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

การสืบค้นยีนที่มีศักยภาพเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ที่ ได้รับสาร bisphenol A ด้วยวิธี cDNA-AFLP

ยุทธนา เทพทอง

เริ่มบริการ
26 ก.ค. 2554
16 ส.ค. 2554
291554

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กรกฎาคม 2554

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ชุทธนา เทพทอง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

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

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์)

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

.....กรรมการ
(ดร.ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)
วันที่...1....เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2554

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม
พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี
ประจำปีการศึกษา 2552

ประกาศคุณูปการ

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

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จตุรงค์ พุทธพรทิพย์ ประธานคณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ จากคณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท คณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาร่วมพิจารณาและให้คำแนะนำในการแก้ไขรายงานให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี ที่มอบทุนการศึกษาและทุนวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ เจ้าของงานวิจัยที่ใช้อ้างอิงตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่

ขอขอบพระคุณ สมาชิกทุกคนของห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

คุณค่าและประโยชน์ทางวิชาการของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอกราบเป็นกตเวทิตาแด่คณาจารย์ผู้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ยุทธนา เทพทอง

51913057: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: bisphenol A/ หอยเจดีย์/ cDNA-AFLP

ยุทธนา เทพทอง: การสืบค้นยีนที่มีศักยภาพเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ที่ได้รับสาร bisphenol A ด้วยวิธี cDNA-AFLP (cDNA-AFLP IDENTIFICATION OF A POTENTIAL BIOMARKER IN THE HORN SNAIL (*Cerithidea cingulata)* EXPOSED TO BISPHENOL A) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph. D., ถนอมศักดิ์ บุญภักดี, D.Agr.Sc. 68 หน้า. พ.ศ. 2554.

การสืบค้นเครื่องหมายทางชีวภาพเพื่อใช้ตรวจสอบสาร bisphenol A (BPA) ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP กับหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ตัวเต็มวัยที่ได้รับสาร BPA โดยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 1 µg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA สามารถคัดเลือกแถบจากเทคนิค cDNA-AFLP เป้าหมายจำนวน 1 แถบ ที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA คือ 372_AFLP เมื่อโคลน อ่านลำดับเบส แล้วนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของเครื่องหมาย 372_AFLP ไม่สามารถเทียบเคียงได้กับยีนใด ๆ ที่ปรากฏในฐานข้อมูล (เมษายน 2554) แต่มีความเหมือน 82 % กับ sex and growth traits AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับเบสของ 372_AFLP สำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในปฏิกิริยาจำเพาะด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ผลการทดสอบเครื่องหมาย 372_AFLP ที่คัดเลือกได้นี้พบว่าเมื่อหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 10 ng/L และ 1 µg/L เป็นระยะเวลานาน 7 วัน ตรวจวัดระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ได้ในระดับต่ำ ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/L เป็นระยะเวลานาน 30 วัน สามารถชักนำระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ที่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียเพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม 11.4 เท่า ดังนั้น 372_AFLP สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพตรวจสอบการสัมผัสสาร BPA ในหอยเจดีย์ และการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

51913057: MOJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M. Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: BISPHENOL A/ HORN SNAIL/ cDNA-AFLP

YOOTHANA THEPTONG: cDNA-AFLP IDENTIFICATION OF A POTENTIAL BIOMARKER IN THE HORN SNAIL (*Cerithidea cingulata)* EXPOSED TO BISPHENOL A. ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph. D., THANOMSAK BOONPHAKDEE, D.Agr.Sc. 68 P. 2011.

To search the putative exposure biomarker for detection of bisphenol A (BPA) contaminated in environment, cDNA-AFLP method in horn snail (*Cerithidea cingulata*) was used in this study. A cDNA-AFLP banding differences between the horn snail adult exposed to 1 μg/L BPA and the control group (no BPA) were screened. A 372-bp cDNA-AFLP fragment designed 372_AFLP, appeared in the BPA-treated group was selected, cloned and then sequenced. However, the 372_AFLP nucleotide sequences did not match any gene sequence deposited in GenBank (April 2011), but showed 82 % identity with sex and growth traits AFLP marker sequences of *Penaeus monodon*. The new specific primers pair, therefore, was designed from these 372_AFLP sequences for the specificity of semi-quantitative RT-PCR. After 7 days of BPA exposure at 10 ng/L and 1 μg/L, low level of horn snail 372_AFLP expression was detected in both gonads (testis and ovaries). The 372_AFLP expression level of 1 μg/L-BPA after 30 days exposure was significantly up-segulated, 11.4-fold higher than that of the control group. Therefore, 372_AFLP can be used as a exposure biomaker for monitoring BPA in the horn snail and contamination in the aquatic environment.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

สมมติฐานของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวข้อง..... 4

อนุกรมวิธานและการจัดหมวดหมู่ของหอยเจดีย์..... 4

วงจรชีวิตของหอยเจดีย์..... 5

สาร bisphenol A (BPA)..... 6

ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker)..... 8

การสืบค้นยีนด้วยวิธี cDNA-AFLP..... 11

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 15

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 18

อุปกรณ์..... 18

สารเคมี..... 19

การเตรียมตัวอย่างหอยเจดีย์..... 20

การสกัดอาร์เอ็นเอจากระบบสืบพันธุ์หอยเจดีย์..... 20

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)..... 21

การค้าหาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP..... 21

การวิเคราะห์แถบ DNA ของAFLP..... 23

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การสกัดแยก DNA ออกจาก polyacrylamide gel	23
	การเชื่อมต่อชิ้น DNA กับพลาสมิดและการทรานฟอร์เมชั่น	24
	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	25
	การวัดระดับการแสดงออกของยีน	26
4	ผลการวิจัย	27
	การเตรียม RNA	27
	การคัดเลือกแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP บนเจลอะกาโรส	28
	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่ได้คัดเลือก	29
	การพัฒนาใช้ Eco_372 เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ	34
	การศึกษาผลของสาร BPA ต่อระดับการแสดงออกของ 372_AFLP	35
5	อภิปรายและสรุปผล	38
	อภิปรายผลการทดลอง	38
	สรุปผลการทดลอง	41
	ข้อเสนอแนะ	42
บรรณานุกรม		43
ภาคผนวก		47
	ภาคผนวก ก	48
	ภาคผนวก ข	55
	ภาคผนวก ค	57
ประวัติย่อของผู้วิจัย		68

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้คัดเลือก DNA ในปฏิกิริยา cDNA-AFLP..... 28

4-2 รายละเอียดของแถบ DNA ที่คัดเลือกได้ภายหลังจากเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR..... 33

ผก-1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยที่ต่อระดับการแสดงออกของ 372_AFLP..... 53

ผก-2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของ 372_AFLP เมื่อหอยเจดีย์ได้รับ BPA เป็นเวลาต่างๆ..... 54

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*)..... 5

2-2 โครงสร้างสาร bisphenol A หรือ BPA..... 7

2-3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ complementary DNA..... 11

2-4 ขั้นดอนการทำปฏิกิริยาเอแอฟแอลพี (AFLP)..... 12

3-1 การคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะจากเทคนิค cDNA-AFLP จากระบบสืบพันธุ์หอยเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 1 µg/L เป็นเวลา 2 สัปดาห์..... 23

4-1 RNA จากอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ที่รับสาร BPAเข้มข้น 1 µg/L นาน 14 วัน ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis..... 27

4-2 แถบ DNA เป้าหมายจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ (Eco_AAG/Mse_CTA) ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gelใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 30

4-3 แถบ DNA เป้าหมายจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gelใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 31

4-4 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA Eco_372 (a) และ Eco_223 (b) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ sex and growth traits AFLP marker sequence ของกุ้งกุลาดำ (GenBank accession no. AY654005) ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast วงรีแสดงจำนวนลำดับเบสที่เทียบเคียงและ % ความเหมือน..... 32

4-5 ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 109 คู่เบส ของ 372_AFLP ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel Electrophoresis..... 34

4-6 ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณยีน 28S *rRNA* ของหอยเจดีย์ขนาดประมาณ 250 คู่เบสตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis (a) และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ของหอยเจดีย์ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast บนฐานข้อมูล GenBank (b)..... 35

4-7 การแสดงออกของ 372_AFLP เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10ng/L และ 1 µg/L ที่ระยะเวลาต่างๆ..... 36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-8 ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียเมื่อได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ความเข้มข้น (a) BPA เข้มข้น 10 ng/L และ (b) BPA เข้มข้น 1 ug/L เป็นเวลา 0, 7, 14 และ 30 วัน..... 37

ผก-1 การคัดเลือกแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_AGC/Mse_CTA ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast..... 49

ผก-2 การคัดเลือกแถบ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_ACT/Mse_CTA ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักดิ์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast..... 50

ผก-3 การคัดเลือกแถบ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_ACT/Mse_CTT ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักดิ์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast..... 51

ผก-4 การคัดเลือกแถบ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_ACT/Mse_CTT ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักดิ์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast..... 52

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมมีความก้าวหน้ากว่าในอดีตมาก โดยเฉพาะอุตสาหกรรมพลาสติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมใช้กันทั่วโลก ดังนั้นสารเคมีที่ใช้ในการผลิตพลาสติกโดยเฉพาะ bisphenol A (BPA) จึงมีโอกาสที่จะปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ ในระบบนิเวศแหล่งน้ำการปนเปื้อนของสาร bisphenol A อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น น้ำทิ้งที่ปล่อยออกมาจากโรงงานบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระบบบำบัดน้ำเสียจะไม่มีระบบการกำจัดสาร bisphenol A ได้อย่างสมบูรณ์ แต่การปนเปื้อนที่พบนั้นจะอยู่ในปริมาณที่ต่ำ (Lee & Peart, 2000) นอกจากนั้นแล้วน้ำเสียจากครัวเรือนที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมพบว่ามีปริมาณการปนเปื้อน bisphenol A ปะปนออกมากับน้ำเสีย เพราะน้ำเสียจากบ้านเรือนจะผ่านการชะล้างผลิตภัณฑ์พลาสติก และท่อพลาสติก PVC น้ำเสียเหล่านี้ส่วนใหญ่จะไม่ได้รับการบำบัดและปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมโดยตรง (Fuerhacker, Scharf, & Weber, 2000)

การรับและสัมผัสสาร bisphenol A ของสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมสามารถเกิดขึ้นได้หลายทาง อาทิเช่น ทางผิวหนังและการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนสาร bisphenol A เข้าไปในร่างกาย สาร bisphenol A จะซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตและมีพฤติกรรมเหมือนกับฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยจะจับกับ estrogen receptor ที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึม ส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนเพศออกมามากผิดปกติ มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์และอวัยวะสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทั้งสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และการผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนี้อาจส่งผลต่อโครงสร้างประชากรของสิ่งมีชีวิต เช่น อัตราการฟักไข่ลดลง อัตราการรอดชีวิตของประชากรลดลง เช่น ในปลาและหอย (Cajaraville, Cancio, Ibabe, & Orbea, 2003) ส่วนในมนุษย์นั้นสาร bisphenol A มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งในต่อมลูกหมาก (Belfroid, Velzen, Horst, & Vethaak, 2007) และส่งผลต่อความผิดปกติทางพันธุกรรมของเซลล์ในร่างกายอีกด้วย bisphenol A เป็นสารที่ใช้ในอุสาหกรรมหลายชนิด เช่น เป็นสารตัวกลางในการผลิตโพลีคาร์บอเนต และเป็นสารเคมีที่ใช้ทั่วไปในการผลิตภาชนะ บรรจุภัณฑ์ หรือผลิตภัณฑ์พลาสติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมากที่สุดในโลก (Cousins, Staples, Klecka, & Mackay, 2002) และยังพบว่ามีปนเปื้อนอยู่ในฝุ่นละอองทั่วไป ดังนั้นถ้าการกำจัดหรือการขนส่งสารไม่ได้มาตรฐาน bisphenol A ก็จะมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนั้นได้

การตรวจวัดและบ่งชี้การปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมนั้นสามารถทำได้โดยใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) หรือดัชนีชี้วัดความผิดปกติที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ภายในตัวของสิ่งมีชีวิต หรือสารผลิตภัณฑ์ซึ่งถูกผลิตขึ้นในสิ่งมีชีวิตได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน และตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหลายชนิดถูกพัฒนาเพื่อใช้ประเมินการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยมลพิษ เช่นสารเคมี และ สารแปลกปลอมทางชีวภาพ โดยศึกษาจากของเหลวในร่างกาย หรือเนื้อเยื่อ รวมถึงการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงระดับการปนเปื้อนของมลพิษได้ (Livingstone, Chipman, Lowe, Minier, Mitchelmore, & Moore, 2000) ในระบบนิเวศแหล่งน้ำ หอยเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความสนใจมากอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากหอยเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่ประจำถิ่นในช่วงชีวิตหนึ่ง ไม่มีการเคลื่อนย้าย เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีระบบการกินอาหารแบบกรอง และมีการแพร่กระจายทั่วไปพบได้ทุกฤดูกาล ซึ่งหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ซึ่งเป็นหอยฝาเดียวขนาดเล็ก กระจายตัวอยู่ตามหาดโคลนแนวชายฝั่งโดยจะพบมากในบริเวณที่มีความเค็มสูง กินพวกสารอินทรีย์ขนาดเล็ก แพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่อยู่ตามพื้นดินเป็นอาหาร จึงมีความเหมาะสมที่จะนำหอยเจดีย์มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของมลพิษในแหล่งน้ำ

ในปัจจุบันเทคนิค cDNA-AFLP ได้รับความสนใจและนำมาประยุกต์ใช้ศึกษามลพิษในสิ่งแวดล้อม โดยศึกษา cDNA จากกระบวนการ Reverse transcription-Polymerase chain reaction โดยเปลี่ยน RNA ให้เป็น complementary DNA เพิ่มจำนวน cDNA แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อคัดเลือกชิ้น cDNA ที่มียีนเป้าหมาย และทำการโคลน อ่านลำดับเบส ในการคัดเลือกด้วยวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก และมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่นๆ เช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค microarray ที่นิยมใช้ศึกษาการแสดงออกและปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและโปรตีน ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายสูงและขั้นตอนการวิเคราะห์ซับซ้อน อย่างไรก็ตาม โปรตีนนั้นเป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับสารเคมีบางชนิดและความร้อน การวิเคราะห์ผลอาจผิดพลาดได้ ด้วยเหตุนี้ cDNA-AFLP จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นเทคนิคค้นหาเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลในครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อค้นหายีนที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ที่รับสัมผัสสาร bisphenol A ด้วยเทคนิค cDNA-AFLP

2. ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางชีวภาพที่คัดเลือกได้ในหอยเจดีย์ที่สัมผัสสาร biphenol A ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

3. เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร bisphenol A ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

1.3 สมมติฐานการวิจัย

หอยเจดีย์เมื่อได้รับสัมผัสสาร bisphenol A จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนบางยีนที่แตกต่างจากหอยเจดีย์ที่ไม่ได้รับสาร BPA ซึ่งสามารถตรวจหายีนนั้นได้ด้วยเทคนิค cDNA-AFLP

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถนำเครื่องหมายทางชีวภาพที่คัดเลือกได้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ bisphenol A ในแหล่งน้ำได้

2. สามารถใช้เครื่องหมายทางชีวภาพเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสาร bisphenol A ได้

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์จากแหล่งธรรมชาติ นำมาทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยให้รับและสัมผัสสาร biphenol A ด้วยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 10 ng/L และ 1 µg/L เป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ แล้วค้นหายีนหรือเครื่องหมาย DNAที่ตอบสนองต่อสารดังกล่าวในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค cDNA-AFLP คัดเลือกชิ้น cDNA เป้าหมายนำมาโคลนและอ่านลำดับเบสเพื่อยืนยันชนิดของยีนหรือเครื่องหมาย DNA และทดสอบประสิทธิภาพดังกล่าวโดยใช้เทคนิค semi-quantitative PCR วัดระดับการแสดงออกของยีนในหอยเจดีย์ที่รับสาร biphenol A ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานและการจัดหมวดหมู่ของหอยเจดีย์

หอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) มีชื่อสามัญคือ Girdled horn shell สามารถจัดลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Gmelin, 1971)

Phylum Mollusca

Class Gastropoda

Subclass Orthogastropoda

Superorder Caenogastropoda

Order Sorbeoconcha

Superfamily Cerithioidea

Family Potamididae

Genus *Cerithidea*

Subgenus *Cerithideopsilla*

Cerithidea (Cerithideopsilla) cingulata

หอยเจดีย์เป็นหอยฝาเดียวขนาดเล็ก เปลือกลักษณะเป็นเกลียว ปลายแหลม คล้ายเจดีย์ มีขนาดโตประมาณ 2 เซ็นติเมตร ผิวเปลือกเป็นแบบปุ่ม (nodule) เมื่อหอยเจดีย์โตเต็มที่แล้วปากเปิดเปลือก (aperture) จะบานออกในตัวเมีย มีวงเปลือกมากกว่า 5 วงขึ้นไป เมื่อเจริญเต็มที่แล้วมักพบปลายยอดแรกเกิด (protoconch) กร่อน เนื่องจากหอยชนิดนี้อยู่ในที่มีสารอินทรีย์สูง ขนาดของเปลือกจะมีขนาดแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปริมาณของสารอินทรีย์แหล่งที่อาศัย (Houbrick, 1984) ตัวเมียจะพบอวัยวะวางไข่ (ovipositor) ทางด้านขวาตอนใต้ของวงยื่นออกมาเป็นตุ่มสีเหลือง ซึ่งจะเชื่อมต่อกับร่องของซีเลีย (ciliated groove) ทำหน้าที่เป็นทางเดินของกลุ่มไข่ (egg mass) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นยาวเรียว เนื่องจากหอยในกลุ่มนี้จะมีการปฏิสนธิภายนอก ปากของหอยเจดีย์จะมีลักษณะเป็นงวง ซึ่งแรดูลา (radula) จะอยู่ทางตอนหน้าของงวง ดังรูปที่ 2-1 หอยเจดีย์อาศัยอยู่ในหาดหินและหาดโคลนบริเวณแนวชายฝั่งโดยเฉพาะในป่าชายเลน และพบว่ามีส่วนน้อยที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดและน้ำกร่อย (Kim & Lee, 2009)

ในระบบนิเวศป่าชายเลน หอยเจดีย์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ตามหน้าดินทำหน้าที่เป็นผู้บริโภคสารอินทรีย์ขนาดเล็ก แพลงก์ตอนพืช และแบคทีเรียที่อยู่ตามพื้นดินเป็นอาหาร นอกจากนั้นหอยเจดีย์จัดเป็นกลุ่มหอยกินซาก (detritivores) ของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศป่าชายเลนอีกด้วย

ภาพที่ 2-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*)

http://www.idscaro.net/sci/01_coll/pics/gastro/potamididae/cerithidea_cingulata1.jpg. 30/11/52

2.2 วงจรชีวิตของหอยเจดีย์

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

การพัฒนาของไข่หอยเจดีย์หลังจากแม่หอยวางไข่ ประมาณชั่วโมงที่ 2 ไข่ของหอยจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ cleavage จากนั้นจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastula ในชั่วโมงที่ 7 และเข้าสู่ระยะ gastrula ตัวอ่อนภายในเปลือกไข่มีการแบ่งเซลล์มากขึ้น ทำให้ระยะจากเปลือกไข่กับตัวอ่อนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด รวมถึงวุ้นที่หุ้มไข่มีความหนืดลดลงทำให้ไข่หลุดลอยไปตามกระแสน้ำได้ง่าย ไข่จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ trochophore ซึ่งยังอยู่ในเปลือกไข่ ตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายลูกข่าง เกิดขน (cilia) เป็นวงรอบตัวและมีกระจุกขนอยู่ปลายด้านบนและมีการเคลื่อนไหวของขน ประมาณชั่วโมง

