ง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)
วันที่ 27 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2553

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม
พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี
ประจำปีการศึกษา 2552

ประกาศคุณูปการ

การทำวิทยานิพนธ์นี้ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้ความอนุเคราะห์จากบุคคลและหน่วยงานต่าง ๆ โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้จุดประกายให้ข้าพเจ้าสนใจงานทางด้านชีววิทยาโมเลกุล และเปิดโอกาสการศึกษาในระดับปริญญาโทแก่ข้าพเจ้า โดยให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ทั้งการเรียน การทำงานวิจัย การจัดทำรายงานนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ ตลอดจนการใช้ชีวิตประจำวัน ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กัมพล แก้วเกษ ประธานคณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร และ ดร. กาญจนา หริ่มเพ็ง คณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาร่วมพิจารณาและให้คำแนะคำในการแก้ไขรายงานให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี ที่มอบทุนการศึกษาและทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณนฤดม พิสิษฐเกษม เจ้าของเพอคูล่า ฟาร์ม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างปลาการ์ตูนเพื่อใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณครู อาจารย์ ทุกท่านที่ให้ความรู้ เจ้าของงานวิจัยที่ใช้อ้างอิงตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณ นายสุรัช แย้มสวาท นายไกรฤกษ์ ตันถาวร นางสาวจีรนันท์ ใจไว และสมาชิกในห้องปฏิบัติชีววิทยาระดับโมเลกุลทุกคน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

คุณค่าและประโยชน์ทางวิชาการของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอกราบเป็นกตเวทิตาแด่คณาจารย์ผู้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ธนากร แสงสง่า

51911848: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: ปลาการ์ตูนส้มขาว/ สารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน/ โกนาโดโทรปิน รีลีซซิ่ง ฮอร์โมน/ ไวเทลโลจีนิน/ 17ß-เอสตราไดออล

ธนากร แสงสง่า: ผลของ 17ß-ESTRADIOL ต่อระดับการแสดงออกของยีนโกนาโดโทรปินรีลีซซิ่งฮอร์โมนและยีนไวเทลโลจีนินในปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) วัยอ่อน (EFFECTS OF 17ß-ESTRADIOL ON THE EXPRESSION OF GONADOTROPIN RELEASING HORMONE AND VITELLOGENIN GENES IN JUVENILE FALSE CLOWN ANEMONEFISH (*Amphiprion ocellaris*)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph. D. 85 หน้า. ปี พ.ศ. 2553.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ 17ß-estradiol ต่อการแสดงออกของยีน gonadotropin releasing hormone (GnRH) และ vitellogenin (VTG) ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) วัยอ่อน ในขั้นตอนแรกทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน GnRH และ VTG ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่สกัดแยกจากเนื้อเยื่อสมองและตับ ตามลำดับ ได้ผลผลิต PCR ขนาด 208 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ โดยยีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาวมีความเหมือนสูงสุดที่ 84% กับ seabream GnRH mRNA ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และในส่วนของยีน VTG มีความเหมือนสูงสุด 77% กับ VTG A mRNA ของปลา Japanese whiting (*Sillago japonica*) เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนอายุ 3 เดือน ที่ได้รับ 17ß-estradiol (E_2) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l โดยการแช่เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 ชั่วโมง) ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ 18S rRNA เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control) พบว่า E_2 ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH ที่ทุกความเข้มข้นและเวลา ($p>0.05$) แต่ในทางตรงกันข้าม E_2 สามารถชักนำระดับการแสดงออกของยีน VTG ให้เพิ่มมากขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 1 และ 0.1 µg/l สามารถชักนำระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ภายในระยะเวลา 3 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำยีน VTG และปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนมาใช้เป็น biomarker ติดตามการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม estrogenic-Endocrine Disrupting Chemicals (e-EDCs) ในแหล่งน้ำได้

51911848: MOJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M. Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: *Amphiprion ocellaris*/ ESTROGENIC ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS/ GONADOTROPIN RELEASING HORMONE/ VITELLOGENIN/ 17ß-ESTRADIOL

THANAKORN SAENGSANGA: EFFECTS OF 17ß-ESTRADIOL ON THE EXPRESSION OF GONADOTROPIN RELEASING HORMONE AND VITELLOGENIN GENES IN JUVENILE FALSE CLOWN ANEMONEFISH (*Amphiprion ocellaris*). ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph. D. 85 P. 2010.

The present work aimed to study the effects of 17ß-estradiol on gonadotropin releasing hormone (GnRH) and vitellogenin (VTG) genes expression in the juvenile false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). Two partial nucleotide sequences of the GnRH and VTG cDNAs of false clown anemonefish were cloned and analyzed as a first step in this study. The 208 and 400-bp portions of GnRH and VTG genes were isolated and RT-PCR amplified from the brain and liver, respectively. The *A. ocellaris* GnRH sequences showed high similarity (84% identity) with the seabream GnRH mRNA of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and the *A. ocellaris* VTG sequences showed high similarity (77% identity) with the VTG A mRNA of Japanese whiting, *Sillago japonica*. The levels of GnRH and VTG mRNAs were analyzed in 3-mounth juvenile *A. ocellaris* exposure to E_2 in different doses (0, 0.1, 1 µg/l) and time intervals (3, 6, 12, 24, 48, 96 hrs.) compared to the control group (0 hr). Semi-quantitative RT-PCR analysis, using 18S rRNA gene as internal standard, showed that expression levels of GnRH mRNA were not different at all dosages and time intervals of E_2-treated fish. On the other hand, VTG mRNA expression levels were significantly increased when the *A. ocellaris* exposed to E_2 at 1 µg/l for 3 hrs and 0.1 µg/l for 96 hrs compared to the E_2-treated fish. Therefore, the VTG gene is a sensitive biomarker and the juvenile *A. ocellaris* can be used for early screening of estrogenic-Endocrine Disrupting Chemicals (e-EDCs) contamination in the aquatic environment.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมติฐานของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

อนุกรมวิธานและชีววิทยาทั่วไปของปลาการ์ตูนส้มขาว..... 4

การเปลี่ยนเพศของปลา..... 5

Gonadotropin releasing hormone (GnRH)..... 8

Vitellogenin (VTG)..... 11

สารรบกวนฮอร์โมน (estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals, e-EDCs).... 12

แหล่งปลดปล่อยและการแพร่กระจายของ e-EDCs ในแหล่งน้ำ..... 13

ผลของ e-EDCs ต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมน GnRH และโปรตีน VTG..... 14

วิธีการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนหรือปริมาณโปรตีน..... 18

3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 20

อุปกรณ์และสารเคมี..... 20

การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH และ VTG..... 22

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3 (ต่อ)	การศึกษาผลของ 17ß-estradiol (E_2) ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG	28
4	ผลการวิจัย	31
	การโคลนบางส่วนของยีน GnRH และ VTG	31
	การศึกษาผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG	42
5	อภิปรายและสรุปผล	48
	อภิปรายผลการวิจัย	48
	สรุปผลการวิจัย	55
	ข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม		57
ภาคผนวก		64
ภาคผนวก ก	วิธีการเตรียมสารเคมี	65
ภาคผนวก ข	ผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ	68
ภาคผนวก ค	งานวิจัยที่นำเสนอในการประชุมวิชาการ	71
ประวัติย่อของผู้วิจัย		85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	พัฒนาการทางเซลล์สืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนลายปล้อง (*Amphiprion clakii*)	8
3-1	สารผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA.....	25
3-2	อุณหภูมิ เวลา และขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ในส่วนของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA.....	25
4-1	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวกับปลาชนิดอื่น	41
ผข-1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของยีน GnRH	68
ผข-2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของยีน VTG	68
ผข-3	สัดส่วนการแสดงออกของยีน GnRH/18S rRNA ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นต่าง ๆ.....	69
ผข-4	สัดส่วนการแสดงออกของยีน VTG/18S rRNA ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นต่าง ๆ.....	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะลักษณะของปลาการ์ตูนส้มขาวอยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเล	6
2-2	วงจรชีวิตของปลาการ์ตูนส้มขาวตั้งแต่ระยะไข่ถึงตัวเต็มวัย	6
2-3	ลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมน GnRH จำนวน 23 รูปแบบที่พบในสิ่งมีชีวิต	10
2-4	การทำงานของฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ผ่าน hypothalamus-pituitary-gonadal-liver (HPGL) axis ในระหว่างการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์	12
2-5	กลไกการทำงานของฮอร์โมนและการรบกวนของ EDCs	13
2-6	โครงสร้างของ e-EDCs	16
2-7	ลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลา gudgeon (*Gobio gobio*) ในระยะที่พัฒนาทั้ง testicular tissue ของเพศผู้ร่วมกับ primary oocyte และ secondary oocyte ของเพศเมียภายหลังได้รับ E_2	17
2-8	Immunohistochemistry แสดงตำแหน่งของโปรตีน VTG ที่เนื้อเยื่อตับของปลาแซลมอน (*Salmo salar*) วัยอ่อน	17
3-1	ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน GnRH ของปลาบางชนิดที่รายงานในฐานข้อมูล GenBank	23
3-2	ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ใช้ในการศึกษา	28
4-1	Agarose gel electrophoresis ของแถบ RNA	31
4-2	Agarose gel electrophoresis ของผลผลิต RT-PCR บริเวณยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวขนาดประมาณ 208, 400 และ 102 คู่เบส ตามลำดับ	33
4-3	การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน GnRH จำนวน 208 นิวคลีโอไทด์ของปลา *Amphiprion ocellaris, Monopterus albus, Rachycentron canadum, Oreochromis niloticus* และ *Haplochromis burtoni*	34
4-4	การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH จาก genomic DNA และ cDNA	35
4-5	การเคียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของ GnRH ของปลา *Amphiprion ocellaris, Oreochromis niloicus, Haplochromis burtoni, Versper variegatus, Versper moseri* และ *Epinephelus fasciatus*	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-6 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน VTG จำนวน 400 นิวคลีโอไทด์ของปลา *Amphiprion ocellaris*, *Sillago japonica*, *Morone americana*, *Verasper moseri* และ *Ctenolabrus rupestris* 37

4-7 การเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของ VTG ของปลา *Amphiprion ocellaris*, *Ctenolabrus rupestris*, *Pagrus major*, *Labrus mixtus* และ *Thunnus thynnus* 39

4-8 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S rRNA จำนวน 102 นิวคลีโอไทด์ของปลา *Amphiprion ocellaris*, *Cirrhinus mrigala*, *Tor khudree*, *Neolissochilus hexagonolepis* และ *Labeo rohita*..... 40

4-9 Agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ในส่วนของยีน GnRH และยีน 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ..... 43

4-10 ระดับการแสดงออกของยีน GnRH ที่เนื้อเยื่อสมองของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ด้วยวิธีแช่ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยแสดงค่าเฉลี่ย±SEM ของแต่ละกลุ่มการทดลอง..... 44

4-11 Agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ในส่วนของยีน VTG และ 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ..... 46

4-12 ระดับการแสดงออกของยีน VTG ที่เนื้อเยื่อตับของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ด้วยวิธีแช่ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยแสดงค่าเฉลี่ย±SEM ของแต่ละกลุ่มการทดลอง..... 47

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogenic-Endocrine Disrupting Chemicals; e-EDCs) เป็นฮอร์โมนหรือสารแปลกปลอมในสิ่งแวดล้อมเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตแล้ว สามารถออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen mimic) ภายในร่างกาย (สินีนาฏ ศิริและกฤษณะ อินทร์คำน้อย, 2549) การปนเปื้อนของ e-EDCs ในสิ่งแวดล้อมมักสะสมในแหล่งน้ำโดยเฉพาะพื้นที่ทะเลชายฝั่งซึ่งเป็นแหล่งรองรับของเสียต่าง ๆ เช่น ของเสียชุมชนจากชุมชน สิ่งขับถ่ายของมนุษย์เพศหญิงที่มีฮอร์โมนเอสโตรเจนเนื่องจากการใช้ยาคุมกำเนิด การปนเปื้อนของ bisphenol A (BPA) จากอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก การใช้ฮอร์โมนสเตอรอยด์ (steroid) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในการทำเกษตรกรรม เป็นต้น ซึ่งจากการตรวจสอบในแถบประเทศอาเซียน e-EDCs ที่พบหลัก คือ 17ß-estradiol (E_2) และ estrone (E_1) และคาดว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดเวลา (Duong et al., 2010) นอกจากนี้ในน่านน้ำไทยจากการเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน อ่าวมะขาม อ่าวคุ้งกระเบน อ่าวขะหริ่ง และหมู่เกาะสีชัง มาทำการวิเคราะห์การสะสมของสารมลพิษ พบสารในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ในปริมาณ 84-221 ng/g dry tissue, nonylphenol (NP) ในปริมาณ 81-201 ng/g dry tissue, octylphenol (OP) ในปริมาณ 1-16 ng/g dry tissue, BPA ในปริมาณ 0.96-5.54 ng/g dry tissue และ linear alkyl benzenes (LABs)ในปริมาณ 57-349 ng/g dry tissue (Isobe et al., 2007) ดังนั้นจึงควรมุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงผลกระทบของ e-EDCs ต่อสิ่งมีชีวิตและปริมาณของสารที่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพ รวมถึงหาดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ หรือ biomarker ที่เหมาะสมในพื้นที่ทะเลชายฝั่งของไทย ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษา และควรใช้ปลาขนาดเล็กซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มใหญ่ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น ๆ ซึ่งเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงที่จะได้รับผลกระทบโดยตรงจากการปนเปื้อนของ e-EDCs และเป็นลำดับแรกก่อนที่จะส่งผลกระทบถึงมนุษย์

มีรายงานจำนวนมากศึกษาถึงผลกระทบของ e-EDCs ในกลุ่มปลาต่อระดับการแสดงออกของยีนหรือโปรตีน vitellogenin (VTG) ที่เนื้อเยื่อตับ (Celius, Matthews, Giesy, & Zacharewski, 2000; Maradonna & Carnevali, 2007; King, Hassell, Nugegoda, & Kristiansen, 2008; Ma, Li, Wang, He, & Yin, 2009) ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้นของโยล์ค (yolk) ที่พบเฉพาะในปลา

เพศเมียสร้างในเซลล์ตับภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยปกติสามารถพบ VTG ในปลาเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ แต่ไม่พบหรือพบได้น้อยในปลาเพศผู้หรือปลาเพศเมียวัยอ่อน แต่อย่างไรก็ตามในปลาเพศผู้หรือปลาวัยอ่อนสามารถสังเคราะห์ VTG ได้เมื่อมีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารที่เลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน นอกจากนี้มีรายงานวิจัยศึกษาความเป็นพิษของ e-EDCs ต่อสมองโดยเฉพาะ gonadotropin releasing hormone (GnRH) (Vetillard & Bailhache, 2006) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ มีหน้าที่กระตุ้นให้ต่อมใต้สมองทำหน้าที่ผลิตและหลั่งฮอร์โมน gonadotropin (GTH) 2 ชนิด คือ GTH I และ GTH II (Arukwe & Goksoyr, 2003) และถูกควบคุมแบบย้อนกลับด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน ดังนั้นสารในกลุ่ม e-EDCs ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำสามารถรบกวนการทำงานของการสังเคราะห์ฮอร์โมน GnRH ได้ (Vetillard & Bailhache, 2005; 2006) และก่อให้เกิดความผิดปกติทางสรีรวิทยา ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ พฤติกรรม รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากร (Toft & Baatrup, 2001; Vetillard & Bailhache, 2005; 2006)

ปลาการ์ตูน (*Amphiprion* spp. และ *Premnas* spp.) เป็นปลากระดูกแข็งจัดอยู่ในวงศ์ Pomacentridae ประชากรส่วนใหญ่มีแหล่งอาศัยที่จำเพาะไม่มีการอพยพย้ายถิ่น โดยอยู่ในแนวปะการังอาศัยร่วมกับดอกไม้ทะเลในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งที่ความลึก 1-15 เมตร ซึ่งเป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการการปนเปื้อนของ e-EDCs เนื่องจากเป็นบริเวณรองรับน้ำทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานบำบัดน้ำเสีย น้ำทิ้งจากชุมชนโดยเฉพาะบริเวณที่มีประชากรหนาแน่น โรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งฮอร์โมนเพศที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น ที่มักจะมีการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม e-EDCs ผู้วิจัยจึงสนใจใช้ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) เป็นต้นแบบการศึกษาถึงผลกระทบของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG โดยให้ปลาได้รับฮอร์โมน E_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งขั้นตอนการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและค่าที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพในการประเมินสถานการณ์และความเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมทางทะเลที่มีผลกระทบจากการปนเปื้อนของ e-EDCs ต่อสิ่งมีชีวิต เพื่อพิจารณาจัดการ ควบคุม ป้องกัน และอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติเป็นลำดับต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนในบริเวณยีน GnRH และ VTG ของปลาการ์ตูนส้มขาว

2. เพื่อศึกษาผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน

สมมติฐานของการวิจัย

E_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน GnRH และ VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาว

2. ได้วิธีการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น biomarker ติดตามการปนเปื้อนของ e-EDCs ในแหล่งน้ำ

3. นำไปคาดการณ์ถึงผลกระทบและแนวโน้มการเปลี่ยนเพศของปลาการ์ตูนที่อาศัยในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนด้วยสารในกลุ่ม e-EDCs

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน GnRH และ VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) แล้วออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนจำนวน 2 ยีน คือ GnRH และ VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน (อายุประมาณ 3 เดือน ขนาดลำตัวยาวเหยียดประมาณ 25 mm) ที่ได้รับฮอร์โมน E_2 ด้วยวิธีการแช่ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 0-96 ชั่วโมง ทำการวัดระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR เปรียบเทียบกับยีนควบคุมภายในคือ 18S rRNA จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานและชีววิทยาทั่วไปของปลาการ์ตูนส้มขาว

ปลาการ์ตูนส้มขาวจัดลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Nelson, 1994)

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Division Teleostei

Order Perciformes

Family Pomacentridae

Genus *Amphiprion*

Species *A. ocellaris*

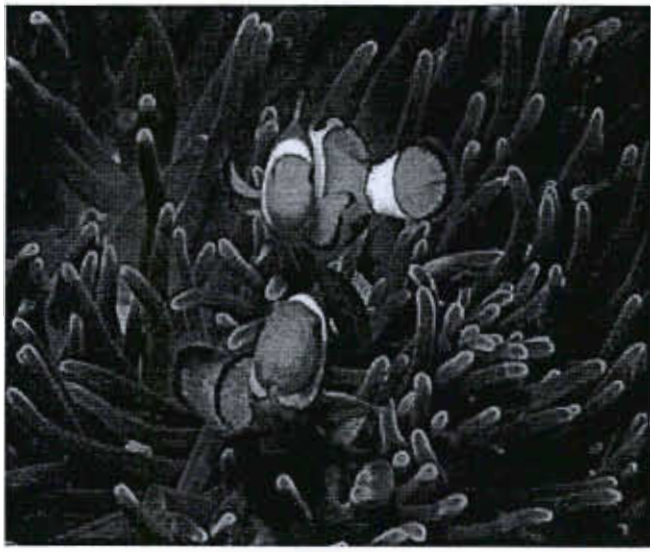
ปลาการ์ตูนที่ได้รับการจำแนกชนิดแล้วในปัจจุบันมีจำนวน 29 ชนิด จัดอยู่ในสกุล (genus) *Amphiprion* จำนวน 28 ชนิด ส่วนอีก 1 ชนิดอยู่ในสกุล *Premnas* (Allen, Drew, & Kaufman, 2008) ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) เป็นปลาการ์ตูน 1 ใน 7 ชนิดที่พบในน่านน้ำไทย ทางฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย (ธรณ์ ธำรงนาวาสวัสดิ์, 2546) นอกจากนี้ยังพบแพร่ กระจายในมหาสมุทรอินเดีย มหาสมุทรแปซิฟิก หมู่เกาะอินโดมาลายัน นิโคบาร์ ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่น และทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศออสเตรเลีย โดยพบอยู่ในระบบนิเวศแนวปะการังที่ความลึกตั้งแต่ 1-15 เมตร อยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเล *Heteractis magnifica* และ *Stichodactyla gigantean* (ภาพที่ 2-1) เพื่อเป็นแหล่งผสมพันธุ์ วางไข่ อนุบาลตัวอ่อน อาศัย หลบภัย และเป็นแหล่งอาหาร (Allen, 1980)

ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนส้มขาวที่พบในประเทศไทย คือ ลำตัวมีสีส้มเข้มมีแถบสีขาว 3 แถบพาดบริเวณส่วนหัวและลำตัว เป็นจำนวน 3 แถบ โดยแถบแรกพาดบริเวณส่วนหัวลงทางด้านหลังตา แถบที่ 2 พาดบริเวณกลางลำตัวระหว่างรอยเว้าของครีบหลัง ด้านหน้าของแถบนี้จะโค้งยื่นไปทางแถบแรก ส่วนแถบที่ 3 อยู่บริเวณคอดหาง แถบขาวแต่ละแถบจะมีเส้นสีดำคัดบริเวณขอบรวมไปถึงบริเวณขอบของครีบต่าง ๆ ครีบหางของปลาการ์ตูนส้มขาวมีลักษณะกลม ครีบหลังมีลักษณะเว้าบริเวณตรงกลางลำตัว จึงทำให้ดูมีลักษณะคล้ายครีบหลังแบ่งออกเป็น 2 ตอน มีก้าน

ครีบหลัง (dorsal fin spines) จำนวน 11 ก้าน ในวงจรชีวิตของปลาการ์ตูนส้มขาว ปลาการ์ตูนจะอยู่กันเป็นคู่และอาจมีปลาขนาดเล็กอาศัยร่วมอยู่ด้วย ปลาตัวเมียจะมีพัฒนาการสูงสุดและมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้และตัวอื่น ๆ และทำหน้าที่เป็นผู้นำ คอยปกป้องอาณาเขตที่เป็นแหล่งอาศัย ถ้าปลาตัวเมียตายไป จะมีปลาตัวใหม่เจริญเติบโตขึ้นมาอย่างรวดเร็วและกลายเป็นตัวเมียแทน ปลาการ์ตูนจะวางไข่ครั้งละหลายร้อยฟองบริเวณฐานของดอกไม้ทะเล ซึ่งมีหนวดของดอกไม้ทะเลปกคลุม ทำให้ไข่มีความปลอดภัย พ่อปลาจะคอยดูแลไข่ หลังจากนั้น 6-7 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวและล่องลอยไปตามน้ำ ใช้ระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ เมื่อมีอายุได้ประมาณ 3-4 สัปดาห์จะมีสีสันและลวดลายเหมือนกับพ่อหรือแม่ทุกประการ ขนาดของลำตัวยาวประมาณ 1 นิ้ว เมื่อมีอายุ 4-6 เดือน และเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์เมื่ออายุครบ 12-18 เดือน (ภาพที่ 2-2) (Allen, 1997)

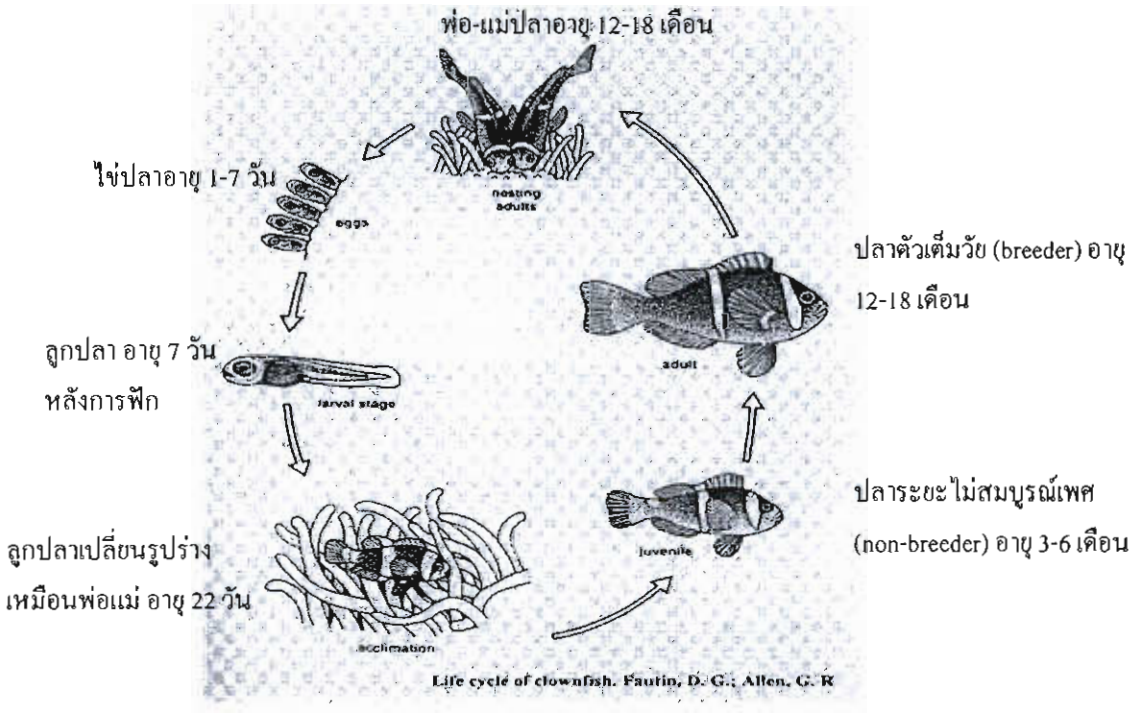
การเปลี่ยนเพศของปลา

ตามปกติเพศของสัตว์ทั่วไปถูกกำหนดโดยข้อความพันธุกรรมหรือยีน แต่สำหรับสัตว์ในกลุ่มปลาปัจจัยภายนอกและปัจจัยทางสังคมมีผลต่อลักษณะเพศที่ปรากฏหรือฟีโนไทป์ (phenotype) ในปลาวัยอ่อนจะพบเซลล์สืบพันธุ์ปฐมภูมิ (primodial germ cells; PGc) มีคุณสมบัติเป็นสองเพศ (hermaphrodite) สามารถจะเจริญต่อไปเป็นเพศผู้หรือเพศเมียก็ได้ ในปลาบางชนิดระยะวัยรุ่นจะเป็นสองเพศชัดเจน เช่น มีเซลล์ไข่เกิดขึ้นก่อนและสลายแล้วถูกแทนที่โดยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในช่วงระยะต่าง ๆ เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*) มีเซลล์ไข่ขนาดใหญ่สังเกตเห็นเมื่อปลาอายุได้ 2 เดือนหลังฟัก จากนั้นเซลล์ไข่จะสลายไปครึ่งหนึ่ง ในขณะที่มีเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พัฒนาขึ้นมาจากสเปอร์มาโตโกเนีย (spermatogonia) และสเปอร์มาโตไซต์ (spermatocyte) ทั้งนี้การเกิดสภาวะสองเพศที่พบมากในปลากระดูกแข็งนั้น มีเหตุผล 3 ประการคือ 1) การกำหนดเพศของปลากระดูกแข็งมีสารพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้องค่อนข้างน้อย 2) การพัฒนาของเนื้อเยื่อที่จะเจริญเป็นรังไข่หรืออัณฑะไม่เป็นไปตามปกติ คือ สัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปจะมีสองชนิด ชั้นนอกเป็นคอร์เท็กซ์ (cortex) และชั้นในเป็นเมดุลลา (medulla) ในปลามีแต่ชั้นของคอร์เท็กซ์เพียงอย่างเดียวที่พัฒนาไปเป็นอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ดังกล่าว และ 3) มีการต่อต้านน้อยระหว่างต้นกำเนิดของเซลล์ ที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อต่างเพศกัน (เรณู ยาชิโร, 2542)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะของปลาการ์ตูนส้มขาวอยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเล

(http://www.diverosa.com/categories/Damsel&Nemos.htm)



ภาพที่ 2-2 วงจรชีวิตของปลาการ์ตูนส้มขาวตั้งแต่ระยะไข่ถึงตัวเต็มวัย

(ดัดแปลงจาก http://www.advancedaquarist.com/2007/2/fish)

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาวงศ์ Pomacentidae ในกลุ่มปลาการ์ตูนลายปล้อง (*A. clarkii*) พบว่าในช่วงอายุ 0-30 วันหลังการฟักไม่พบเซลล์สืบพันธุ์ แต่หลังจากอายุ 60 วัน พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย และพบทั้งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียที่สมบูรณ์เมื่ออายุ 214 วัน และ 273 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2-1) (Miura, Nakamura, Kobayashi, Piferrer, & Nakamura, 2008) โดยปลาตัวเมียจะมีพัฒนาการสูงสุดทำหน้าที่เป็นผู้นำและตัวผู้มีพัฒนาการรองลงมา นอกจากนี้อาจพบปลาวัยอ่อนหรือปลาที่ยังไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ (juvenile or nonbreeders) อาศัยร่วมอยู่ด้วย ถ้าปลาตัวเมียอพยพหรือตายไปจะมีปลาตัวอื่นเปลี่ยนเพศและกลายเป็นตัวเมียแทน ดังนั้นปลาการ์ตูนจัดเป็นปลาที่มีลักษณะเฉพาะที่ถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางสังคม เป็นปลาสองเพศแบบโพรแทนดรัส (Fricke & Fricke, 1977) ปลากลุ่มนี้สามารถพัฒนาเป็นเพศผู้หรือเพศเมียได้เนื่องจากมีอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียพร้อมกัน นอกจากนี้การมีปลาตัวเมียในกลุ่มตัวผู้สามารถกระตุ้นให้ตัวผู้สร้างสเปิร์มได้และในขณะที่มีตัวผู้อยู่ในสังคม ปลาในกลุ่มวัยรุ่นก็จะถูกยับยั้งไม่ให้มีการสร้างสเปิร์ม ดังนั้นปลาวัยรุ่นจึงเจริญเป็นตัวเด็มวัยเพศเมียได้โดยตรง เนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์ในกลุ่มตัวผู้ (functional male) เป็นแบบผสมผสาน (ovotestis) ซึ่งมีบริเวณที่เป็นเซลล์สร้างสเปิร์มหรืออัณฑะ (testicular area) และบริเวณที่จะสร้างไข่หรือรังไข่ (ovarian area) อยู่ติดกันแบบไม่มีขอบเขตที่แน่นอน แต่ในปลาตัวเมียจะเป็นรังไข่เพียงอย่างเดียว (Brusle-sicard & Reinboth, 1990 อ้างอิงจาก เรณู ยาชิโร, 2542)

จากการที่เพศของปลานั้นถูกควบคุมได้หลายปัจจัย ทั้งจากพันธุกรรม ระดับฮอร์โมนเพศ สิ่งแวดล้อม และปัจจัยสังคม ดังนั้นจึงมีการใช้ฮอร์โมนสเตียรอยด์ เช่น E_2 ทำการเปลี่ยนเพศของปลาให้มีลักษณะตามต้องการ เช่น ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) ซึ่งสามารถเปลี่ยนตัวเต็มวัยจากเพศผู้เป็นเพศเมียได้ (Tolf & Baatrup, 2001) นอกจากนี้สำเนาว์ เสาวกูล (2541) พบว่าการให้ฮอร์โมน E_2 ที่ระดับ 50 mg/1 kg ของอาหารทำให้ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) เปลี่ยนเป็นเพศเมียสูงสุดโดยปัจจัยที่ควบคุมการเปลี่ยนเพศของปลานั้นขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน ระยะเวลาที่ได้รับฮอร์โมน และอายุปลาที่เริ่มได้รับสัมผัสกับฮอร์โมน (บัญชา ทองมี, 2538)

ตารางที่ 2-1 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนลายปล้อง (*Amphiprion clarkii*) โดยเครื่องหมาย (–) คือ ไม่พบ และ (+) คือ พบ เซลล์สืบพันธุ์

อายุ (วัน)	เซลล์สืบพันธุ์		testicular tissue (%)	ovarian tissue (%)
	เพศผู้	เพศเมีย		
0	–	–	0	0
3	–	–	0	0
30	–	–	0	0
60	–	+	0	100
92	–	+	0	100
122	–	+	0	100
153	–	+	0	100
214	+	+	100	100
245	+	+	83.3	100
273	+	+	87.5	100

ที่มา: คัดแปลงจาก Miura et al. (2008)

Gonadotropin releasing hormone (GnRH)

GnRH เป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังเกือบทุกชนิด ประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ตัว สร้างจากเซลล์ประสาทในสมอง สัตว์จำพวกปลาพบได้ทั้งในรังไข่และอัณฑะ ส่วนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบทั้งในรังไข่ อัณฑะ ต่อมน้ำนม และรก (Sherwood & Adams, 2005) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์กลุ่มโปรโตคอด (protochordate) GnRH ที่พบมีโครงสร้างมากกว่า 23 รูปแบบ (type) (ภาพที่ 2-3) โดยปลาย NH_2-terminus (pGlu-His-Trp-Ser) และ COOH-terminus (Pro-Gly-NH_2) เป็นบริเวณอนุรักษ์ มีวิวัฒนาการมาเป็นเวลานานกว่า 500 ล้านปี (Millar, 2005) โดยเฉพาะ chicken GnRH-II ซึ่งพบครั้งแรกในสัตว์ปีก (Sherwood, Doroshov, & Lance, 1991) ส่วนในปลากระดูกแข็งพบมากถึง 8 รูปแบบ ประกอบด้วย catfish GnRH, chicken GnRH-II, herring GnRH, mammalian GnRH, pejerey GnRH, salmon GnRH, seabream GnRH และ whitefish GnRH (Lethimonier, Madigou, Munoz-Cueto, Lareyre, & Kah, 2004) โดยส่วนมากในปลาแต่ละชนิดจะมีถึง 2-3 รูปแบบ เช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*)

มี 2 รูปแบบ คือ salmon GnRH และ chicken GnRH (Klausen, Chang, & Habibi, 2001) ปลานิล (*Oreochromis mossambicus*) ปลา sockeye (*Oncorhynchus nerka*) ปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) และปลา barfin flounder (*Verasper moseri*) มี 3 รูปแบบ คือ chicken GnRH-II, salmon GnRH และ seabream GnRH (Amano et al., 2002) GnRH มีหน้าที่กระตุ้นเซลล์ gonadotroph ของ adenohypophysis ให้ผลิตและหลั่ง gonadotropin (GTH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และกระตุ้นให้ต่อมเพศ (gonad) สร้างฮอร์โมนเพศ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2546) GTH ของปลามีลักษณะคล้ายกับของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น คือ GTH I และ GTH II ซึ่งเปรียบเทียบได้กับฮอร์โมนที่พบในมนุษย์ คือ follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinsing hormone (LH) ตามลำดับ โดย GTH I มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไข่แดง (vitellogenesis) และการสร้างเปลือกไข่ (zonagenesis) ในขณะที่ GTH II ทำหน้าที่ควบคุมการสมบูรณ์ (maturation) และการตกไข่ (ovulation) การหลั่ง GTHs ถูกควบคุมด้วยกลไกการควบคุมย้อนกลับแบบยับยั้ง (negative feedback mechanism) ด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนและฮอร์โมนเทสโทสโทโรนโดยผ่านการทำงานของ hypothalamus-pituitary-gonadal-liver (HPGL) axis (ภาพที่ 2-4) ฮอร์โมนที่หลั่งจาก HPGL axis จะกระตุ้นการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และการวางไข่ของปลา และถูกยับยั้งด้วยสาร โดปามีน (dopamine) (Arukwe & Goksoyr, 2003)

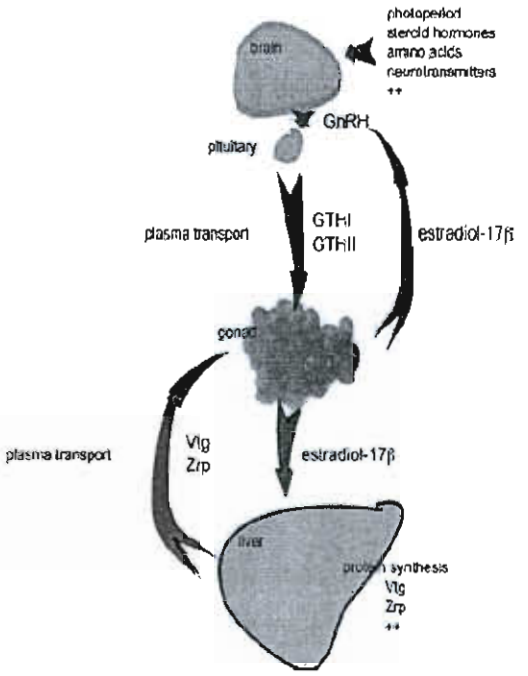
GnRH เป็นฮอร์โมนที่สำคัญต่อการเปลี่ยนเพศตลอดจนการควบคุมพฤติกรรมของปลา ผลการศึกษาในปลา labrid fish และ bluehead wrasse ซึ่งเปลี่ยนจากเพศเมียเป็นเพศผู้ พบว่าในระหว่างการเปลี่ยนเพศนั้นจำนวนเซลล์ของ GnRH ในสมองส่วน preoptic area (POA) ของไฮโปทาลามัสเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ส่วนปลาในกลุ่มโพรเทนดรัส เช่น ในปลาการ์ตูน *A. melanopus* ในช่วงเปลี่ยนเพศจำนวนเซลล์ GnRH ใน POA ของเพศผู้พบมากกว่าเพศเมียและมีจำนวนลดลง แต่ในปลากลุ่มโพรโตจินัส (protogynous) เช่น ปลา bluehead wrasse มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องมาจากการถูกชักนำโดยกลไกทางสังคม แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนสถานะทางเพศหรือพฤติกรรมในการสืบพันธุ์นั้นย่อมเป็นผลมาจากการทำงานและการควบคุมของสมอง (Elofsson, Winberg, & Francis, 1997)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Mammal	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	NH_2
Guinea Pig	pGlu	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly	NH_2
Chicken I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	NH_2
Rana d.	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly	NH_2
Seabream	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH_2
Salmon	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH_2
Medaka	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH_2
Catfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly	NH_2
Herring	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH_2
Dogfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH_2
Chicken II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly	NH_2
Lamprey III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly	NH_2
Lamprey I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly	NH_2
Chelyosoma I	pGlu	His	Trp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Lys	Pro	Gly	NH_2
Chelyosoma II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Cys	His	Ala	Pro	Gly	NH_2
Ciona I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly	NH_2
Ciona II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly	NH_2
Ciona III	pGlu	His	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Pro	Gly	NH_2
Ciona IV	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Phe	Met	Pro	Gly	NH_2
Ciona V	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Met	Pro	Gly	NH_2
Ciona VI	pGlu	His	Trp	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly	NH_2
Ciona VII	pGlu	His	Trp	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Pro	Gly	NH_2
Octopus	pGlu	Asn	Tyr	Ser	Phe	Ser	Trp	His	Pro	Gly	NH_2
						Asn	Gly				

ภาพที่ 2-3 ลำดับกรดอะมิโนของฮอร์โมน GnRH จำนวน 23 รูปแบบที่พบในสิ่งมีชีวิต ในกรอบแรเงาเป็นบริเวณอนุรักษ์ของปลาย NH_2-terminus (pGlu-His-Trp-Ser) และ COOH-terminus (Pro-Gly-NH_2) (Millar, 2005)

Vitellogenin (VTG)

VTG เป็นโปรตีนตั้งต้นของโยล์ค (yolk) ที่พบเฉพาะในเพศเมีย (female specific protein) ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเช่น หอย เป็นต้น (Romano, Rosanova, Anteo, & Limatola, 2004; Puinean & Rotchell, 2006) VTG ประกอบไปด้วยสายของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และฟอสเฟส (phospholipoglycloprotein) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงตั้งแต่ 250 - 600 kDa แตกต่างกันตามชนิดของสิ่งมีชีวิต (Arukwe & Goksoyr, 2003) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง VTG ถูกสร้างที่ตับ ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจนในช่วงที่มีการสร้างไข่หรือในช่วงที่ปลามีความสมบูรณ์เพศ การสังเคราะห์ VTG ถูกควบคุมโดย GTH I ที่หลั่งจากต่อมใต้สมอง ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนหลักที่หลั่งออกมากระตุ้นการทำงานร่วมกันของเซลล์ธีคา (theca cell) และเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) โดย GTH I จะกระตุ้นเซลล์ธีคาให้หลั่งฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน จากนั้นฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนจะเคลื่อนที่ไปยังเซลล์แกรนูโลซาที่อยู่ติดกันและถูกเปลี่ยนเป็นเอสตราไดออล (estradiol) โดยการควบคุมการทำงานของ cytochrome P450 aromatase (CYP19) ที่อยู่ในเซลล์แกรนูโลซา (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2546) เอสโตรเจนภายในร่างกายจะกระตุ้นเซลล์ตับให้สังเคราะห์ VTG จากนั้นหลั่งและลำเลียงผ่านกระแสเลือดมาสะสมที่เซลล์ไข่ (ภาพที่ 2-4) แล้วมีการย่อยเป็นโปรตีนโยล์ค คือ lipovitellin และ phosvitin เพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (Arukwe & Goksoyr, 2003) โดยปกติสามารถพบ VTG ในเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ แต่ไม่พบในเพศผู้หรือเพศเมียที่ยังเจริญไม่เต็มวัย เช่นที่พบในปลา sheepshead minnows (*Cyprinodon variegates*) (Knoebl, Hemmer, & Denslow, 2004) ปลาแซลมอน (*Salmo salar*) (Meucci & Arukwe, 2005) ปลาม้าลาย (*Danio rerio*) และปลาข้าวสาร (*Oryzias latipes*) (Tong et al., 2004) แต่ในปลาเพศผู้สามารถสังเคราะห์ VTG ได้ ก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นหรือได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารที่สามารถเลียนแบบฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ (Celius et al., 2000; Knoebl et al., 2004; Tong et al., 2004; Maradonna & Carnevali, 2007)



ภาพที่ 2-4 การทำงานของฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ผ่าน hypothalamus-pituitary-gonadal-liver (HPGL) axis ในระหว่างการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Arukwe & Goksoyr, 2003)

สารรบกวนฮอร์โมน (estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals; e-EDCs)

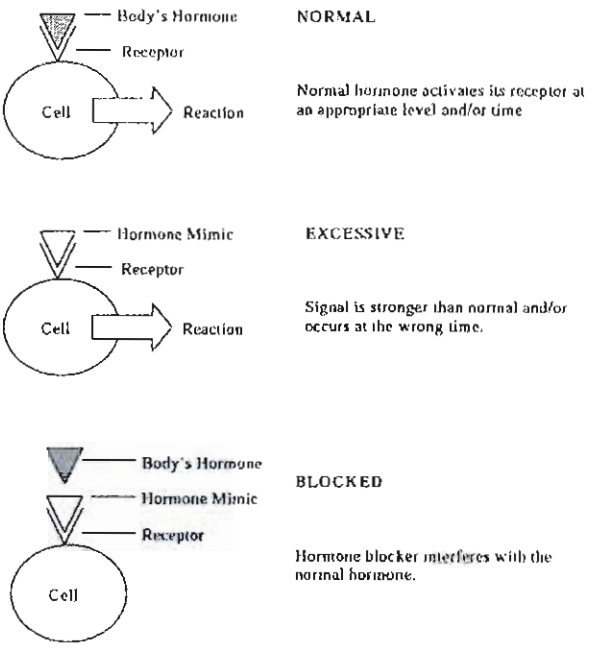
สารรบกวนฮอร์โมนเป็นสารแปลกปลอมในสิ่งแวดล้อมที่รบกวนการทำงานของฮอร์โมนภายในร่างกายอาจกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือฮอร์โมนอื่น ๆ (ภาพที่ 2-5) ซึ่งกลไกการรบกวนในระดับโมเลกุลสามารถเกิดขึ้นได้ 4 แบบ (Goksoyr et al., 2003) คือ

1) เลียนแบบฮอร์โมนภายในร่างกาย โดยจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER) จึงทำให้เกิดการตอบสนองในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ เช่นเดียวกับการที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจน

2) ขัดขวางการทำงานของฮอร์โมน โดยแย่งจับกับตัวรับของฮอร์โมน ทำให้ฮอร์โมนตัวจริงไม่สามารถทำงานได้

3) เปลี่ยนแปลงการสร้างและทำลายฮอร์โมนของร่ายกาย จะรบกวนระดับการสร้างมีผลทำให้การส่งสัญญาณผิดปกติ

4) เปลี่ยนแปลงหน้าที่ตัวรับภายในเซลล์ มีผลทำให้การตอบสนองต่อฮอร์โมนผิดปกติ



ภาพที่ 2-5 กลไกการทำงานของฮอร์โมนและการรบกวนของ EDCs (Minnesota Pollution Control Agency, 2008)

แหล่งปลดปล่อยและการแพร่กระจายของ e-EDCs ในแหล่งน้ำ

จากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร การพัฒนาอุตสาหกรรมและสังคมเมืองเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่าง ๆ ขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งการปนเปื้อนของ e-EDCs ในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาหนึ่งที่เกิดจากปัจจัยดังที่กล่าวมาข้างต้น ของเสียจากแหล่งชุมชนที่มักมีสารคัดหลั่งจากร่างกายซึ่งเป็นฮอร์โมนสเตอรอยด์ น้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสีย (sewage treatment plants, STPs) โรงงานอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกและแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น (Duong et al., 2010) ปล่อยลงสู่พื้นที่ชายฝั่งทะเล ซึ่งสารเหล่านี้อาจรวมตัวกับดินตะกอน คงตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานและสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตผ่านลำดับขั้นการบริโภค (biomagnification) สารรบกวนฮอร์โมนส่วนใหญ่ที่พบในสิ่งแวดล้อมเป็นสารที่เลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน ในประเทศบราซิลพบการปนเปื้อนของ E_2, estrone (E_1) และ ethynylestradiol (EE_2) ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 21, 40 และ 6 ng/l ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันจากการเก็บตัวอย่างน้ำในรัศมี 1 กิโลเมตรก่อนถึงปากแม่น้ำ Tiber ประเทศอิตาลี พบ estriol (E_3), E_2, E_1 และ EE_2 ที่ความเข้มข้น 0.33, 0.11, 1.5 และ 0.04 ng/l ตามลำดับ (Matozzo, Gagne, Marin, Ricciardi, & Blaise, 2008) ในเขตภูมิภาคเอเชียในรายงานของ Duong et al. (2010) ทำการศึกษาใน 8 ประเทศ ได้แก่ ประเทศจีน เกาหลี เวียดนาม กัมพูชา ลาว อินโดนีเซีย มาเลเซีย และประเทศไทย e-EDCs ชนิดหลักที่พบ คือ E_2 และ E_1 ซึ่งผลจากการ

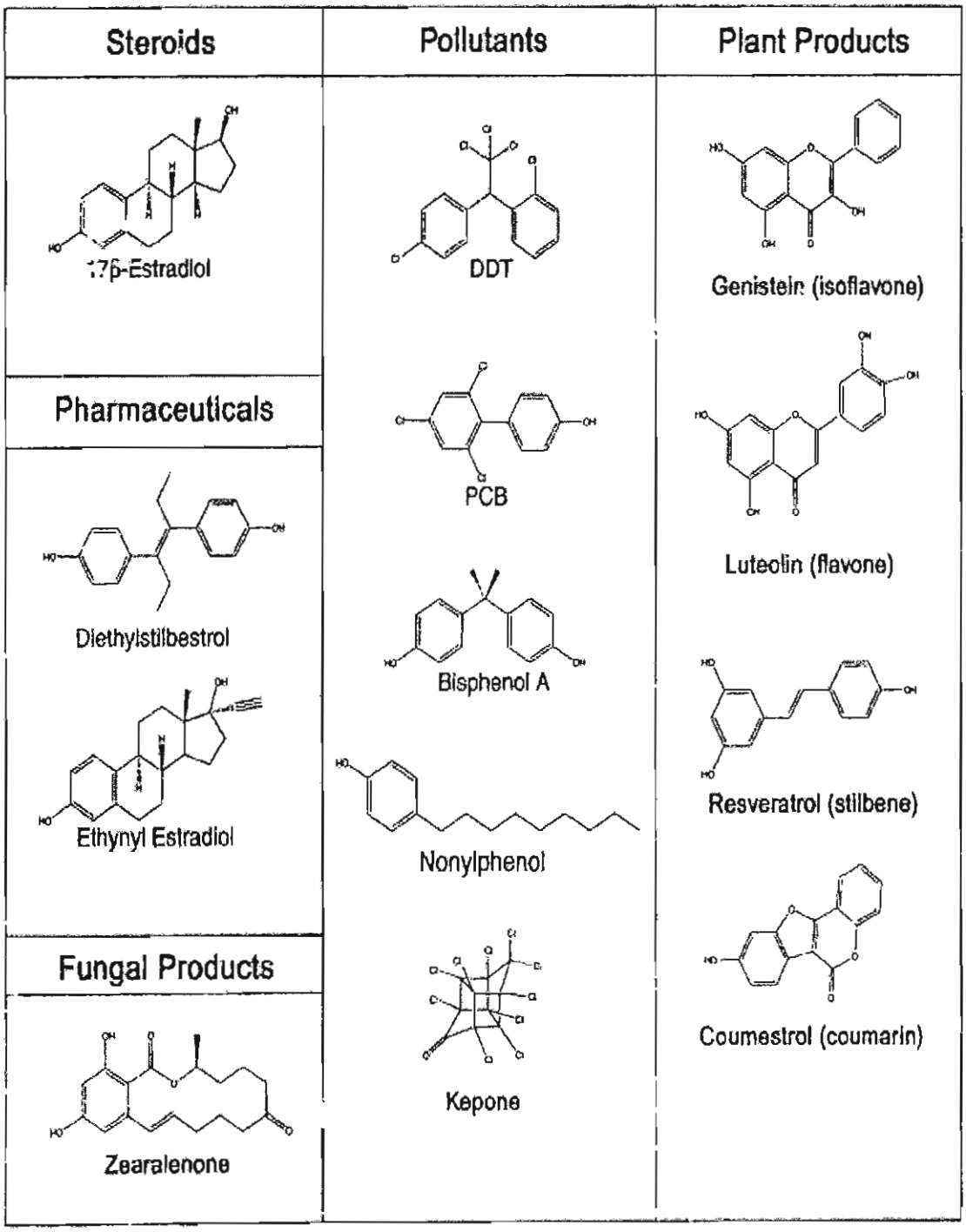
เก็บตัวอย่างน้ำจากโรงบำบัดน้ำเสียพบเพิ่มมากขึ้นในปี ค.ศ. 2008 จากเดิมที่รายงานไว้ในปี ค.ศ. 2007 และในรายงานของ Zhang, Li, Li, Wang, and Yan (2009) ทำการตรวจวัด E_1, E_2, EE_2, diethylstilbestrol (DES), NP, OP และ BPA ในบริเวณอ่าว Xiamen ประเทศจีน พบว่ามีความเข้มข้นรวม 49.20-1,230.69 ng/g น้ำหนักแห้งของตัวอย่างดินตะกอน และ 102.33-4,376.60 ng/l จากน้ำในดิน ในน่านน้ำไทยจากการเก็บตัวอย่างหอย *P. viridis* ในบริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน อ่าวมะขาม อ่าวคุ้งกระเบน อ่าวยะหริ่ง และหมู่เกาะสีชัง มาทำการวิเคราะห์การสะสมของสารมลพิษ พบสารในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ในปริมาณ 84-221 ng/g dry tissue, nonylphenol (NP) ในปริมาณ 81-201 ng/g dry tissue, octylphenol (OP) ในปริมาณ 1-16 ng/g dry tissue, BPA 0.96-5.54 ng/g dry tissue และ linear alkyl benzenes (LABs)ในปริมาณ 57-349 ng/g dry tissue (Isobe et al., 2007) จากผลการศึกษาของนักวิจัยหลายกลุ่มยืนยันว่า e-EDCs ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม แม้จะมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน (ภาพที่ 2-6) แต่สามารถจับตัวรับสัญญาณของเอสโตรเจน (estrogen receptor) และออกฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนภายในร่างกายได้ (McLachlan, 2001) จึงสามารถรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจนภายในร่างกายและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะปลาซึ่งอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำและสัมผัสกับสารเคมีโดยตรงผ่านช่องเหงือกหรือปนเปื้อนอยู่กับอาหาร มีรายงานที่พบว่าเมื่อปลาได้รับหรือสัมผัสกับสารเหล่านี้จะมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ การควบคุมการทำงานของยีนและตอบสนองทางสรีรวิทยา ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเพศการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติ เช่น ลักษณะของปลาเพศเมียที่พบในปลาเพศผู้ ทำให้มีการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (intersex) ในเวลาเดียวกัน (ภาพที่ 2-7) (Jobling et al., 2003)