ที่ 40 ตัวอ่อนของหอยเจดีย์จะเข้าสู่ระยะ veliger เริ่มมีเปลือกใสๆเกิดขึ้น รอยคอดของตัวชัดเจนขึ้น มีการแบ่งเซลล์ให้เห็น velum ชัดเจน เกิดลักษณะของเปลือกวัยอ่อน สามารถสังเกตเห็นอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ตับ และทางเดินอาหาร จากนั้นตัวอ่อนจะเริ่มใช้ velum เจาะเปลือกไข่ จนสามารถออกสู่ภายนอก ระยะเวลาการพัฒนาจากไข่จนเข้าสู่ระยะ veliger ใช้เวลาประมาณ 3 วัน ตัวอ่อนระยะ veliger จะพัฒนาเข้าสู่ระยะคืบคลาน ลูกหอยจะเริ่มลงสู่พื้นหรือหาวัสดุยึดเกาะ ใช้เวลาประมาณ 15 วัน velum จะหายไปเกิดเป็นแผ่นเนื้อแมนเทิล เริ่มคืบคลาน และกินอาหารประเภทแพลงก์ตอนเซลล์เดียว ลูกหอยจะเริ่มสร้างเปลือกที่แท้จริงและพัฒนาเท้าจนเหมือนกับระยะตัวเต็มวัย ระยะเวลาการพัฒนาจากระยะคืบคลานจนถึงเปลือกมี 5 เกลียวใช้เวลาประมาณ 1 เดือน (กฤษณา รัตนอาภา, 2540)

2.3 สารรบกวนฮอร์โมน (estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals)

สารรบกวนฮอร์โมนเป็นสารแปลกปลอมในสิ่งแวดล้อมที่รบกวนการทำงานของฮอร์โมนในร่างกาย ซึ่งอาจจะไปกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือฮอร์โมนอื่น ๆในร่างกาย กลไกการรบกวนในระดับโมเลกุลสามารถเกิดขึ้นได้ 4 แบบ (Goksoyr et al., 2003)

1. เลียนแบบฮอร์โมนภายในร่างกาย โดยจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจน (estrogen receptor) จึงทำให้เกิดการตอบสนองในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์เช่นเดียวกับที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจน

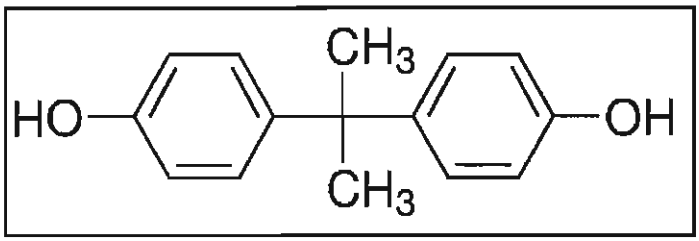
2. ขัดขวางการทำงานของฮอร์โมน โดยแย่งจับกับตัวรับสัญญาณของฮอร์โมน ทำให้ฮอร์โมนตัวจริงไม่สามารถทำงานได้

3. เปลี่ยนแปลงการสร้างและทำลายของฮอร์โมนในร่างกาย จะรบกวนระดับการสร้างมีผลทำให้การส่งสัญญาณผิดปกติ

2.4 สาร bisphenol A (BPA)

bisphenol A หรือ BPA; 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ของ phenol 2 หมู่ที่เชื่อมต่อกัน และหมู่ methyl 2 หมู่เชื่อมอยู่ระหว่างกลาง ดังภาพที่ 2-2 BPA เป็นสารตัวกลางในการผลิตโพลีคาร์บอเนต เป็นสารเคมีที่ใช้มากในภาชนะบรรจุอาหาร โดยเป็นตัวทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพลาสติกมีความแข็งแรงมากขึ้น และเป็นส่วนประกอบของ resin ที่ใช้ในการผลิตกระป๋องใส่ผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมของสารประกอบที่ใช้ในการอุดฟันอีกด้วย สาร BPA เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตเจน ซึ่งทำให้การเจริญและเพศ

ของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนไป โดยในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเพศผู้จะไปลดจำนวนสเปิร์มให้น้อยลง ส่วนในเพศเมียในกลุ่มของหอยและหมึกที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้ระบบสืบพันธุ์ผิดรูปไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ (Ohelmann et al., 2006) นอกจากนั้นแล้วยังพบว่า BPA มีผลชักนำให้ผลิต vitellogenin ที่ตับในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และผลิต vitellin ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Crain et al., 2007) ตัวอย่างผลการศึกษาในกบ (*Xenopus laevis*) เมื่อได้รับ BPA มากกว่า 5.7 mg/L เกิดความผิดปกติของการขดตัวของอวัยวะในระบบทางเดินอาหารมีการเจริญของอวัยวะผิดปกติ และลำตัวสั้นกว่าปกติ (Sone et al., 2004)



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างสาร bisphenol A หรือ BPA

http://www.standardsusers.org/standardsusers/images/stories/800px-bisphenol_a.svg.png. 30/11/52

2.4.1 กลไกการทำงานของสาร bisphenol A

เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสัมผัสสาร bisphenol A ที่ปนเปื้อนไปกับอาหาร หรือการรับสัมผัสสารทางผิวหนัง สาร BPA จะเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือด และเนื่องจากสาร BPA นั้นมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงเข้าไปแย่งจับกับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen-receptor) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอสโตรเจนและจะรวมตัวกันเป็นไดเมอร์ของเอสโตรเจน (estrogen receptor dimmer) แล้วเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนที่สร้างฮอร์โมนเพศ (sex hormone) ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศมากผิดปกติ นอกจากนี้ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกปลาเมื่อรับสัมผัสสารเหล่านี้เป็นเวลานานจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ vitellogenin เพิ่มขึ้นด้วย (Crain et al., 2007)

เมื่อสิ่งมีชีวิตสัมผัสกับสารพิษจะเกิดการตอบสนองต่อสารตามการเป็นพิษของสารนั้น ซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีบริเวณที่ก่อให้เกิดพิษแตกต่างกันออกไปส่วนใหญ่จะพบมากที่ตับและไต เนื่องจากเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่กำจัดสารพิษ (Walker, Hopkin, Sibly, & Peakall, 2006)

BPA เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะทำหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน มีผลทำให้เกิดการตอบสนองขั้นแรกทางอณูชีววิทยาและชีวเคมี (molecular and biochemical responded) ของสิ่งมีชีวิต เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนหรือฮอร์โมนเพศในร่างกายของสัตว์ เนื่องจากการเพิ่มของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนมากกว่าปกติ จะทำให้เกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยา (physiological response) เช่น การลดจำนวนตัวอสุจิในมนุษย์ ลดอัตราการเจริญเติบโต เกิดความผิดปกติของอวัยวะสืบพันธุ์ช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์และในระยะเจริญพันธุ์ เป็นต้น ปรากฏการณ์ที่เกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากร เช่น จำนวนของประชากร ลดอัตราการฟักไข่ เป็นต้น

การปนเปื้อนของสาร BPA ในสิ่งแวดล้อมก็อาจเกิดมาจากหลายสาเหตุ เช่น โรงงานอุตสาหกรรม พลาสติกหากมีการจัดการที่ไม่เหมาะสมก็อาจทำให้มีการปนเปื้อนของสาร BPA ในสิ่งแวดล้อมและอาจก่อผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ในธรรมชาติ และนอกจากนั้นน้ำเสียจากครัวเรือนซึ่งถือเป็นของเสียที่ไม่ทราบแหล่งที่มา (non-point source) ที่ผ่านการชะล้างผลิตภัณฑ์พลาสติก และท่อพลาสติกที่ทำจากพีวีซี และไม่ได้ผ่านการบำบัดจากโรงงานบำบัดน้ำเสียจะพบการปนเปื้อนของ BPA ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 4-1730 μg/L (Yamamoto, & Yasuhara, 1999)

2.5 ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker)

Biomarker หมายถึง ดัชนีชี้วัดความเป็นพิษที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ภายในตัวของสิ่งมีชีวิต หรือสารผลิตภัณฑ์ซึ่งถูกผลิตขึ้นจากสิ่งมีชีวิต (Oriti-Zarragoitia, & Cajaraville, 2006) จากการได้รับสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้ประเมินสถานการณ์การปนเปื้อนที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม การประเมินความเสี่ยงต่อความปลอดภัยของประชากรสิ่งมีชีวิตจากการรับสัมผัส และบริโภคสิ่งมีชีวิตในบริเวณที่ปนเปื้อนรวมทั้งสามารถประเมินผลกระทบความเสียหายทางด้านระบบนิเวศได้ด้วย ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพนั้นเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการศึกษาสุขภาวะของระบบนิเวศทั้งบริเวณปากแม่น้ำและระบบนิเวศทางทะเล ดังนั้นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหลาย ๆ ชนิดจึงได้รับความสนใจและถูกพัฒนาเพื่อใช้ประเมินการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนมลพิษ ตัวบ่งชี้ชีวภาพสามารถวัดปริมาณของเหลวในร่างกาย เซลล์ หรือเนื้อเยื่อซึ่งจะบ่งชี้ส่วนของชีวเคมีในระดับเซลล์ซึ่งจะแสดงให้เห็นสิ่งที่ปนเปื้อนหรือการตอบสนองทางชีวเคมีที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตต่อสิ่งปนเปื้อนเหล่านั้น (Livingstone, Chipman, Lowe, Minier, Mitchelmore, & Moore, 2000)

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่รายงานถึงตัวบ่งชี้ชีวภาพที่ใช้ตรวจสอบสาร BPA ที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น การทดสอบการเพิ่มปริมาณของ peroxisome ในตัวอ่อนของหอยทาก (*Potamopyrgus antipodarum*) (Duft . Schulte-Oehlmann, Tillmann, Weltje, & Oehlmann, 2003) การศึกษาโปรตีน zona radiata ในเยื่อหุ้มไข่ชั้นในของปลาข้าวสาร (*Oryzias latipes*) (Lee, Na, & Park, 2002) แต่อย่างไรก็ตามตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ได้รับความสนใจส่วนใหญ่คือ vitellogenin ซึ่งมักจะพบได้ทั่วไปในตับของสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศเมียที่ออกลูกเป็นไข่ เช่น ปลา และ กบ ส่วนในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวก หมึก และหอย ก็มีการสร้าง vitellogenin ด้วยเช่นกัน (Porte, Janer, Lorusso, Ortiz-Zarragoitia, Cajaraville, Fossi, & Cancsi, 2006) แต่จะเป็น vitellogenin-like โปรตีน vitellogenin นั้นได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วย ดังนั้นในสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศผู้หรือตัวอ่อนที่ฟักออกมาจากไข่ หรือแม้แต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังก็ยังมีสาร vitellogenin อยู่ แต่ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเพศผู้นั้นมีปริมาณต่ำจึงไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สาร vitellogenin ขึ้นมาได้ แต่อย่างไรก็ตาม vitellogenin นั้นสามารถถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์ขึ้นมาได้หากสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศผู้และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังได้รับสารประกอบของฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น BPA (Pampanin, Marangon, Volpvato, Campesan, & Nasci, 2005)

2.6 วิธีการตรวจวัดการแสดงออกของยีนหรือปริมาณโปรตีน

วิธีการตรวจวัดระดับการสังเคราะห์ยีนหรือการวัดปริมาณโปรตีนมีหลายวิธีที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างสัตว์ทดลอง เช่น การใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา ที่ทดสอบหาแอนติบอดีหรือแอนติเจน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน เช่น radioimmunoassay (RIA) ซึ่งมีความไวสูงแต่อาศัยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์แบบจับ (binding assay) โดยการนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีไปติดฉลากกับสารเรืองแสงที่มีความไวสูง และ immunohistochemistry ซึ่งต้องอาศัยทักษะการเตรียมเนื้อเยื่อตัวอย่างและความเชี่ยวชาญในการตรวจวัด ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต มีขั้นตอนการศึกษายุ่งยากและใช้เวลามากในการผลิตแอนติบอดี ทั้งนี้การตรวจวัดในระดับโปรตีนแอนติบอดีอาจเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจน (cross reaction) ต่อพลาสมาของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกัน ไม่จำเพาะต่อชนิดได้ เช่น การใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน VTG ของปลาหมอ (*Oreochromis aureus*) ทดสอบกับโปรตีน VTG ของปลาไน (*Cyprinus carpio*) ปลาทอง (*Carassius auratus*) และปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) พบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน

VTG ของปลาหมอไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน VTG ของปลาไนและปลาทองซึ่งเป็นปลาต่างวงศ์กัน แต่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน VTG ของปลาหมอเทศซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกัน (Ding, Hee, & Lam, 1989) ส่วนการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนนั้นเป็นขั้นตอนการศึกษาในระดับการทรานสคริปชัน ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์ mRNA เพื่อนำรหัสพันธุกรรมไปสังเคราะห์โปรตีนต่อไป ดังนั้นการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของ mRNA จะมีความไวและเกิดการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าระดับโปรตีน และด้วยเทคโนโลยี polymerase chain reaction (PCR) ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มชิ้นส่วนหรือปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองโดยเลียนแบบการสังเคราะห์ DNA ตามธรรมชาติ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase, co-enzyme, 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 28S ribosomal RNA (28S *rRNA*) เนื่องจากยีนดังกล่าวมีระดับการแสดงออกคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมที่ได้รับ (Arukwe, 2006)

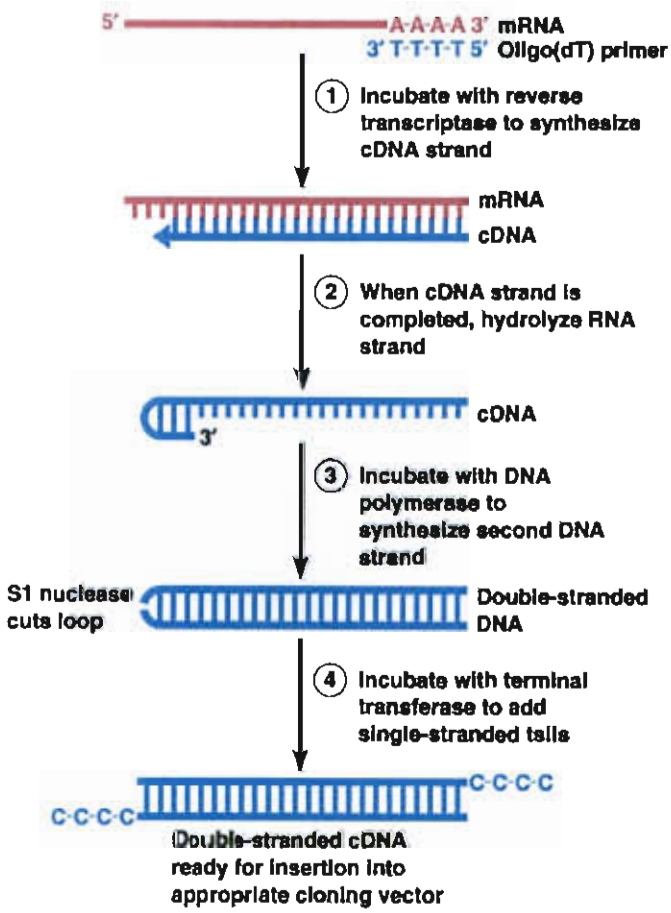
การวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR จึงกลายเป็นวิธีที่มีบทบาทสำคัญในปัจจุบันที่สามารถเข้าใจกลไกการทำงานของเซลล์ขั้นพื้นฐานที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารมลพิษในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถทำได้ 3 วิธีคือ semi-quantitative RT-PCR, competitive RT-PCR และ real-time RT-PCR ซึ่ง 2 วิธีแรก การทำ PCR ต้องหาจำนวนรอบที่ทำการเพิ่มปริมาณที่เหมาะสม โดยการเพิ่มจำนวน DNA และปริมาณ DNA ต้นแบบให้มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง (linear relationship) ซึ่งเป็นการวัดการแสดงออกของยีนจากปริมาณของ mRNA ที่อยู่ภายในเซลล์ แต่วิธีนี้อาจต้องใช้เวลานานเนื่องจากต้องหาจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสม และในการวัดปริมาณของ DNA ทำได้เมื่อกระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA เสร็จสิ้นก่อนจึงจะสามารถตรวจสอบได้ด้วย gel electrophoresis จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี PCR ขึ้นไปอีกระดับคือ real-time RT-PCR ซึ่งมีความไวสูงซึ่งสามารถตรวจสอบในระดับ 1 ug/mL หรือต่ำกว่าได้ (Arukwe & Goksoyr, 2003) และติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองได้ตลอดกระบวนการ วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องหารอบที่เหมาะสม สามารถติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ไปพร้อม ๆ กับการเพิ่มปริมาณโดยใช้สารเรืองแสงเป็นตัวติดตาม แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค

real-time RT-PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงจึงเป็นข้อจำกัดในการปฏิบัติสำหรับบางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นเทคนิค semi-quantitative RT-PCR จึงยังได้รับความนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

2.7 การสืบค้นยีนด้วยวิธี cDNA-AFLP

ซีดีเอ็นเอ (cDNA: complementary DNA)

complementary DNA (cDNA) เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมาจากเอ็มอาร์เอ็นเอต้นแบบ เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase วิธีการสังเคราะห์ cDNA จึงเรียกว่า Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) มีขั้นตอนดังภาพที่ 2-3

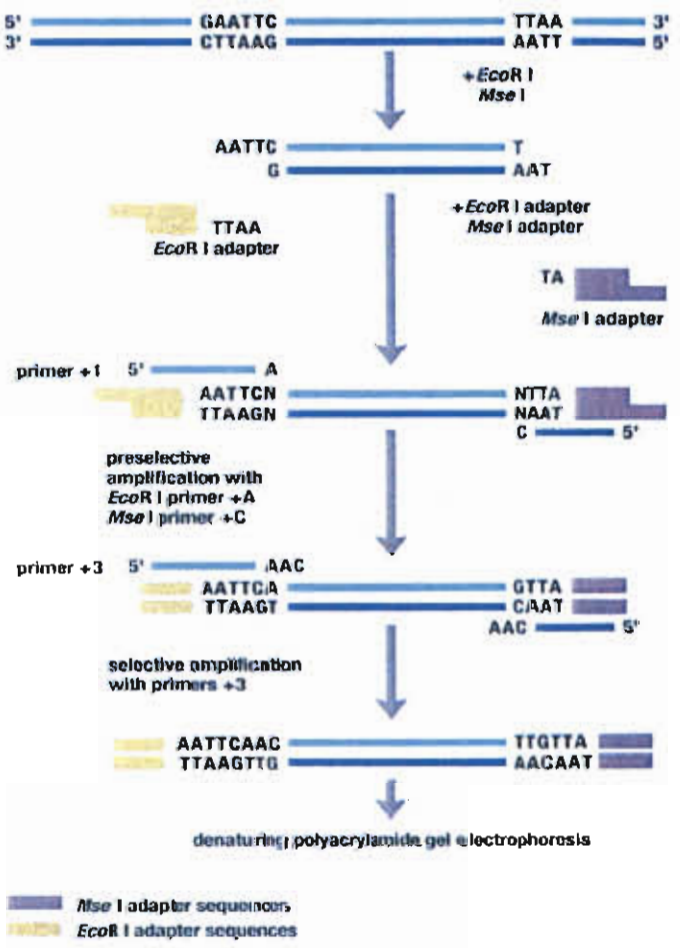


ภาพที่ 2-3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ complementary DNA

http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/1831.JPG. 01/12/52.

เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)

เทคนิค เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นสั้น ๆ ที่ปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ตัดไว้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับกับไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเอเอฟแอลพี (AFLP)

https://www.msu.edu/course/mmg/835/snapshot.afs/DNAmarkers/aflp.jpg. 01/12/52.

ด้วยวิธีดังกล่าวชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มในคราวเดียวกันมีจำนวนมาก และแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่ง ๆ เรียกว่าลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีจึงเป็นการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบหนึ่ง แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างสามารถบ่งบอกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น

หลักการของเทคนิคเอเอฟแอลพี (สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล, 2545)

ขั้นแรก คือการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส ซึ่งเรียก rare culture ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ซึ่งเรียกว่า frequent culture แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adaptor ของเอนไซม์ทั้งสองเพื่อให้เป็นที่จับของไพร์เมอร์ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดจะได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะและมีข้อดีอีกหลายประการ

ขั้นที่สอง คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5′ เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้นส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรียกว่า Common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณลงโดยชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป เป็นต้น

การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3′ มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกจะเรียกว่า preselective amplification และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification การทำปฏิกิริยา preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้นแบบให้มากขึ้นและช่วยให้เกิดการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดและ ยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นดำในลายพิมพ์ ดีเอ็นเอได้อีกด้วย

ขั้นสุดท้าย คือการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสม

ในการแยกด้วยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้ฉลากไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสีหลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสร็จแล้วตรวจผลโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ หรืออาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วตรวจอบด้วยเครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (automated sequencer) ก็ได้ จากการที่ต้องตรวจสอบผลการทำ เอแอฟแอลพีโดยใช้สารกัมมันตรังสีหรือใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติทำให้เกิดข้อจำกัดในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เนื่องจากการขาดประสบการณ์และระบบปฏิบัติหลายแห่ง เนื่องจากขาดประสบการณ์และระบบการปฏิบัติงานที่ใช้สารกัมมันตรังสี หรือไม่สามารถซื้อเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติที่มีราคาแพง จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีตรวจสอบเอแอฟแอลพีด้วยการไฮบิไดเซชั่นด้วยโพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (non radioactite lable) หรือ วิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining) ซึ่งให้เป็นผลที่น่าพอใจและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอทั่วไป

ข้อดีของเทคนิค AFLP

1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยใช้เทคนิคเอแอฟแอลพีไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอพีดี จึงทำได้อย่างกว้างขวาง

2. ทำได้อย่างรวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนน้อย โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์จึงมีประสิทธิภาพสูง

3. ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อมกันคือ มี multiplex ratio สูงในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอ มากกว่าอาร์เอพีดีประมาณ 4 เท่า

4. ทำให้เกิดโพลิเมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การจดทะเบียนลิขสิทธิ์ การตรวจสอบการเป็นลูกผสม เป็นต้น

5. ใช้กับสิ่งมีชีวิตขนาดใดก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกส่วยปลาย 3′ ของ ไพรเมอร์ หรือใช้กับดีเอ็นเอที่โคลนไว้ก็ได้

6. สามารถแยกความแตกต่างของแถบ ดีเอ็นเอแบบโฮโมไซกัส และ เฮเทอโรกัสได้ โดยดูความเข้มของแถบจึงวิเคราะห์ผลได้แบบเดียวกับดีเอ็นเอเครื่องหมายที่แสดงเครื่องหมายการข่มแบบ codominance แต่จากการรายงานอื่น ๆ จะถือว่าเครื่องหมายเอแอฟแอลพีแสดงการข่มแบบ dominance

ข้อจำกัดของเทคนิค AFLP

1.ค่าใช้จ่ายการทำเอเอฟแอลพีค่อนข้างสูง วัสดุหลายอย่างมีราคาแพง วิธีการใช้ค่อนข้างซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอาร์เอพีดีหรือการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์

2. แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ได้ยากกว่าที่เป็นเครื่องหมายที่เป็น codominance เช่น อาร์เอฟแอลพี

3. เนื่องจากการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากและมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง ทำให้เกิดการวิเคราะห์ ผลผิดพลาดได้

4. เทคนิคเอเอฟแอลพีไม่เหมาะกับการใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ คือมีลำดับเบสที่ต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) จำนวน น้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่ความสำพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้

5. สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมากก็ไม่เหมาะสมเช่นกันเพราะจะพบแถบ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย แม้ว่าในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากก็ตาม

2.6 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่ได้รับสัมผัส BPA จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยจะทำให้มีการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศมากผิดปกติ ส่วนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นจากการศึกษาของ Jobling et al. (2003) และ Ohelmann, Schulte-Ohelmann Bachmann, Oetken, Lutz, Kloas, and Ternes (2006) พบว่าสาร BPA ที่มีระดับความเข้มข้นสูงสามารถทำลายระบบสืบพันธุ์โดยพบได้ชัดเจนในสัตว์จำพวกหอยและหมึก Canesi, Borghi, Fabbri, Vergani, Tavolari, and Gallo (2007) ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อดับและตับอ่อนของสัตว์พวกหอย และหมึกที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสาร bisphenol A โดยพบว่า bisphenol A จะเข้าไปรบกวนระบบการทำงานของฮอร์โมนและสามารถมีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ โดยศึกษาผลกระทบของสาร bisphenol A ต่อการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อนในหอยสองฝาชนิด *mytilus galloprovincialis* โดยหอยจะได้รับสัมผัส bisphenol A ที่ระดับความเข้มข้น (3-60 ng) เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค RT-Q-PCR พบว่าการแสดงออกของ MeEr2 (*Mytilus edulis* Estrogen receptor 2) เพิ่มขึ้นและยังมีแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของ catalase GSH transferase และ GSSG reductase และยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ neutral lipid โดยใน

การศึกษาจะนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับหอยสองฝาชนิดเดียวกันที่ถูกฉีดด้วย 17ß-estradiol ในความเข้มข้นที่เท่ากัน จากข้อมูลที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า bisphenol A สามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับสมดุลรีดอกซ์ (Redox balance) การทำงานของไลโซโซมอลในดับและตับอ่อนของหอยและหมึก และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวกับการควบคุมระบบการเผาผลาญและการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติไป โดยทั้งหมดที่กล่าวมาบ่งชี้ว่าในสภาพแวดล้อมที่มีระดับความเข้มข้นของสาร bisphenol A จะให้ผลเช่นเดียวกันกับฮอร์โมนเอสโตรเจนและจะแสดงผลที่แตกต่างกันในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Canesi et al., 2007)

สาร bisphenol A เป็นสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อและฮอร์โมนต่อสิ่งมีชีวิต โดยจะไปมีผลต่อระบบสืบพันธุ์และกระบวนการพัฒนาในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น หอยทาก *Potamopyrgus antipodarum* ปริมาณไข่ที่สร้างมีจำนวนน้อยลง และยังส่งผลกระทบต่อการเจริญเป็นตัวเต็มวัยของ *Chironomus riparius* ทำให้ประชากรลดลง (Duft, Schulte-Oehlmann, Weltje, Tillmann, & Oehlmann, 2003) นอกจากนั้นแล้วยังได้มีการศึกษาผลกระทบของ bisphenol A ต่อลักษณะของระบบสืบพันธุ์ของครัสเตเชี่ยนในกลุ่ม *Gammarus fossarum* โดย Shirling et al. (2006) ได้ทดลองติดต่อกันเป็นเวลามากถึง 103 วัน โดยผลที่ได้พบว่า bisphenol A ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 500 µg/L จะไปเร่งพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในเพศเมียทำให้ไข่แก่ (vitellogenic oocytes) มีจำนวนลดลง เป็นต้น นอกจากนั้นในรายงานของ Schirling, Triebskorn, and Kohler (2004) ศึกษาผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L ส่งผลกระทบต่อ หอยทาก (*P. antipodarum*) โดยจะมีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของไข่ลดลงและลดอัตราการเต้นของหัวใจของหอยทากเมื่อรับสัมผัส BPA เป็นระยะเวลา 9 วัน ส่วนในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เช่น *Xenopus laevis* เมื่อรับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 5.7 mg/L จะส่งผลให้ลำตัวสั้นผิดปกติ การขดตัวของระบบทางเดินอาหารผิดปกติ (Sone et al., 2004) ส่วนในปลาข้าวสารพบว่า BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L ทำให้ลักษณะของลำตัวปลาวัยอ่อนเพศผู้ผิดรูปทั้งความยาวของลำตัวและน้ำหนักของปลา (Pastva, Villalobos, Kannan, & Giesy, 2001) และ Suzuki, Kambegawa, and Hattori (2003) ศึกษาปลาทอง (*Carassius auratus*) ที่ให้รับสัมผัส BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 µM เป็นเวลา 8 วัน พบว่า BPA จะไปขัดขวางและยับยั้งการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก osteoblast และยังสามารถยับยั้งการทำงานของ Insulin-like growth factor (IGF)-I ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์กระดูกได้อีกด้วย

การศึกษาความผิดปกติของสิ่งแวดล้อมนั้นสามารถทำได้โดยการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) และในปัจจุบันได้มีผู้สนใจตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่เชื่อมโยงต่อการรบกวนระบบต่อม

ไร้ท่อและฮอร์โมนในการสืบพันธุ์ของหอยสองฝา (Oriti-Zarragoitia & Cajaraville, 2006) ใช้ peroxisome proliferation เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพต่อมลพิษและระดับของ vitellogenin (Vtg)-like โดยให้หอย *Mytilus edulis* รับสัมผัสสารมลพิษจำพวกสารอินทรีย์ เช่น น้ำมันดิบ และ polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และวัดปฏิกิริยาของ acyl-CoA oxidase (AOX) โดยระดับของ Vtg-like จะตรวจวัดในอวัยวะสืบพันธุ์โดยใช้ alkali-labile phosphate (ALP) ตรวจสอบความสมบูรณ์เพศ โดยหอยที่ได้รับสัมผัสสารพิษจะมีระดับการแสดงออกของ acyl-CoA oxidase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าในกลุ่มของหอยเพศเมีย จะมีระดับการแสดงออกของ alkali-labile phosphate ต่ำกว่าในกลุ่มหอยเพศผู้ ดังนั้นจึงสามารถใช้ peroxisome proliferation เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพต่อมลพิษจำพวกสาร xenoestrogens ได้อีกด้วย นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานของ Lindholst, Pedersen, and Bjerregaard (2001) ศึกษาการตอบสนองของระดับไวเทลโลจีนิน ในปลา rainbow trout ที่ได้รับ BPA ที่ระดับ 100 μg/L พบการตอบสนองของไวเทลโลจีนินในปลา 5-7 วันหลังจากได้รับ BPA แสดงว่าไวเทลโลจีนินต้องการช่วงเวลาระยะหนึ่งจึงจะมีการสังเคราะห์ออกมาเป็นต้น

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า บริษัท Gallenkamp
2. ตู้บ่มเชื้อ บริษัท Carbolite
3. ตู้อบ บริษัท Memmert
4. เครื่องผสมสาร รุ่น REAX 2000 บริษัท Heidolph
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง บริษัท Denville scientific
6. เครื่องนึ่งค่าเชื้อด้วยความร้อน รุ่น SS-245 บริษัท Tomy
5. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น HLF 1200 E
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง บริษัท Tanita และบริษัท Sartonus
7. ตู้ไมโครเวฟ บริษัท LG
8. เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น T-Gradient thermoblock บริษัท Biometra
9. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น MD 625B-12 บริษัท Hoefer scientific unstruments
10. เครื่องรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส รุ่น GE-100 บริษัท Lio lab international
11. เครื่องถ่ายภาพเจล บริษัท Syngene
12. คอมพิวเตอร์
13. เครื่องต้มน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ(Universal Water Thermostate) บริษัท Biosan
14. เครื่องวัดปริมาณ RNA รุ่น Nano drop 2000 บริษัท invitrogen
15. เครื่องแก้ว
16. อุปกรณ์ผ่าตัด ใบมีด ปากคีบ
17. ไมโครทิวบ์ขนาดต่าง ๆ
18. ปิเปตแบบปรับปริมาตรได้

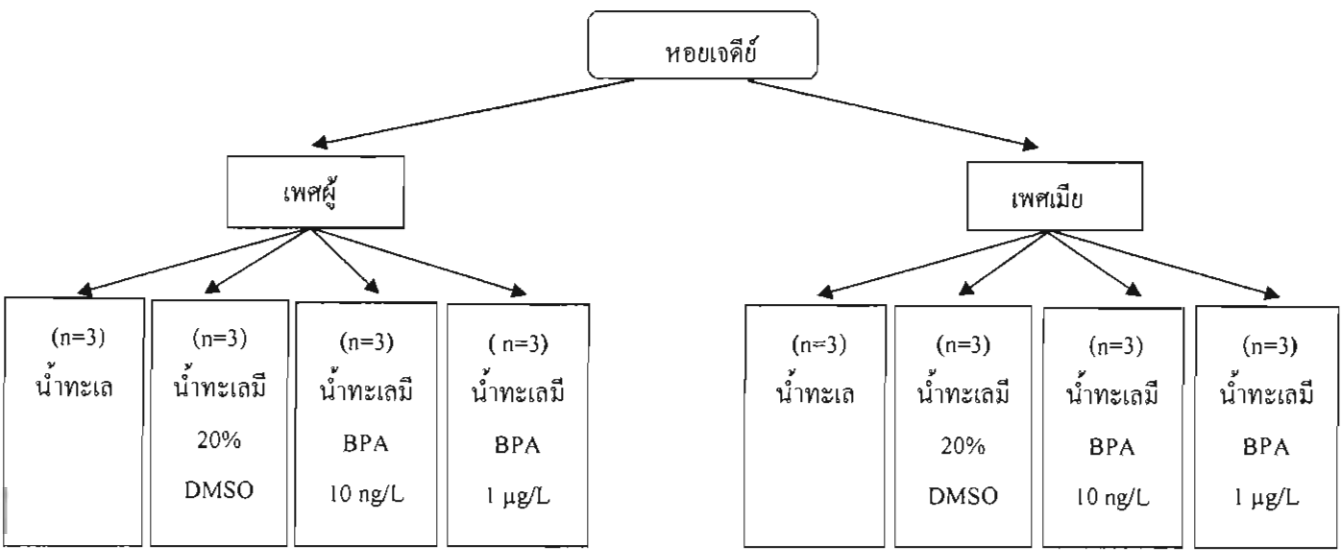
3.2 สารเคมี

1. ไพรเมอร์สังเคราะห์โดย บริษัท Biodesign, ประเทศไทย แบ่งออกเป็น
   - ไพรเมอร์ Preselective amplification
   - ไพรเมอร์ Selective amplification
2. adapter บริษัท Biodesign
   - EcoRI adapter
   - MseI adapter
3. Ethanol บริษัท Merck
4. Tris Base บริษัท Promega
6. Boric acid บริษัท Univar
7. EDTA(Ethylene diamine tetra-acetic acid) บริษัท Amresco
8. DNase I บริษัท Roche
9. Ethidium Bromide บริษัท Invitrogen
11. Seakem LE agarose บริษัท Cambrex bioscience rockland
12. LB Broth บริษัท Hardy Diagnostics
13. Agar บริษัท Criterion
14. X-gal บริษัท Amresco
15. Amplicillin บริษัท T.P. Drug Laboratories
16. 100 bp DNA Ladder Plus (0.5ug/ul) บริษัท Fermentas
17. 6x loading dye บริษัท Fermentas
18. Taq DNA polymerase บริษัท vivantis
19. SuperScript III Reverase Transcriptase บริษัท invitrogen
20. Primer random $p(dN)_6$ บริษัท Roche
22. 10 mM dNTP Mix บริษัท Fermentas
23. เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ MseI บริษัท New England Biolab
26. bisphenol A บริษัท sigma-Aldrich
27. dimethylsulfoxide, DMSO บริษัท Ricdel-deHaen
29. Bronze competent cell บริษัท Cybeles

3.3 การเตรียมตัวอย่างหอยเจดีย์

เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยช่วงเดือนเมษายน จากแหล่งธรรมชาติที่กระจายอยู่ตามหาดโคลนและป่าชายเลนบริเวณหาดเจ้าหลาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี จำนวนประมาณ 1,000 ตัวอย่าง โดยแบ่งหอยเจดีย์เป็น 2 กลุ่มคือ เพศผู้ และเพศเมีย นำมาทำการทดลองในห้องวิจัย

โดยทำความสะอาดและเตรียมตัวอย่างหอยเจดีย์โดยเลี้ยงในน้ำทะเลเป็นเวลา 7-14 วัน เพื่อปรับสภาพจากนั้นจึงแยกหอยเจดีย์เลี้ยงไว้ในตู้ปลาขนาด 20X20X20 เซนติเมตร^3 โดยแต่ละกลุ่มนำไปทดสอบแบ่งออกเป็นกลุ่มควบคุม (ไม่มีสาร BPA) คือ น้ำทะเล และน้ำทะเลที่มี 20% DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของ BPA และกลุ่มทดสอบให้ได้รับสารBPA ที่ความเข้มข้น 10 ng/L และ 1 µg/L เป็นระยะเวลา 1, 2, และ 4 สัปดาห์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดังแผนภาพด้านล่าง



3.4 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์หอยเจดีย์

ทำการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 10 ng/L และ 1 µg/L เป็นระยะเวลา 1, 2, และ 4 สัปดาห์ โดยปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท Invitrogen Life Technologies โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ นำระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ที่รักษาสภาพไว้ใน RNA*later* solution ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี trizol จำนวน 500 ไมโครลิตร เติม glass beads acid washed จำนวน 15 เม็ดนำไปเขย่าด้วยเครื่อง disruptor genie นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม chloroform จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงให้สารละลายผสมเข้ากัน นาน 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว

รอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วทำการตกตะกอน RNA โดยการเติม isopropanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 5-10 ครั้ง แล้ววางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 75% ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 5 นาที เท 75% ethanol ในหลอกทดลองทิ้ง จากนั้นเติม 75% ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตรเพื่อล้างตะกอน RNA อีกครั้งหนึ่ง นำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 5 นาที เท 75% ethanol ทิ้ง จากนั้นทำ air dry เพื่อให้ 75% ethanol ที่อยู่ใน RNA ระเหยจนแห้งโดยใช้เวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย RNA storage solution จำนวน 50 ไมโครลิตร แล้วเติม 10U/ul Dnase I จำนวน 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop 2000/2000c spectrophotometer

3.5 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) (Brenner, Elgar, Sandford, Macrae, Venkatesh, & Aparicio, 2006)