ผลของ e-EDCs ต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมน GnRH และโปรตีน VTG

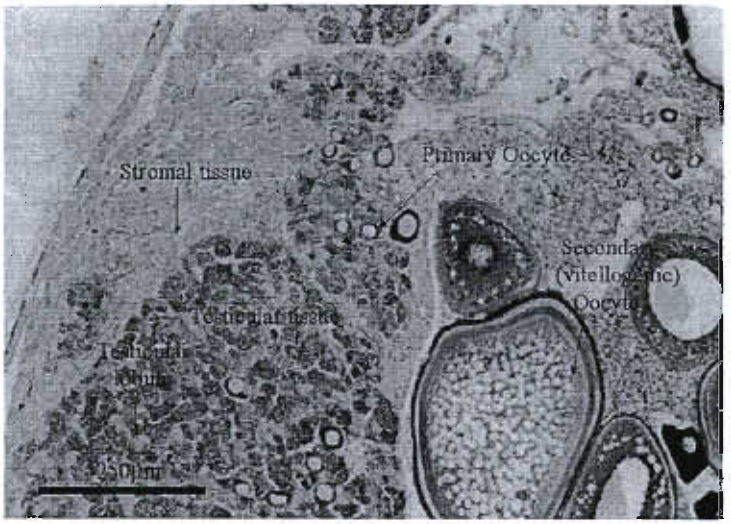
ฮอร์โมน E_2 เป็นฮอร์โมนเพศเมียที่สร้างขึ้นตามธรรมชาติในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนในสัตว์กลุ่มปลานั้นมีหน้าที่กระตุ้นให้เซลล์ตับสร้างโปรตีน ZRP (zona radiata protein) และโปรตีน VTG เกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์ธีคาและเซลล์แกรนูโลซา โดยเซลล์ธีคาหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนแล้วถูกส่งไปยังเซลล์แกรนูโลซาที่อยู่ติดกันและเปลี่ยนเป็น E_2 โดยกระบวนการนี้อยู่ภายใต้การควบคุมการทำงานของฮอร์โมน GTH นอกจาก E_2 ภายในร่างกายแล้วพบว่าสารที่เลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน VTG ในปลาวัยอ่อนและปลาเพศผู้ได้ จากการศึกษาด้วยวิธี immunohistochemistry ตำแหน่งของโปรตีน VTG ที่เนื้อเยื่อตับของปลาแซลมอน (*S. salar*) วัยอ่อนที่ได้รับ E_2 หรือ NP พบว่า E_2 และ NP สามารถชักนำระดับการสังเคราะห์โปรตีน VTG เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 2-8) นอกจากนี้ยังมี

รายงานศึกษาเมื่อปลาได้รับ e-EDCs เช่น E_2 หรือ α-zearalanol (α-ZEA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg body weight สามารถชักนำให้ปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) สังเคราะห์โปรตีน VTG ได้ (Celius et al., 2000) อย่างไรก็ตามการได้รับกับ E_2 เพียงชนิดเดียวอาจจะมีผลในการชักนำระดับการแสดงออกของยีน VTG ได้แตกต่างกับการได้รับกับสารเคมีหลายชนิด เช่น ปลาบู่ดำ (*Gobius niger*) ได้รับ E_2 เพียงชนิดเดียวจะสังเคราะห์โปรตีน VTG ได้มากกว่าได้รับ NP ร่วมกับ b-naphthoflavone (bNF) หรือ E_2 ร่วมกับ bNF (Maradonna & Carnevali, 2007) เช่นเดียวกับปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*) ที่พบว่า E_2 สามารถชักนำการสังเคราะห์โปรตีน VTG ได้ดีกว่า NP และ E_2 ร่วมกับ tamoxifen (Vetillard & Bailhache, 2006) นอกจากนี้การที่ปลาได้รับโลหะหนัก เช่น แคดเมียม จะมีผลไปลดการทำงานของ E_2 ในการชักนำให้เซลล์ตับสังเคราะห์โปรตีน VTG (Vetillard & Bailhache, 2005) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน VTG ในพลาสมาที่พบในปลาอาจแปรผันไปตามชนิดของปลาได้มากถึง 100 ล้านเท่า (Arukwe & Goksoyr, 2003) หรือในปลา sheepshead minnows (*C. variegatus*) การสังเคราะห์ mRNA VTG เพิ่มมากขึ้นถึง 1,100 pg เมื่อปลาได้รับ E_2 ที่ความเข้มข้น 182 ng/l ติดต่อกันเป็นเวลา 8 วัน (Knoebl et al., 2004)

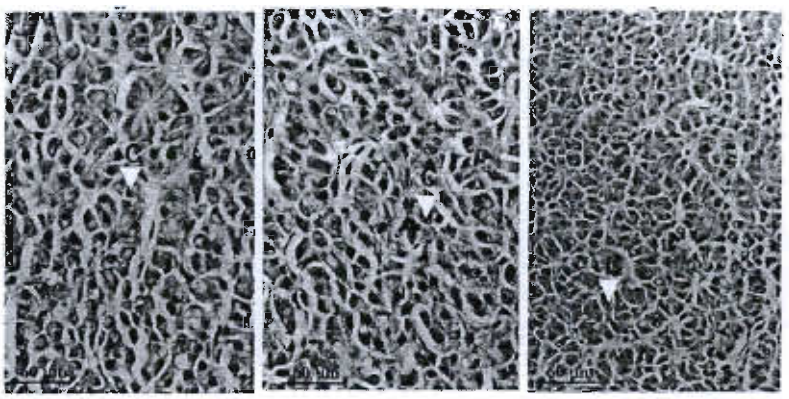
Gore (2002) พบว่า methoxychlor และ chlorpyrifos ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม organochlorine มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH ในเซลล์ GT1-7 hypothalamic cell line ที่แยกได้จากหนู โดยพบว่า methoxychlor ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 μM กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน GnRH เพิ่มมากยิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 1, 10 และ 100 μM จะมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน GnRH ในทำนองเดียวกัน chlorpyrifos ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 μM กระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน GnRH เพิ่มมากยิ่งขึ้น แต่ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 μM จะยับยั้งการแสดงออกของยีน GnRH นอกจากนี้ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/ml สามารถกระตุ้นให้เซลล์ GT1-7 hypothalamic cell line สังเคราะห์ GnRH primary transcript และ GnRH nuclear mRNA มากยิ่งขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ GnRH cytoplasmic mRNA แสดงว่าบทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH นั้นอยู่ในระดับการถอดรหัสของ RNA และกระบวนการปรับแต่ง mRNA ให้สมบูรณ์ภายในนิวเคลียสเท่านั้น แต่ไม่พบในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ E_2 สามารถกระตุ้นให้ปลาอีคุต (*Acanthopagrus schlegeli* Bleeker) สังเคราะห์ฮอร์โมน GTH II เพิ่มมากขึ้นส่งผลต่อการเปลี่ยนเพศของปลาในกลุ่มโพรแทนดรัส และเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ CYP19 (Du et al., 2001) แต่ในทางตรงกันข้าม E_2 ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน salmon GnRH ในปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*) (Vetillard & Bailhache, 2005)



ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของ e-EDCs (McLachlan, 2001)



ภาพที่ 2-7 ลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลา gudgeon (*Gobio gobio*) ในระยะที่พัฒนาทั้ง testicular tissue ของเพศผู้ร่วมกับ primary oocyte และ secondary oocyte ของเพศเมียภายหลังได้รับ E_2 (Arukwe & Goksoyr, 2003)



(a) (b) (c)

ภาพที่ 2-8 Immunohistochemistry แสดงตำแหน่งของโปรตีน VTG ที่เนื้อเยื่อตับของปลาแซลมอน (*S. salar*) วัยอ่อนในกลุ่มควบคุม (a) และกลุ่มที่ได้รับ NP (b) หรือ E_2 (c) ตรวจสอบด้วย monoclonal antibody (BN-5) ตำแหน่งของโปรตีน VTG จะติดสีเหลืองใน endothelial cells, hepatic sinusoids และ cytoplasm ของเซลล์ตับ (labeled C) ส่วนที่ติดสีฟ้า คือ nuclei ของเซลล์ตับ (Arukwe & Goksoyr, 2003)

วิธีการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนหรือปริมาณโปรตีน

วิธีตรวจวัดระดับการสังเคราะห์ยีนหรือการวัดปริมาณโปรตีนมีหลายวิธีที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างสัตว์ทดลอง เช่น การใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา ที่ทดสอบหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน วิธีที่ใช้กัน เช่น radioimmunoassay (RIA) ซึ่งมีความไวสูง แต่อาศัยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์แบบจับ (binding assay) โดยนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีไปติดฉลากกับสารเรืองแสงที่มีความไวสูง และ immunohistochemistry ซึ่งต้องอาศัยทักษะการเตรียมเนื้อเยื่อตัวอย่างและความเชี่ยวชาญในการตรวจวัด ซึ่งการใช้เทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต มีขั้นตอนการศึกษาที่ยุ่งยากและใช้เวลามากในการผลิตแอนติบอดี ทั้งนี้การตรวจวัดในระดับโปรตีนแอนติบอดีอาจเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจน (cross reaction) ต่อพลาสมาของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกัน ไม่จำเพาะต่อชนิดได้ เช่น การใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน VTG ของปลาหมอ (*O. aureus*) ทดสอบกับโปรตีน VTG ของปลาไน (*C. carpio*) ปลาทอง (*C. auratus*) และปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) พบว่า แอนติบอดีต่อโปรตีน VTG ของปลาหมอไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน VTG ของปลาไนและปลาทองซึ่งเป็นปลาต่างวงศ์กัน แต่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน VTG ของปลาหมอเทศซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกัน (Ding, Hee, & Lam, 1989) ส่วนการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนนั้นเป็นขั้นตอนศึกษาในระดับการทรานสคริปชัน ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์ mRNA เพื่อนำรหัสพันธุกรรมไปสังเคราะห์โปรตีนต่อไป ดังนั้นการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของ mRNA จะมีความไวและเกิดการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าระดับโปรตีน และด้วยเทคโนโลยี polymerase chain reaction (PCR) ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มชิ้นส่วนหรือปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองโดยเลียนแบบการสังเคราะห์ DNA ตามธรรมชาติ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase, co-enzymes และ co-factors ต่าง ๆ สามารถสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ได้จาก mRNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase หรือ RNA-dependent DNA polymerase ซึ่งมีประโยชน์มากสำหรับการเปลี่ยนตัวอย่างที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนของ DNA แต่เปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA แล้วเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนมากเพื่อตรวจวัดปริมาณหรือระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า reverse transcription (RT)-PCR เป็นวิธีการวัดปริมาณของ mRNA เพื่อบ่งชี้ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายโดยเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิง (reference gene) ได้แก่ ß-actin, ß-tubulin, 18S ribosomal RNA (18S rRNA) และ elongation factor-1α (EF-1 α) เนื่องจากยีนดังกล่าวมีระดับการแสดงออกคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมที่ได้รับ (Arukwe, 2006)

การวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR จึงกลายเป็นวิธีที่มีบทบาทสำคัญในปัจจุบันที่สามารถเข้าใจกลไกการทำงานของเซลล์ขั้นพื้นฐานที่ได้รับผลกระทบจากปนเปื้อนของสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม สามารถทำได้ เช่น 1) semi-quantitative RT-PCR 2) competitive RT-PCR และ 3) real-time RT-PCR ซึ่ง 2 วิธีแรกการทำ PCR ต้องหาจำนวนรอบการเพิ่มปริมาณที่เหมาะสม โดยการเพิ่มจำนวน DNA และปริมาณ DNA ต้นแบบให้มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง (linear relationship) ซึ่งเป็นการวัดการแสดงออกของยีนจากปริมาณของ mRNA ที่อยู่ภายในเซลล์ แต่วิธีนี้อาจใช้เวลานานเนื่องจากต้องหาจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมและในการวัดปริมาณของ DNA ทำได้เมื่อกระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA เสร็จสิ้นก่อนจึงจะสามารถตรวจสอบได้ด้วย gel electrophoresis จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี PCR ขึ้นไปอีกระดับ คือ real time RT- PCR ซึ่งมีความไวสูงสามารถตรวจสอบได้ในระดับ 1 ng/ml หรือต่ำกว่าได้ (Arukwe & Goksoyr, 2003) และติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองได้ตลอดกระบวนการ วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องหารอบที่เหมาะสม สามารถติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ไปพร้อม ๆ กับการเพิ่มปริมาณ โดยใช้สารเรืองแสงเป็นตัวติดตาม (Breljak, Ambriovic-Ristov, Kapitanovic, Cacev, & Gabrilovac, 2005) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค real time RT-PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงจึงเป็นข้อจำกัดในการปฏิบัติสำหรับบางห้องปฏิบัติการ เทคนิค semi-quantitative RT-PCR จึงยังคงเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. T-Personal thermal cycler (Biometra, Germany)
2. Gel documentation and analysis system (Syngene, England)
3. Refrigerate centrifuge (J.P. Selacta, Spain)
4. Universal water thermostat BWT-U (Biosan, England)
5. Shaking incubator (Gallenkamp, U.K.)
6. Autoclave (Prestige Medical, England)
7. i-Mupid gel electrophoresis apparatus (Helixx Technology, Canada)
8. Vortex REAX 2000 (Heidolph, Germany)
9. Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scienctific, USA)
10. Disruptor Genie™ (Scienctific Industries, USA)
11. Micropipette ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 µl
12. Micropipette tips และ filter tips ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 µl
13. Microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5, 1.5 และ 2 ml
14. Isofreeze rack
15. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
16. หลอดแก้วและจานเพาะเชื้อ
17. บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร ปากครีบ กรรไกร ใบมีดและแท่งแก้ว
18. ตู้เลี้ยงปลาขนาดบรรจุน้ำ 6 ลิตร
19. อุปกรณ์ให้ออกซิเจน

เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

3.1.2 สารเคมี

1. 17ß-estradiol (Sigma Aldrich, Germany)
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, Germany)
3. Ethyl 3-aminobenzoate (MS-222) (Sigma Aldrich, Germany)
4. RNA*later* solution (Ambion, Germany)
5. Trizol reagent (Invitrogen, USA)
6. Glass beads acid washed (Sigma Aldrich, Germany)
7. Chloroform (APS finechen, Australia)
8. Isopropanol (2-Propanol) (Sigma Aldrich, Germany)
9. Absolute ethanol (VWR Prolabo, France)
10. RNA storage solution (Ambion, Germany)
11. DNase I (AppliChem, Germany)
12. RevertAid M-MuLV reverse transcriptase, 200 U/µl (Fermentas, USA)
13. Random primer $p(dN)_6$ (4 µg/µl) (Roche Applied Science, Germany)
14. Nuclease free water (GIBCO™ Invitrogen Corperation, USA)
15. 5X reaction buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 $MgCl_2$, 50 mM DDT) (Fermentas, USA)
16. RiboLock RNase inhibitor (Fermentas, USA)
17. GoTaq green master mix, 2X (Promega, USA)
18. 100 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas, Germany)
19. SeaKem® LE agarose (Cambrex Bio Science, USA)
20. 100 bp DNA ladder plus และ 100 bp DNA ladder (Fermentas, Germany)
21. Tris base (Invitrogen™ life technologies, USA)
22. Boric acid (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia)
23. EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) (Amresco, USA)
24. Ethidium bromide 10 mg/ml (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
25. *Escherichia coli* JM109 (Promega, USA)
26. LB broth (Hardy Diagnostics, USA)
27. Bacto agar (Hardy Diagnostics, USA)

28. S.O.C. medium (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
29. Calcium chloride ($Cacl_2$) (Ajax finechem, New Zealand)
30. UltraPure glycerol (Invitrogen™ Life Technologies, USA)
31. Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan)
32. pGEM T-easy vector system (Promega, USA)
33. 2X rapid ligation buffer (Promega, USA)
34. T_4 DNA ligase (Promega, USA)
35. X-gal (Amresco, USA)
36. Isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG)
37. Ampicillin (T.P. Drug Laboratories, Thailand)
38. High speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan)
39. อาหารปลา (Ocean nutrition, protein 41.1%, fat 9%, fiber 2.4%, moisture 14.5%, ash 10.5%)

3.2 การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน GnRH และ VTG

3.2.1 สัตว์ทดลอง

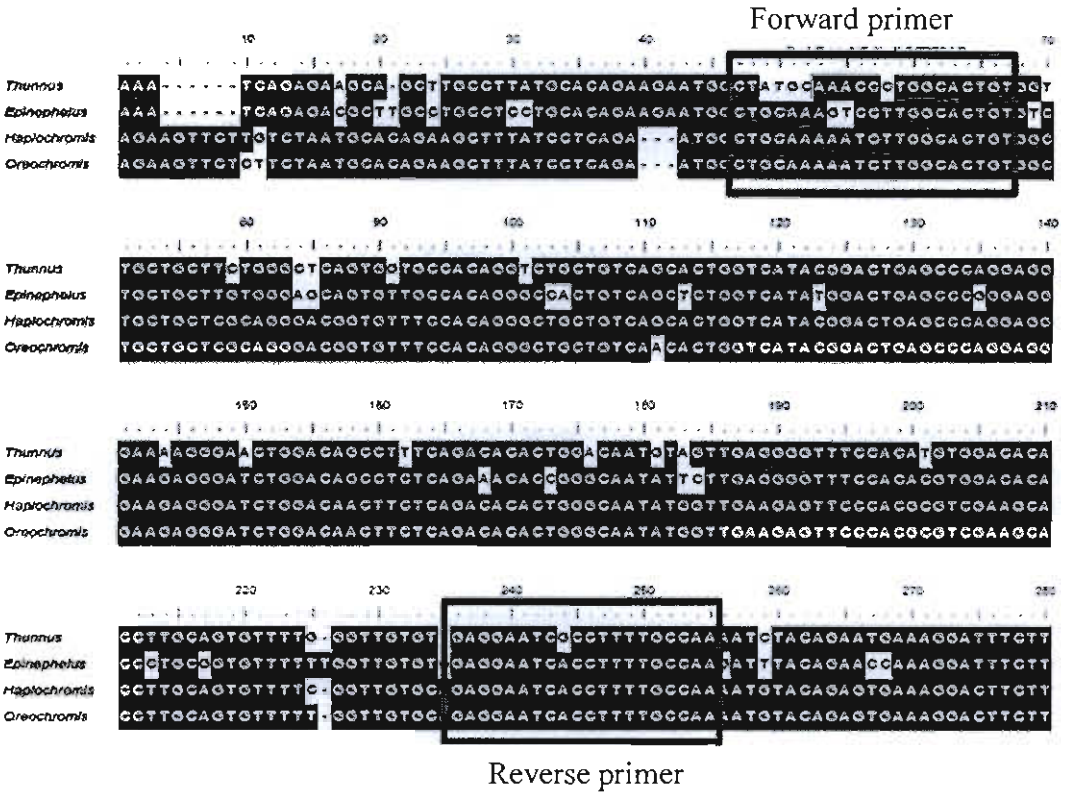
ปลาการ์ตูนส้มขาววัยเจริญพันธุ์เพศเมียที่เพาะพันธุ์และเลี้ยงที่เพอคูล่าฟาร์ม ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี อายุประมาณ 15 เดือน จำนวน 3 ตัวอย่าง แยกสมองและตับรักษาสภาพใน RNA*later* solution

3.2.2 ไพรเมอร์

3.2.2.1 ยีน GnRH

เนื่องจากบนฐานข้อมูล GenBank ยังไม่ปรากฏรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนของยีน GnRH ในกลุ่มของปลาการ์ตูน ดังนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน GnRH ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ (conserve sequences) จากปลากระดูกแข็งที่มีรายงานไว้แล้ว โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเทียบเคียงด้วยโปรแกรม ClustalX 1.81 (Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997) และออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) คาดว่าได้ผลผลิตขนาด 208 คู่เบส (ภาพที่ 3-1)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



ภาพที่ 3-1 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน GnRH ของปลากระดูกแข็งบางชนิดที่รายงานในฐานข้อมูล GenBank

3.2.2.2 ยีน VTG

ทำการศึกษาโดยใช้ degenerate primers ของกลุ่มปลาทะเล คือ VF2 และ VR2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-AAATTCATRGTKYTGCTGAAG-3' และ 5-AGRMASMACCCAGG ARTGVGC-3' ตามลำดับ (Barucca, Canapa, Olmo, & Regoli, 2006)

3.2.2.3 ยีน 18S rRNA

จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S rRNA ขนาด 206 คู่เบสที่ศึกษาไว้โดยไกรฤกษ์ ตันถาวร (2553) จึงนำมาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดสั้นลง ผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดเท่ากับ 102 คู่เบส

278026
5 ม.ค. 56
ว 591/ผ
ค.1

3.2.3 การสกัด RNA

ปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท Invitrogen Life Technologies โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ นำเนื้อเยื่อสมองและตับที่แยกและรักษาสภาพใน RNA*later* solution ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี Trizol จำนวน 300 µl เติม glass beads acid washed จำนวน 15 เม็ดเขย่าด้วยเครื่อง disruptor genie นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม chloroform จำนวน 200 µl เขย่าอย่างแรงให้สารละลายเข้ากันนาน 15 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูดสารละลายจำนวน 100 µl ส่วนบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วทำการตกตะกอน RNA โดยการเติม isopropanol จำนวน 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 3-5 ครั้งแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 75% ethanol จำนวน 500 µl แล้วนำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 5 นาที ดูด ethanol ทิ้งแล้วเติม 75% ethanol จำนวน 500 µl อีกครั้งเพื่อล้างตะกอน RNA แล้วนำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 5 นาที ดูด ethanol ทิ้ง จากนั้น air dry ให้ ethanol ที่อยู่ใน RNA ระเหยจนแห้งโดยใช้เวลา 30 นาที จึงละลายตะกอน RNA ด้วย RNA storage solution จำนวน 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที เติม 10U/µl Dnase I จำนวน 2 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณ RNA ด้วย nanodrop 2000/2000c spectrophotometer

3.2.4 การสังเคราะห์ cDNA

เตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA ในหลอดทดลองผนังบางขนาด 0.2 ml โดยเติม RNA จำนวน 500 ng, random hexamer (4 µg/µl) จำนวน 1 µl แล้วเติม nuclease free water ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 11 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 นาทีด้วยเครื่อง T-personal thermal cycler จากนั้นทำให้เย็นโดยนำมาวางใน isofreeze rack แล้วเติม 5X reaction buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 $MgCl_2$, 50 mM DDT) จำนวน 4 µl, 10 mM dNTPs จำนวน 2 µl และ 40 U RiboLock Rnase inhibitor จำนวน 0.5 µl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 19 µl ด้วย nuclease free water ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 5 นาที แล้วนำออกมาเติม 200 U M-MuLV reverse transcriptase จำนวน 1 µl บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 นาทีและต่อด้วยที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 70°C นาน 10 นาที

3.2.5 การเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีองค์ประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3-1 และ 3-2

ตารางที่ 3-1 สารผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA

สารผสม	ปริมาตรที่ใช้ในแต่ละยีน (µl)		
	GnRH	VTG	18S rRNA
GoTag green master mix	7	7	7
10 µM Primer L*	0.5	1	0.2
10 µM Primer R**	0.5	1	0.2
cDNA	2	2	2
Nuclease free water	3	3	4.6
ปริมาตรรวม	14	14	14

หมายเหตุ * GnRH = GnRH L; VTG = VF2; 18S rRNA = 18S L

** GnRH = GnRH R; VTG = VR2; 18S rRNA = 18S R

ตารางที่ 3-2 อุณหภูมิ เวลา และขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ในส่วนของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA

ยีน	ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR					จำนวนรอบ
	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final-extension	
GnRH	94°C, 3 min	94°C, 30 s	51°C, 20 s	72°C, 20 s	72°C, 5 min	35
VTG	94°C, 3 min	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	72°C, 5 min	35
18S rRNA	94°C, 3 min	94°C, 30 s	58°C, 20 s	72°C, 20 s	72°C, 5 min	30

3.2.6 การตรวจสอบขนาดผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 1% SeaKem LE agarose gel electrophoresis ใน 0.5X Tris Borate EDTA (TBE) buffer เปรียบเทียบกับ DNA marker 100 bp ladder plus จำนวน 250 ng ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml แล้วบันทึกภาพโดยส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

3.2.7 การโคลนบางส่วนของยีน GnRH และ VTG

3.2.7.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cells)

นำ stock เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* JM109 ใส่ลงในอาหาร LB broth จำนวน 400 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ข้ามคืน (12-14 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อจำนวน 400 µl ลงในอาหาร LB broth จำนวน 20 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm จนกระทั่งเชื้อเจริญอยู่ในช่วง mid-log phase (OD_{600} อยู่ในช่วง 0.3-0.4) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2.5-3 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 2 ml ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ จำนวน 1 ml กระจายเซลล์ให้ทั่วเบา ๆ จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ ที่ความเร็ว 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย 100 mM $CaCl_2$ จำนวน 200 µl กระจายเซลล์เบา ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเติมสารละลาย 100 mM $CaCl_2$ ที่มี 10% glyceral จำนวน 80 µl กระจายเซลล์เบา ๆ จะได้เซลล์คอมพีเทนต์

3.2.7.2 การเชื่อมต่อผลผลิต PCR กับพลาสมิด (ligation) และการทรานสฟอร์เมชั่น (transformation)

นำผลผลิต PCR ของแต่ละยีนที่ได้ ตัวอย่างยีนละ 3 ตัวอย่างมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit ตามคู่มือที่แนะนำโดยผู้ผลิต จากนั้นแทรก DNA เข้าสู่พลาสมิด pGEM T-easy vector เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสมระหว่างชิ้น DNA ของยีนเป้าหมายกับพลาสมิดโดยนำผลผลิต PCR จำนวน 2-3.5 µl และพลาสมิด 50 ng จำนวน 0.5 µl มาผสมรวมกันในหลอดทดลองขนาด 1.5 µl เติมสารละลาย 2X rapid ligation buffer จำนวน 5 µl และเอนไซม์ T_4 DNA ligase (3 Weiss unit/µl) จำนวน 1 µl เติม nuclease free water ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 µl

ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน (ประมาณ 14 ชั่วโมง) จะได้ DNA สายผสมระหว่างชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายกับพลาสมิด DNA จากนั้นจึงถ่ายฝาก DNA สายผสมเข้าในเซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* JM 109 โดยการนำ DNA สายผสมจำนวน 2 µl ผสมกับเซลล์คอมพีเทนต์จำนวน 50 µl ผสมให้เข้ากันบ่มในน้ำแข็ง 20 นาที แล้วนำไป heat shock ทันทีที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 45 วินาที แล้วแช่น้ำแข็งอย่างรวดเร็ว นาน 5 นาที เติมอาหารสูตร LB broth หรือ S.O.C. medium (อุณหภูมิ 37 °C) จำนวน 500 µl แล้วไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่ได้เจริญบนอาหารแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 µg/ml, X-gal ความเข้มข้น 40 µg/ml และ IPTG ความเข้มข้น 4 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง

3.2.7.3 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมและการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวโดยแตะด้วยไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในสารผสมของปฏิกิริยา PCR และทำ replica plate ให้เชื้อเจริญในอาหาร LB agar ส่วนปฏิกิริยา PCR เพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ M13 F/R จากนั้นตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis จะทราบว่าโคโลนีใดที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม จึงนำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ DNA สายผสมจากการ replica plate ให้เจริญใน LB broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16-20 ชั่วโมง จึงทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ high speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) ตามคู่มือที่แนะนำโดยผู้ผลิต จากนั้นตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยทำในปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วยพลาสมิดลูกผสมจำนวน 8 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Eco*RI (10 U/µl) จำนวน 1 µl, 10X *Eco*RI buffer จำนวน 2 µl แล้วปรับปริมาตรด้วย nuclease free water บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.2.7.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่ตรวจสอบได้ในข้อ 1.7.3 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท First Base Laboratories SdnBdh (Malaysia) จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.0 (Hall, 1999) เปรียบเทียบความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ต (http://blast.ncbi.nlm .nih.gov/blast.cgi)

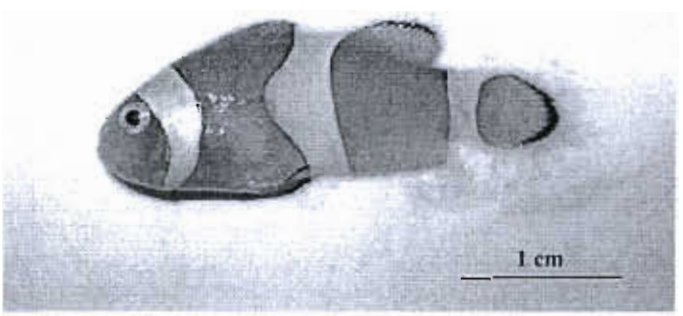
3.3 การศึกษาผลของ 17ß-estradiol ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG

3.3.1 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน GnRH และ VTG ของปลาการ์ตูนส้มขาว แล้วจากการศึกษาในขั้นต้น ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลาการ์ตูนส้มขาวโดยให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดสั้นลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้โปรแกรม Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) คู่ไพรเมอร์ใหม่จะถูกนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้ในส่วนของยีน GnRH และ VTG คือ rtGnRH L/R และ rtVTG L/R ตามลำดับ ให้ผลผลิต PCR ขนาด 145 และ 112 คู่เบส ตามลำดับ

3.3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนอายุประมาณ 3 เดือน จำนวน 120 ตัว มีความยาวมาตรฐาน 19.4±0.1 mm ความยาวเหยียด 24.9±0.2 mm การทดสอบทำ 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ปลาจำนวน 60 ตัว โดยแบ่งปลาเลี้ยง 3 ตัวต่อตู้ รวมทั้งสิ้น 20 ตู้ แต่ละตู้บรรจุน้ำทะเลธรรมชาติจำนวน 6 ลิตร โดยน้ำทะเลนำมาจากช่องแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี แล้วนำมาพักในบ่อกักเก็บน้ำเค็มของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (รายงานของกรมควบคุมมลพิษ ปี พ.ศ. 2552 ในสถานีตรวจวัดช่องแสมสาร พบว่า น้ำทะเลมีคุณภาพดี) โดยน้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองมีความเค็ม 25-27 ppt อุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยประมาณ 27-28 °C ให้อาหารปลาวันละ 2 มื้อ ทั้งนี้ทำการปรับสภาพของปลาก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกว่าปลาจะกินอาหารปกติ สถานที่ทดลองคือ โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



ภาพที่ 3-2 ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ใช้ในการศึกษา

ภายหลังปลาการ์ตูนส้มขาวปรับสภาพได้ ทำการทดสอบให้ปลาในแต่ละตู้ได้รับสารละลาย E_2 ด้วยวิธีการแช่ โดยผสมสารละลายฮอร์โมน E_2 (ละลายฮอร์โมน E_2 ด้วย DMSO เป็น 100 µg/ml stock solution) กับน้ำทะเลที่เลี้ยงปลาให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.1 และ 1.0 µg/l และเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 2 วัน เป็นจำนวน 15% ของปริมาตรน้ำทั้งหมดและเติมน้ำที่มีสารละลาย E_2 ความเข้มข้นเท่าเดิมลงไปแทน ช่วงเวลาที่ทดสอบแบ่งออกเป็น 6 ช่วง คือ 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้แช่ในสารละลายกับ E_2 ที่เวลา 0 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาสลบปลาด้วยสารละลาย MS-222 (ethyl 3-aminobenzoate) ความเข้มข้น 100 mg/l จากนั้นแยกเนื้อเยื่อสมองและเนื้อเยื่อตับเก็บรักษาสภาพใน RNA*later* solution ที่อุณหภูมิ -20 °C ส่วนน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงปลาหลังจากทำการทดลองตั้งทิ้งไว้ 10 วัน เพื่อให้ E_2 สลายตัวหมด ก่อนปล่อยลงสู่บ่อน้ำทิ้ง

3.3.3 การวัดระดับการแสดงออกของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA

ทำการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อสมองและตับของปลาการ์ตูนส้มขาวแยกแต่ละตัวอย่าง จากนั้นสังเคราะห์เป็น cDNA โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 และ 3.2.4 ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA จากเนื้อเยื่อสมองโดยใช้คู่ไพรเมอร์ rtGnRH L/R ที่จำเพาะต่อยีน GnRH โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 14 µl ที่ประกอบด้วย cDNA จำนวน 2 µl, 2X GoTaq green mastermix (reaction buffer pH 8.5, 400 µM dNTPs, 3 mM $MgCl_2$) จำนวน 7 µl ไพรเมอร์ 10 µM rtGnRH L/R อย่างละ 0.5 µl ปรับปริมาตรให้ครบ 14 µl ด้วย nuclease free water จากนั้นเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอน pre-denuturing ที่ 94 °C นาน 3 นาที ก่อนเข้าสู่รอบปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ที่ขั้นตอน denaturing ที่ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่ 50 °C นาน 20วินาที และ extension ที่ 72 °C นาน 20 วินาที และ final-extension ที่ 72 °C นาน 5 นาที ในขณะเดียวกันตัวอย่าง cDNA เดียวกันนี้นำมาทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนควบคุม 18S rRNA โดยมีองค์ประกอบ ขั้นตอน และสภาวะการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับยีน GnRH แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็น 10 µM 18S R/L อย่างละ 0.2 µl และเพิ่ม nuclease free water ให้ปริมาตรครบ 14 µl แทน

การเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน VTG ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อตับด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ rtVTG L/R โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 14 µl ที่ประกอบด้วย cDNA จำนวน 2 µl, 2X GoTag green mastermix (reaction buffer pH 8.5, 400 µM dNTPs, 3 mM $MgCl_2$) จำนวน 7 µl ไพรเมอร์ 10 µM 112rtVtg_L/R อย่างละ1 µl ปรับปริมาตรให้ครบ 14 µl ด้วย nuclease free water จากนั้นเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอน pre-denuturing ที่ 94 °C นาน 3 นาที

ก่อนเข้าสู่รอบปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ที่ขั้นตอน denaturing ที่ 94 °C นาน 20 วินาที annealing ที่ 47 °C นาน 20 วินาที และ extension ที่ 72 °C นาน 15 วินาที และ final-extension ที่ 72 °C นาน 5 นาที ในขณะเดียวกันตัวอย่าง cDNA เดียวกันก็ทำการเพิ่มปริมาณยีนควบคุม 18S rRNA โดยมีองค์ประกอบ ขั้นตอนและสภาวะการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับยีน VTG แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็น 10 µM 18S R/L อย่างละ 0.2 µl และเพิ่ม nuclease free waterให้ครบ 14 µl

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ของแต่ละยีนทำวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis โดยนำผลผลิต RT-PCR จำนวน 3 µl เคลื่อนที่ใน 1% SeaKem LE agarose ใน 0.5X TBE buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml นาน 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 10 นาที จึงส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation และวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ด้วยโปรแกรม Gene Tool ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนคำนวณได้จากสูตร

Expression ratio = ความเข้มของแถบ DNA ของยีนเป้าหมาย / ความเข้มของแถบ DNA ของยีนควบคุม

3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

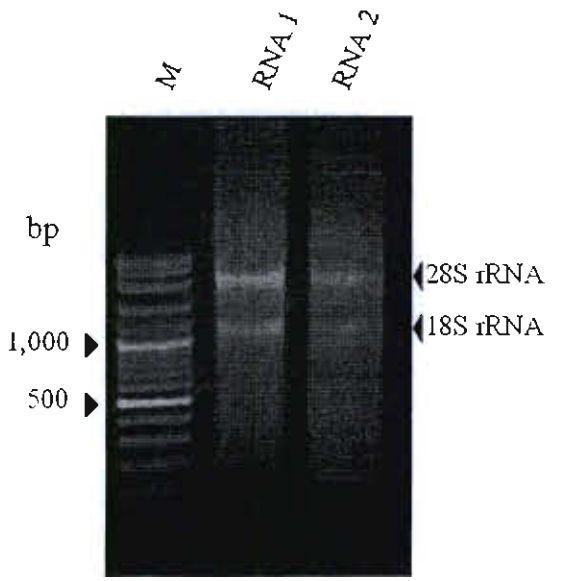
ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG จากค่า expression ratio คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อน (standard error) ของแต่ละตัวในกลุ่มทดลองของปลาที่ได้รับ E_2 ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นระยะเวลา 3, 6 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้แช่ในสารละลายกับ E_2 ที่เวลา 0 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การโคลนบางส่วนของยีน GnRH และ VTG

4.1.1 การเตรียม RNA

ผลจากการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อสมองและตับของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วย Trizol reagent แล้วทำการวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายหลังการย้อมด้วย ethidium bromide และส่องภายใต้แสง UV ปรากฏแถบ RNA จำนวน 2 แถบ คือ 28S rRNA และ 18S rRNA ตามลำดับ ซึ่งสัดส่วนความเข้มของแถบ 28S rRNA จะมีความเข้มมากกว่า 18S rRNA ประมาณ 2 เท่า (ภาพที่ 4-1; แสดง 2 ตัวอย่าง)



ภาพที่ 4-1 Agarose gel electrophoresis ของแถบ RNA (M=DNA มาตรฐาน 100 bp ladder plus)

4.1.2 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR

4.1.2.1 ยีน GnRH

เมื่อทำการเพิ่มจำนวน cDNA บริเวณยีน GnRH จากเนื้อเยื่อสมองและตับของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยคู่ไพรเมอร์ GnRH L/R ซึ่งได้ออกแบบขึ้นใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีน GnRH ให้ผลผลิตขนาดประมาณ 200 คู่เบส (ภาพที่ 4-2) จากนั้นจึงนำผลผลิต RT-PCR ของยีน GnRH ที่ได้เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดและเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* แล้วจึงสกัดพลาสมิดเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่โคลนได้มีขนาด 208 คู่เบส จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนสูงสุด (identity) กับ mRNA seabream-type GnRH ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลา burton's mouthbrooder (*Haplochromis burtoni*) ปลาไหลนา (*Monopterus albus*) และปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) ที่ 84% (179/211), 84% (180/212), 84% (170/202) และ 81% (164/202) ตามลำดับ (ข้อมูล ณ วันที่ 12 มี.ค. 2553) (ภาพที่ 4-3 และตารางที่ 4-1) เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีน GnRH จาก genomic DNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวพบว่าให้ผลผลิตขนาด 296 คู่เบส ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับส่วนที่แปลรหัสเป็น mRNA แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 ถึง 134 และ 223 ถึง 296 เป็นส่วน exon และตำแหน่งที่ 135 ถึง 222 เป็นส่วนของ intron (ภาพที่ 4-4) และทำการแปลรหัส mRNA ให้เป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 68 ตัว จากนั้นนำไปเปรียบเทียบความเหมือนด้วยโปรแกรม protein BLAST พบว่า มีความเหมือนสูงสุด 75% กับ seabream-type GnRH ของปลานิล (GenBank accession no. BAC56849) (ภาพที่ 4-5)

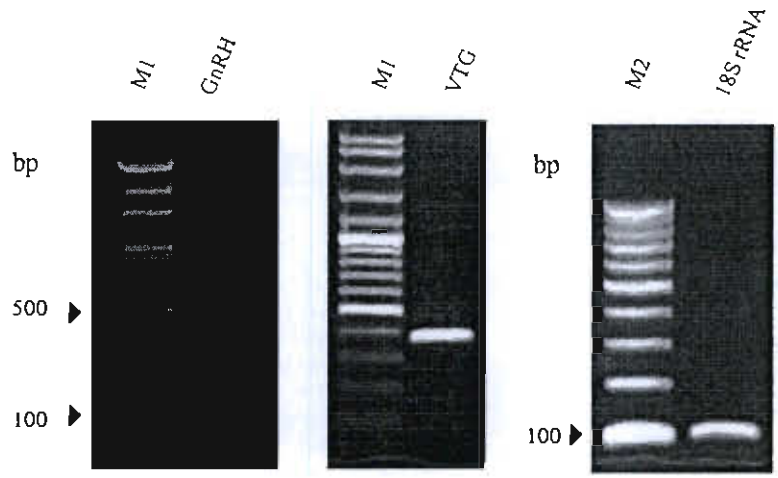
4.1.2.2 ยีน VTG

เมื่อทำการเพิ่มจำนวน cDNA บริเวณยีน VTG จากเนื้อเยื่อตับของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยคู่ไพรเมอร์ VF2/VR2 (Barucca et al., 2006) ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส (ภาพที่ 4-2) จากนั้นจึงทำการโคลนผลผลิต RT-PCR เช่นเดียวกับยีน GnRH พบว่ายีน VTG ที่ได้มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากัน 400 คู่เบส จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนสูงสุดกับยีน VTG ของปลา Japanese whiting (*Sillago japonica*) ปลา white perch *(Morone Americana)* ปลา barfin flounder (*Verasper moseri*) และปลา goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) โดยมีความเหมือนสูงสุด 77% (316/408), 77% (317/410), 77% (319/412) และ 76% (310/404) ตามลำดับ

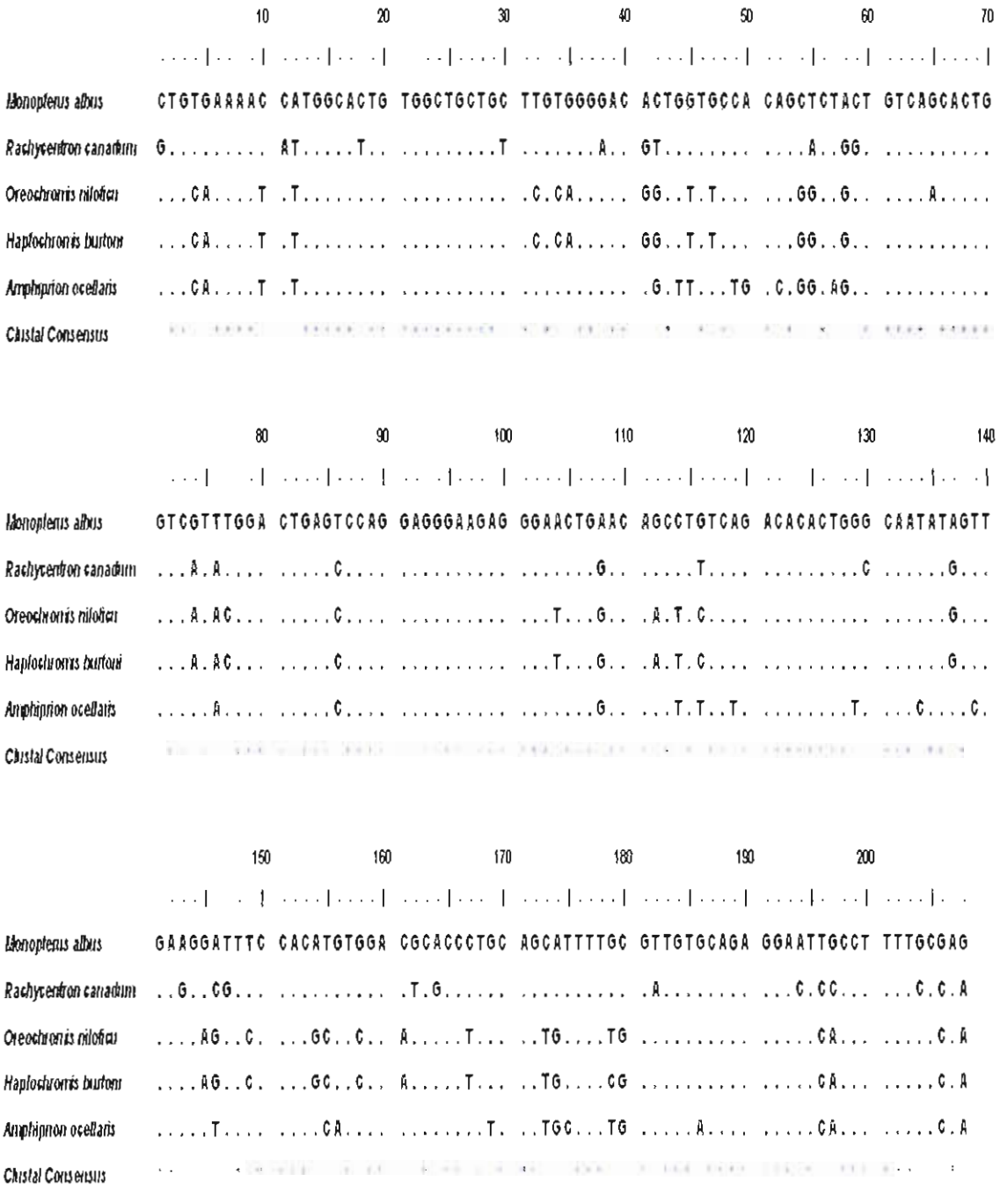
(ข้อมูล ณ วันที่ 21 พ.ค. 2553) (ภาพที่ 4-6 และตารางที่ 4-1) และจากการแปลรหัส mRNA เป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 133 ตัว จากนั้นนำไปเปรียบเทียบความเหมือนด้วยโปรแกรม protein BLAST พบว่า มีความเหมือนสูงสุด 69% กับโปรตีน VTG A ของปลา *Ctenolabrus rupestris* (GenBank accession no. ABS53014) (ภาพที่ 4-7)

4.1.2.3 ยีน 18S rRNA

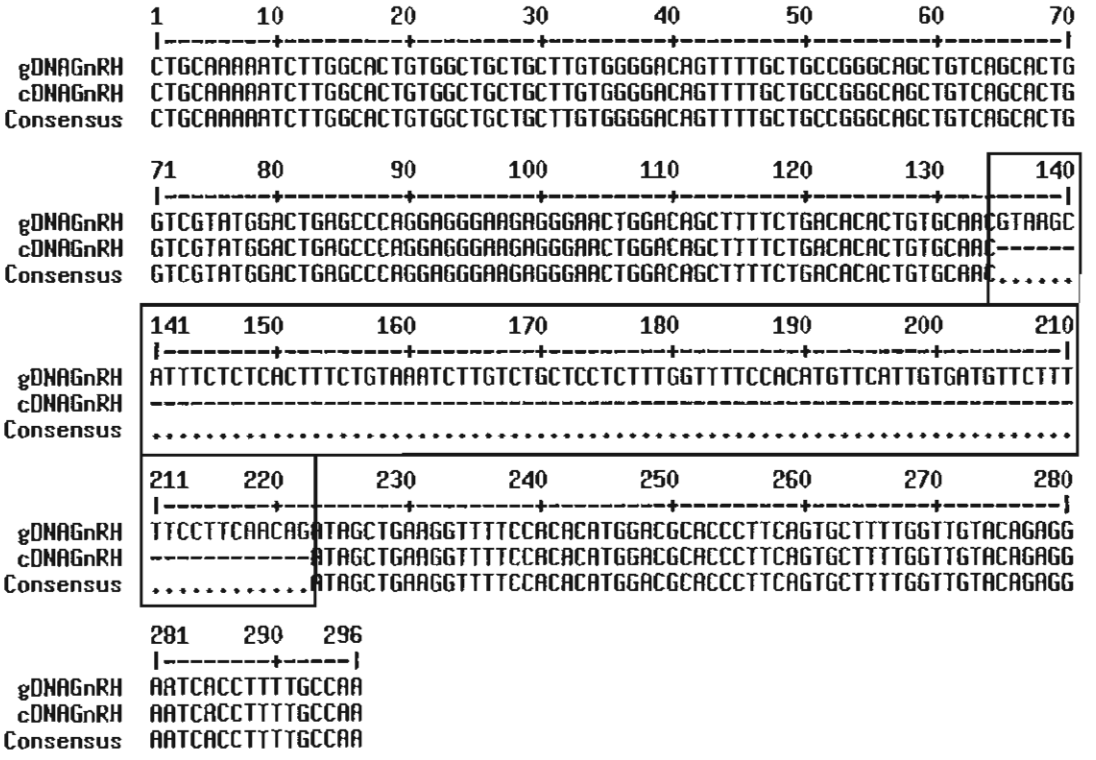
เมื่อทำการเพิ่มจำนวน cDNA บริเวณยีน 18S rRNA จากเนื้อเยื่อสมองด้วยคู่ไพรเมอร์ 18S_L/R ซึ่งได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวขนาด 206 คู่เบส ได้ผลผลิตขนาด 102 คู่เบส (ภาพที่ 4-2) และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือน 100% จากการเปรียบเทียบ 102 คู่เบส (ภาพที่ 4-8 และตารางที่ 4-1) กับยีน 18S rRNA ของปลาหลายชนิด (แสดง 4 ชนิด) เช่น ปลา Indian major carp (*Cirrhinus mrigala*) ปลา Indian mahseer (*Tor khudree*) ปลา copper mahseer (*Neolissochilus hexagonolepis*) และปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) เป็นต้น (ข้อมูล ณ วันที่ 21 พ.ค. 2553)



ภาพที่ 4-2 Agarose gel electrophoresis ของผลผลิต RT-PCR บริเวณยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวขนาด 208, 400 และ 102 คู่เบส ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp ladder plus (M1) และ 100 bp ladder (M2)



ภาพที่ 4-3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน GnRH จำนวน 208 นิวคลีโอไทด์ของปลา *Amphiprion ocellaris, Monopterus albus*, *Rachycentron canadum*, *Oreochromis niloticus* และ *Haplochromis burtoni* โดยตัวเลขด้านบนระบุตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์สัญลักษณ์จุด (.) หมายถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกันและดอกจัน (*) หมายถึง consensus sequences

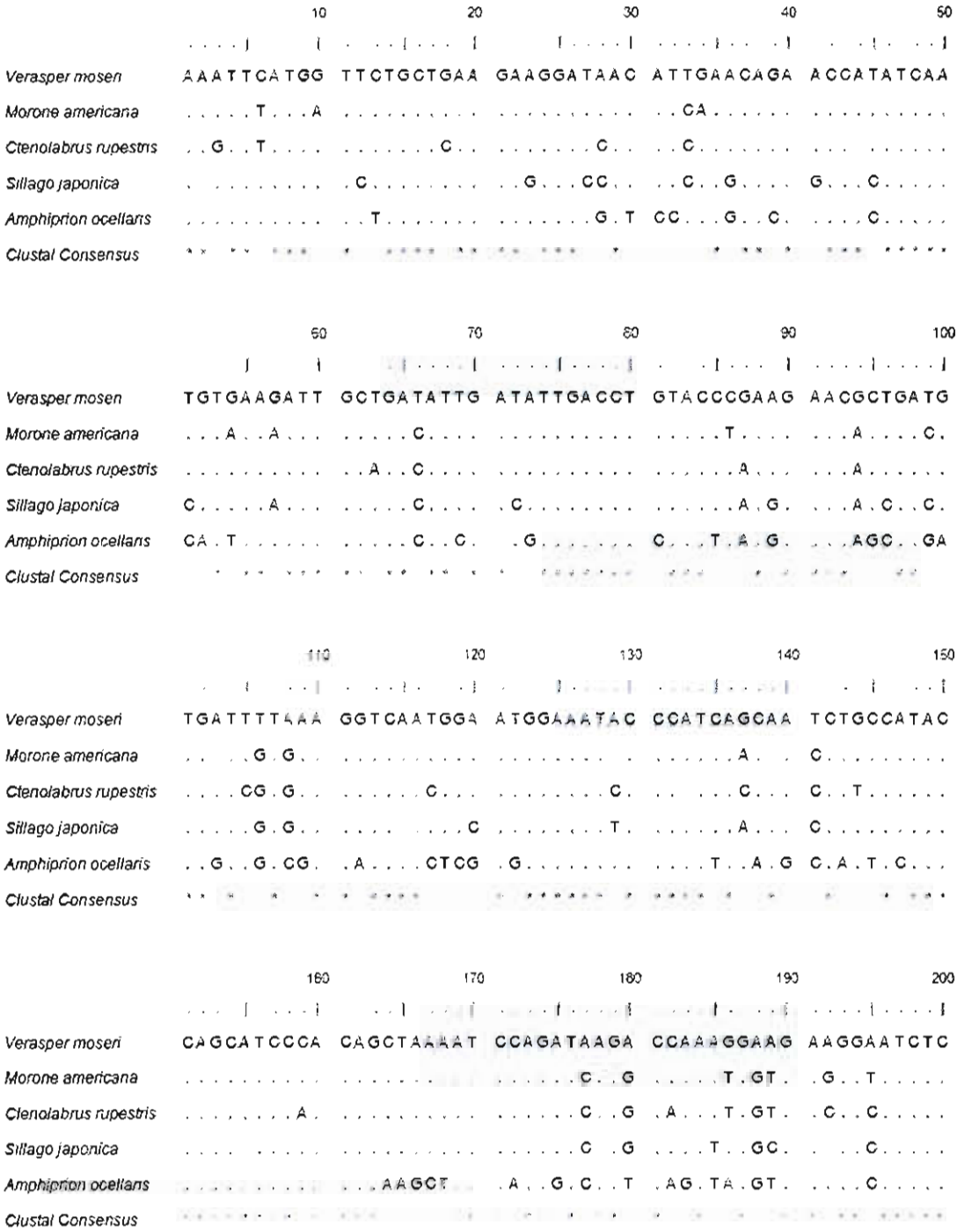


ภาพที่ 4-4 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH จาก genomic DNA (gDNAGnRH) และ cDNA (cDNAGnRH) โดยตำแหน่งที่ 1 ถึง 134 และ 223 ถึง 296 เป็นส่วน exon และตำแหน่งที่ 135 ถึง 222 เป็นส่วนของ intron (กรอบสี่เหลี่ยม)