การสังเคราะห์ cDNA เป็นการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ การสังเคราะห์ cDNA จะทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองผนังบางขนาด 0.2 ml ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ RNA จำนวน 6 ไมโครลิตร (ประมาณ 500 นาโนกรัม) ผสมกับ random hexamer (4U/ul) จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 11 ไมโครลิตร ด้วย nuclease free water นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที ด้วยเครื่อง T-personal thermal cycler จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย 5X reaction buffer จำนวน 4 ไมโครลิตร 10mM dNTP จำนวน 2 ไมโครลิตร 40U RiboLock inhibitor จำนวน 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 19 ไมโครลิตร ด้วย nuclease free water บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที จากนั้นเติม 200U M-MuL V reverse transcriptase จำนวน 1 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 10 นาที ต่อด้วยบ่มที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ บ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -30°C

3.6 การค้าหาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP (สุรินทร์ ปียะโชคคณากุล, 2547)

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ในข้อ 3.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I โดยใช้ cDNA จำนวน 8 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย NEB buffer 4 จำนวน 2 ไมโครลิตร, BSA buffer จำนวน 0.2 ไมโครลิดร, nuclease free water 7.8 ไมโครลิตร, เอนไซม์

*EcoR*I และ *Mse*I อย่างละ 0.5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยา ที่ 65°C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพและเก็บไว้ที่ -30°C เพื่อเตรียมที่จะเชื่อมต่อกับ adapter ต่อไป

การเชื่อมต่อ adapter ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 10mM *EcoR*I adapter 5′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 10mM *EcoR*I adapter 3′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 100mM *Mse*I adapter 5′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 100mM *Mse*I adapter 3′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร T4 DNA Ligase จำนวน 0.3 ไมโครลิตร T4 DNA Ligase buffer จำนวน 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 1.7 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อเตรียมทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตผล AFLP จะประกอบไปด้วยสองขั้นตอนคือ preselective amplification และ selective amplification

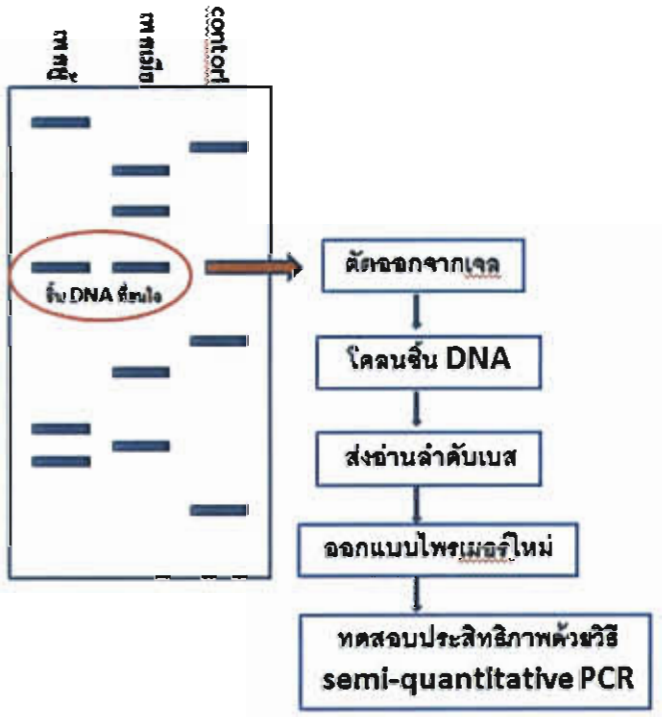
ขั้นแรก การทำ preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นแรก ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา (10X buffer A, dNTP, 25mM $MgCl_2$ และ Taq DNA polymerase) จำนวน 10 ไมโครลิตร cDNA ที่ต่อ adapter จำนวน 3 ไมโครลิตร 10 µM *EcoR*I_Pre-amp primer จำนวน 1 ไมโครลิตร 10 µM *Mse*I_Pre-amp primer จำนวน 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 5 ไมโครลิตร โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR จะเริ่มจาก predenature ที่ 94°C นาน 3 นาที denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 54°C นาน 1 นาที extension ที่ 72°C นาน 1 นาที และ final extension ที่ 72°C นาน 5 นาที ทำปฏิกิริยารวม 20 รอบ

ขั้นที่สอง การทำ selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นที่สอง ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา (10X buffer A, dNTP, 25mM $MgCl_2$ และ Taq DNA polymerase) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากขั้นตอน preselective amplification ที่ (เจือจาง 20 เท่า) จำนวน 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 10 µM *EcoR*I_amp จำนวน 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 10 µM *Mse*I_amp จำนวน 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 3 ไมโครลิตร โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR จะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ประกอบด้วย ช่วงที่ 1 เป็นการทำ Touch-down PCR (อุณหภูมิในขั้น annealing จะลดลงรอบละ 0.7°C / รอบ) จะเริ่มจาก predenature ที่ 94°C นาน 3 นาที denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 65°C นาน 1 นาที โดย extension ที่ 72°C นาน 40 วินาที ทำปฏิกิริยารวม 11 รอบ จากนั้นจะเข้าสู่ช่วงที่ 2 โดยเริ่มจาก denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 60°C นาน 1 นาที extension ที่ 72°C นาน 40 วินาที และ final extension ที่ 72°C นาน 3 นาที ทำปฏิกิริยารวม 25 รอบ

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

3.7 การวิเคราะห์แถบ DNA ของ AFLP

ตรวจผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนในข้อที่ 3.6 (selective amplification) โดยใช้ polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้น 8% ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย EtBr 3 นาที แล้วนำมาล้างในน้ำกลั่น 3 นาที แล้วบันทึกภาพ จากนั้นเลือกตัดแถบ DNA บนแผ่นเจลที่ปรากฏตำแหน่งตรงกันภายในกลุ่มตัวอย่างหอยเจดีย์ทั้งสองเพศที่ได้รับสาร BPA แต่ต่างจากกลุ่มควบคุมแสดงดังภาพที่ 3-1 จากนั้นนำแถบ DNA มาทำให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัดของ geneaid แล้วทำการโคลนหาลำดับเบส และยืนยันชิ้น DNA นั้นเป็นยีนอะไรโดยเทียบเคียงข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 3-1 การคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะจากเทคนิค cDNA-AFLP จากระบบสืบพันธุ์หอยเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 1 µg/L เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.8 การสกัดแยก DNA ออกจาก polyacrylamide gel

นำชิ้น DNA ที่ตัดจากข้อ 3.7 มาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติม 1X TE buffer จำนวน 300 ไมโครลิตร เติม glass beads acid washed จำนวน 15 เม็ดนำไปเขย่าด้วยเครื่อง disruptor genie นาน 5 นาที เพื่อให้ชิ้น polyacrylamide gel แตก จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

วิ
ว.ด.3
ย355ก
ส.2
291554

เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ชิ้นส่วนของ acrylamide ตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม 100% ethanol จำนวน 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติม 70% ethanol จำนวน 300 ไมโครลิตร กลับหลอดทดลองไปมาประมาณ 10 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วนำหลอดทดลองไปเข้าเครื่อง speed vac เพื่อระเหย 70% ethanol ออกไปและละลายตะกอน DNA ด้วย nuclease free water จำนวน 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°C เพื่อนำไปใช้งานต่อไป

3.9 การเชื่อมต่อชิ้น DNA กับพลาสมิดและการทรานสฟอร์เมชั่น

นำชิ้น DNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.6 มาแทรกเข้าไปในพลาสมิด pGEM T-easy vector เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม โดยใช้ DNA จำนวน 3 ไมโครลิตรและพลาสมิด 50 ng จำนวน 1 ไมโครลิตร ผสมกันในหลอดทดลองขนาด 0.5 ml เติม 2X Rapid ligation buffer จำนวน 5 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (3 weiss unit/μl) จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืนจะได้ DNA สายผสมระหว่างชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายกับพลาสมิด DNA จากนั้นถ่ายฝาก DNA สายผสมเข้าในเซลล์คอมพลีเทนต์ (Bronze competent cell) โดยนำ DNA จำนวน 3 ไมโครลิตร ผสมลงในคอมพลีเทนต์เซลล์แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วนำออกมาแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที แล้วเติม S.O.C. medium จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียไปเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 ng/ml, X-gal ความเข้มข้น 40 ng/ml และ IPTG ความเข้มข้น 4ug/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชั่วโมง

3.10 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมและการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

คัดเลือกโคโลนีสีขาวโดยแตะด้วยไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในสารผสมของปฏิกิริยา PCR แล้วทำ replica plate ให้เชื้อเจริญในอาหาร LB agar ส่วนปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ M13 F/R จากนั้นตรวจสอบผลผลิตด้วย agarose gel electrophoresis จะทราบว่าโคโลนีใดที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม จึงนำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ DNA สายผสมในจานอาหาร replica plate โตยนำไปเจริญในอาหารเหลว LB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-20 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ high speed plasmid mini kit

(Geneaid, Taiwan) ตามคู่มือที่แนะนำจากผู้ผลิต จากนั้นตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทำปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดลูกผสมจำนวน 8 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Eco*RI (10U/µl) จำนวน 1 ไมโครลิตร 10X *Eco*RI buffer จำนวน 2 ไมโครลิตร BSA buffer จำนวน 0.2 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรรวมให้ครบ 20 ไมโครลิตร ด้วย nuclease free water นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่ตรวจสอบได้ในข้อ 3.8 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท First Base Laboratories SdnBdh (Malaysia) จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.0 เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (blast) ผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ต (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)

3.12 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบางส่วนของยีนเป้าหมายจากการศึกษาในข้อ 3.11 จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่มีความจำเพาะ โดยให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดสั้นลงโดยใช้โปรแกรม primer 3 ซึ่งคู่ไพรเมอร์ใหม่ที่ออกแบบมานี้คือ EcoAGC_109_L และ EcoAGC_109_R ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ต่อไป

3.11 การวัดระดับการแสดงออกของยีน

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายโดยการเพิ่มปริมาณจาก cDNA ที่ได้มาจากระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 10 ng/L และ 1 µg/L เป็นระยะเวลา 1, 2, และ 4 สัปดาห์ กับคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากข้อ 3.10 โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 2X GoTaq green mastermix (reaction buffer pH 8.5, 400 µM dNTP, 3 mM $MgCl_2$) จำนวน 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 10 µM EcoAGC_109_L และ EcoAGC_109_R อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร cDNA จำนวน 3 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 6 ไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ predenature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 53°C เป็นเวลา 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

โดยทำปฏิกิริยารวม 35 รอบ ในขณะเดียวกัน cDNA ชุดเดียวกันที่ใช้เพิ่มปริมาณในขั้นต้นก็นำมาเพิ่มปริมาณยีนควบคุม 28S rRNA โดยมีองค์ประกอบ ขั้นตอนและสภาวะการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับยีนเป้าหมายแต่จะเปลี่ยนคู่ไพรเมอร์เป็น 28S Oce_L99 และ 28S Oce_R334

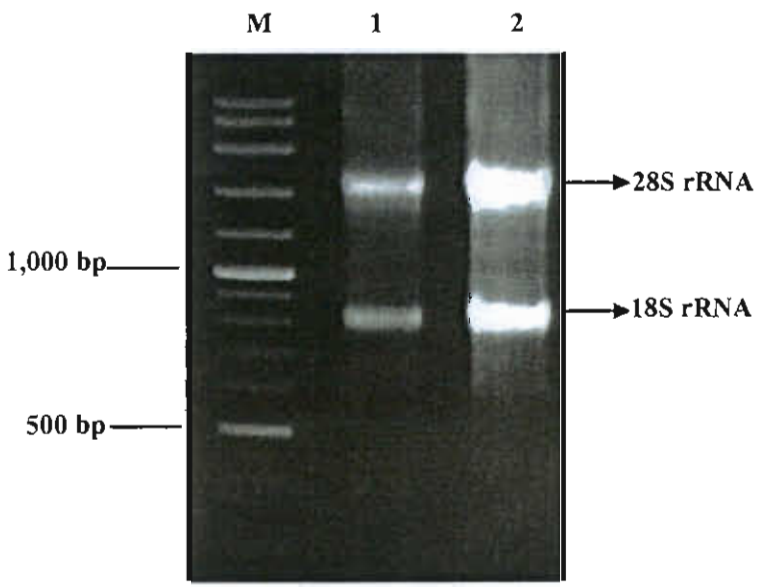
เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR จะทำการวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis โดยนำผลผลิต RT-PCR จำนวน 20 ไมโครลิตร เคลื่อนที่ใน 1% SeaKem LE agarose ใน 0.5X TBE buffer ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 μg/ml นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที จึงส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation และวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA โดยใช้โปรแกรม Gene Tool ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Expression ratio} = \frac{\text{ความเข้มของแถบ DNA ยีนเป้าหมาย}}{\text{ความเข้มของแถบ DNA ยีนควบคุม}}$$

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเตรียม RNA

ผลจากการสกัด RNA จากอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียที่รับสาร BPA เข้มข้น 1 µg/L นาน 14 วัน โดยใช้ Trizol reagent และทำการวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายหลังการย้อมด้วย ethidium bromide และส่องภายใต้แสง UV ปรากฏแถบ RNA จำนวน 2 แถบ คือ 28S rRNA และ 18S rRNA ซึ่งสัดส่วนของ 28S rRNA จะมีความเข้มมากกว่า 18S rRNA ประมาณ 2 เท่า ดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 RNA จากอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ที่รับสาร BPAเข้มข้น 1 µg/L นาน 14 วัน ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis

M คือ 100 bp DNA ladder plus

ช่อง 1 คือ RNA ของหอยเจดีย์เพศเมีย

ช่อง 2 คือ RNA ของหอยเจดีย์เพศผู้

4.2 การคัดเลือกแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP บนเจลอะกาโรส

เมื่อนำ RNA (ในภาพที่ 4-1) มาถอดรหัสย้อนกลับเป็น cDNA แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Mse*I จากนั้นเชื่อมต่อกับ adaptor และทำการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 5 คู่ แสดงดังตารางที่ 4-1 แล้วคัดเลือกแถบ DNA ของหอยเจดีย์ทั้งสองเพศที่ได้รับสาร bisphenol A (BPA) ที่มีขนาดตรงกันบนอะกาโรสเจล แต่ต่างขนาดจากกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ ที่ 1 (Eco_AAG/Mse_CTA) จากผลผลิต PCR สามารถคัดเลือกแถบ DNA ได้ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 400 (Eco_372) และ 220 (Eco_223) คู่เบส ดังภาพที่ 4-2 ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Eco_AGC/Mse_CTA), 3 (Eco_ACT/Mse_CTA), 4 (Eco_ACT/Mse_CTT) และ 5 (Eco_AAG/Mse_CTA) สามารถคัดเลือกแถบ DNA ได้จากคู่ไพรเมอร์ละ 1 แถบ มีขนาดเท่ากับ 169 (Eco_169), 120 (Eco_120), 350 (Eco_350) และ 161 (Eco_161) คู่เบส ตามลำดับ

ตารางที่ 4-1 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้คัดเลือก DNA ในปฏิกิริยา cDNA-AFLP

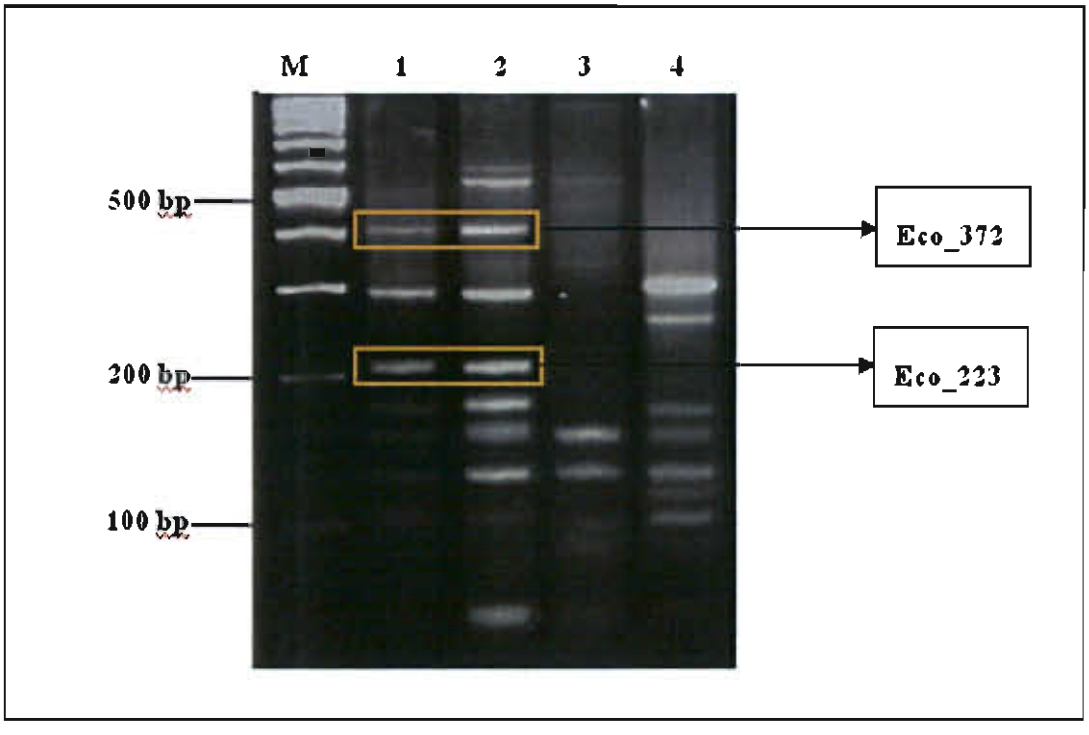
คู่ไพรเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′-3′)
1	Eco_AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
	Mse_CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
2	Eco_AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC
	Mse_CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
3	Eco_ACT	GACTGCGTACCAATTCACT
	Mse_CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
4	Eco_ACT	GACTGCGTACCAATTCACT
	Mse_CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT
5	Eco_AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
	Mse_CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT

4.2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่ได้คัดเลือก

เมื่อตัดแถบ DNA บนเจลอะกาโรส (ในภาพ 4-2) นำมาทำให้บริสุทธิ์ โคลน แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (อ่าน 2 ทิศทาง) พบว่าแถบ DNA Eco_372 มีขนาดเท่ากับ 372 คู่เบส และ Eco_223 มีขนาดเท่ากับ 223 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ทั้งสองบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม blast พบว่า Eco_372 มีความเหมือนสูงสุดที่ 82 % (ตำแหน่งที่ 201-350 ของ Query ภาพที่ 4-4(a)) และ Eco_223 มีความเหมือนสูงสุดที่ 93% (ตำแหน่งที่ 55-139 ของ Query ภาพที่ 4-4(b)) กับ sex and growth traits AFLP marker sequence ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) accession number AY654005 เช่นกัน

ส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 และ 3 เมื่อตัดแถบ DNA Eco_169 (ภาพที่ 4-3 (a)) และ แถบ DNA Eco_120 (ภาพที่ 4-3 (b)) ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 169 คู่เบส และ 120 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม blast พบว่า มีความเหมือนสูงสุดที่ 94% กับ AFLP marker mRNA sequence ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) accession no: DQ132921 (ภาคผนวก: ภาพที่ ผก-1a, b) และ 92% กับ clone 050 AFLP marker mRNA sequence ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) accession no: DQ132927 (ภาคผนวก: ภาพที่ ผก-2a, b)