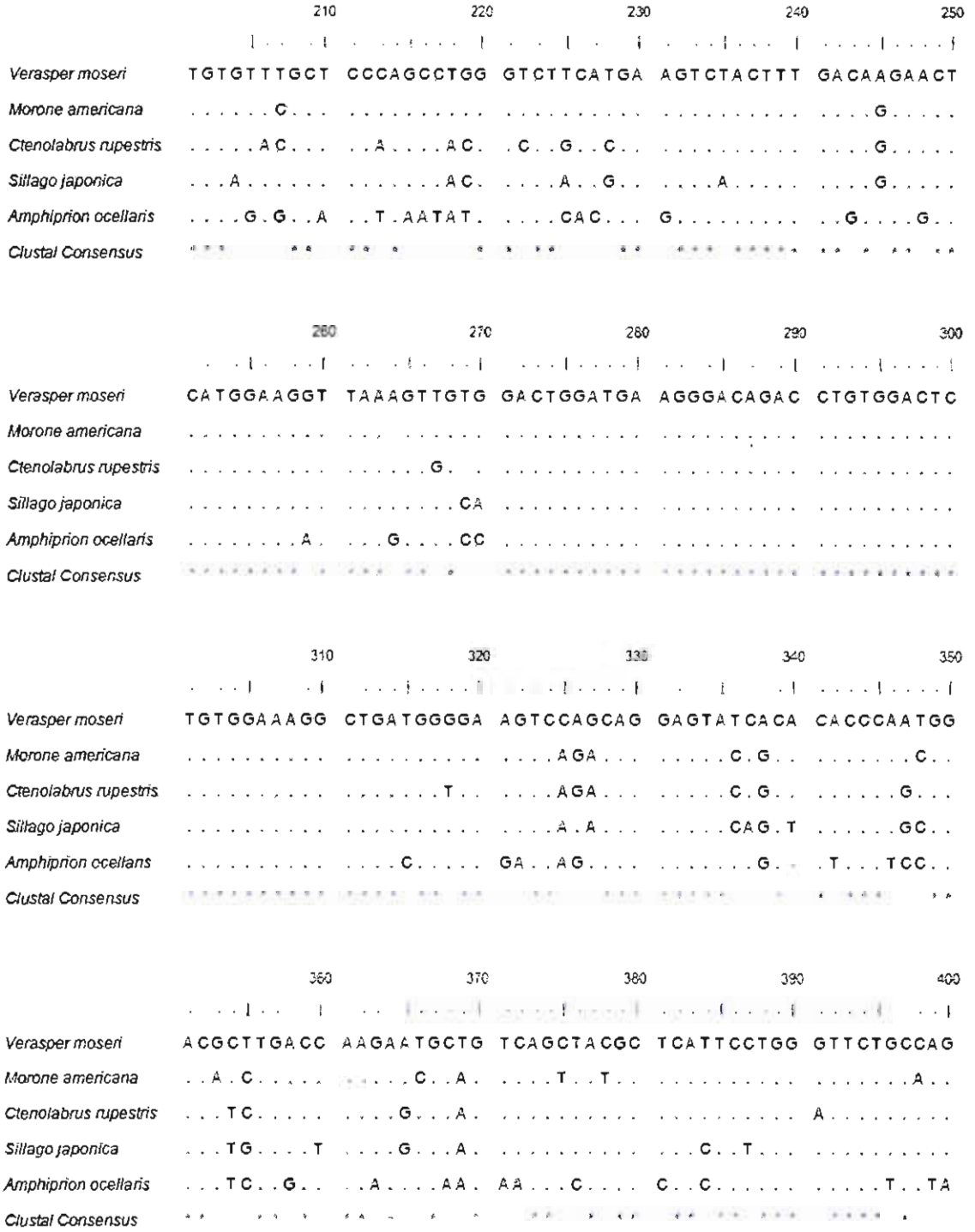
```
                          10        20        30        40        50
                          .   .   .|   .   .|   .   .   .|   .   .   .|   .   .   .|   .   .   .|   .   .   .|   .   .   .|   .   .   .|
Amphiprion ocellaris      AKILALWLLL VGTVLLPGSC QHWSYGLSPG GKRELDSFSD TLCNIAEGFP
Oreochromis niloticus     .......... A...FPQ.C. .......... ...D..N... ..G.MV.E..
Haplochromis burtoni      .......... A...FPQ.C. .......... ...D..N... ..G.MV.E..
Verasper variegatus       V.T.SV.... ...LVPQHC. .......... .......L.Q ..G.VV.E..
Verasper moseri           KTLSVWL..V GTL.PQHCCQ HWSYGLSPG. KRQLDSLSQT LGNVVE.FPR
Epinephelus fasciatus     ..S...C..I ..A..PQ.H. .......... ...D...L.. .PG..P....

                          60
                          .   .   .|   .   .|   .   .   .|   .
Amphiprion ocellaris      HMDAPFSAFG CTEESPFA
Oreochromis niloticus     RVE..C.V.. .A......
Haplochromis burtoni      RVE..C.V.. .A......
Verasper variegatus       RV.S.C.VL. GA......
Verasper moseri           VDSPCSVLG. AE.SPFA
Epinephelus fasciatus     .V.T.C.V.. .V......
```

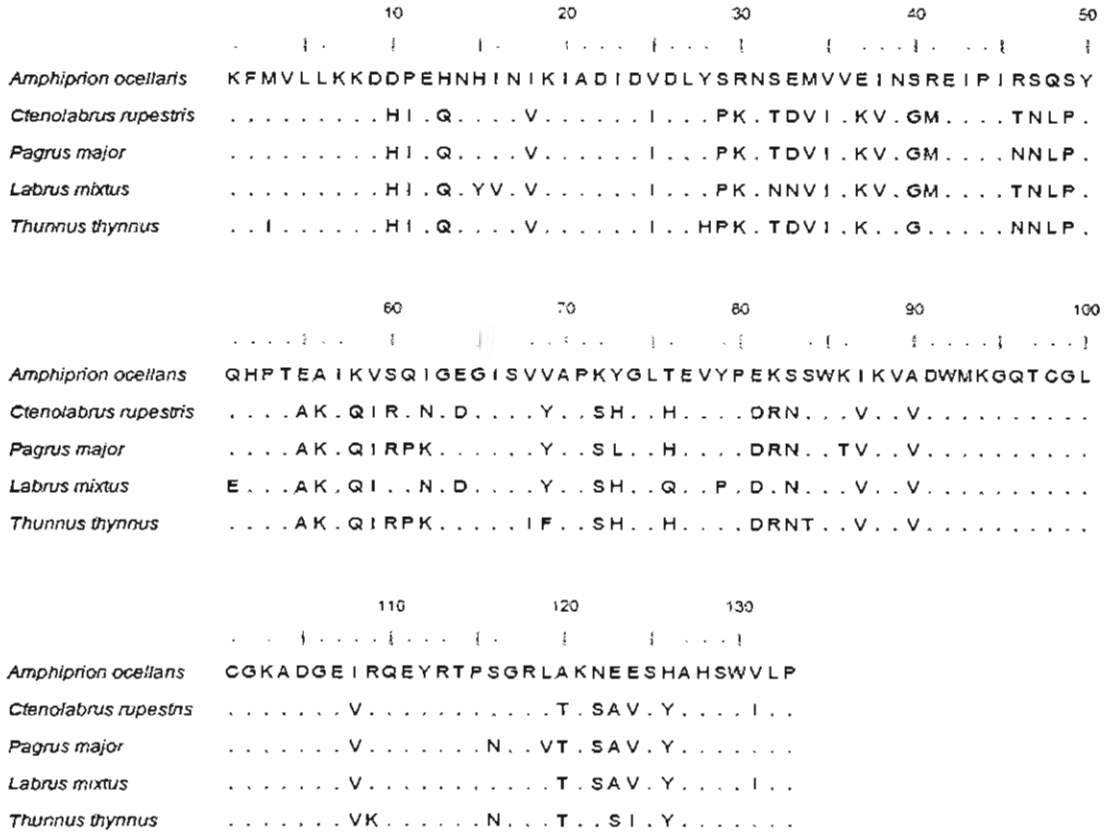
ภาพที่ 4-5 การเคียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของ GnRH ของปลา *Amphiprion ocellaris*, *Oreochromis niloicus*, *Haplochromis burtoni*, *Versper variegatus*, *Versper moseri* และ *Epinephelus fasciatus* สัญลักษณ์จุด (.) หมายถึงลำดับกรดอะมิโนชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน



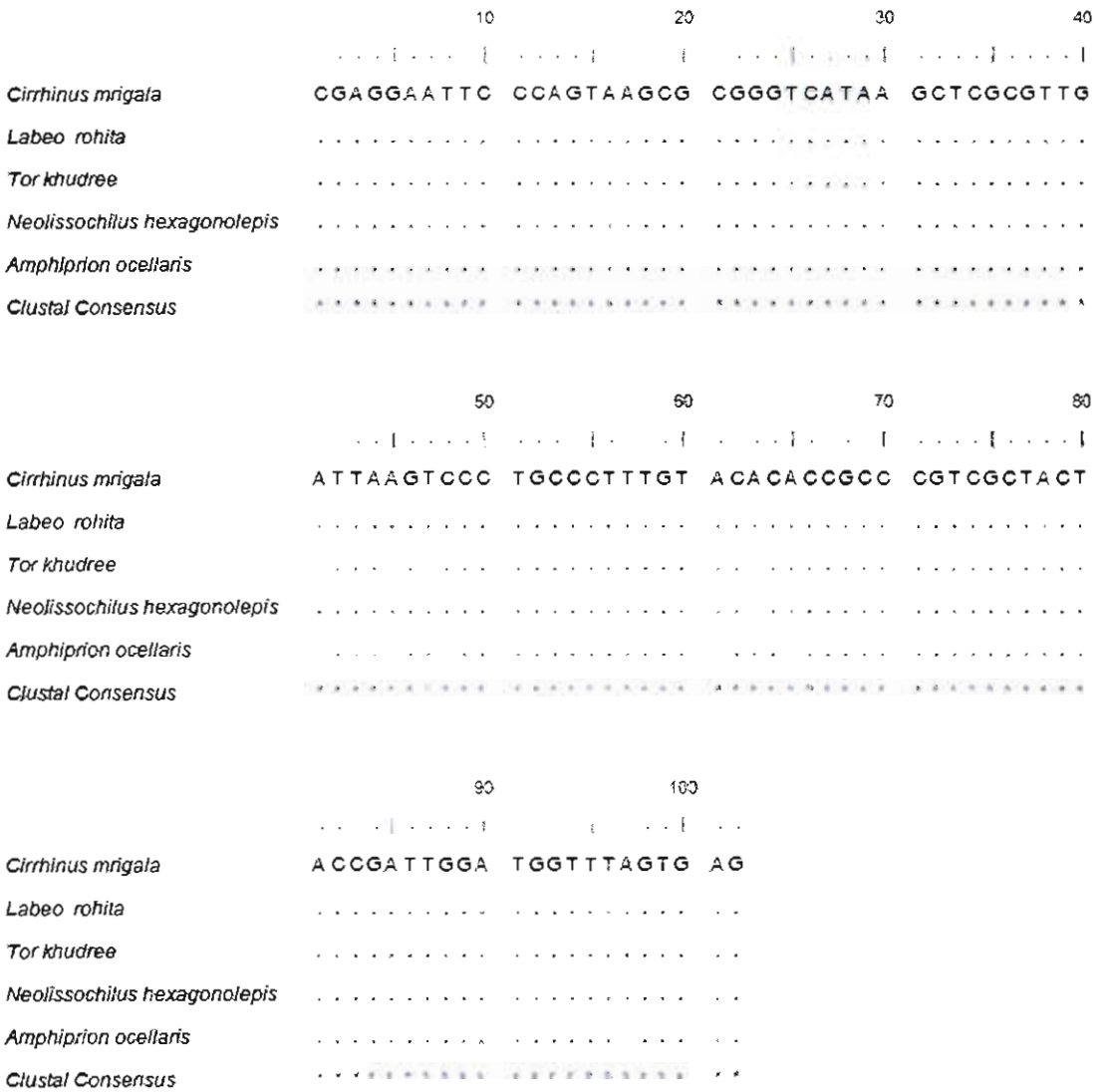
ภาพที่ 4-6 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน VTG จำนวน 400 นิวคลีโอไทด์ของปลา *Amphiprion ocellaris*, *Sillago japonica*, *Morone americana*, *Verasper moseri* และ *Ctenolabrus rupestris* โดยตัวเลขด้านบนระบุตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ สัญลักษณ์จุด (.) หมายถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกันและดอกจัน (*) หมายถึง consensus sequences (ต่อหน้าถัดไป)



ภาพที่ 4-6 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน VTG (ต่อ)



ภาพที่ 4-7 การเคียบเคียงลำดับกรดอะมิโนของ VTG ของปลา *Amphiprion ocellaris*, *Ctenolabrus rupestris*, *Pagrus major*, *Labrus mixtus* และ *Thunnus thynnus* ลักษณ์จุด (.) หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน



ภาพที่ 4-8 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 18S rRNA จำนวน 102 นิวคลีโอไทด์ของปลา *Amphiprion ocellaris*, *Cirrhinus mrigala*, *Tor khudree*, *Neolissochilus hexagonolepis* และ *Labeo rohita* โดยตัวเลข ด้านบนระบุตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์สัญลักษณ์จุด (.) หมายถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกันและดอกจัน (*) หมายถึง consensus sequences

ตารางที่ 4-1 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน GnRH, VTG และ 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล GenBank

Gene	GenBank accession no.	Description	Identities (%)
GnRH	AB101665	*Oreochromis niloticus* mRNA for seabream-type gonadotropin-releasing hormone precursor	84
	U31865	*Haplochromis burtoni* gonadotropin-releasing hormone mRNA	84
	AY858056	*Monopterus albus* pejerrey-type gonadotropin-releasing hormone precursor	84
	AY677175	*Rachycentron canadum* seabream-type gonadotropin-releasing hormone precursor	81
VTG	AB081299	*Sillago japonica* mRNA for vitellogenin	77
	DQ020120	*Morone americana* vitellogenin A mRNA	77
	AB181833	*Verasper moseri* Vg A mRNA for vitellogenin	77
	EU011580	*Ctenolabrus rupestris* lipovitellin (VTG Aa) mRNA	76
18S rRNA	GU967675	*Cirrhinus mrigala* voucher Cm06 CG-NBFGR-LKO 18S ribosomal RNA gene	100
	GU967674	*Labeo rohita* voucher Lr11 CG-NBFGR-LKO 18S ribosomal RNA gene	100
	GU568370	*Tor khudree* voucher Tk06 CG-NBFGR-LKO 18S ribosomal RNA gene	100
	GU568381	*Neolissochilus hexagonolepis* voucher Nh06 CG-NBFGR-LKO 18S ribosomal RNA gene	100

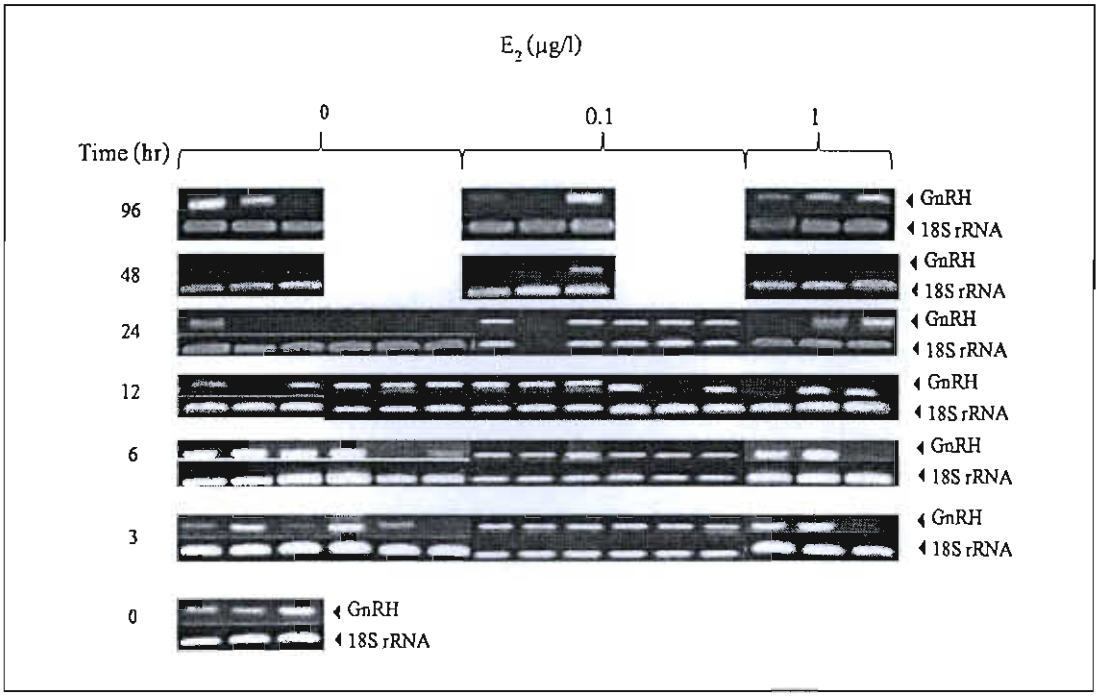
2. การศึกษาผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG

2.1 ยีน GnRH

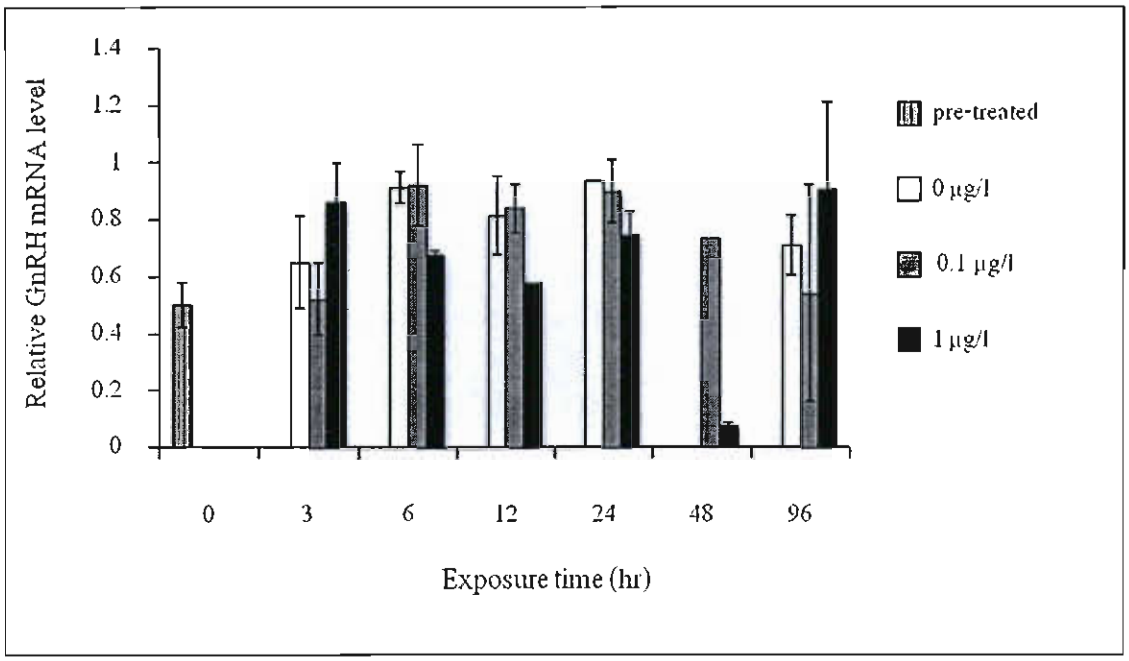
จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน GnRH ที่เนื้อเยื่อสมองในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนอายุประมาณ 3 เดือนจำนวน 6 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง ที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 μg/l เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับปลาก่อนทำการทดลอง (n=3) ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนของยีนควบคุม 18S rRNA ได้ความเข้มของแถบ DNA ใกล้เคียงกัน แต่มีบางกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนทั้งในส่วนของยีน 18S rRNA และยีน GnRH ได้ โดยที่ความเข้มข้น 0 μg/l ที่เวลา 48 ชั่วโมง ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน GnRH ได้ และที่ระดับความเข้มข้น 1 μg/l ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลผลิต PCR ในส่วนของยีน GnRH ภายหลังจากการทำ agarose gel electrophoresis เกิดแถบ DNA จาง (ภาพที่ 4-9; แสดงจำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ) ดังนั้นในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน GnRH จึงไม่ได้นำข้อมูลที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 1 μg/l ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน GnRH ที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาดังกล่าวข้างต้น ทำโดยเปรียบเทียบระดับความเข้มของแถบ DNA ระหว่างยีน GnRH ต่อยีน 18S rRNA ของแต่ละตัวอย่างในแต่ละกลุ่มการทดลอง แล้วนำค่าเฉลี่ย±SEM มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปัจจัยที่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH ทั้ง 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับ E_2 พบว่า E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1 μg/l และระยะเวลาที่ปลาการ์ตูนส้มขาวได้รับ E_2 ติดต่อกันนาน 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH ทุกกลุ่มมีระดับการแสดงออกของยีน GnRH ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาก่อนได้รับ E_2 (pre-treated ที่ 0 ชั่วโมง) (ภาพที่ 4-10)

เมื่อพิจารณาแนวโน้มระดับการแสดงออกของยีน GnRH ในกลุ่มปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ความเข้มข้น 1 μg/l ที่เวลา 3 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของยีน GnRH เพิ่มมากขึ้นและลดลงที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มที่ได้รับ E_2 ความเข้มข้น 0 และ 0.1 μg/l



ภาพที่ 4-9 Agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ในส่วนของยีน GnRH และยีน 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 เป็นเวลานาน 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 0 µg/l (n= 3, 6, 6, 6, 6, 3 และ 3), 0.1 µg/l (n= 3, 6, 6, 6, 5, 3 และ 3) และ 1 µg/l (n= 3, 6, 6, 6, 6, 3 และ 3) ตามลำดับ



ภาพที่ 4-10 ระดับการแสดงออกของยีน GnRH ที่เนื้อเยื่อสมองของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน ที่ได้รับ E_2 ด้วยวิธีแช่ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยแสดงค่าเฉลี่ย±SEM ของแต่ละกลุ่มการทดลอง

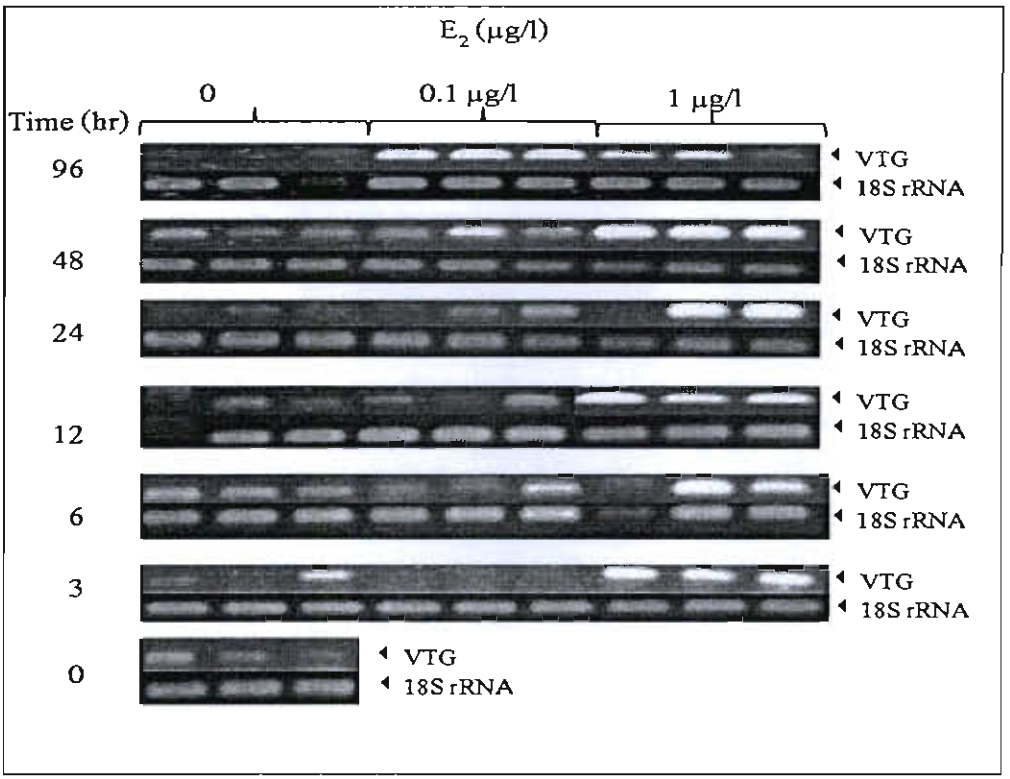
หมายเหตุ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

2.2 ยีน VTG

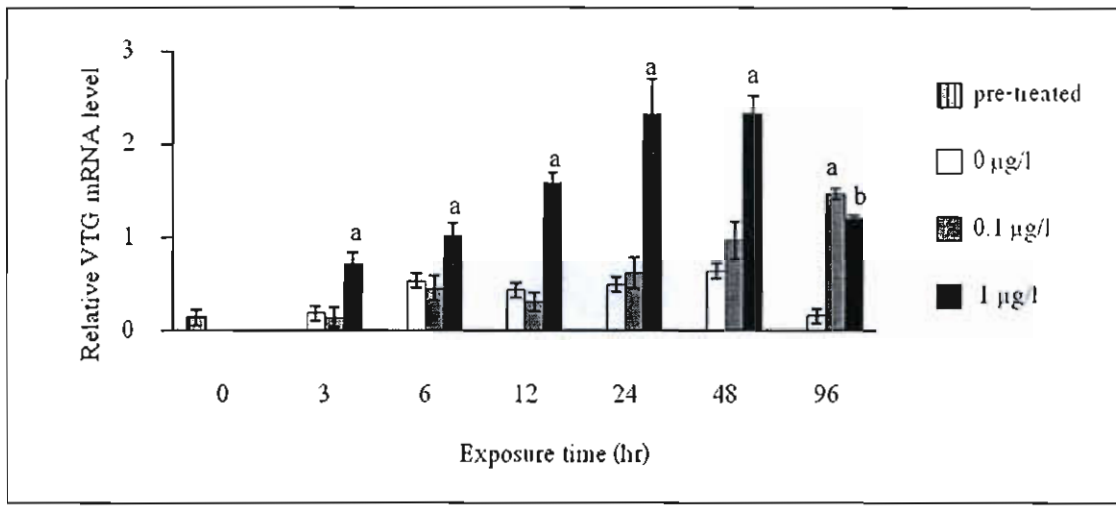
จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน VTG ที่เนื้อเยื่อดับในปลาการ์ดูนส้มขาววัยอ่อนอายุประมาณ 3 เดือนจำนวน 3 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง ที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1 μg/l เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCRพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนในส่วนของยีนควบคุม 18S rRNA และในส่วนของยีน VTG ได้ (ภาพที่ 4-11)

ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน VTG ในปลาการ์ดูนส้มขาววัยอ่อนอายุประมาณ 3 เดือน ที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1 μg/l เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบระดับความเข้มของแถบ DNA ระหว่างยีน VTG ต่อยีน 18S rRNA และนำค่าเฉลี่ย±SEM มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปัจจัยที่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน VTG ทั้ง 2 ปัจจัย คือ ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1 μg/l และเวลาที่ได้รับ E_2 ติดต่อกันนาน 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาและระดับความเข้มข้นที่ปลาการ์ดูนส้มขาววัยอ่อนได้รับ E_2 มีผลชักนำระดับการแสดงออกของยีน VTG ให้เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4-12)

เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีน VTG ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1 μg/l มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อปลาการ์ดูนส้มขาววัยอ่อนได้รับ E_2 เป็นระยะเวลาติดต่อกันนานขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง โดยกลุ่มปลาการ์ดูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 μg/l เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (E_2 0 μg/l) เป็นระยะเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกของยีน VTG ค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อได้รับ E_2 ครบ 48 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้นเป็น 1.5 เท่า และเมื่อครบ 96 ชั่วโมง จะมีระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้น 8.8 เท่า แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ E_2 (ภาพที่ 4-12) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 1 μg/l เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าปลาการ์ดูนส้มขาววัยอ่อนมีระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้น 3.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ E_2 และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับ E_2 เป็นเวลานาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แต่มีระดับการแสดงออกค่อนข้างคงที่เมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงเมื่อครบระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-12) และทุกระยะเวลา (3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง) แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ E_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 4-11 Agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ในส่วนของยีน VTG และยีน 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นเวลานาน 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (n=3 ต่อกลุ่มการทดลอง)



ภาพที่ 4-12 ระดับการแสดงออกของยีน VTG ที่เนื้อเยื่อตับของปลาการ์ดูนส้มขาวัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ด้วยวิธีแช่ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง โดยแสดงค่าเฉลี่ย±SEM ของแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=3 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง)

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ของความเข้มข้น E_2 ที่ 0, 0.1 และ 1 µg/l จากการเปรียบเทียบภายในเวลาเดียวกัน

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ หรือ biomarker นอกจากใช้ตรวจสอบติดตามการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม e-EDCs ในแหล่งน้ำแล้ว ยังสามารถทราบถึงผลกระทบของสารในกลุ่ม e-EDCs ต่อสิ่งมีชีวิตและปริมาณของสารที่อาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของ e-EDCs ปัจจุบันนิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางและมีรายงานการศึกษาแล้วในแหล่งน้ำจืดโดยใช้ปลาข้าวสารและปลาม้าลาย (Tong et al., 2004) เป็นต้น โดยนิยมตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน VTG แต่อย่างไรก็ตามในระบบนิเวศแนวปะการังใกล้ชายฝั่งของประเทศไทย ซึ่งเป็นบริเวณที่อาจได้รับการปนเปื้อนของสาร e-EDCs จากแหล่งชุมชน การเกษตรกรรม และโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น ซึ่งน่าจะมีปริมาณการปนเปื้อนของสารเพิ่มมากขึ้นและได้รับผลกระทบมากขึ้นในอนาคตอันใกล้ ยังไม่มีรายงานการศึกษาแต่อย่างใด การเตรียมการณ์ เฝ้าระวัง โดยสืบหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ และวิธีการตรวจที่เหมาะสมที่สามารถวัดได้แม้จะมีการปนเปื้อนของ e-EDCs ในปริมาณน้อย ๆ การใช้ปลาการ์ตูนส้มขาวเป็นต้นแบบของการตรวจสอบติดตามการปนเปื้อนของ e-EDCs ในแหล่งน้ำ โดยวัดระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG ซึ่งเป็นยีนที่ถูกควบคุมด้วย E_2 ที่มีอยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ในขณะเดียวกันถ้ามีการปนเปื้อนของ e-EDCs จะสามารถเลียนแบบการทำงานของ E_2 ได้ ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการติดตามการปนเปื้อนของ e-EDCs ในแหล่งน้ำได้

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และระดับการแสดงออกของยีน GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน GnRH ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี semi-quantitative RT-PCR ทำควบคู่กับยีนควบคุมภายใน (internal control) ที่มีระดับการแสดงออกของยีนคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมที่ได้รับ ซึ่งยีนที่นิยมใช้เป็นยีนควบคุมภายในที่มีความเหมาะสมเมื่อสิ่งชีวิตหรือสัตว์ทดลองได้รับสัมผัสกับสารพิษ โดยเฉพาะสารกลุ่ม e-EDCs ได้แก่ 18S rRNA, ribosomal protein l8, tata box binding protein และ hypoxanthine phosphoribosyltransferase I (Filby & Tyler, 2007) การศึกษานี้จึงเลือกใช้ยีน 18S rRNA ซึ่งเป็นโครงสร้างของไรโบโซม โดยออกแบบไพรเมอร์ (18S R/L) ที่ให้ผลผลิต PCR ขนาด 102 คู่เบส เป็นส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์

เหมือนกับปลาอื่น ๆ หลายชนิด เมื่อนำมาทดสอบโดยการเพิ่มจำนวนในส่วนของยีน 18S rRNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวในแต่ละกลุ่มการทดลองทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับ E_2 พบว่า มีความเข้มของแถบ DNA เท่ากันสอดคล้องกับรายงานของ Filby and Tyler (2007) ที่กล่าวว่าการแสดงออกของยีน 18S rRNA มีการแสดงออกคงที่ ไม่ขึ้นอยู่กับอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ เพศ และไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน

รูปแบบ (type) ของฮอร์โมน GnRH ในกลุ่มปลากระดูกแข็งมีรายงานการศึกษาแล้ว 8 รูปแบบ ได้แก่ catfish GnRH, chicken GnRH-II, herring GnRH, mammalian GnRH, pejerrey GnRH, salmon GnRH, seabream GnRH และ whitefish GnRH (Lethimonier et al., 2004) ซึ่งในปลาแต่ละชนิดจะพบฮอร์โมน GnRH จำนวน 2-3 รูปแบบ เช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*) มี 2 รูปแบบ คือ salmon GnRH และ chicken GnRH (Klausen et al., 2001) ปลานิล (*O. mossambicus*) ปลา sockeye (*Oncorhynchus nerka*) ปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) และปลา barfin flounder (*Verasper moseri*) มี 3 รูปแบบ คือ chicken GnRH-II, salmon GnRH และ seabream GnRH (Amano et al., 2002) และอาจเป็นไปได้ว่าฮอร์โมน GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาวจะน่ามีรูปแบบอื่นอีก นอกเหนือจากรูปแบบ seabream GnRH ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ฮอร์โมน GnRH ในปลาแต่ละรูปแบบมีตำแหน่งและหน้าที่ต่างกัน บทบาทด้านสรีรวิทยานั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก เช่น ในปลา barfin flounder พบ 3 รูปแบบ (chicken GnRH-II, salmon GnRH และ seabream GnRH) โดย chicken GnRH-II แสดงออกในสมองส่วน terminal nerve ganglion (TNG) และ midbrain tegmentum (MT) ในขณะที่ salmon GnRH แสดงออกในสมองส่วน ventromedial olfactory bulbs (VOB) และ seabream GnRH แสดงออกในสมองส่วน preoptic area (POA) ซึ่ง seabream GnRH ที่พบใน POA นั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมฮอร์โมนระบบสืบพันธุ์ กระตุ้นการสร้างและการหลั่ง GTH (Amano et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตามในสัตว์จำพวกปลายังพบได้ในบริเวณรังไข่และอัณฑะ (Sherwood & Adams, 2005) เช่นเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ที่คาดว่ายีน GnRH ที่เพิ่มจำนวนได้เป็น seabream GnRH ซึ่งแสดงออกที่สมองของปลาการ์ตูนส้มขาว และยังพบว่ามีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อตับด้วย (ไม่ได้รายงานผล) ซึ่งยังไม่ปรากฏรายงานในปลาชนิดอื่นแต่อย่างใด

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาวที่เพิ่มจำนวนได้โดยใช้คู่ไพรเมอร์ GnRH L/R ให้ผลผลิตขนาด 208 คู่เบส เทียบเคียงได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 73-280 ของยีน seabream GnRH ในปลานิล (*O. niloticus*) (GenBank accession no. AB101665) และปลา burton's mouthbrooder (*H. burtoni*) (GenBank accession no. U31865) ที่มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์สายสมบูรณ์เท่ากับ 480 คู่เบส (White, Kasten, Bond, Adelman, & Fernald, 1995; Parhar, Ogawa, Hamada, & Sakuma, 2003) มีความเหมือนสูงสุด 84% กับ

seabream GnRH mRNA ของปลานิล ซึ่งเป็นปลาอยู่ในอันดับ Perciformes เดียวกันกับปลาการ์ตูนส้มขาว แต่ต่างวงศ์กัน โดยปลานิลจัดอยู่ในวงศ์ Cichlidae ส่วนปลาการ์ตูนส้มขาวจัดอยู่ในวงศ์ Pomacentridae แสดงว่ายีน GnRH ค่อนข้างเป็นยีนอนุรักษ์ของกลุ่มปลากระดูกแข็ง โดยเฉพาะลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างปลายด้าน NH_2-terminus (pGlu-His-Trp-Ser) และ COOH-terminus (Pro-Gly-NH_2) แต่ลำดับของกรดอะมิโนภายในสายโพลีเปปไทด์ของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 2-3) ดังเช่นลำดับกรดอะมิโนของ GnRH ของปลาในสกุล *Verasper* (GenBank accession no. ADJ18210 และ BAB83984) จะมีความเหมือนสูงสุดที่ 75% กับ seabream-type GnRH ของปลานิลเช่นเดียวกันกับของปลาการ์ตูนส้มขาว ดังนั้นถึงแม้จะเป็นโปรตีนรูปแบบ (type) เดียวกันแต่ปลาต่างวงศ์กัน จะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน

จากการเพิ่มปริมาณยีน seabream GnRH จาก genomic DNA ของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยคู่ไพรเมอร์ GnRH L/R พบว่าให้ผลผลิตขนาด 296 คู่เบส ซึ่งเมื่อนำมาเทียบเคียงกับส่วนที่แปลรหัสเป็น mRNA แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีส่วนของ intron แทรกอยู่นั่นคือ ตำแหน่งที่ 1 ถึง 134 และ 223 ถึง 296 เป็นส่วน exon และตำแหน่งที่ 135 ถึง 222 เป็นส่วนของ intron (ภาพที่ 4-4) ตำแหน่งไพรเมอร์อยู่ต่าง exon ของยีน seabream GnRH นี้ จะสามารถใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ genomic DNA ใน cDNA ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ คือ ผลผลิต PCR จะมีขนาดมากกว่าขนาดของยีนเป้าหมาย 88 คู่เบส เมื่อมีการปนเปื้อนด้วย genomic DNA

การศึกษาผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH โดยใช้ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนเป็นต้นแบบของการศึกษา เนื่องจากเป็นปลาที่มีขนาดเล็ก มีถิ่นอาศัยประจำอยู่กับดอกไม้ทะเลในแนวปะการัง และสามารถเพาะพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากในฟาร์มเพาะเลี้ยง โดยไม่ต้องจับจากแหล่งธรรมชาติ จึงน่าจะเหมาะสมที่จะใช้เป็น biomarker สำหรับการตรวจสอบติดตามการปนเปื้อนของ e-EDCs ในทะเลหรือระบบนิเวศชายฝั่งได้ โดยทำการวัดระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH ที่แสดงออกในสมองส่วน POA ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 μg/l เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH ที่เนื้อเยื่อสมองในกลุ่มปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ทุกระดับความเข้มข้นและเวลา แสดงว่า E_2 อาจไม่มีบทบาทต่อระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Vetillard and Bailhache (2006) ที่ศึกษาผลกระทบ E_2, NP และ tamoxifen ต่อระดับการแสดงออกของยีน salmon GnRH, α-estrogen receptor (α-ER) และ VTG ในปลาเรนโบว์เทราต์วัยอ่อน โดยพบว่าการให้ E_2 และ tamoxifen เป็นเวลานาน 3 และ 6 วัน ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของ salmon GnRH 1 หรือ salmon GnRH 2 แต่ NP มีผลยับยั้งการ

แสดงออกของยีน salmon GnRH 2 การที่ระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/l ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากกลุ่มที่ไม่ได้รับ E_2 อาจมีสาเหตุร่วมด้วยจากความเข้มข้นของ E_2 ที่ให้นั้นอาจต่ำเกินไป และระยะเวลาที่ได้รับสูงสุด 96 ชั่วโมงนั้นอาจจะน้อยเกินไป การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH จึงยังไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR หรืออาจเนื่องจากการแสดงออกของยีน GnRH นั้นอาจจะไม่ได้ขึ้นอยู่กับการควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน (non-estrogenic hormone) แต่ขึ้นอยู่กับฮอร์โมนชนิดอื่น เช่น แอนโดรเจน ดังที่มีการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราต์โดย Vetillard and Bailhache (2006) หรือโครงสร้างของยีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาวนั้นอาจจะไม่มีส่วนที่เป็น estrogen response element (ERE) ที่สมบูรณ์ แต่มีเพียงบางส่วนของยีนเท่านั้นที่ estrogen receptor (ER) สามารถเข้าไปจับกับ ERE ได้ เมื่อปลาการ์ตูนส้มขาวได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นจึงส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH ได้มากกว่าความเข้มข้นต่ำ (Breton & Sambroni, 1996)

อนึ่ง เมื่อพิจารณาแนวโน้มระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH ในกลุ่มปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ความเข้มข้น 1 µg/l ที่เวลา 3 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของยีน seabream GnRH เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 4-10) อาจเกิดจากยีน seabream GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนมีความไวตอบสนองต่อการชักนำของ E_2 ในช่วงแรกของการได้รับ E_2 จากสิ่งแวดล้อม และเมื่อเวลาผ่านไป E_2 ที่อยู่ภายในเซลล์มีจำนวนมากเพียงพอในระดับหนึ่งแล้ว จะเกิดกลไกควบคุมย้อนกลับแบบยับยั้ง (negative feedback mechanism) คือ สมองจะชะลอหรือยับยั้งการสร้าง GnRH (Arukwe & Goksoyr, 2003) จึงทำให้ระดับการแสดงออกของยีน GnRH ลดลงที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แตกต่างกับปลาในกลุ่มที่ได้รับ E_2 ที่ความเข้มข้น 0 และ 0.1 µg/l ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน seabream GnRH ที่ลดลงอาจทำให้ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ยังไม่มีเพศชัดเจนมีแนวโน้มเปลี่ยนเป็นเพศเมียได้ ดังที่มีรายงานการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ของฮอร์โมน GnRH ของปลาการ์ตูน *A. melanopus* ที่สมองส่วน POA ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการควบคุมการเปลี่ยนเพศ เมื่อปลาเปลี่ยนเป็นเพศเมียจำนวนเซลล์ GnRH จะลดน้อยลง แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าเปลี่ยนเป็นเพศผู้จำนวนเซลล์ GnRH จะเพิ่มมากขึ้น (Elofson et al., 1997)

เมื่อพิจารณา ณ เวลาที่ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนได้รับ E_2 ที่ความเข้มข้น 1 µg/l เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของ seabream GnRH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากปลาอาจมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม หากปลาได้รับฮอร์โมนเป็นระยะเวลานานมากยิ่งขึ้น ระดับการแสดงออกของยีน GnRH อาจจะเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราต์เมื่อได้รับฮอร์โมนเทสโทสโทโรน (testosterone) และเอสโตรเจนเป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 28, 60 และ 96

วัน ระดับการแสดงออกของยีน GnRH จะเพิ่มมากขึ้น และฮอร์โมนเทสโทสโทโรนสามารถชักนำการสังเคราะห์ GnRH ได้ดีกว่าเอสโตรเจน ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/kg และ 2 mg/kg ตามลำดับ (Breton & Sambroni, 1996) จะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ระดับการแสดงออกของยีน GnRH (วัดด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR) ยังไม่ชัดเจนนัก อาจเนื่องมาจากค่า expression ratio ของยีน GnRH ต่อยีนควบคุมภายใน 18S rRNA ภายในกลุ่มการทดลองเดียวกันยังมีความแปรปรวน ดังนั้นควรจะมีการทำการทดลองซ้ำเพิ่มจำนวนตัวอย่างทดสอบ (n) ให้มากขึ้นหรือเพิ่มความถี่ของการทดสอบวัดระดับการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาก่อน 3 ชั่วโมง (เช่นที่ 30, 60 และ 120 นาที เป็นต้น) จะทำให้ได้ผลที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และระดับการแสดงออกของยีน VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อน

ข้อความพันธุกรรมในบริเวณยีน VTG ของปลากระดูกแข็งทั่วไปจะถูกถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนโยล์คที่เป็นแหล่งสำรองอาหารของการเจริญของเอมบริโอได้เฉพาะในปลาเพศเมียช่วงเจริญพันธุ์ แต่ไม่พบหรือพบได้น้อยในปลาเพศเมียวัยอ่อนหรือปลาเพศผู้ แต่อย่างไรก็ตามในปลาเพศเมียวัยอ่อนหรือปลาเพศผู้จะสามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ VTG ในระดับ mRNA เพิ่มมากขึ้นเมื่อปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อนได้รับสารที่เลียนแบบฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งตรวจพบได้ในหลายอวัยวะเช่น ตับ ลำไส้ อัณฑะ กล้ามเนื้อ หัวใจและสมอง แต่จะแสดงออกมากที่เนื้อเยื่อตับ (Wang, Tan, Emelyanov, Korzh, & Gong, 2005; Ma et al., 2009) จากเหตุผลดังกล่าวการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการเพิ่มจำนวนบางส่วนของยีน VTG จากเนื้อเยื่อตับของปลาการ์ตูนส้มขาวได้ผลผลิต PCR ขนาด 400 คู่เบส และคาดว่าจะเป็นรูปแบบ VTG A เนื่องจากมีความเหมือนสูงสุดที่ 77% กับยีน VTG A mRNA ของปลา barfin flounder (*Verasper moseri*) ปลา Japanese whiting (*Sillago japonica*) และปลา white perch (*Morone Americana*) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สายสมบูรณ์ของ VTG A mRNAขนาด 4,966, 5,235 และ 5,752 คู่เบส ตามลำดับ (Sawaguchi et al., 2005; Yoon et al., 2008; Reading et al., 2009) และผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาการ์ตูนส้มขาวนี้ คาดว่าเป็นชนิด VTG A ซึ่งมีความเหมือนสูงสุดที่ 69% กับปลา *Ctenolabrus rupestris* (GenBank accession no.ABS53014)

จากรายงานการศึกษาจะพบว่าโปรตีน VTG ที่พบในปลากระดูกแข็งมีหลายรูปแบบตามชนิดของปลา เช่น VTG A, VTG B และ VTG C ที่พบในปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) และปลา white perch (Davis et al., 2007; Reading et al., 2009) ซึ่ง VTG A และ B พบได้ทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่แปลรหัสเป็นโปรตีนโยล์ค 3 กลุ่ม คือ lipovitellin I, lipovitellin II และ phosvitin ส่วน VTG C จะไม่มีส่วนของ lipovitellin II และ phosvitin มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับโปรตีน

VTG ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยที่ VTG A ที่คาดว่าเป็นรูปแบบที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ มีหน้าที่เป็นแหล่งอาหารสำรองของเอมบริโอ ส่วน VTG B มีหน้าที่ช่วยในการลอยตัวในน้ำของเซลล์ไข่ จะสลายในระหว่างที่ไข่กำลังพัฒนาและเป็นแหล่งกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ของกระบวนการ egg hydration (Sawaguchi et al., 2005; Kang et al., 2007)

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน VTG ปลาการ์ดูนส้มขาววัยอ่อนอายุประมาณ 3 เดือน ในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับ E_2 ในกลุ่มก่อนทำการทดลองมีระดับการแสดงออกของยีน VTG ในระดับต่ำ (ภาพที่ 4-12) สอดคล้องกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนลายปล้อง (*A. clakii*) ที่หลังจากปลาอายุครบ 2 เดือน จะมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ในระยะนี้อาจเริ่มมีการสังเคราะห์ VTG ร่วมด้วย (Miura et al., 2008) ส่วนในกลุ่มปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/l มีระดับการแสดงออกของยีน VTG ที่เนื้อเยื่อตับเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับ E_2 ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Tong et al. (2004) ที่มีรายงานว่าเมื่อให้ปลาม้าลายและปลาข้าวสารแช่ในสารละลาย E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/l และในปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*) ที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 1,000 nM ระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้น (Vetillard & Bailhache, 2005) และเมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีน VTG ในกลุ่มปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/l จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปลาได้รับ E_2 ติดต่อกันนานเป็นระยะเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของยีน VTG ยังค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อได้รับ E_2 ครบ 48 ชั่วโมง เริ่มมีการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้นเป็น 1.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับ E_2 และเมื่อครบ 96 ชั่วโมง จะมีระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้น 8.8 เท่า แตกต่างจากกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับ E_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/l ที่ทุกระยะเวลาสามารถชักนำการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้นแตกต่างจากกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับ E_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเมื่อปลาได้รับ E_2 ติดต่อกันนานเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน VTG จะเพิ่มขึ้นและเพิ่มอย่างต่อเนื่องจนครบเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ลดลงที่เวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นแล้วลดลงที่เกิดขึ้นหลังจากผ่านไป 48 และ 96 ชั่วโมง อาจเกิดจากการปรับตัวของปลาให้ต้านทานต่อสภาพแวดล้อม ในทำนองเดียวกับการศึกษาในปลาข้าวสาร (*O. latipes*) ที่ได้รับ E_2 ที่ความระดับความเข้มข้น 0.1 µg/l ระดับการแสดงออกของยีน VTG จะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ E_2 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และเพิ่มมากขึ้นกระทั่งครบระยะเวลาประมาณ 12 วัน แต่หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของยีน VTG จะลดน้อยลงเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 30 วัน แต่ในทางตรงกันข้ามในปลาม้าลาย (*D. rerio*) ที่ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/l ระดับการ

สังเคราะห์ยีน VTG จะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ E_2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 30 วัน (Tong et al., 2004)

ระดับการแสดงออกของยีน VTG A ในระดับ mRNA ที่เพิ่มมากขึ้นในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 เนื่องจากกลไกการสังเคราะห์ VTG นั้นถูกกระตุ้นด้วย E_2 ที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมเข้าไปจับกับ estrogen receptor ภายในเซลล์จากนั้นส่งสัญญาณให้เซลล์ตับสังเคราะห์ VTG A mRNA จากนั้นลำเลียงผ่านกระแสเลือดไปสะสมที่เซลล์ไข่ จากที่กล่าวมาอาจทำให้ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนมีโอกาสที่จะเปลี่ยนเพศเป็นเพศเมีย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีน VTG อาจขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับ E_2 (Celius et al., 2000; Tong et al., 2004) การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน VTG และการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ VTG ในระดับโปรตีนที่พบในปลานั้นมีความแปรผันมากถึง 100 ล้านเท่า (Arukwe & Goksoyr, 2003) เช่น ในปลา sheepshead minnows (*C. variegatus*) พบว่ามีระดับการสังเคราะห์ VTG เพิ่มมากขึ้นถึง 1,100 pg เมื่อปลาได้รับ E_2 ที่ความเข้มข้น 182 ng/l ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 8 วัน (Knoebl et al., 2004) อย่างไรก็ตามในกรณีของปลาการ์ตูนส้มขาวถ้าจะสามารถสรุปผลได้อย่างชัดเจนควรมีการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนร่วมด้วย เปรียบเทียบกับตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย และศึกษา immunohistochemistry แสดงตำแหน่งของโปรตีน VTG ที่เนื้อเยื่อดับร่วมด้วย ดังที่มีรายงานในปลาม้าลาย (*D. rerio*) เพศผู้ที่ได้รับ E_2 ที่ระดับเข้มข้น 1 nM ทำให้มีการสร้าง VTG เพิ่มมากขึ้นจากปลาปกติที่ไม่ได้รับ E_2 (Van der Ven et al., 2003)