ในทำนองเดียวกันกับไพรเมอร์คู่ที่ 4 และ 5 ในการศึกษาได้คัดเลือกแถบ DNA Eco_350 (ภาพที่ 4-3 (c)) และ Eco_161 (ภาพที่ 4-3 (d)) ซึ่งแถบ DNA มีขนาดเท่ากับ 350 และ 161 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ทั้งสองด้วยโปรแกรม blast พบว่ามีความเหมือนสูงสุดที่ 81% กับ clone RP11-282I1บนโครโมโซมคู่ที่ 10 ของมนุษย์ accession no. AL357127 (ภาคผนวก: ภาพที่ ผก-3a b) และ ที่ 100% กับ clone RP11-497D6 บนโครโมโซม 6q24.2-25.2 ของมนุษย์ accession no. AL13891 (ภาคผนวก: ภาพที่ ผก-4a, b) ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแถบ DNA ของมนุษย์ที่ปนเปื้อนขณะทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งไม่ได้นำมาศึกษาต่อ รายละเอียดของแถบ DNA ที่กล่าวมาสรุปในตารางที่ 4-2

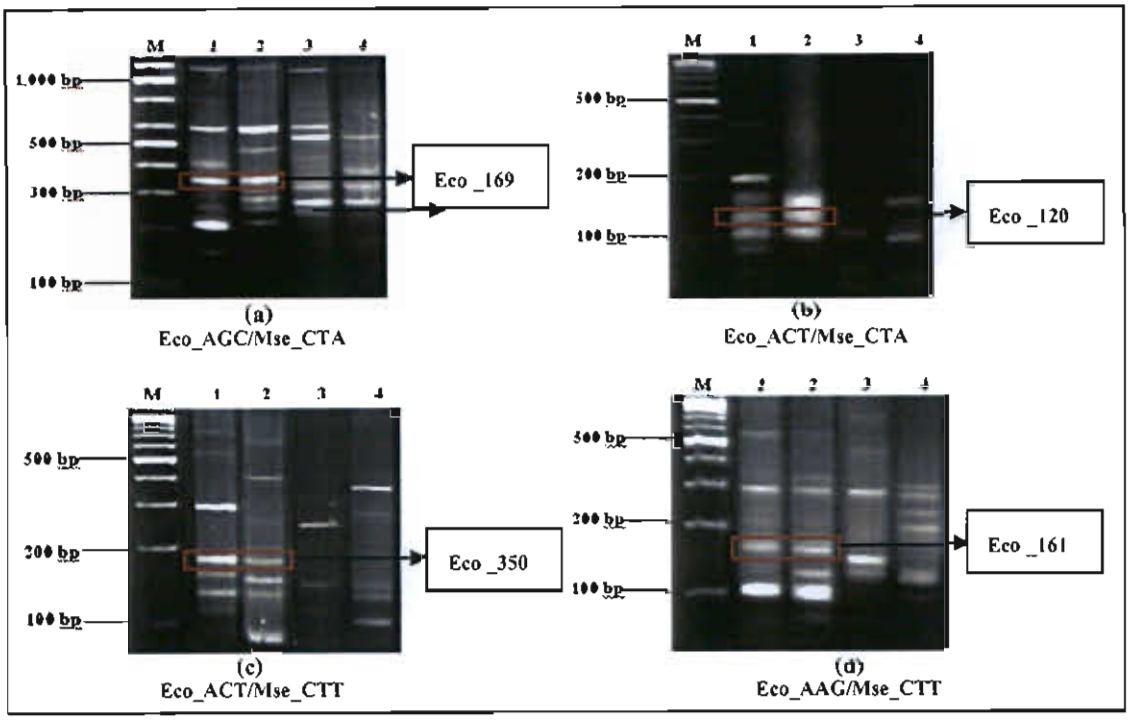


ภาพที่ 4-2 แถบ DNA เป้าหมายจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ (Eco_AAG/Mse_CTA) ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่อง 1 และ 2 คือ แถบ DNA หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA (1 μg/L) เพศเมียและเพศผู้

ช่อง 3 และ 4 คือ แถบ DNA หอยเจดีย์กลุ่มควบคุมเพศเมียและเพศผู้

ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder plus

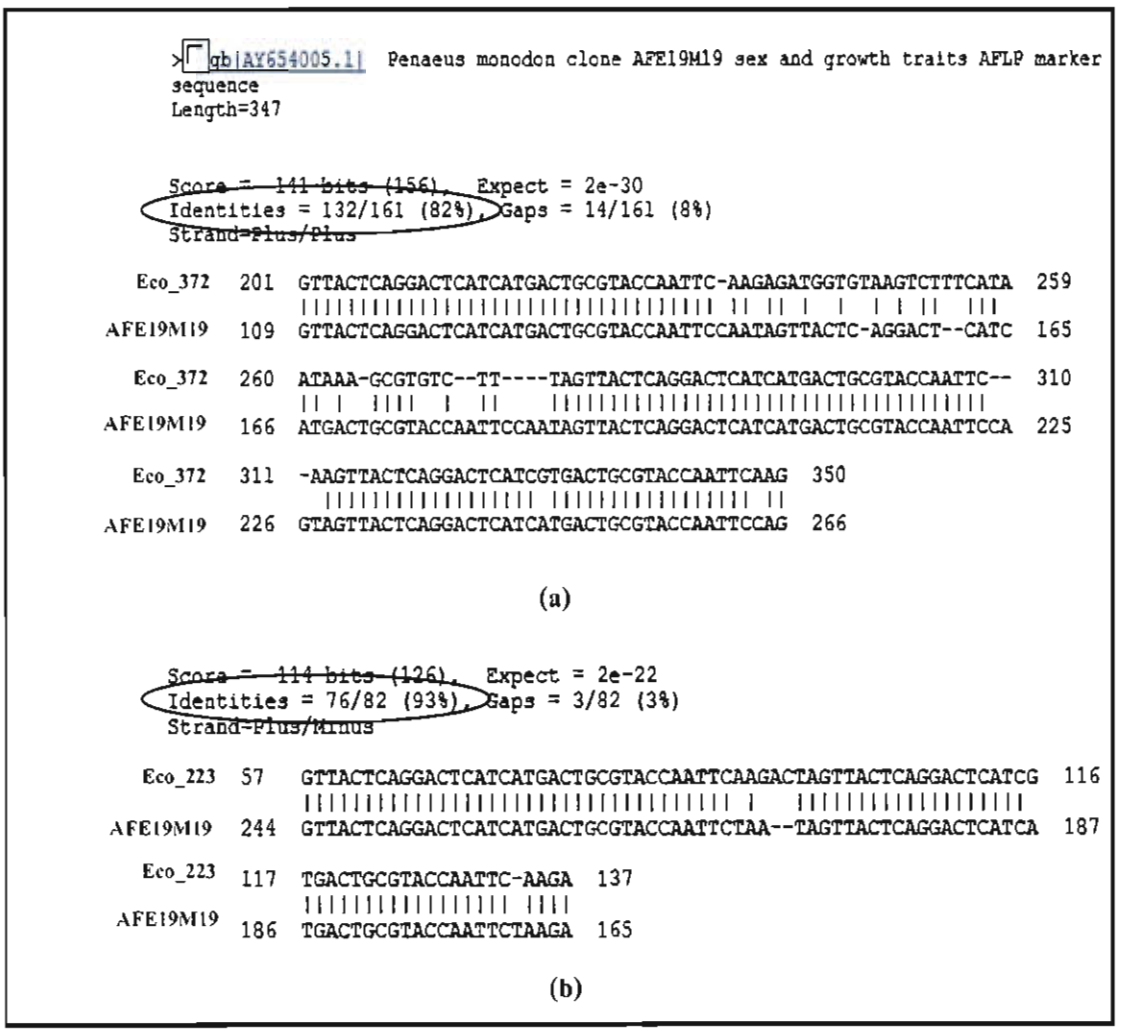


ภาพที่ 4-3 แถบ DNA เป้าหมายจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gelใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่อง 1 และ 2 คือ แถบ DNA หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA (1 µg/L) เพศเมียและเพศผู้

ช่อง 3 และ 4 คือ แถบ DNA หอยเจดีย์กลุ่มควบคุมเพศเมียและเพศผู้

ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder plus



ภาพที่ 4-4 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA Eco_372 (a) และ Eco_223 (b) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ sex and growth traits AFLP marker sequence ของกุ้งกุลาดำ (GenBank accession no. AY654005) ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast วงรีแสดงจำนวนลำดับเบสที่เทียบเคียงและ % ความเหมือน

ตารางที่ 4-2 รายละเอียดของแถบ DNA ที่คัดเลือกได้ภายหลังจากเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ขนาดแถบ DNA (bp)	การเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank		
			Accession no.	รายละเอียด	Identitites (%)
1	Eco_AAG/Mse_CTA	372	AY654005	Penaeus monodon clone AFE19M19 sex and growth traits AFLP marker sequence	82 (132/161)
		223	AY654005	Penaeus monodon clone AFE19M19 sex and growth traits AFLP marker sequence	93 (76/82)
2	Eco_AGC/Mse_CTA	169	DQ132921	Penaeus monodon clone 021 AFLP marker mRNA sequence	94 (45/58)
3	Eco_ACT/Mse_CTA	120	DQ132927	Penaeus monodon clone 050 AFLP marker mRNA sequence	92 (54/95)
4	Eco_ACT/Mse_CTT	350	AL357127	Human DNA sequence from clone clone RP11-282I1 on chromosome 10 Containspart of a novel gene, complete sequence	81 (133/166)
5	Eco_AAG/Mse_CTT	161	AL13891	Human DNA sequence from clone RP11-497D6 on chromosome 6q24.2-25.2 Contains the 3' end of the C6orf103 gene for chromosome 6 open reading frame 103	100 (136/136)

4.2.2 การพัฒนาใช้ Eco_372 เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ

ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากข้อมูลพันธุกรรมที่อ่านได้จากแถบ DNA Eco_372 (372_AFLP) จากคู่ไพรเมอร์ Eco_AAG/Mse_CTA ที่มีขนาด 372 คู่เบส เพื่อพัฒนาใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพที่สามารถใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ BPA ในแหล่งน้ำโดยศึกษาระดับการแสดงออกของเครื่องหมาย DNA ในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใหม่นี้คือ EcoAGC_109_L และ EcoAGC_109_R ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 109 คู่เบส และเมื่อนำไปทดสอบทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cDNA สังเคราะห์จากเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ตัวอย่างเดิม (แช่ใน BPA เข้มข้น 1ug/L เป็นเวลา 14 วัน) ที่นำมาใช้คัดเลือก พบว่าให้ผลบวกกับหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 1ug/L แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์ในตัวอย่างกลุ่มควบคุม ดังภาพ 4-5

ภาพที่ 4-5 ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 109 คู่เบส ของ 372_AFLP ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

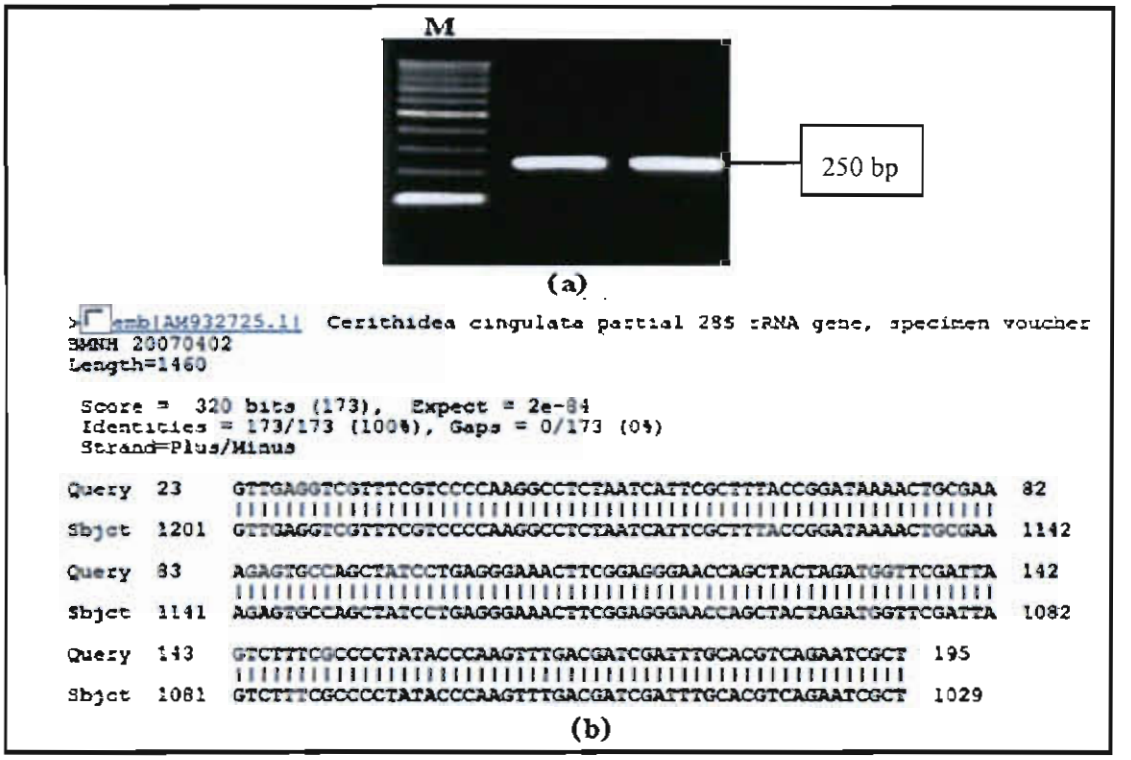
ช่อง 1 และ 2 คือ แถบ DNA หอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมีย ตามลำดับ

ช่อง 3 และ 4 คือ แถบ DNA หอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียกลุ่มควบคุม ตามลำดับ

M คือ 100 bp DNA ladder plus

4.3 การทดสอบระดับการแสดงออกของยีนควบคุม 28S *rRNA* ในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์

ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA บริเวณยีน 28S *rRNA* จากระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ เพศผู้และเพศเมียด้วยคู่ไพรเมอร์ 28S_OceL99 และ 28S_OceR334 ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 250 คู่เบส เมื่อตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ดังภาพที่ 4-6(a) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความเหมือนกับยีน 28S *rRNA* ของหอยเจดีย์ (*cerithidea cinguta*) 100% ที่ได้บันทึกไว้บนฐานข้อมูล GenBank (ตำแหน่งที่ 23-195 ของ Query) ดังภาพ 4-6(b)



ภาพที่ 4-6 ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณยีน 28S *rRNA* ของหอยเจดีย์ขนาดประมาณ 250 คู่เบสตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis (a) และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ของหอยเจดีย์ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast บนฐานข้อมูล GenBank (b)

M คือ 100 bp DNA ladder plus

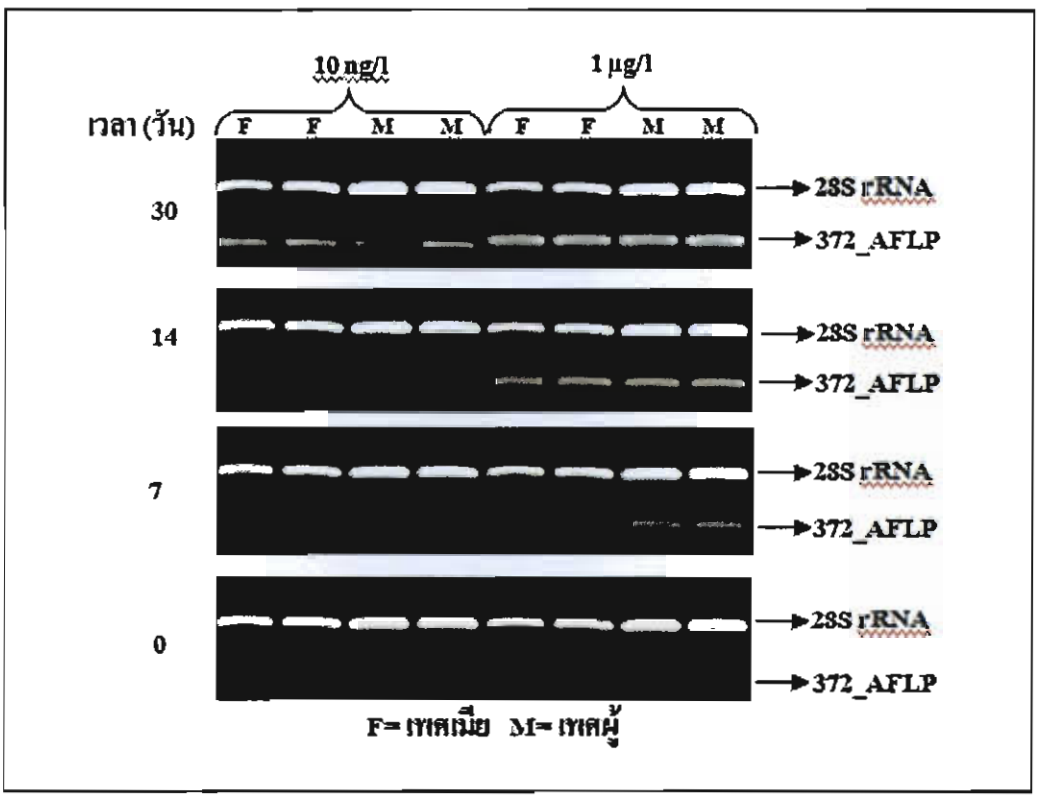
4.4 การศึกษาผลของสาร BPA ต่อระดับการแสดงออกของ 372_AFLP

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ที่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L และ 1 ug/L เป็นระยะเวลานาน 0, 7, 14 และ 30 วัน ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าเมื่อหอยเจดีย์รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L เป็นระยะเวลา 7 วัน ไม่สามารถวัดระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ได้ แต่เมื่อได้รับ BPA นานติดต่อกัน 14 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของ 372_AFLP เพิ่มขึ้น 3.7 เท่า เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA และเมื่อครบ 30 วัน ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP จะเพิ่มขึ้นเป็น 8.1 เท่า ดังภาพที่ 4-7 และ 4-8