จากผลการศึกษาดังที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การเลือกยีนที่มีความเหมาะสมที่จะสามารถใช้เป็น biomarker เพื่อเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของ e-EDCs ในแหล่งน้ำของประเทศไทยนั้นมีความสำคัญ และการใช้ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนเป็นตัวทดสอบ จะมีความเหมาะสม สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบติดตามการปนเปื้อนของ e-EDCs ในแหล่งน้ำทะเลได้ โดยการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน VTG จะมีความเหมาะสมมากกว่าการใช้ยีน GnRH (seabream GnRH) เนื่องจากยีน VTG ตอบสนองต่อการชักนำของ E_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและใช้ระยะเวลาสั้น (3 ชั่วโมง เมื่อได้รับ E_2 1 μg/l หรือ 96 ชั่วโมง เมื่อได้รับ E_2 0.1 μg/l) ได้ดีกว่ายีน GnRH ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนมีแนวโน้มลดลง ดังที่มีการศึกษาแล้วในปลาหลายชนิด เช่น ปลา European eel (*Anguilla anguilla*) ที่ยีน VTG ถูกนำมาใช้เป็น biomarker ของการปนเปื้อน e-EDCs ในแหล่งน้ำจากทั่วทวีปยุโรป (Versonnen, Goemans, Belpaire, & Janssen, 2004) หรือปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*) ปลาไน (*C. carpio*) ปลา roach (*Rutilus rutilus*) และปลา European eel (*A. anguilla*) จากบริเวณแหล่งน้ำที่เป็นแหล่งรองรับน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสีย โดย

พบว่า e-EDCs ที่ปนเปื้อนทำให้กลุ่มปลาดังกล่าวมีระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้นถึง 500-100,000 เท่า (Solé, Porte, & Barceló, 2001) การที่พบว่าในกลุ่มปลากระดูกแข็งที่อาศัยในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีการปนเปื้อน e-EDCs ในปริมาณน้อย แต่ถ้าได้รับเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของยีนต่าง ๆ และอาจส่งผลให้เกิด intersex คือมีการพัฒนาทั้งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียพร้อมกัน ทำให้เสี่ยงต่อการเสียสมดุลของโครงสร้างประชากรและระบบนิเวศในอนาคตได้ (Van Campenhout, De Coen, Vandenbergh, Denayer, & Janssen, 2002 อ้างใน Versonnen et al., 2004)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และยีน VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาว เริ่มจากการเพิ่มจำนวนบางส่วนของยีน GnRH และ VTG โดลนและอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด 208 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์คาดว่าเป็นยีน seabream GnRH และ VTG A ตามลำดับ ซึ่งยังไม่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank (ข้อมูล ณ วันที่ 12 มี.ค.2553 และ 21 พ.ค.2553)

จากการศึกษาผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนอายุประมาณ 3 เดือนโดยวิธีการแช่ปลาในสารละลาย E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 µg/l เป็นระยะเวลานาน 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนที่ได้รับ E_2 ความเข้มข้น 1 µg/l มีการแสดงออกของยีน GnRH เพิ่มมากขึ้นที่เวลา 3 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับ E_2 ความเข้มข้น 0 และ 0.1 µg/l แต่ E_2 มีผลต่อการชักนำระดับการแสดงออกของยีน VTG ให้เพิ่มมากขึ้นแตกต่างจากกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับ E_2 โดยที่ความเข้มข้น 1 และ 0.1 µg/l สามารถชักนำการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มมากขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อได้รับ E_2 นาน 3 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการวิจัยในครั้งนี้การวัดระดับการแสดงออกของยีน VTG ในปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนมีความเหมาะสมที่จะประยุกต์ใช้เป็น biomarker ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค real-time RT-PCR ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน GnRH และ VTG เพื่อให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วและมีความไวมากกว่าเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

2. ควรเพิ่มระยะเวลาในการให้ปลาการ์ตูนสัมผัสกับ E_2 นานยิ่งขึ้น (long-term exposure) เพื่อศึกษาผลกระทบต่อสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในระยะยาวต่อไป

3. ควรทดลองนำปลาการ์ตูนส้มขาวัยอ่อนอายุ 3 เดือนไปทดสอบในสถานที่จริง (field study) เพื่อคาดการณ์ ประเมิน ติดตามการปนเปื้อนของ e-EDCs ในน้ำทะเล

4. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างทดสอบ เพื่อศึกษาผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของยีน GnRH ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

กรมควบคุมมลพิษ. (2552). *ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทะเลในพื้นที่ชายฝั่งทั่วประเทศ.* วันที่สืบค้นข้อมูล 20 สิงหาคม 2553, เข้าถึงได้จาก http://www.marinepcd.org/coastalwater/waterquality40-52.htm.

ไกรฤกษ์ ตันถาวร. (2553). *ผลของ 17β-estradiol ต่อระดับการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์ growth hormone, insulin-like growth factor-I และ vitellogenin ในปลาการ์ตูนส้มขาว (Amphiprion ocellaris).* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ธรณ์ ธำรงนาวาสวัสดิ์. (2546). *ปี๊ะป๋า ปลาการ์ตูน.* กรุงเทพฯ: บ้านพระอาทิตย์.

บัญชา ทองมี. (2538). *ผลของ 17 เบต้า-เอสตราไดออลในการเปลี่ยนเพศปลาสลิด.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรณู ยาชิโร. (2542). การเปลี่ยนเพศของปลา. *สัตว์น้ำ, 113*, 93-102.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2546). *วิทยาต่อมไร้ท่อของปลาและครัสเตเชีย.* ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

สินีนาฏ ศิริ และกฤษณะ อินทร์คำน้อย. (2549). สารเอสโตรเจนจากสิ่งแวดล้อม. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข, 34*, 89-96.

สำเนาว์ เสาวกูล. (2541). *ผลของ 17 เบต้า-เอสตราไดออลในการเปลี่ยนเพศปลาตะเพียนขาวเป็นเพศเมีย.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Allen, G. R. (1997). *Tropical Reef Fishes of Thailand.* Asia Books, Bangkok.

_____. (1980). *Anemonefishes of the World: Species, Care and Breeding.* Ohio: Aquarium, Mentor.

Allen, G. R., Drew, J., & Kaufman, L. (2008). *Amphiprion barberi,* a new species of anemonefish (Pomacentridae) from Fiji, Tonga, and Samoa. *Aqua International Journal of Ichthyology, 14*, 105-114.

Amano, A., Takahashi, A., Yamanome, T., Okubo, K., Aida, K., & Yamamori, K. (2002). Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRHs in the brain of barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology, 126*, 325-333.

Arukwe, A. (2006). Toxicological housekeeping genes: Do they really keep the house? *Environmental Science and Technology, 40,* 7944-7949.

Arukwe, A., & Goksoyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology, 2.*

Barucca, M., Canapa, A., Olmo, E., & Regoli, F. (2006). Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environmental Research, 101,* 68-73.

Breljak, D., Ambriovic-Ristov, A., Kapitanovic, S., Cacev, T., & Gabrilovac, J. (2005). Comparison of three RT-PCR based methods for relative quantification of mRNA. *Food Technology and Biotechnology, 43,* 379-388.

Breton, B., & Sambroni, E. (1996). Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss. General and Comparative Encrinology, 101,* 156-164.

Celius, T., Matthews, J. B., Giesy, J. P., & Zacharewski, T. R. (2000). Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after *in vivo* treatment with estradiol-17ß or α-zearalenol. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 75,* 109-119.

Davis, L. K., Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Reading, B. J., Matsubara, T., Hara, A., Sullivan, C. V., Pierce, A. L., Hirano, T., & Grau, E. G. (2007). Induction of three vitellogenins by 17beta-estradiol with concurrent inhibition of the growth hormone-insulin-like growth factor I axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Biology of Reproduction, 77,* 614-625.

Ding, J. L., Hee, P. L., & Lam, T. J. (1989). Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 93,* 363-370.

Du, J-L., Lee, C-Y., Tacon, P., Lee, Y-H., Yen, F-P., Tanaka, H., Dufour, S., & Chang, C-F. (2001). Estradiol-17ß stimulates gonadotropin II expression and release in the protandrous male black porgy *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker: a possible role in sex change. *General and Comparative Endocrinology, 121,* 135-145.

Duong, C. N., Ra, J. S., Cho, J., Kim, S. D., Choi, H. K., Park, J-H., Kim, K. W., Inam, E., & Kim, S. D. (2010). Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere, 78*, 286-293.

Elofsson, U., Winberg, S., & Francis, R. C. (1997). Number of preoptic GnRH-immunoreactive cells correlates with sexual phase in a protandrously hermaphroditic fish, the dusky anemonefish (*Amphiprion melanopus*). *Journal of Comparative Physiology A, 181*, 484-492.

Fautin, D. G., & Allen, G. R. (n.d.). *Life Cycle of Clownfish.* วันที่ค้นข้อมูล 19 มีนาคม 2553, เข้าถึงได้จาก http://www.advancedaquarist.com/2007/2/fish.

Filby, A. L., & Tyler, C. R. (2007). Appropriate "housekeeping" genes for use in expression profiling the effect of environmental estrogens in fish. *BMC Molecular Biology, 8*, 10.

Fricke, H., & Fricke, S. (1977). Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. *Nature, 266*, 830-832.

Goksoyr, A., Arukwe, A., Larsson, J., Cajaraville, M. P., Haucer, L., Nilson, B. M., Lowe, D., & Mattiessen, P. (2003). Molecular/cellular processes and the impact on reproduction. In A. J. Lawrence, & K. L. Hemingway (Eds.), *Effect of Pollution on Fish* (pp. 179-220). Oxford: Blackwell Science.

Gore, A. C. (2002). Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology, 192*, 157-170.

Groeneveld, R., & Reijs, S. (n.d.). *Nemos & Damsels.* วันที่ค้นข้อมูล 19 มีนาคม 2553, เข้าถึงได้จาก http://www.diverosa.com/categories/Damsel&Nemos.htm.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series, 41*, 95-98.

Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K. O., Boonyatumanond, R., & Zakaria, M. P. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in South and Southeast Asian mussels. *Environmental Monitoring and Assessment, 135*, 423-440.

Jalabert, B. (2005). Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproductive Nutrition Development, 45*, 261-279.

Jobling, S., Casey, D. Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P., & Tyler, C. R. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology, 65*, 205-220.

Kang, B. J., Jung, J. H., Lee, J. M., Lim, S. G., Saito, H., Kim, M. H., Kim, Y. J., Saigusa, M., & Han, C. H. (2007). Structure and expression analyses of two vitellogenin gene in the carp, *Cyprinus carpio. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 148*, 445-453.

King, S. D., Hassell, K., Nugegoda, D., & Kristiansen, S. I. (2008). The assessment of vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in two Australian perciformes. *Marine Environmental Research, 66*, 116-118.

Klausen, C., Chang, J. P., & Habibi, H. R. (2001). The effect of gonadotropin releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish, *Carassius auratus. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 129*, 511-516.

Knoebl, I., Hemmer, M. J., & Denslow, N. D. (2004). Induction of zona radiata and vitellogenin genes in estradiol and nonylphenol exposed male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Environmental Research, 58*, 547-551.

Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J-A., Lareyre, J- J., & Kah, O. (2004). Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology, 135*, 1-16.

Maradonna, F., & Carnevali, O. (2007). Vitellogenin, zona radiata protein, cathesin D and heat shock protein 70 as biomarkers of response to xenobiotics. *Biomarkers, 12*, 240-255.

Ma, L., Li, D., Wang, J., He, J., & Yin, Z. (2009). Effects of adrenergic agonist on the extrahepatic expression of vitellogenin Aol in heart and brain of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquatic Toxicology, 91*, 19-25.

Matozzo, V., Gagne, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., & Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environment International, 34*, 531-545.

McLachlan, J. A. (2001). Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Review, 22*, 319-341.

Meucci, V., & Arukwe, A. (2005). Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic Toxicology, 73*, 1-10.

Millar, R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science, 88*, 5-28.

Minnesota Pollution Control Agency. (2008). Endrocrine disrupting compound: a report to the Minnesota legislature.

Miura, S., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Piferrer, F., & Nakamura, M. (2008). Differentiation of ambisexual gonads and immunohistochemical localization of P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme during gonadal sex differentiation in the protandrous anemonefish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 149*, 29-37.

Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the World* (3rd ed.). New York: Wiley.

Parhar, I. S., Ogawa, S., Hamada, T., & Sakuma, Y. (2003). Single-cell real-time quantitative polymerase chain reaction of immunofluorescently identified neurons of gonadotropin releasing hormone subtypes in cichlid fish. *Endocrinology, 144*, 3297-3300.

Puinean, A-M., & Rotchell, J. M. (2006). Vitellogenin gene expression as a biomarker of endrocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research, 62*, 211-214.

Reading, B. J., Hiramatsu, N., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Hara, A., Lively, M. O., & Sullivan, C. V. (2009). Conserved and variant molecular and functional features of multiple egg yolk precursor proteins (vitellogenins) in white perch (*Morone americana*) and other teleosts. *Marine Biotechnology, 11*, 169-187.

Romano, M., Rosanova, P., Anteo, C., & Limatola, E. (2004). Vertebrate yolk proteins: a review. *Molecular Reproduction and Development, 69*, 109-116.

Rozen, S., & Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Krawetz, & S. Misener (Eds.), *Bioinformatics Method and Protocols: Method in Molecular Biology* (pp. 365-386) Humana Press: Totowa, NJ.

Sawaguchi, S., Koya, Y., Yoshizaki, N., Ohkubo, N., Andoh, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V., Hara, A., & Matsubara, T. (2005). Multiple vitellogenins (Vgs) in mosquitofish *(Gambusia affinis)*: identification and characterization of three functional Vg genes and their circulating and yolk protein products. *Biology of Reproduction*, *72*, 1045-1060.

Sherwood, N. M., & Adams, B. A. (2005). Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the GnRH gene. In P. Melamed, & N. M. Sherwood. (Eds.), *Hormone and Their Receptors in Fish Reproduction* (pp. 1-39) New Jersey: World Scientific Publishing Company.

Sherwood, N. M., Doroshov, S., & Lance, V. (1991). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) in bony fish that are phylogenetically ancient: reedfish (*Calamoichthys calabaricus*), sturgeon (*Acipenser transmotanus*), and alligator gar (*Lepisosteus spatula*). *Genetic Comparative Endocrinology*, *84*, 44-57.

Solé, M., Porte, C., & Barceló, D. (2001). Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving water using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trends in Analysis Chemistry*, *20*, 518-525.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *24*, 4876-4882.

Toft, G., & Baatrup, E. (2001). Sexual characteristics are altered by 4-tert-octylphenol and 17ß-estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicological and Environmental Safety*, *48*, 76-84.

Tong, Y., Shan, T., Poh, Y. K., Yan, T., Wang, H., Lam, S. H., & Gong, Z. (2004). Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17ß-estradiol. *Gene*, *328*, 25-36.

Van der Ven, L. T. M., Holbech, H., Fenske, M., Van den Brandhop, E-J., Gielis-Proper, F. K., & Wester, P. W. (2003). Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: evalution by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. *Aquatic Toxicology, 65*, 1-11.

Versonnen, B. J., Goemans, G., Belpaire, C., & Janssen, C. R. (2004). Vitellogenin content in European ell (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution, 128*, 363-371.

Vetillard, A., & Bailhache, T. (2005). Cadmium: an endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biology of Reproduction, 72*, 119-126.

_____. (2006). Effects of 4-*n*-nonylphenol and tamoxifen on salmon gonadotropin-releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicological Sciences, 92*, 537-544.

Wang, H., Tan, J. T. T., Emelyanov, A., Korzh, V., & Gong, Z. (2005). Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene, 356*, 91-100.

White, S. A., Kasten, T. L., Bond, C. T., Adelman, J. P., & Fernald, R. D. (1995). Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92*, 8363-8367.

Yoon, S. H., Itoh, Y., Kaneko, G., Nakaniwa, M., Ohta, M., & Watabe, S. (2008). Molecular characterization of Japanese sillago vitellogenin and changes in its expression levels on exposure to 17ß-estradiol and 4-tert-octylphenol. *Marine Biotechnology, 10*, 19-30.

Zhang, X., Li, Q., Li, G., Wang, Z., & Yan, C. (2009). Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. *Marine Pollution Bulletin, 58*, 1210-1216.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมี

วิธีการเตรียมสารเคมี

1) 17ß-estradiol (stock solution 100 mg/ml)

17ß-estradiol	500 mg
DMSO	5 ml

2) 5X TBE buffer

เตรียมสารละลายปริมาตร 1,000 ml

Tris base	54.0 g
Boric acid	27.5 g
EDTA, disodium dehydrate (MW=372.24 g/mol)	3.72 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

3) 1M Tris-HCl, pH 8.0

เตรียมสารละลายปริมาตร 50 ml

Tris-base (MW=121.14 g/mol)	6.06 g

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 ml

5) LB (Lauria-Bertani) broth (20 mg/l)

LB broth	4 g
น้ำกลั่น	200 ml

7) LB agar

LB broth	4 g
Bacto agar	3 g
น้ำกลั่น	200 ml

8) X-gal (40 mg/ml)

X-gal	0.04 g
Dimethyl formamide	1 ml

9) Ampicillin (200 mg/ml)

Amplicillin	0.02 g
น้ำกลั่น	10 ml

ภาคผนวก ข

ผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ผข-1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของยีน GnRH

Dependent Variable: GnRH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.078(a)	15	.072	.939	.533
Intercept	17.147	1	17.147	223.963	.000
Time	.271	5	.054	.708	.621
Conc.	.076	2	.038	.496	.613
Time * Conc.	.475	8	.059	.775	.627
Error	2.756	36	.077		
Total	35.094	52			
Corrected Total	3.834	51			

a R Squared = .281 (Adjusted R Squared = -.018)

ตารางที่ ผข-2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของยีน VTG

Dependent Variable: VTG

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	25.139(a)	17	1.479	11.595	.000
Intercept	51.088	1	51.088	400.591	.000
Time	8.565	5	1.713	13.433	.000
Conc.	12.262	2	6.131	48.074	.000
Time * Conc.	5.378	10	.538	4.217	.000
Error	5.739	45	.128		
Total	75.626	63			
Corrected Total	30.878	62			

a R Squared = .814 (Adjusted R Squared = .744)

ตารางที่ ผข-3 สัดส่วนการแสดงออกของยีน GnRH/18S rRNA ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc. of E_2 (µg/l)	Relative GnRH mRNA level					
	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	96 hr
0	0.648±0.162	0.913±0.054	0.814±0.139	0.936±0.090	0.00±0.000	0.712±0.105
0.1	0.521±0.125	0.922±0.142	0.840±0.084	0.901±0.109	0.734±0.000	0.542±0.380
1	0.861±0.137	0.679±0.013	0.578±0.00	0.748±0.081	0.074±0.011	0.907±0.301

หมายเหตุ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ ผข-4 สัดส่วนการแสดงออกของยีน VTG/18S rRNA ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc.of E_2 (µg/l)	Relative VTG mRNA level					
	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	96 hr
0	0.193±0.060	0.544±0.085	0.441±0.034	0.503±0.228	0.647±0.090	0.166±0.024
0.1	0.145±0.103	0.463±0.126	0.312±0.102	1.235±0.168	0.969±0.200	1.466±0.057[a]
1	0.717±0.087[a]	1.023±0.137[a]	1.586±0.112[a]	2.326±0.379[a]	2.328±0.201[a]	1.205±0.036[b]

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ของความเข้มข้น E_2 ที่ 0, 0.1 และ 1 µg/l เมื่อเปรียบเทียบภายในเวลาเดียวกัน

ภาคผนวก ค

งานวิจัยที่นำเสนอในการประชุมวิชาการ

CLONING AND PARTIAL SEQUENCING OF HATCHING ENZYME GENE OF FALSE CLOWN ANEMONEFISH (*Amphiprion ocellaris*)

Thanakorn Saengsanga[1] and Chuta Boonphakdee[2]

1. Graduate School of Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131 Thailand
2. Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131 Thailand
Corresponding author Fax: +66-(0)38-393489
Email address: chuta@buu.ac.th

The present study aims to investigate cloning and partial sequencing of the hatching enzyme gene of false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) to be a candidate DNA marker for detecting contaminants in aquatic environments. A 1,228-bp portion of the hatching enzyme was obtained from juvenile fish and amplified by PCR. Further investigation of this hatching enzyme fragment by sequencing and nucleotide BLAST against GenBank database exhibited highest identity (87% over 71 bp) to the high chloriolytic enzyme (HCE) mRNA of the yellow-tailed damselfish (*Chrysiptera parasema*). The most part of the HCE-amplified fragment obtained from this anemonefish is intron that has not previously been deposited in the GenBank database.

Keywords:
Hatching enzyme/ High chloriolytic enzyme (HCE)/ *Amphiprion ocellaris*/ DNA marker

การโคลนและหาลำดับเบสบางส่วนของยีนสังเคราะห์ Hatching Enzyme ในปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)

CLONING AND PARTIAL SEQUENCING OF HATCHING ENZYME GENE OF FALSE CLOWN ANEMONEFISH (*Amphiprion ocellaris*)

ธนากร แสงสง่า[1] และชุตา บุญภักดี[2]

1. โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

*สามารถติดต่อได้ที่: +66-(0)38-393489, Email address: chuta@buu.ac.th

Thanakorn Saengsanga[1] and Chuta Boonpbakdee[2]

1. Graduate School of Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131 Thailand

2. Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131 Thailand

Corresponding author Fax: +66-(0)38-393489 Email address: chuta@buu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสังเคราะห์ Hatching Enzyme ในปลาการ์ตูนส้มขาว *(Amphiprion ocellaris)* เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบความผิดปกติของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้รับผลกระทบจากมลพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ โดยการเตรียมดีเอ็นเอจากปลาวัยอ่อนและเพิ่มปริมาณยีนในบริเวณดังกล่าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ได้ผลผลิตขนาด 1,228 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 87 เปอร์เซ็นต์กับ mRNA ของ High Chloriolytic Enzyme (HCE) ของปลาสลิดหินสีน้ำเงินหางเหลือง (*Chrysiptera parasema*) จากการเทียบเคียงจำนวน 71 คู่เบส เนื่องจากโครงสร้างของยีนส่วนใหญ่ที่เพิ่มจำนวนได้เป็นส่วนของอินทรอนที่ไม่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แต่อย่างใด

คำสำคัญ: Hatching Enzyme/ High Chloriolytic Enzyme (HCE)/ ปลาการ์ตูนส้มขาว/ เครื่องหมายดีเอ็นเอ

บทนำ

ปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) เป็นปลาทะเลที่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Pomacentridae (Damselfish) อาศัยตามแนวปะการังในทะเลเขตร้อน ปลาในกลุ่ม Damselfish มีประมาณ 235 ชนิด และส่วนมากพบในทะเลแถบอินโดแปซิฟิก (Olivotto et al., 2004) สังคมของปลาการ์ตูนจะอาศัยร่วมกันในดอกไม้ทะเลและวางไข่บริเวณฐานของดอกไม้ทะเล ภายหลังจากการปฏิสนธิ 6-7 วัน ไข่จะฟัก (Hatching) เป็นตัวและลอยไปตามกระแสน้ำ (Allen, 1997)

ในปลา Hatching Enzymes สร้างจาก Hatching Gland Cells โดยมีหน้าที่ที่สำคัญในการสลายเยื่อหุ้มไข่ (Egg Envelope หรือ Chorion) ของเอมบริโอ โดยมีรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ในปลา

หลายชนิดทั้งปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม เช่น ปลาข้าวสาร (*Oryzias latipes*) ปลาม้าลาย (*Danio rerio*) ปลามะชื่แซลมอน (*Oncorhynchus masou*) ปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) ปลาอายุ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) ปลาปักเป้า (*Takifugu rubripes*) และปลาสลิดหินสีน้ำเงินหางเหลือง (*Chrysiptera parasema*) (Kawaguchi et al., 2008) เป็นต้น โดยศึกษากันอย่างกว้างขวางในปลาข้าวสาร (*O. latipes*) (Yasumasu et al., 1989a, 1989b) Hatching Enzymes เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีสังกะสีเป็นองค์ประกอบ (Zinc-Proteases) พบ 2 ชนิด คือ High Choriolytic Enzyme (HCE) และ Low Choriolytic Enzyme (LCE) (Olivotto et al., 2004) ลักษณะและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเอนไซม์ HCE และ LCE มีความคล้ายคลึงกัน แต่กลไกการทำงานของเอนไซม์จะแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสับเสตรท (Substrate) บริเวณ Inner Layer ของ Chorion ซึ่ง HCE จะทำให้บริเวณ Inner Layer บวมและถูก Hydrolyzing ในขณะที่ LCE จะสลายชั้น Inner Layer ได้เพียงเล็กน้อย (Yasumasu et al., 1989a, 1989b) แต่ประสิทธิภาพในการทำให้ไข่แตกออกในกระบวนการ Chloriolysis สามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสังเคราะห์ Hatching Enzymes ในปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษา ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้อาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) ตรวจสอบความผิดปกติของเอมบริโอ (Donato et al., 2003) หรือความผิดปกติของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Kawaguchi et al., 2008) ที่ได้รับผลกระทบจากมลพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) วัยอ่อนอายุ 1 เดือนจำนวน 1 ตัวอย่าง จากแหล่งเพาะเลี้ยง ใช้เนื้อเยื่อบริเวณครีบหางด้วยชุดสกัดทางการค้า (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit, Vivantis) โดยปฏิบัติตามคู่มือการสกัดดีเอ็นที่แนบมา จากนั้นนำดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ดีเอ็นเอส่วนที่เหลือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ศึกษาต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 50 นาโนกรัม Jumpstart™ REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma) จำนวน 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่ได้จากลำดับกรดอะมิโน (Degenerate Primers) ZRP for และ ZRP rev ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์/ไพรเมอร์ ซึ่งมีลำดับเบส 5′-GGY TCC ATC ACM AGR GAC AG-3′ และ 5′-CCA RRD GAK GGM WGG CAC AC-3′ ตามลำดับ (Maradonna & Carnevali, 2007) ปรับปริมาตรด้วย Nuclease Free Water ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยมีขั้นตอน Pre-Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วเข้าสู่รอบปฏิกิริยาจำนวน 36 รอบ เริ่มจากขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และ Final Extension หลังรอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดด้วย

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas)

3. การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดแถบดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล (Gel Extraction) ภายหลังจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตร-โฟรีซิสโดยใช้ชุดสกัดทางการค้า (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid) แล้วแทรกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าพลาสมิด pGEM® T-easy Vector จากนั้นถ่ายฝากเพื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM 109 เลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ Amplicillin 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ประมาณ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเลี้ยงในอาหารเหลว แล้วจึงสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ชุดสกัดทางการค้า (High-Speed Plasmid Mini Kit, Geneaid) นำพลาสมิดที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (อ่าน 2 ทิศทาง) โดยบริษัท First Base Laboratories SdnBhd (Malaysia) แล้วตรวจสอบเพื่อยืนยันผลด้วยโปรแกรม Blast (Altschul et al., 1990)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการจัดเรียงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple Alignment) เฉพาะส่วนของยีนกับข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank ปัจจุบัน (มกราคม 2552; ตารางที่ 1) ด้วยโปรแกรม ClustalX (Thompson et al., 1997) จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) โดยใช้ Maximum Composite Likelihood ด้วยวิธี Neighbor-Joining และค่า Bootstrap 1,000 ครั้งด้วยโปรแกรม MEGA Version 4 (Tamura et al., 2007)