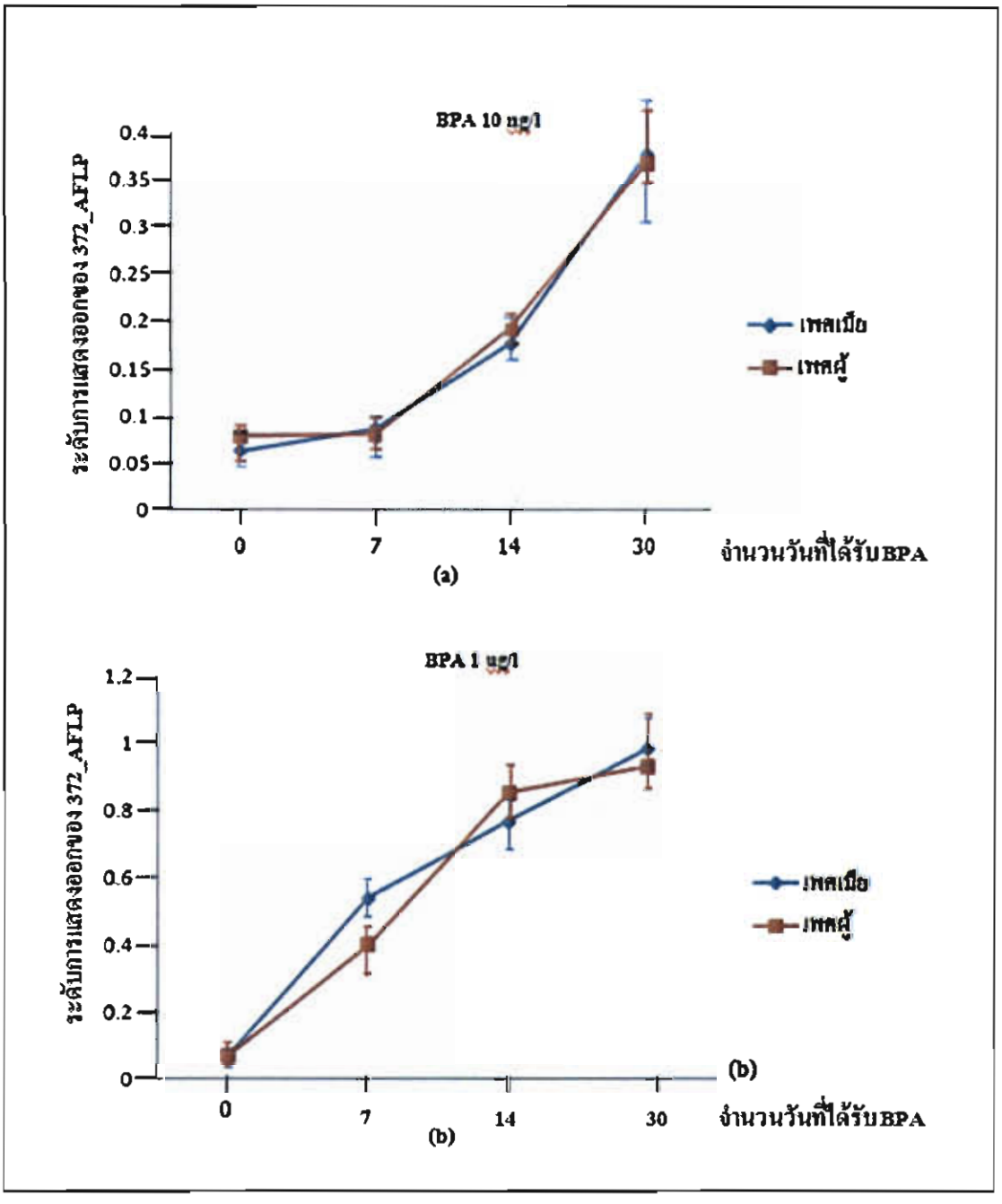
หอยเจดีย์ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA เข้มข้น 1 ug/L สามารถตรวดวัดระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ได้ตั้งแต่วันที่ 7 ซึ่งระดับการแสดงออกของ 372_AFLP เพิ่มขึ้น 6.1 เท่า และ เมื่อได้รับ BPA ติดต่อกัน14 วัน การแสดงออกของ 372_AFLP เพิ่มขึ้น 9.8 เท่า และในวันที่ 30 การ

แสดงออกของ 372_AFLP จะเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 11.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสัมผัสสาร BPA ดังนั้นการชักนำระดับการแสดงออกของ 372_AFLP จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ได้รับสารยาวนานขึ้น 30 วัน ดังภาพที่ 4-8

ดังนั้นเมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ในกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA กับยีน 28S rRNA แล้วนำค่าเฉลี่ยมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน คือ ระยะเวลาที่รับสัมผัสสาร BPA เพศของหอยเจดีย์ และความเข้มข้นของ BPA พบว่าระยะเวลาที่รับสัมผัสสาร BPA และระดับความเข้มข้นของ BPA มีผลต่อระดับการแสดงออกของ 372_AFLP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ ในขณะที่เพศของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ทั้ง 2 ความเข้มข้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ 372_AFLP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p>0.05$



ภาพที่ 4-7 การแสดงออกของ 372_AFLP เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L และ 1 µg/L ที่ระยะเวลาต่างๆ



ภาพที่ 4-8 ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียเมื่อได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ความเข้มข้น (a) BPA เข้มข้น 10 ng/L และ (b) BPA เข้มข้น 1 ug/L เป็นเวลา 0, 7, 14 และ 30 วัน

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

ปัจจุบัน BPA มีรายงานการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมของประเทศต่าง ๆ เช่น ในปี ค.ศ. 1996 พบการปลดปล่อย BPA ออกสู่สิ่งแวดล้อมประมาณ $1.62X10^9$ กิโลกรัม ทั่วโลก จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บมาจาก 3 บริเวณแล้วประเมินสัดส่วนร้อยละของการปลดปล่อยสาร BPA พบว่า ประเทศสหรัฐอเมริกาปล่อยสาร BPA ประมาณ 48% ประเทศในแถบตะวันตกของยุโรป ประมาณ 32% และ ประเทศญี่ปุ่น 20% ซึ่งร้อยละ 65 ของการปนเปื้อนมาจากการใช้ BPA ในกระบวนการผลิตพลาสติกกลุ่มโพลิคาร์บอเนต ร้อยละ 28 มาจากกระบวนการใช้ BPA เป็นตัวร่วมในการผลิตอีพอกซี่เรซิน และร้อยละ 7 มาจากการผลผลิตอื่น ๆ ที่มีการใช้ BPA เป็นตัวร่วมในปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของ BPA จากวัสดุที่มี BPA เป็นส่วนประกอบหลัก และน้ำเสียจากบ้านเรือน ที่ไม่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียปล่อยลงสู่แหล่งน้ำโดยตรงซึ่งจะทำให้ BPA ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำ (Desbrow, Routledge, Brighty, Sumpter, & Waldock, 1998)

ในปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวกับการปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยยังมีไม่มากนัก แต่จะเน้นถึงการปนเปื้อนของ BPA ในอาหาร และผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับเด็กทารก เพราะมีรายงานการศึกษาแล้วพบว่าหากกลุ่มทารกได้รับสาร BPA เข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อระบบประสาทและการพัฒนาระบบต่างๆของร่างกายได้ และในผู้ใหญ่จะก่อให้เกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมากได้ (Belfroid et al., 2007) โดยในประเทศไทยได้มีการกำหนดมาตรฐานของ BPA ในผลิตภัณฑ์พลาสติก เช่น ขวดน้ำดื่ม และถุงพลาสติกแบบร้อน ไม่เกิน 2.5 mg/kg จึงจะไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานถึงตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับใช้ตรวจสอบสาร BPA ที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น การวิเคราะห์ฟองน้ำทะเล การศึกษาการเพิ่มจำนวนของ peroxisome ในตัวอ่อนของหอยทาก และการศึกษาโปรตีนของเยื่อหุ้มไข่ชั้น zona radiate ของปลา (Lee, Na, & Park, 2002) ซึ่งเป็นการศึกษาผลของ BPA ที่มีต่อสิ่งมีชีวิต แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพส่วนใหญ่มักใช้โปรตีนไวเทลโลจีนิน (vitellogenin หรือ VTG) เป็นตัวบ่งชี้การรับสัมผัสสาร BPA ในสิ่งแวดล้อม เช่น การวิเคราะห์โปรตีนไวเทลโลจีนินภายในโอโอไซต์ หรือในรังไข่ของหอยแมลงภู่ (Eckelbarger & Davis, 1996) แม้แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเพศผู้ และตัวอ่อนที่พึ่งออกจากไข่พบว่ามี VTG แต่การแสดงออกของยีน VTG นั้นจะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่สามารถตรวจพบได้เนื่องจากระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจน

ต่ำเกินไปจึงกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ VTG ได้น้อย (Marin & Matozzo, 2004; Goksoyr, 2006) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาการเพิ่มประมาณของ acyl-CoA oxidase ในหอยแมลงภู่เป็นตัวบ่งชี้เมื่อมีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ที่เป็นอันตรายอีกด้วย ดังนั้นการที่จะพัฒนาและค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อใช้เป็นตัวติดตามตรวจสอบการสัมผัสสารในสิ่งมีชีวิตและบ่งชี้การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้นจึงมีความสำคัญ และปัจจุบันมีเทคนิคต่าง ๆ ที่นำมาใช้ศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค microarray ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายสูงและขั้นตอนการวิเคราะห์ซับซ้อน ดังนั้นการศึกษาในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค cDNA-AFLP จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นเทคนิคค้นหาเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลเพราะเป็นวิธีที่สะดวก และมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ เป็นต้น

ในการสืบค้นเครื่องหมาย cDNA-AFLP เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสาร BPA โดยใช้หอยเจดีย์เป็นต้นแบบในครั้งนี้ เนื่องจากหอยเจดีย์เป็นหอยทะเลขนาดเล็ก พบว่ามีการแพร่กระจายอยู่ตามบริเวณหาดทรายและหาดโคลนที่มีปริมาณสารอินทรีย์จำนวนมาก และกินสารอินทรีย์เหล่านั้นเป็นอาหาร และไม่มีการย้ายถิ่นที่อยู่เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป (Houbrick, 1984) โดยคัดเลือกจากการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์เนื่องจากสาร BPA มีการออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์โดยตรงและในระดับหนึ่งอาจส่งผลให้การสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศเสียสมดุลไปโดยเฉพาะในเพศผู้ทำให้เกิดการลดจำนวนของอสุจิลงได้ เช่นเดียวกับการทดสอบทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของหอยหลายชนิดที่ได้รับสาร BPA และ17ß-estradiol (E_2) (Jobling et al., 2006; Ganaire et al., 2009) ผลกระทบของสาร BPA ต่อระดับการแสดงออกของยีนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีรายงานในหอยแมลงภู่ *Mytilus galloprovincialis* ที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 10-60 ng/L เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของยีน MeEr2 ที่เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase GSH transferase และ GSSG reductase อีกด้วย (Canesi et al., 2007) ส่วนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*) เมื่อได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 1 μM เป็นเวลาติดต่อกัน 8 วัน พบว่าสาร BPA จะไปขัดขวางและยับยั้งการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก osteoblast และยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน Insulin-like growth factor (IGF)-I ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์กระดูกได้อีกด้วย (Suzuki et al., 2003) จะเห็นว่าสาร BPA มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนและเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ BPA ยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของหอย โดยผลการศึกษาในหอยน้ำจืด *Marisa conurietis* เมื่อได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-1 μg/L เป็นเวลา 6 เดือน โยค์ล (yolk) จะสลาย ส่วนในเพศผู้การพัฒนาของ

ตัวอสุจิ (spermatogenesis) ลดลง และเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการสร้างอสุจิ เกิดการฝ่อและสลายตัว (Jobling et al., 2004) ดังนั้น หอยเจดีย์จึงเป็นสัตว์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบระดับการปนเปื้อนของสาร BPA ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ แม้มีในปริมาณน้อย เนื่องจากหอยเจดีย์เป็นสัตว์ที่อยู่ประจำถิ่น จึงมีโอกาสที่จะได้รับ BPA ติดต่อกันเป็นระยะเวลายาวนานจึงเกิดความผิดปกติในระดับยีนหรือโปรตีนขึ้นได้ ดังนั้นเทคนิค cDNA-AFLP ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมและถูกนำมาใช้ในการค้นหายีนหรือเครื่องหมายต่าง ๆ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะสำหรับจำแนกเพศในปลาปักเป้า *Takifugu rubripes* (Cui, Shen, Gong, Yang, & Gu, 2006) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าเทคนิคนี้สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อราและระดับการสังเคราะห์ ochratoxin A (OTA) ของเชื้อรา *Aspergillus carbonarius* (Atoui, Mitchell, Mathieu, Magan, & Lebrihi, 2007) ได้ เป็นต้น

เมื่อศึกษาการปนเปื้อนของสาร BPA ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล โดยให้หอยเจดีย์ได้รับสาร BPA เข้มข้น 10 ng/L (เป็นความเข้มข้นต่ำสุด) และ 1 ug/L (ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ผิดปกติ) โดยวิธีการแช่ติดต่อกันนาน 7, 14 และ 30 วัน และคัดเลือกเครื่องหมายชีวโมเลกุลได้ คือ 372_AFLP เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสและเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของหอยเจดีย์ที่ได้ยังไม่ปรากฏในฐานข้อมูลแต่อย่างใด ระบุได้แต่เพียงว่ามีความใกล้เคียงกับ sex and growth AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (accession no. AY654005) เพียง 83 % หรืออาจเป็นเพราะแถบดีเอ็นเอที่ได้ (ขนาด 372 คู่เบส) ไม่ครอบคลุมหรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่บันทึกไว้บนฐานข้อมูล เป็นต้น

ผลการทดสอบศักยภาพของ 372_AFLP ของหอยเจดีย์สำหรับนำไปใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร BPA ในน้ำทะเล โดยศึกษาในห้องปฏิบัติการ ทำโดยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับเบสของ 372_AFLP สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ซึ่งเปรียบเทียบสัดส่วนระดับการแสดงออกของ 372_AFLP กับยีนควบคุมภายใน 28S *rRNA* เนื่องจากยีน 28S *rRNA* เป็นยีนที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีการแสดงออกคงที่ไม่ขึ้นอยู่กับอวัยวะและเนื้อเยื่อ (Filby & Tyler, 2007) ทั้งนี้ 372_AFLP สามารถใช้ตรวจสอบได้เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L เป็นระยะเวลานาน 7 วัน สามารถวัดระดับของ 372_AFLP ได้เล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามหากใช้เทคนิคที่มีความไวสูง เช่น real-time PCR ก็อาจจะสามารถวัดระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ได้ชัดเจนและภายในเวลาสั้นกว่า 7 วัน ที่ระยะเวลา 7 วัน เดียวกันนี้เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA เข้มข้น 1 µg/L มีผลชักนำให้ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ที่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เป็นไปได้ว่า BPA ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจน เมื่อเข้าสู่ร่างกายด้วยการกินและซึมผ่านทางผิวหนังเข้า

สู่ระบบหมุนเวียนเลือดไปแย่งจับกับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนแล้วเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของ 372_AFLP ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ 372_AFLP มากผิดปกติ

จากผลการศึกษาดังที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า เครื่องหมาย DNA 372_AFLP และหอยเจดีย์มีความเหมาะสม สามารถใช้เป็น biomarker เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของกลุ่มสารที่รบกวนต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ คือ BPA ในหอยเจดีย์ได้เป็นอย่างดี ขณะเดียวกันการใช้หอยเจดีย์เป็นสัตว์ทดสอบจะมีความเหมาะสมเนื่องจากหอยชนิดนี้มีจำนวนมาก และมีแหล่งอาศัยในบริเวณที่มีสารอินทรีย์สูง ซึ่งเป็นบริเวณที่หอยเจดีย์มีโอกาสที่จะได้รับและสะสมสารเคมีไว้ในตัวได้โดยตรง การเฝ้าระวังและติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีที่ปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำ โดยการวิเคราะห์สาร BPA ด้วยวิธีทางเคมีโดยตรงทำได้ยาก แต่เมื่อตรวจพบได้ในปริมาณน้อยจากการสัมผัสสาร BPA ในหอยเจดีย์ จะเป็นการเฝ้าระวังไม่ให้เกิดผลกระทบต่อโครงสร้างของประชากรสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศนั้นได้

สรุปผลการวิจัย

จากการค้นหาเครื่องหมายทางชีวภาพที่มีศักยภาพใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของ BPA ในแหล่งน้ำ โดยค้นหาจากระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมีย ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 μg/L เป็นระยะเวลานาน 14 วัน โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP สามารถคัดเลือกแถบ DNA 372_AFLP จากคู่ไพรเมอร์ Eco_AAG/Mse_CTA มีขนาด 372 คู่เบส ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 83% กับ sex and growth AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (accession no. AY654005) และได้พัฒนาเป็นเครื่องหมาย DNA เพื่อใช้ตรวจสอบสาร BPA ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ โดยออกแบบไพรเมอร์ใหม่ เมื่อทำปฏิกิริยา PCR จะได้ผลผลิตที่มีขนาด 109 คู่เบส และพบว่า 372_AFLP มีศักยภาพในการบ่งชี้การปนเปื้อนของ BPA ในแหล่งน้ำโดยศึกษาด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ตรวจสอบได้เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L และ 1 μg/L เป็นระยะเวลานาน 7 วัน และมีผลชักนำให้ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ที่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA อย่างมีนัยสำคัญ $P< 0.05$ และเมื่อได้รับ BPA นาน 30 วัน พบว่ามีระดับการแสดงออกของ 372_AFLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 11.4 เท่า ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรม 372_AFLP จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร BPAในแหล่งน้ำได้

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของเครื่องหมาย DNA 372_AFLP ในระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพียงอย่างเดียว ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีทดสอบในเนื้อเยื่อชนิดอื่นเพิ่มเติมด้วย เช่น ปมประสาทเท้า และปมประสาทสมองเป็นต้น เพื่อยืนยันศักยภาพของเครื่องหมาย DNA ที่สืบค้นได้ในครั้งนี้ การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ควรใช้เทคนิคที่มีความไวสูงทดสอบเพิ่มเติม เช่น real-time PCR ซึ่งอาจจะสามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ในหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ได้เร็วกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ที่ศึกษาในครั้งนี้ ที่ตรวจพบได้เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น10 ng/L เป็นระยะเวลานาน 7 วัน ได้ แต่อย่างไรก็ตามควรต้องมีการศึกษากลไกการทำงาน และโครงสร้างที่สมบูรณ์ของเครื่องหมาย 372_AFLP นี้ร่วมด้วย รวมทั้งนำหอยเจดีย์ไปทดสอบกับแหล่งน้ำที่มีโอกาสได้รับ BPA เพื่อยืนยันศักยภาพและประสิทธิภาพของเครื่องหมาย 372_AFLP ที่สืบค้นได้ และพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้หรือใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมต่อไป

บรรณานุกรม

กฤษณา รัตนอาภา. (2540). *ผลกระทบของหอยขี้นก* (*Cerithium* sp.) *ต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon Fabricius) แบบพัฒนาระบบปิด*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. (2547). *จีโนมและเครื่องหมาย DNA*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Atoui, A., Mitchell, D., Mathieu, F.,Magan, N., & Lebrihi, A. (2007). A cDNA-AFLP approach to study ochratoxin A production in Aspergillus carbonarius. *Journal of Applied Microbiology*, *103*, 961–968.

Arukwe, A. (2006). Toxicological housekeeping gene: 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 endocrinc disruption. *Comparative Hepatology*, *2*.

Belfroid, A., Velzen, V. M., Horst, V.-D. B., & Vethaak, D. (2002). Bisphenol A Risk Assessment Document. *Chemosphere, 49*, 97–103.

Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., & Aparicio, S. (2006). Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. *Nature*, *366*, 265–268.

Cajaraville, M.P., Cancio, I., Ibabe, A., & Orbea, A. (2003). Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Micros Res Tech*, *61*, 191–202

Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Vergani, L., Tavolari, S., & Gallo, G. (2007). Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *276*, 36-44.

Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., & Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environment fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*, *8*, 1107-1135.

Crain, A.D., Eriksen, M., Igcchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette, Jr., & Louis, J. (2007). An ecological assessment of bisphenol A. *Evidence comparative biology. Reproductive Toxicology*, *24*, 225-239.

Cui, J.Z., Shen, X.Y., Gong, Q.L., Yang, G.P., & Gu, Q. (2006). Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes. Science and Technology*, *14*, 30-36.

Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., & Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ*mental *Sci*ence *and Technol*ogy, 32, 1549–1558.

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

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., & Oehlmann, J. (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology*, *64*, 437–449.

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*, 10-15.

Furhacker, M., Scharf, S., & Weber, H. (2000). Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, *41*, 751-756.

Houbrick, R.S. (1984). Revision of higher taxa in genus *Cerithidea* (mesogastopod: Potamididae) based on comparative morphology and biology data. *American Malacology Bullrtin*, *2*, 1-20.

Jobling, S., Casey, D., Rogers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Ohelmann, 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*, *66*, 207–222.