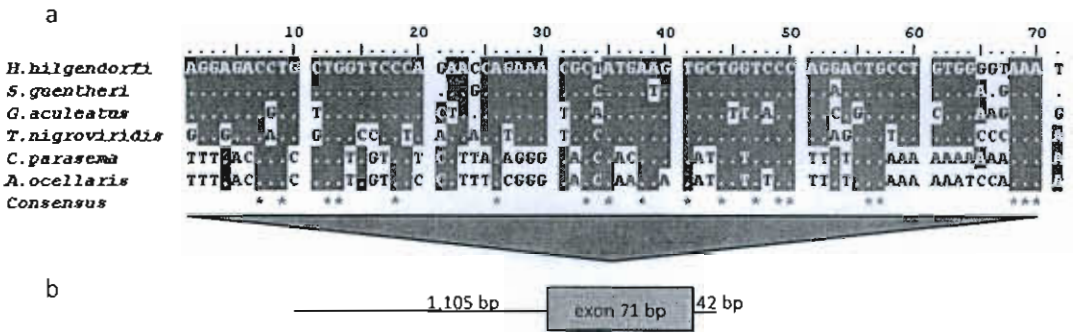
ตารางที่ 1 Accession Number ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน High Choriolytic Enzyme ของสิ่งมีชีวิตจากฐานข้อมูล GenBank

Species	GenBank Accession Number
Chrysiptera parasema	AY129816
Gasterosteus aculeatus	AB353108
Sebastes schlegelii	AB353009
Helicolenus hilgendorfi	AB353102
Setarches guentheri	AB353105
Tetraodon nigroviridis	AB246043

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

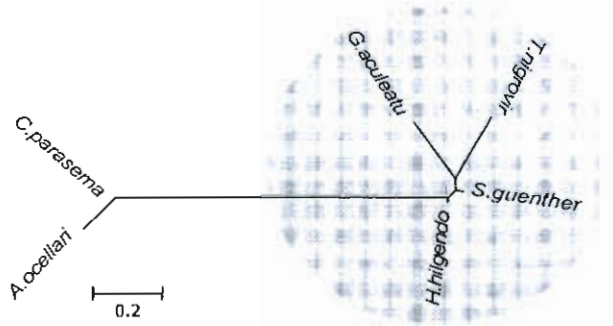
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาโดยใช้ไพรเมอร์ Degenerate Primer ของปลาบู่ดำ (*Gobius niger*) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (อ่าน 2 ทิศทาง) ได้ผลผลิตที่มีขนาด 1,228 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank สามารถเปรียบเทียบได้ 71 คู่เบส ในตำแหน่งที่

1,106-1,176 (ไม่ได้รายงานผล) มีความเหมือนสูงสุด 87 เปอร์เซ็นต์ กับ mRNA ของ High Chloriolytic Enzyme (HCE) ของปลาสลิดหินสีน้ำเงินหางเหลือง (*C. parasema*) (Accession Number AY129816) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HCE เทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาชนิดอื่นโดยใช้โปรแกรม ClustalX พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1-1,105 และ 1,177-1,228 (ภาพที่1a, b) คาดว่าจะเป็นส่วนของอินทรอน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสังเคราะห์ Hatching Enzyme ทั้ง LCE และ HCE ยีนมีโครงสร้างที่แตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด เช่น ในปลาข้าวสาร (*O. latipes*) ยีนโครงสร้างของ LCE มี 8 แอกซอน 7 อินทรอน ในขณะที่ HCE แทบจะไม่มีส่วนอินทรอน (Intron-Less) LCE ในปลาไหลญี่ปุ่น (*A. japonica*) มีโครงสร้างคล้ายกันมากกับของปลาข้าวสาร ปลาไหลญี่ปุ่นมี HCE 9 แอกซอน 8 อินทรอน ส่วนปลาม้าลาย (*D. rerio*) มี 5 แอกซอน 4 อินทรอน (Kawaguchi et al., 2007) สำหรับในปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) นั้นยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสังเคราะห์ High Choriolytic Enzyme (HCE) จำนวน 71 bp ของ *H. hilgendorfi, S. guentheri, G. aculeatus, T. nigroviridis, C. parasema* และ *A. ocellaris*

จากผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของแอกซอนจำนวน 71 คู่เบส กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาบางชนิดในยีนบริเวณเดียวกัน เมื่อสร้างแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) วิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-Joining ค่า Bootstrap 1,000 ครั้งโดยใช้โปรแกรม MEGA Version 4 พบว่า HCE ของปลาการ์ตูนส้มขาวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน HCE ของปลาสลิดหินสีน้ำเงินหางเหลืองและแยกออกจากกลุ่มของ HCE ในปลาชนิดอื่นอย่างเด่นชัด (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HCE ที่มีความแตกต่างจากปลาชนิดอื่นที่นำมาเปรียบเทียบค่อนข้างมาก



ภาพที่ 2 Phylogenetic Tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสังเคราะห์ High Choriolytic Enzyme (HCE) ของ *H. hilgendorfi, S. guentheri, G. aculeatus, T. nigroviridis, C. parasema* และ *A. ocellaris*

ดังนั้นควรมีการศึกษาขีนโครงสร้างที่สมบูรณ์ของ HCE ของปลาในวงศ์ Pomacentridae โดยเฉพาะในกลุ่มปลาการ์ตูนเพิ่มมากขึ้น เพื่อจะทำให้มีความเข้าใจในกลไกการควบคุมแสดงออกของขีน รวมทั้งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น การแทนที่ (Substitution) การหายไปของนิวคลีโอไทด์เพียง 1 โมเลกุล (Frameshift Mutation) ที่อาจมีผลขัดขั้งการแปลรหัสเป็นโปรตีน และส่งผลให้ขีนนั้นกลายเป็น Pseudogene (Kawaguchi et al., 2008) อีกทั้งสามารถใช้ขีนดังกล่าวประเมินผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมจากการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของขีนของปลาในระยะไข่ซึ่งได้รับสัมผัสกับสารมลพิษโดยตรง เพื่อติดตามการปนเปื้อนของมลสารในแหล่งน้ำได้

สรุปผลการวิจัย

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณขีนสังเคราะห์ High Chloriolytic Enzyme (HCE) เมื่ออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถอ่านได้ 1,228 คู่เบส และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 87 เปอร์เซ็นต์กับ mRNA ของขีนดังกล่าวในปลาสลิดหินสีน้ำเงินหางเหลือง (*Chrysiptera parasema*) ซึ่งเป็นบริเวณแอกซอน ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลือน่าจะเป็นส่วนอินทรอนซึ่งไม่มีรายงานการศึกษาแต่อย่างใด

รายการอ้างอิง

Allen, G. R. (1997). *Tropical Reef Fishes of Thailand*. Bangkok: Asia Books.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology, 215*, 403-410.

Donato, D. M., Hiramatsu, N., Arey, K. M., Hiramatsu, K., Kennedy, A. M., Morton, C. L., Hara, A., & Sullivan, C. V. (2003). Atresia in temperate basses: Coning of hatching enzyme (choriolysin) homologues from atretic ovaries. *Fish Physiology and Biochemistry, 28*, 329-330.

Kawaguchi, M., Nakagawa, M., Noda, T., Yoshizaki, N., Hiroi, J., Nishida, M., Iuchi, I., & Yasumasu, S. (2008). Hatching enzyme of the ovoviviparous black rockfish *Sebastes schlegelii* - environmental adaptation of the hatching enzyme and evolutionary aspects of formation of the pseudogene. *FEBS Journal, 275*, 2884-2898.

Kawaguchi, M., Yasumasu, S., Hiroi, J., Naruse, K., Suzuki, T., & Iuchi, I. (2007). Analysis of the exon-intron structures of fish, amphibian, bird and mammalian hatching enzyme genes, with special reference to the intron loss evolution of hatching enzyme genes in Teleostei. *Gene, 392*, 77-88.

Maradonna, F., & Carnevali, O. (2007). Vitellogenin, zona radiata protein, cathesin D and heat shock protein 70 as biomarkers of response to xenobiotics. *Biomarkers, 12*, 240-255.

Olivotto, I., Yasumasu, S., Gioacchini, G., Maradonna, F., Cionna, C., & Carnevali, O. (2004). Cloning and expression of high choriolytic enzyme, a component of the hatching enzyme system, duringembryonic development of the marine ornamental fish *Chrysiptera parasema*. *Marine Biology, 145*, 1235-1241.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution, 24*, 1596-1599.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research, 24*, 4876-4882.

Yasumasu, S., Iuchi, I., & Yamagami, K. (1989a). Purification and partial characterization of high choriolytic enzyme (HCE), a component of the hatching enzyme of the teleost *Oryzias latipes*. *The Journal of Biochemistry, 105*, 204-211.

_____. (1989b). Isolation and some properties of low choriolytic enzyme (LCE), a component of the hatching enzyme of the teleost *Oryzias latipes*. *The Journal of Biochemistry, 105*, 212-218.

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโกนาโดโทรปินรีลีซซิ่งฮอร์โมนของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)

Sequencing of gonadotropin-releasing hormone gene of false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*)

ธนากร แสงสง่า[1,2] และ ชูตา บุญภักดี[1,3]

Thanakorn Saengsanga[1,2] and Chuta Boonphakdee[1,3]

บทคัดย่อ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนโกนาโดโทรปินรีลีซซิ่งฮอร์โมน (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) ทำโดยการสังเคราะห์ยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR จากเนื้อเยื่อสมองแล้วเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ GnRH_L/R ที่ออกแบบขึ้นใหม่ ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 208 คู่เบส มีความเหมือนสูงสุดกับยีน GnRH ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลา Burton's mouthbrooder (*Haplochromis burtoni*) ปลาไหลนา (*Monopterus albus*) และปลาข่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) (E value = 1e-50, 1e-50, 4e-46 และ 2e-34 ตามลำดับ) ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาวนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนได้เมื่อปลาได้รับสัมผัสสารรบกวนฮอร์โมน และศึกษาลักษณะโครงสร้างของยีน GnRH ในระบบสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนส้มขาวเป็นลำดับต่อไปได้

Abstract

The partial nucleotide sequences of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene of false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) were analyzed in this study. A 208-bp portion of GnRH gene was RT-PCR synthesized from the brain using a pair of primers (GnRH_L/R), newly designed from this study. The *A. ocellaris* GnRH sequences show high similarity with the GnRH from those of *Oreochromis niloticus*, *Haplochromis burtoni*, *Monopterus albus* and *Rachycentron canadum* (E values = 1e-50, 1e-50, 4e-46 and 2e-34, respectively). The nucleotide sequences can obviously be applied for investigating GnRH mRNA expression levels in fish upon exposure to endocrine disrupters, including gene structure and function in reproductive system of fish.

E-mail: auda1986@hotmail.com

[1]โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี

[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

[1]Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi

[2]Center of Excellence on Environmental Health, Toxicology and Management of Chemical

[3]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi

บทนำ

ในช่วงระยะ 10 ปีที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ของปลาหลายชนิดที่ได้รับสัมผัสกับสารรบกวนฮอร์โมน (endocrine disruptor) เช่น สาร nonyphenol (NP) และ bisphenol A (BPA) รวมทั้งฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น 17ß-estradiol (E_2) ในปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) (Vetillard & Bailhache, 2006) และปลาบู่ดำ (*Gobius niger*) (Maradonna & Carnevali, 2007) เป็นต้น ซึ่งสารรบกวนฮอร์โมนก่อให้เกิดการเบี่ยงเบนการทำงานของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันสารรบกวนฮอร์โมนในสิ่งแวดล้อมมีแนวโน้มเพิ่มมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการค้นหาดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะในปลาซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มใหญ่ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำและมักเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงที่จะได้รับผลกระทบโดยตรงเป็นลำดับแรกก่อนที่จะส่งผลกระทบถึงมนุษย์

เนื่องจากระบบนิเวศในแนวปะการังของไทยอยู่ใกล้กับชายฝั่งซึ่งเป็นแหล่งอาศัยหลักของสัตว์น้ำหลายชนิด จึงมีโอกาสปนเปื้อนของสารรบกวนฮอร์โมนได้ ปลาในวงศ์ Pomacentridae เช่น ปลาการ์ตูนเป็นกลุ่มปลาที่มีพฤติกรรมที่อาศัยอยู่ประจำถิ่นอยู่กับดอกไม้ทะเล แต่ในปัจจุบันจำนวนปลาในธรรมชาติลดน้อยลงโดยเฉพาะปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) อาจมีสาเหตุมาจากสารรบกวนฮอร์โมน ซึ่งปนเปื้อนมากับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โรงบำบัดน้ำเสียและจากชุมชน ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งอาศัยของปลาไปรบกวนฮอร์โมน GnRH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลในการลดระดับการสังเคราะห์ยีน GnRH2 ในปลาเรนโบว์เทราต์ (Vetillard *et al.*, 2006) เป็นต้น โดย GnRH มีหน้าที่กระตุ้นให้ต่อมใต้สมองผลิตและหลั่งฮอร์โมน GtHs (gonadotropin) 2 ชนิด คือ GtH I และ GtH II โดย GtH I จะควบคุมกระบวนการสร้างไวเทลโลจีนิน (vitellogenesis) และการสร้างเปลือกไข่ (zonagenesis) ในขณะที่ GtH II จะควบคุมการสมบูรณ์ของไข่ การตกไข่ กระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศ (Arukwe & Goksoyr, 2003) ดังนั้นการโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาวซึ่งยังไม่มีรายงาน จึงเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์หรือดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะในการศึกษาระดับการแสดงออกยีนเมื่อปลาสัมผัสกับสารรบกวนฮอร์โมนหรือลักษณะโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน GnRH ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาว
2. พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาว

วัสดุและระเบียบวิธีวิจัย

สัตว์ทดลอง

ปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัยอายุ 16-18 เดือน เพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 1 ตัวอย่าง

การออกแบบไพรเมอร์

ศึกษาบริเวณอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH จากปลาชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank แล้วทำการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) และออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ด้วยโปรแกรม Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000)

การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อสมองของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยสารละลาย Trizol (Invitrogen) ปฏิบัติตามวิธีในคู่มือของผู้ผลิต จากนั้นวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

การสังเคราะห์และการเพิ่มจำนวนซีดีเอ็นเอ (cDNA)

สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้น 500 นาโนกรัม ด้วย random hexamer nucleotide primer จำนวน 4 ไมโครกรัม และ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) จำนวน 200 ยูนิต โดยปฏิบัติตามวิธีการในคู่มือของผู้ผลิต จากนั้นเพิ่มจำนวนซีดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทำในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ซีดีเอ็นเอจำนวน 3 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (Vivantis) จำนวน 1 ยูนิต $MgCl_2$ จำนวน 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPmix จำนวน 0.2 มิลลิโมลาร์ และไพรเมอร์ GnRH L และ R ความเข้มข้นอย่างละ 2 ไมโครโมลาร์ และปรับปริมาตรด้วย nuclease free water จากนั้นนำเข้าเครื่อง T-Personal Thermal cycler (Biometra) โดยมีขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ก่อนเข้ารอบของปฏิกิริยาในขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.0% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใน 0.5x Tris-borate EDTA (TBE) เป็นเวลา 30 นาที และย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จำนวน 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การโคลน อ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

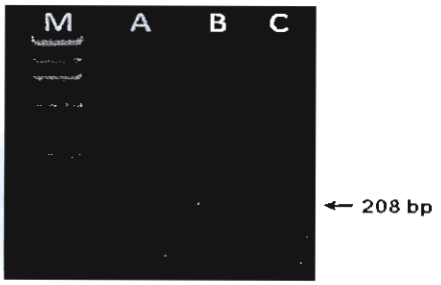
นำผลผลิตของยีน GnRH ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) โดยปฏิบัติตามวิธีในคู่มือของผู้ผลิต จากนั้นแทรกชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เข้าสู่พลาสมิด pGEM® T-easy Vector (Promega) และถ่ายฝากเพื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM 109 เลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพลิซิลินจำนวน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเลี้ยงในอาหารเหลวแล้วสกัดพลาสมิดโดยใช้ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท First Base Laboratories SdnBhd (Malaysia) แล้วเปรียบเทียบความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีรายงานบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ต http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

ทำการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาวกับปลาชนิดอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างเดนโดรแกรมเพื่อดูความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH ในปลาแต่ละชนิดโดยใช้ Maximum Composite Likelihood ด้วยวิธี Neighbor-Joining และค่า bootstrap 1,000 ครั้งด้วยโปรแกรม MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007)

ผลการทดลอง

จากการเพิ่มจำนวนซีดีเอ็นเอบริเวณยีน GnRH จากเนื้อเยื่อสมองของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นใหม่ในครั้งนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ (ภาพที่ 1) เมื่อผ่านการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วมีขนาด 208 คู่เบส จากนั้นทำการยืนยันผลโดยการเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วย nucleotide blast บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับยีน GnRH ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลา Burton's mouthbrooder (*Haplochromis burtoni*) ปลาไหลนา (*Monopterus albus*) และปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) โดยมีค่า E value เท่ากับ 1e-50, 1e-50, 4e-46 และ 2e-34 ตามลำดับ

จากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 2) และเดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของยีน GnRH ของปลาแต่ละชนิดที่มานำมาเปรียบเทียบด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยมีค่า bootstrap 1,000 ครั้งด้วยโปรแกรม MEGA 4 พบว่ายีน GnRH ที่นำมาวิเคราะห์นั้นแบ่งได้เป็น 2 เคลด (clad) โดยปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) จัดอยู่ในเคลดเดียวกันกับปลานิล (*O niloticus*) และปลา Burton's mouthbrooder (*H. burtoni*) ซึ่งแยกจากเคลดของปลาไหลนา (*Monopterus albus*) และปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) (ภาพที่ 3)



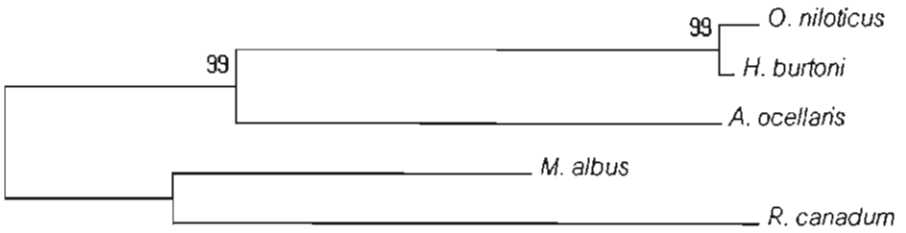
ภาพที่ 1 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน GnRH ที่เพิ่มจำนวนได้จากซีดีเอ็นเอของปลาการ์ตูนส้มขาว โดย M; standard marker, A: ปลาเพศเมีย, B: ปลาเพศผู้ และ C: ตัวควบคุมไม่มีซีดีเอ็นเอ

```
                    10        20        30        40        50        60        70
                    |  . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |
M.albus             CTGTGAAAAC CATGGCACTG TGGCTGCTGC TTGTGGGGAC ACTGGTGCCA CAGCTCTACT GTCAGCACTG
R.canadum           G......... AT.....T.. .........T .......A.. GT........ ....A..GG. ..........
O.niloticus         ...CA....T .T........ .......... .C.CA..... GG..T.T... ...GG..G.. ....A.....
H.burtoni           ...CA....T .T........ .......... .C.CA..... GG..T.T... ...GG..G.. ..........
A.ocellaris         ...CA....T .T........ .......... .......... .G.TT...TG .C.GG.AG.. ..........
Clustal Consensus

                    80        90        100       110       120       130       140
                    . . |  . . . |  . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |
M.albus             GTCGTTTGGA CTGAGTCCAG GAGGGAAGAG GGAACTGAAC AGCCTGTCAG ACACACTGGG CAATATAGTT
R.canadum           ...A.A.... .....C.... .......... .......G.. .....T.... .........C ......G...
O.niloticus         ...A.AC... .....C.... .......... ...T...G.. .A.T.C.... .......... ......G...
H.burtoni           ...A.AC... .....C.... .......... ...T...G.. .A.T.C.... .......... ......G...
A.ocellaris         .....A.... .....C.... .......... .......G.. ...T.T..T. ........T. ...C....C.
Clustal Consensus

                    150       160       170       180       190       200
                    . . . |  . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . . |  . . . .
M.albus             GAAGGATTTC CACATGTGGA CGCACCCTGC AGCATTTTGC GTTGTGCAGA GGAATTGCCT TTTGCGAG
R.canadum           ..G..CG... .......... .T.G...... .......... .A........ ...C.CC... ...C.C.A
O.niloticus         ....AG..C. ...GC..C.. A.....T... ..TG....TG .......... .....CA... .....C.A
H.burtoni           ....AG..C. ...GC..C.. A.....T... ..TG....CG .......... .....CA... .....C.A
A.ocellaris         .....T.... ....CA.... .........T ..TGC...TG .....A.... .....CA... .....C.A
Clustal Consensus
```

ภาพที่ 2 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน GnRH ทั้งสิ้น 208 คู่เบสของปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) กับปลาปลานิล (*O. niloticus*) ปลา Burton's mouthbrooder (*H. burtoni*) ปลาไหลนา (*Monopterus albus*) และปลาช่อนทะเล (*R. canadum*) โดยเครื่องหมาย (.) คือ นิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกัน (*) คือ clustal consensus



ภาพที่ 3 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลานิล (*O. niloticus*) ปลา Burton's mouthbrooder (*H. burtoni*) ปลาไหลนา (*M. albus*) และปลาช่อนทะเล (*R. canadum*); ตัวเลขแสดงค่า consensus tree ที่มีค่ามากกว่า 50% จากการทำ bootstrap 1,000 ครั้ง

วิจารณ์และสรุปผล

GnRH เป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ของปลากระดูกแข็ง พบทั้งสิ้น 8 ชนิด ประกอบด้วย catfishGnRH, chicken type II GnRH, herringGnRH, mammalianGnRH, pejerreyGnRH, salmonGnRH, seabreamGnRH และ whitefish GnRH (Lethimonier *et al.*, 2004) โดยส่วนมากในปลาแต่ละชนิดจะมี 2-3 ชนิด เช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*) มี 2 ชนิด คือ salmonGnRH และ chicken GnRH (Klausen *et al.*, 2001) ปลานิล (*O. mossam bicus*) ปลา Sockeye (*Oncorhynchus nerka*) ปลา Turbot (*Scophthalmus maximus*) และปลา Barfin Flounder (*Verasper moseri*) มี 3 ชนิด คือ chickenGnRH-II, salmonGnRH และ seabream GnRH (Amano *et al.*, 2002) ด้วยเหตุที่ GnRH ในปลาการ์ตูนส้มขาวยังไม่มีรายงานการศึกษา คณะผู้วิจัยจึงสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลาชนิดอื่นแล้วออกแบบไพรเมอร์ขึ้นใหม่ที่สามารถเพิ่มจำนวนจากซีดีเอ็นเอและได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 208 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 84% กับยีน seabreamGnRH ของปลานิล (*O. niloticus*; accession no. AB101665) โดยมียีนสมบูรณ์ (mRNA) ของ GnRH จำนวน 480 คู่เบส (White *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับปลา Burton's mouthbrooder (*H. burtoni*) (Parhar *et al.*, 2003)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาวพบจัดอยู่ในเคลดเดียวกับ GnRH ของปลานิล (*O. niloticus*) ปลา Burton's mouthbrooder (*H. burtoni*) แต่แยกกลุ่มจาก GnRH ของปลาไหลนา (*M. albus*) และปลาช่อนทะเล (*R. canadum*) แสดงว่า GnRH ของปลาการ์ตูนส้มขาวเป็นชนิด seabreamGnRH เช่นเดียวกับ GnRH ของปลานิล จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้จะเป็นข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบดีเอ็นเอโพรบหรือไพรเมอร์ที่จำเพาะในการทำ real time PCR และ/หรือการสร้างยีนที่สมบูรณ์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเมื่อปลาการ์ตูนส้มขาวได้รับสารรบกวนฮอร์โมนหรือคุณลักษณะโครงสร้างของยีน GnRH เป็นลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารการจัดการสารเคมี และอีกส่วนหนึ่งจากทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2552-2554 และตัวอย่างปลาการ์ตูนจากเพอคูล่าฟาร์ม ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

บรรณานุกรม

Amano, A., Takahashi, A., Yamanome, T., Okubo, K., Aida, K. & Yamamori, K. (2002). Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRHs in the brain of barfin flounder. *General and Comparative Endocrinology*, *126*, 325-333.

Arukwe, A., & Goksoyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, *2*, 1-21.

Klausen, C., Chang, J. P. & Habibi, H. R. (2001). The effect of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *129*, 511-516.

Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J-A., Lareyre, J- J. & Kah, O. (2004). Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, *135*, 1-16.

Maradonna, F. & Carnevali, O. (2007). Vitellogenin, zona radiata protein, cathesin D and heat shock protein 70 as biomarkers of response to xenobiotics. *Biomarkers*, 12, 240-255.

Parhar, I. S., Ogawa, S., Hamada, T. & Sakuma, Y. (2003). Single-cell real-time quantitative polymerase chain reaction of immunofluorescently identified neurons of gonadotropin-releasing hormone subtypes in cichlid fish. *Endocrinology*, 144, 3297-3300.

Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds) *Bioinformatics method and protocols: method in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *24*, 4876-4882.

Vetillard, A. & Bailhache, T. (2006). Effects of 4-*n*-nonylphenol and tamoxifen on salmon gonadotropin releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicological Sciences*, *92*, 537-544.

Vetillard, A., Ferriere, F., Jegot, P. & Bailhachet, T. (2006). Regulation of salmon gonadotropin-releasing hormone gene expression by sex steroids in rainbow trout brain. *Journal of Neuroendocrinology*, *18*, 445-453.

White, S. A., Kasten, T. L., Bond, C. T., Adelman, J. P. & Fernald, R. D. (1995). Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 8363-8367.