Kim, E. K., & Lee J. S. (2009). Ultrastructural Description on Oogenesis of the Melania Snail,*Semisulcospira libertina libertina* (Gastropoda: Pleuroceridae). *Korean Journal Malacology*, *25*, 145-151.

Lee, C., Na, J.G., Lee, K.C., & Park, K. (2002). Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. *Aquatic Toxicology, 61*, 233-241.

Lee, H.B., & Peart, T.E. (2000). Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Quality Research Journal Canada, 35*, 283-298.

Lindholst, C., Pedersen, S.N., & Bjerregaard, P. (2001). Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology, 55*, 75-84.

Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., & Moore, M.N. (2000). Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis*). *International Journal Environ*mental *Pollution, 13*, 56–91.

Ohelmann, J., Schulte-Ohelmann, U., Bachmann, J., Oetken, M., Lutz, I., Kloas,W., & Ternes, T.A. (2006). Bisphenol A induces superfeminisation in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: prosobranchia) at environmental relevant concentrations. *Environmental Health Perspect, 114*, 127–133.

Oriti-Zarragoitia, M., & Cajaraville, M.P. (2006). Biomakers of exposure and reproduction-related effect in mussels exposed to endocrine disruptors. *Environmental Contamination Toxicoloy, 50*, 361-369.

Pampanin, D.M., Marangon, I., Volpvato, E., Campesan, G., & Nasci, C. (2005). Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus dalloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Itaty). *Environmental Pollution, 136*, 103-107.

Pastva, S.D., Villalobos, S.A., Kannan, K., & Giesy, J.P. (2001). Morphological effects of bisphenal A on the early life stage of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere, 45*, 535-541.

Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., & Cancsi, L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry Physiology, 143*, 303-315.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R., & Kohler, H.-R. (2006). Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda) Importance of wastewater effluents, temporal variability and spatial aspects for free-living populations. *Environmental Contamination Toxicology, 15*, 143-156.

Schirling, M., Triebskorn, R., & Kohler, H.-R. (2004). Variation in stress protein levels (hsp70 and hsp90) in relation to oocyte development in *Potamopyrgus antipodarum* (Koch 1835). *Invertebrate Reproductive Physiology, 45*, 161–167.

Sone, K., Hinago, M., Kitayama, A., Morokuma, J., Ueno, N., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2004). Effects of 17ß-estradiol nonylphenol and bisphenal A on developing *Xenopus laevis* embryo. *General and Comparative Endocrinology, 138*, 228-236.

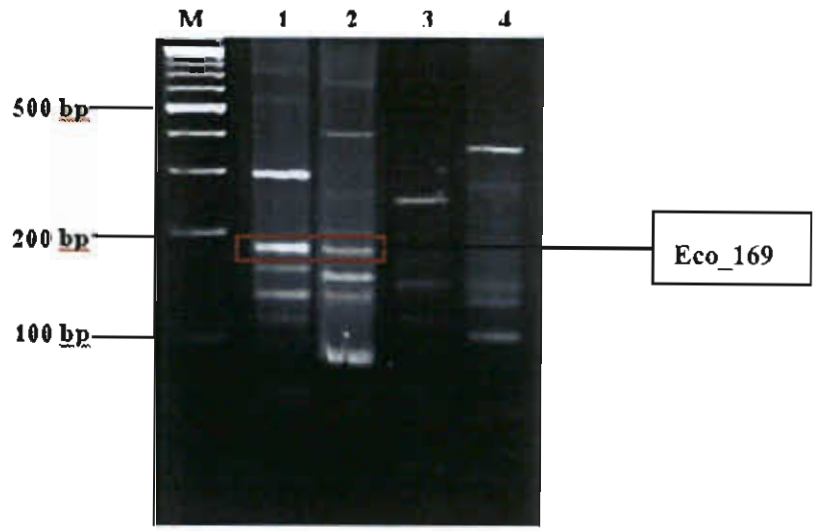
Suzuki, N., Kambegawa, A., & Hattori, A. (2003). Bisphenal A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sciences, 73*, 2237-2247.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., & Peakall, D.B. (2006). *Principle of Ecotoxicology* (3rd ed.). Crc Press.

Yamamoto, T., & Yasuhara, A. (1999). Quantities of bisphenol A leached from plastic Waste samples. *Chemosphere, 38*, 2569-2576.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ (เพิ่มเติม)



(a)

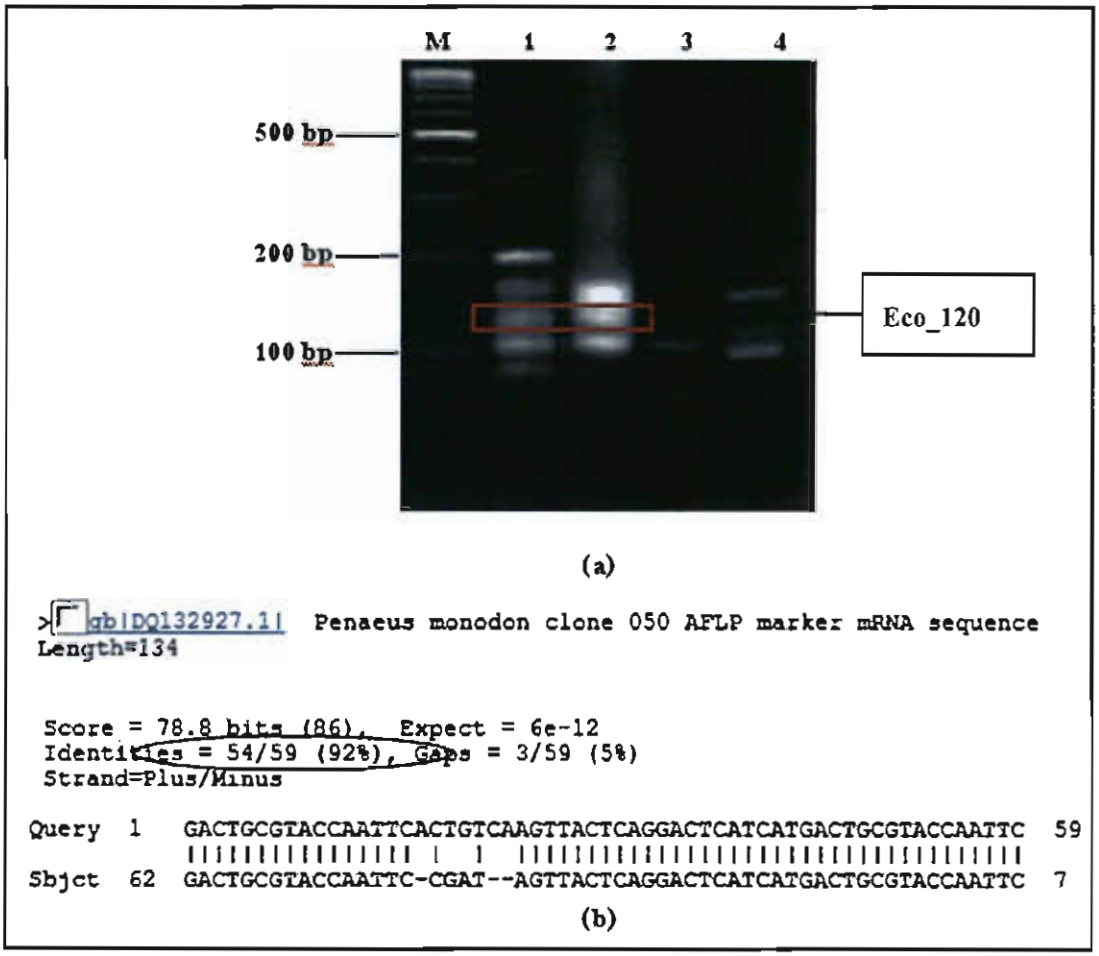
>gb|DQ132921.1| Penaeus monodon clone 020 AFLP marker mRNA sequence
Length=92

Score = 69.8 bits (76), Expect = 4e-09
Identities = 45/48 (94%), Gaps = 1/48 (2%)
Strand=Plus/Plus

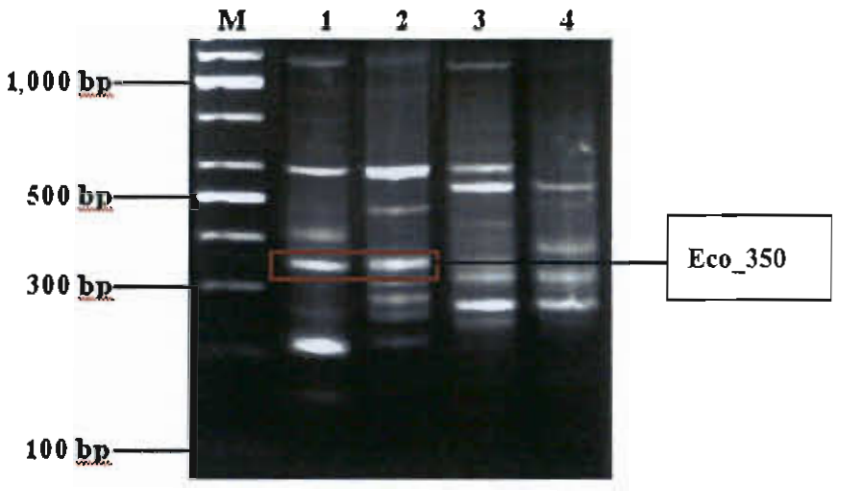
```
Query  73   GTTACTCAGGACTCATCATGACTGCGTACCAATTCAACGTCAACAGAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||| | |||||
Sbjct  39   GTTACTCAGGACTCATCATGACTGCGTACCAATTCCACGT-AGCAGAC  85
```

(b)

ภาพที่ ผก-1 (a) การคัดเลือกแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_AGC/Mse_CTA ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ช่อง 1 และ 2 คือ หอยเจดีย์ที่รับสัมผัสสาร BPA เพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ
ช่อง 3 และ 4 คือ หอยเจดีย์กลุ่มควบคุมเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ
ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder plus
(b) การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast



ภาพที่ ผก-2 (a) การคัดเลือกแถบ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_ACT/Mse_CTA ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักดิ์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
ช่อง 1 และ 2 คือ หอยเจดีย์ที่รับสัมผัสสาร BPA เพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ
ช่อง 3 และ 4 คือ หอยเจดีย์กลุ่มควบคุมเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ
ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder plus
(b) การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast



(a)

>emb|AL357127.17| Human DNA sequence from clone RP11-282I1 on chromosome 10 Contains the 3' end of a novel gene and a novel gene, complete sequence
Length=124343

Score = 140 bits (154), Expect = 8e-30
Identities = 133/166 (81%), Gaps = 3/166 (1%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  109    TTCCTTCCTCTGTCAGCTGAGTGGGCTTAGAAGCAATGATATTCCAGTAGCAACAAACAC  168
              |||||| |||||||||||||| |||| |||||||||||| || |||||| |||  | |||
Sbjct  93515  TTCCTTGCTCTGTCAGCTGACAGGGCCTAGAAGCAATGACATCCCAGTAACAATGAGCAC  93456

Query  169    ACC-AGCTGCCACATTTTGGTTTCTAATACCATTTTCC-ATAAAAGGAATCAAAGCCCTT  226
              ||| ||| ||  || | ||||||||  |||||| ||| ||||||||||| ||  || |||
Sbjct  93455  ACCTAGC-ACCTGATCTAGGTTTCTATCACCATTCTCCAATAAAAGGAACCAGTGCTCTT  93397

Query  227    TGGAGAAATGGCTGATTCTAACATTGGGCCAGGAAATATGCAACAT  272
              |||||||||| |||||||||  | || | |||||||||| ||| ||
Sbjct  93396  TGGAGAAATGACTGATTCTAGGACTGAGGCAGGAAATATACAAAAT  93351
```

(b)

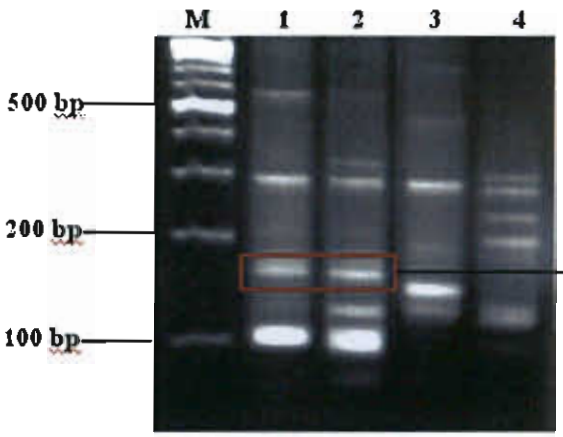
ภาพที่ ผก-3 (a) การคัดเลือกแถบ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_ACT/Mse_CTT ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักดิ์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่อง 1 และ 2 คือ หอยเจดีย์ที่รับสัมผัสสาร BPA เพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ

ช่อง 3 และ 4 คือ หอยเจดีย์กลุ่มควบคุมเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ

ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder plus

(b) การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast



(a)

>emb|AL138916.14| Human DNA sequence from clone RP11-497D6 on chromosome 6q24.2-25.2
Contains the 3' end of the C6orf103 gene for chromosome
6 open reading frame 103, a novel pseudogene, a novel gene
and the 3' end of a novel gene, complete sequence
Length=183115

Score = 246 bits (272), Expect = 3e-62
Identities = 136/136 (100%), Gaps = 0/136 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  14     TAACTATGCCTATATCTTAGCACAGTTCAAGCCCCCAACATAATTGTAACCTGTGGTCTT  73
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  58077  TAACTATGCCTATATCTTAGCACAGTTCAAGCCCCCAACATAATTGTAACCTGTGGTCTT  58136

Query  74     TCATTAGTCTGATATAGTCACTTTCAGTCCCCAAACAAGGAGGCGGGTAGTTTTGGGACA  133
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  58137  TCATTAGTCTGATATAGTCACTTTCAGTCCCCAAACAAGGAGGCGGGTAGTTTTGGGACA  58196

Query  134    GGAATTATGCTGAATT  149
              ||||||||||||||||
Sbjct  58197  GGAATTATGCTGAATT  58212
```

(b)

ภาพที่ ผก-4 (a) การคัดเลือกแถบ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ Eco_ACT/Mse_CTT ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gel ใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักดิ์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่อง 1 และ 2 คือ หอยเจดีย์ที่รับสัมผัสสาร BPA เพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ

ช่อง 3 และ 4 คือ หอยเจดีย์กลุ่มควบคุมเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ

ช่อง M คือ 100 bp DNA ladder plus

(b) การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP ตรวจสอบโดยโปรแกรม blast

ตารางที่ ผก-1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยต่อระดับการแสดงออกของ 372_AFLP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15.634a	15	1.042	528.543	0.000
Intercept	10.004	1	10.004	5073.249	0.000
time	10.055	3	3.352	1699.693	0.000
sex	0.001	1	0.001	0.45	0.505
con	3.832	1	3.832	1943.337	0.000
time * sex	0.018	3	0.006	2.99	0.037
time * con	1.714	3	0.571	289.809	0.000
sex * con	0.007	1	0.007	3.471	0.067
time * sex * con	0.007	3	0.002	1.139	0.340
Error	0.126	64	0.002		
Total	25.764	80			
Corrected Total	15.76	79			

R Squared = .992 (Adjusted R Squared = .990)

Sig= significance

ตารางที่ ผก-2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของ 372_AFLP เมื่อหอยเจดีย์ได้รับ BPA เป็นเวลาต่าง ๆ

Variable: log	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	0	7	-0.4271*	0.0140	0.000	-0.4551	-0.3990
		14	-0.7306*	0.0140	0.000	-0.7587	-0.7026
		30	-0.9436*	0.0140	0.000	-0.9717	-0.9156
	7	0	0.4271*	0.0140	0.000	0.3990	0.4551
		14	-0.3036*	0.0140	0.000	-0.3316	-0.2755
		30	-0.5165*	0.0140	0.000	-0.5446	-0.4885
	14	0	0.7306*	0.0140	0.000	0.7026	0.7587
		7	0.3036*	0.0140	0.000	0.2755	0.3316
		30	-0.2130*	0.0140	0.000	-0.2411	-0.1850
	30	0	0.9436*	0.0140	0.000	0.9156	0.9717
		7	0.5166*	0.0140	0.000	0.4886	0.5446
		14	0.2130*	0.0140	0.000	0.185	0.2411

Based on observed means. Sig= significance

*The mean difference is significant at the .05 level.

ภาคผนวก ข

สารเคมี และวิธีการเตรียม

1. วิธีการเตรียมสารเคมี

1.1 bisphenol A (stock solution 100 mg/ml)

Bisphenol A (BPA)	500 mg
DMSO	5 ml

1.2 5X TBE buffer (เตรียมสารละลายปริมาตร 1,000 ml)

Tis-base	54 g
Boric acid	27.5 g
EDTA (disodium dehydrate MV=372.24 g/mol)	3.72 g

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

LB broth	4 g
น้ำกลั่น	200 ml

1.4 LB agar

LB broth	4 g
Bacto agar	3 g
น้ำกลั่น	200 ml

1.5 X-gal (40 mg/ml)

X-gal	0.04 g
Dimethyl formamide	1 ml

1.6 Ampicillin (200 mg/ml)

Ampicillin	0.02 g
น้ำกลั่น	1 ml

ภาคผนวก ค
บทความที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการ

การสืบค้นเครื่องหมายทางชีวภาพในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ที่มีศักยภาพบ่งชี้การปนเปื้อนของ bisphenol A ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ ด้วยวิธี cDNA-AFLP

cDNA-AFLP search for the potential biomarker in hornsnail (*Cerithidea cingulata*) to detect bisphenol A contamination in the aquatic environment

ยุทธนา เทพทอง[1,2], ชูตา บุญภักดี[1,2,3]

[1]บัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี

[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

บทคัดย่อ

การสืบค้นเครื่องหมายทางชีวภาพเพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร bisphenol A (BPA) ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP ในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ตัวเต็มวัยที่ได้รับสาร BPA โดยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA คัดเลือกชิ้น cDNA-AFLP เป้าหมายจำนวน 1 แถบที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA คือ 372_AFLP เมื่อโคลน อ่านลำดับเบส แล้วนำไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับเบสของเครื่องหมาย 372_AFLP ไม่สามารถเทียบเคียงได้กับยีนใดๆ ที่ปรากฏในฐานข้อมูล (เมษายน 2554) แต่มีความเหมือน 82 % กับ sex and growth traits AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับเบสของ 372_AFLP สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR จำเพาะ ผลการทดสอบเครื่องหมาย cDNA-AFLP ที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้นนี้พบว่า สาร BPA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ลิตร มีผลชักนำระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ที่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่อย่างไรก็ตามการยืนยันศักยภาพของเครื่องหมาย cDNA-AFLP นี้ควรต้องดำเนินการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: bisphenol A, หอยเจดีย์, *Cerithidea cingulat*, cDNA-AFLP

ABSTRACT

To search the putative biomarker for detection of bisphenol A (BPA) contaminated in environment, cDNA-AFLP method in homsnail (*Cerithidea cingulata*) was used in this study. A cDNA-AFLP banding differences between the hornsnail adult exposed to 1 μg/L BPA and the control group (no BPA) were screened. A 372-bp cDNA-AFLP fragment designed 372_AFLP, appeared in the BPA-treated group was selected, cloned and then sequenced. However, the 372_AFLP nucleotide sequences did not match any gene sequence deposited in GenBank, but showed 82 % identity (April

2011) with sex and growth traits AFLP marker sequences of *Penaeus monodon*. The new specific primers pair, therefore, was designed from these 372_AFLP sequences for the specificity of PCR. The preliminary study of 372_AFLP expression was then performed. The result revealed that 1 μg/L-BPA up-regulated 372_AFLP marker in the gonads of both genders of hornsnail. However to complete evaluation 372_AFLP as the potential biomarker, much more studies should be required.

Keywords: bisphenol A, hornsnail, *Cerithidea cingulat*, cDNA-AFLP

บทนำ

biphenol A หรือ BPA เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งเกี่ยวข้องกับพัฒนาการการเจริญของสัตว์โดยมีผลทำให้ระบบสืบพันธุ์เจริญผิดปกติจนไม่สามารถทำหน้าที่อย่างปกติได้ เช่นที่พบในปลาและหอย (Cajaraville *et al.*, 2003) ส่วนในมนุษย์นั้น สาร BPA ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งในต่อมลูกหมาก (Belfroid *et al.*, 2002) และสารพันธุกรรมมีความผิดปกติ BPA เป็นสารที่ใช้ในอุสาหกรรมหลายชนิด เช่น เป็นสารตัวกลางในการผลิตโพลีคาร์บอเนต เป็นสารเคมีที่ใช้ในการผลิตภาชนะบรรจุภัณฑ์ หรือผลิตภัณฑ์พลาสติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมากที่สุดในโลกในปัจจุบัน และยังพบว่าปนเปื้อนอยู่กับฝุ่นละออง (Fuerhacker *et al.*, 2000) รวมถึงปะปนมากับน้ำทิ้งจากบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมของผลิตภัณฑ์ที่มีสาร BPA เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นการกำจัดหรือการขนส่งสารถ้าไม่ได้มาตรฐาน สาร BPA ก็อาจปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนั้นได้

การใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) หรือดัชนีชี้วัดความเป็นพิษที่วิเคราะห์ได้ภายในตัวของสิ่งมีชีวิต หรือสารซึ่งถูกผลิตขึ้นภายในสิ่งมีชีวิตได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน โดยศึกษาจากของเหลวในร่างกาย เนื้อเยื่อ รวมถึงการแสดงออกของยีน หรือโปรตีนที่อาจผิดปกติเกิดขึ้นภายในร่างกายซึ่งสารผลิตภัณฑ์นี้สามารถบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของมลพิษแม้มีในปริมาณน้อยได้ (Livingstone *et al.*, 2000) และในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ หอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดผลกระทบของมลภาวะที่เกิดจากการปนเปื้อนของสาร BPA ในบริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งทะเลได้ดี เนื่องจากหอยเจดีย์เป็นสัตว์ที่อยู่ประจำถิ่น ในช่วงชีวิตหนึ่งมีระบบการกินอาหารแบบกรอง และพบแพร่กระจายทั่วไปทุกฤดูกาล เป็นต้น

เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นการตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR การเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้น DNA ต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ด้วยวิธีดังกล่าวชิ้น DNA ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงมีข้อดีคือ มีความรวดเร็วและใช้

ปริมาณ DNA จำนวนน้อย โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR จึงมีประสิทธิภาพสูง และการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบ DNA ได้หลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อมกัน เป็นต้น ดังนั้นเทคนิค cDNA-AFLP จึงเป็นวิธีที่สะดวก มีค่าใช้จ่ายน้อย เหมาะสมที่จะนำมาใช้ค้นหาเครื่องหมายชีวโมเลกุลในหอยเจดีย์ที่มีศักยภาพบ่งชี้ระดับการปนเปื้อนของสาร BPA ในแหล่งน้ำต่อไปได้

วัตถุประสงค์

เพื่อค้นหาเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค cDNA-AFLP ในหอยเจดีย์ที่มีศักยภาพเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร bisphenol A ในแหล่งน้ำได้

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างหอยเจดีย์

เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ ตัวเต็มวัยขนาดความยาวเปลือกประมาณ 2.2 เซนติเมตร จากบริเวณหาดเจ้าหลาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมีย นำมาปรับสภาพในห้องทดลอง 1 สัปดาห์ จากนั้นนำหอยเจดีย์มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 20X20X20 เซนติเมตร^3 บรรจุน้ำทะเล 700 มิลลิลิตร ผสมสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 ug/l (พบว่าก่อให้เกิดความผิดปกติในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์) และชุดควบคุม (20% DMSO ในน้ำทะเล) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นสุ่มหอยเจดีย์เพศละ 5 ตัวอย่าง กะเทาะเปลือกออกแล้วนำระบบสืบพันธุ์มาสกัด RNA โดยปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท Invitrogen Life Technologoies (สหรัฐอเมริกา)

2. การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA ทำในหลอดทดลองผนังบางขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ RNA ที่ผ่านกระบวนการย่อย DNA ด้วย *DNase* I ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงมาแล้ว จำนวน 6 ไมโครลิตร (500 นาโนกรัม) ผสมกับ random hexamer (4U/μl) จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 11 ไมโครลิตร ด้วย nuclease free water นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย 5X reaction buffer จำนวน 4 ไมโครลิตร 10mM dNTP จำนวน 2 ไมโครลิตร 40U RiboLock inhibitor จำนวน 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 19 ไมโครลิตร ด้วย nuclease free water บ่มที่อุณหภูมิ 25°C

นาน 5 นาที จากนั้นเติม 200U M-MuL V reverse transcriptase จำนวน 1 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 10 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที

3. การเตรียมเครื่องหมาย cDNA-AFLP

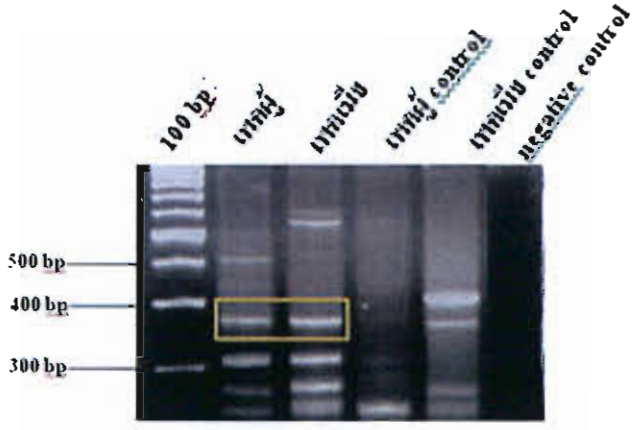
นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จำนวน 8 ไมโครลิตร มาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR*I และ *Mse*I อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร โดยผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ 65°C เป็นเวลา 20 นาที ผสม 10 μM *EcoR*I adapter 5′ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM *EcoR*I adapter 3′, 100 μM *Mse*I adapter 5′, 100 μM *Mse*I adapter 3′ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase จำนวน 0.3 ไมโครลิตร, T4 Ligase buffer จำนวน 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป ในปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร cDNA เชื่อมต่อ adapter แล้ว จำนวน 3 ไมโครลิตร 10 μM *EcoR*I_Pre-amp primer และ10 μM *Mse*I_Pre-amp primer อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR ทำจำนวน 20 รอบ แล้วเพิ่มปริมาณ DNA อีกครั้งในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์ PCR จากครั้งแรกเจือจาง 20 เท่า จำนวน 5 ไมโครลิตร 10 μM *EcoR*I_amp และ10 μM *Mse*I_amp อย่างละ 1 ไมโครลิตร ช่วงที่ 1 ทำปฏิกิริยา PCR แบบ Touch-down PCR ซึ่งมีขั้นตอนเช่นเดียวกับในปฏิกิริยา PCR ช่วงที่ 2 แต่อุณหภูมิขั้น annealing ลดลงรอบละ 0.7°C / รอบ โดยทำรวม 11 รอบ จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ช่วงที่ 2 ที่เริ่มจาก denature ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 60°C นาน 1 นาที extension ที่ 72°C นาน 40 วินาที และ final extension ที่ 72°C นาน 3 นาที จำนวน 25 รอบ

4. การวิเคราะห์เครื่องหมาย cDNA-AFLP

การวิเคราะห์เครื่องหมาย cDNA-AFLP ทำโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ความเข้มข้น 8% คัดเลือกแถบของ cDNA-AFLP ของผลิตภัณฑ์ PCR ในข้อที่ 3 ที่ปรากฏขึ้นตรงกันภายในกลุ่มตัวอย่างหอยเจดีย์ทั้งสองเพศที่ได้รับสาร BPA แต่ไม่ปรากฏในกลุ่มควบคุม จากนั้นตัดแถบ cDNA-AFLP ที่คัดเลือกได้ ทำการโคลน อ่านลำดับเบส แล้วเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุว่าเป็นเครื่องหมาย DNA หรือเป็นส่วนของยีนใด แล้วออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR อย่างจำเพาะเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร BPA ได้

ผลการวิจัย

เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ cDNA-AFLP บน polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบระหว่างหอยเจดีย์กลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสารกับกลุ่มควบคุม พบแถบ cDNA-AFLP ที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ทั้งเพศผู้และเพศเมียเท่านั้น มีขนาดประมาณ 380 คู่เบส □ , ภาพที่ 1) เมื่อตัดชิ้น DNA ดังกล่าวไปทำการโคลนและอ่านลำดับเบสพบว่าแถบ DNA นี้ (372_AFLP) มี



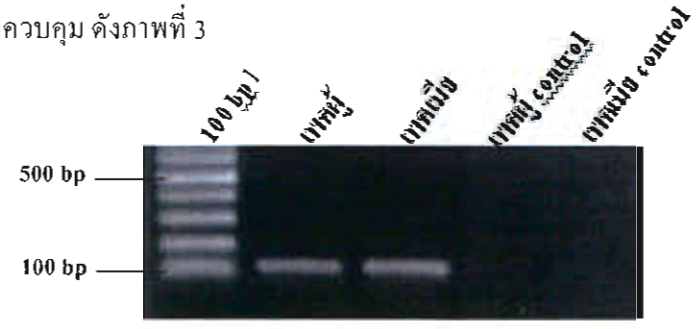
ภาพที่ 1 แถบ DNA ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา cDNA-AFLP เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ Eco_AAG/Mse_CTA ตรวจสอบด้วย 8 % polyacrylamide gelใน 1X electrode buffer pH 8.3 ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ขนาดเท่ากับ 372 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 82 % กับ sex and growth traits AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Accession no. AY654005) ดังแสดงในภาพที่ 2

```
>gb|AY654005.1|  Penaeus monodon clone AFE19M19 sex and growth traits AFLP marker
sequence
Length=347

 Score =  141 bits (156),  Expect = 2e-30
 Identities = 132/161 (82%), Gaps = 14/161 (8%)
 Strand=Plus/Plus

372_AFLP 201  GTTACTCAGGACTCATCATGACTGCGTACCAATTC-AAGAGATGGTGTAAGTCTTTCATA  259
              ||||||||||||||||||||||||||||||||| || || |  |  | | ||  |||
AFE19M19 109  GTTACTCAGGACTCATCATGACTGCGTACCAATTCCAATAGTTACTC-AGGACT--CATC  165

372_AFLP 260  ATAAA-GCGTGTC--TT----TAGTTACTCAGGACTCATCATGACTGCGTACCAATTC--  310
              || |  ||||  |  ||    ||||||||||||||||||||||||||||||||||
AFE19M19 166  ATGACTGCGTACCAATTCCAATAGTTACTCAGGACTCATCATGACTGCGTACCAATTCCA  225

372_AFLP 311  -AAGTTACTCAGGACTCATCGTGACTGCGTACCAATTCAAG  350
               |||||||||||||||||  ||||||||||||||||| ||
AFE19M19 226  GTAGTTACTCAGGACTCATCATGACTGCGTACCAATTCCAG  266
```

ภาพที่ 2 การเทียบเคียงลำดับเบสของ 372_AFLP ในหอยเจดีย์กับ sex and growth traits AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (AFE19M19) ด้วยโปรแกรม blast (แสดงการเปรียบเทียบเพียง 161 คู่เบส)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 372_AFLP มาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ สำหรับใช้ทดสอบศักยภาพการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค PCR) ได้คู่ไพรเมอร์ EcoAGC_109_L และ EcoAGC_109_R ซึ่งผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์คู่นี้จะมีขนาดเท่ากับ 109 คู่เบส และเมื่อนำไปทดสอบทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cDNA สังเคราะห์จากเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ (cDNA ตัวอย่างเดิมที่ถูกใช้คัดเลือก) พบว่าให้ผลบวกกับหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 1 ug/L แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ในตัวอย่างกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 109 คู่เบส ในส่วนของ 372_AFLP ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 1 ug/L ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

อภิปรายผล

ในการสืบค้นเครื่องหมาย cDNA-AFLP เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสาร BPA โดยใช้หอยเจดีย์เป็นต้นแบบทำการคัดเลือกจากการแสดงออกของยีนที่เนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์เนื่องจากสาร BPA มีการออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์โดยตรงและอาจส่งผลให้การสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศเสียสมดุลไป โดยเฉพาะในเพศผู้ทำให้เกิดการลดจำนวนของอสุจิลงได้ เช่นเดียวกับการทดสอบทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของหอยหลายชนิดที่ได้รับสาร BPA และ17ß-estradiol (E_2) (Jobling *et al.*, 2006; Ganaire *et al.*, 2009) ผลกระทบของสาร BPA ต่อระดับการแสดงออกของยีนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีรายงานในหอยแมลงภู่ *Mytilus galloprovincialis* ที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 10-60 ng/L เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของยีน MeEr2 ที่เนื้อเยื่อตับและดับอ่อนเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase GSH transferase และ GSSG reductase (Canesi *et al.*, 2007) อีกด้วย ส่วนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*) เมื่อได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 1 µM เป็นเวลาติดต่อกัน 8 วัน พบว่าสาร BPA จะไปขัดขวางและยับยั้งการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก osteoblast และยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน Insulin-like growth factor (IGF)-I ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการสร้างเซลล์กระดูกได้อีกด้วย (Suzuki *et al.*, 2003) จะเห็นว่าสาร BPA มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนและระดับการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ หอยเจดีย์จึงเป็นสัตว์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบระดับการปนเปื้อนของสาร BPA แม้มีในปริมาณน้อย เนื่องจากหอยเจดีย์เป็นสัตว์ที่อยู่ประจำถิ่น จึงมีโอกาสที่จะได้รับ BPA ติดต่อกันเป็นในระยะเวลายาวนานจึงอาจเกิดความผิดปกติในระดับยีนหรือโปรตีนขึ้นได้ ดังนั้นการค้นหาเครื่องหมาย DNA ด้วยเทคนิค cDNA-AFLP ซึ่งเป็นเทคนิคที่สะดวกและมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น เช่น microarray จึงยังเป็นที่นิยมและถูกนำมาใช้ในการค้นหายีน/เครื่องหมายต่างๆ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะสำหรับจำแนกเพศในปลาปักเป้า *Takifugu rubripes* (Cui *et al.*, 2006) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าเทคนิคนี้สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อราและระดับการสังเคราะห์ ochratoxin A (OTA) ของเชื้อรา *Aspergillus carbonarius* (Atoui *et al.*, 2007) ได้ เป็นต้น

การค้นหาเครื่องหมาย cDNA-AFLP สำหรับนำไปใช้ศึกษาการปนเปื้อนของสาร BPA ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำในครั้งนี้ ใช้หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 1 ug/L โดยวิธีการแช่ติดต่อกันนาน 14 วัน สามารถคัดเลือกเครื่องหมายชีวโมเลกุลที่ตอบสนองในระดับ mRNA ได้ คือ 372_AFLP เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของหอย

เจดีย์ที่ได้ยังไม่ปรากฏในฐานข้อมูลแต่อย่างใด และระบุได้แต่เพียงว่ามีความใกล้เคียงกับ sex and growth AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (accession no. AY654005) มากที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 372 คู่เบส ไม่ครอบคลุมหรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่บันทึกไว้บนฐานข้อมูล แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบศักยภาพเพื่อนำ 372_AFLP ของหอยเจดีย์ไปใช้สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร BPA ในแหล่งน้ำอย่างจำเพาะนั้น ในเบื้องต้นพบว่ามีความเหมาะสมโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สามารถตรวจสอบและบ่งชี้ได้ว่าสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/L มีผลชักนำให้ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ที่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียเพิ่มสูงขึ้น แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA (ภาพที่ 3) อย่างชัดเจน อาจเป็นไปได้ว่า BPA ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน เมื่อเข้าสู่ร่างกายผ่านเข้าระบบหมุนเวียนเลือดไปแย่งจับกับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนแล้วเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของเครื่องหมาย 372_AFLP (ที่ปัจจุบันยังไม่ทราบว่าเป็นยีนใด) ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ยีนนี้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรต้องมีการทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างจำนวนมากขึ้นที่เนื้อเยื่อหลายชนิด และที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วย เพื่อยืนยันศักยภาพของเครื่องหมาย cDNA-AFLP ที่สืบค้นได้จากการศึกษาในครั้งนี้

สรุปผลการวิจัย

จากการค้นหาเครื่องหมาย DNA ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมีย ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA โดยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA โดยคัดเลือกชิ้น cDNA-AFLP เป้าหมายได้จำนวน 1 แถบ จากคู่ไพรเมอร์ Eco_AAG/Mse_CTA ซึ่งมีขนาด 372 คู่เบส ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank แล้วพบว่ามีความคล้ายมากที่สุด (132/161; 82 % identities) กับ sex and growth AFLP marker ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เมื่อออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับศึกษาระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 109 คู่เบส ในเบื้องต้นพบว่าสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/L มีผลชักนำให้ระดับการแสดงออกของ 372_AFLP ที่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร BPA

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการจัดการบริหารสารเคมี และคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนส่วนหนึ่งอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

รายการอ้างอิง

Atoui, A., Mitchell, D., Mathieu, F.,Magan, N., Lebrihi, A., (2007). A cDNA-AFLP approach to study ochratoxin A production in Aspergillus carbonarius. *Journal of Applied Microbiology,* (103), 961–968.

Belfroid, A., Velzen, V. M., Horst, V.-D. B., and Vethaak, D. (2002). Bisphenol A risk assessment document. *Chemosphere,* (49), 97–103.

Cajaraville, M.P., Cancio, I., Ibabe, A., and Orbea, A. (2003). Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Micros Res Tech,* (61), 191–202.

Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Vergani, L., Tavolari, S., and Gallo, G. (2007). Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology,* (276), 36-44.

Cui, J.Z., Shen, X.Y., Gong, Q.L., Yang, G.P., and Gu, Q. (2006). Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes. Science and Technology*, (14), 30-36.

Furhacker, M., Scharf, S., and Weber, H. (2000). Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, (41), 751-756.

Gagnaire, B., Gagne, F., Andre, C., Abbaci, K., Budzinski, Kl., Devier, M.H., and Garric, J. (2009). Devlopment of biomarker of stress related to endocrine disruption in gastropod: Alkali-labile phosphate. Potein-bond lipids and vitellogenin-like protein. *Aquatic Toxicology*, (92), 155-167.

Jobling, S., Casey, D., Oehlmamm, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, Turner, A.P. and Tyler, C.R. (2006). Comparative response of mollusks and fish to environmental estrogen and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, (66), 207-222.

Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., and Moore, M.N. (2000). Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic

invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Int. J Environ. Pollut*, (13), 56–91.

Suzuki, N., Kambegawa, A., and Hattori, A. (2003). Bisphenal A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sci*, (73), 2237-2247.