



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการโคลน รูปแบบการแสดงออก และตำแหน่งในระดับเซลล์ของยีนที่  
เกี่ยวข้องกับพัฒนาการการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนส้มขาว

Cloning, cellular localization and expression pattern of the genes  
related to gonadal development in the false clown anemonefish

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บุณยภักดี

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการโคลน รูปแบบการแสดงออก และตำแหน่งในระดับเซลล์ของยีนที่  
เกี่ยวข้องกับพัฒนาการการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนส้มขาว

Cloning, cellular localization and expression pattern of the genes  
related to gonadal development in the false clown anemonefish

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บุษปภักดิ์  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุน  
รัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่าน  
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 148/2560

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพรทิพย์ ทองบ่อ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัด  
สมุทรสาคร ที่ถ่ายทอดเทคโนโลยีการเลี้ยงปลาการ์ตูนในบ่อปูนด้วยระบบชีวภาพ คุณจิรนนท์  
ธรรมณวโสฬส และคุณเอกรัตน์ น้อยเพ็ง ที่ช่วยดูแลและจัดการระบบการเลี้ยงปลาการ์ตูนส้มขาว  
ตลอดโครงการวิจัย คุณสันติ สนวนลา ช่วยวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล BS3109 และขอขอบคุณ  
ภาควิชาวาริชศาสตร์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุน  
สถานที่ทำการศึกษาตลอดโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บัญญัติ

กรกฎาคม พ.ศ. 2561

## บทคัดย่อ

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นรายงานผลการวิจัยที่ศึกษาในปีที่ 1 ของโครงการวิจัยที่ดำเนินการศึกษาต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 2 ปี เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* และ *cyp19a* ในปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน และตัวเต็มวัยอายุ 8 เดือนที่เข้าคู่กันนาน 1-5 เดือน กับพัฒนาการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ซึ่งศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคด้วยเทคนิคมิถุวิทยา (histology) งานวิจัยเริ่มต้นจากการทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่มีความจำเพาะกับยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ใช้ในปฏิกิริยา quantitative real-time PCR สำหรับวัดระดับการแสดงออกของยีน ผลการศึกษาพบการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในปลาการ์ตูนส้มขาวที่มีอายุตั้งแต่ 5 เดือน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีกระบวนการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) และพบการแสดงออกของยีน *cyp19a* ในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมากกว่าปลาการ์ตูนที่มีพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบการแสดงออกมากที่สุด ปลาการ์ตูนส้มขาวเพศเมียที่เข้าคู่เป็นเวลานาน 4 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่พบ early vitellogenic oocytes

## ABSTRACT

This is the first year report of a two-year project to study the correlation in *dmrt1* and *cyp19a* expression in 1-8 month old false clown anemonefish and paired 8 month adult for 1-5 months and gonadal development using the histological method. To study gene expressions, newly designed specific primers of *dmrt1* and *cyp1a* were conducted and used in quantitative real-time PCR. The results showed that the *dmrt1* was first expressed in 5 month old anemonefish, coinciding with spermatogenesis. *Cyp19a* was found more in developing females than males, most particularly in females paired for 4 months, which is in the period for developing early vitellogenic oocytes.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อไทย.....	ข
บทคัดย่ออังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
4 ผลการทดลอง.....	12
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	31
เอกสารอ้างอิง.....	33
ภาคผนวก.....	36

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
3-1	สารผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณของยีน <i>dmrt1</i> , <i>cyp19a</i> และ <i>rpl8</i> ....	19
3-2	ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ทำในส่วนของยีน <i>dmrt1</i> , <i>cyp19a</i> และ <i>rpl8</i> .....	20
4-1	รายละเอียดการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>dmrt1</i> และ <i>cyp19a</i> .....	23

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัย.....	5
2-2 กลไกระดับชีวโมเลกุลในการกำหนดเพศของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....	6
2-3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ.....	9
2-4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	10
2-5 กราฟแสดงผลจากปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์.....	11
2-6 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย SYBR-Green I Dye.....	12
2-7 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Hydrolysis probe.....	12
2-8 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Hybridization probe.....	13
2-9 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Molecular Beacons.....	13
2-10 การทำงานของเอนไซม์ Aromatase.....	16
4-1 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน <i>dmrt1</i> จากเนื้อเยื่อ <i>gonad</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาว.....	22
4-2 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน <i>cyp19a</i> จากเนื้อเยื่อ <i>gonad</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาว.....	22
4-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>dmrt1</i> และ <i>cyp19a</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาว..	23
4-4 ระดับการแสดงออกของยีน <i>dmrt1</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน.....	24
4-5 ระดับการแสดงออกของยีน <i>dmrt1</i> ในปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัยเข้าคู่.....	24
4-6 ระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp19a</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน.....	25
4-7 ระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp19a</i> ในปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัยเข้าคู่.....	26
4-8 ภาพตัดขวาง <i>gonad</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน.....	28
4-9 ภาพตัดขวาง <i>gonad</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 8 เดือนและเข้าคู่นาน 1-5 เดือน.	30
4-10 ระดับการแสดงออกของยีน <i>dmrt1</i> ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน.....	24



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเพาะพันธุ์ปลาทะเลสวยงามมีการพัฒนามากขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะเพื่อเพิ่มจำนวนผลผลิตให้เพียงพอสำหรับความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ซึ่งมูลค่าของธุรกิจปลาทะเลสวยงามในตลาดโลกเมื่อสิบปีที่ผ่านมานี้มีมูลค่าสูงมากกว่า 2,000 ล้านบาท โดยกลุ่มของปลาทะเลสวยงามที่นิยมเลี้ยงไว้ในตู้ของนักนิยมสัตว์น้ำสวยงามหรือเพื่อใช้จัดแสดงในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำสาธารณะกันมากที่สุดนั้นคือ ปลาในครอบครัว (Family) Pomacentridae เช่น กลุ่มปลาสลิคติน และกลุ่มปลาการ์ตูน (anemonefish, clownfish) และโดยเฉพาะปลาในครอบครัว Pomacent

ridae นี้มีส่วนแบ่งการตลาดเกือบร้อยละ 50 ของปลาทะเลสวยงามที่เลี้ยงกันทั่วโลก ทั้งนี้กลุ่มปลาการ์ตูน สกุล *Amphiprion* มีมูลค่าอยู่ที่ประมาณ 150 ล้านบาทต่อปี โดยความต้องการของตลาดภายในประเทศไทยมีมากถึงประมาณ 240,000 ตัวต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ในสถานการณ์ปัจจุบัน ที่ปริมาณการผลิตปลาการ์ตูนยังมีไม่เพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ ทำให้ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศส่วนหนึ่งซึ่งมีมูลค่าถึงประมาณ 3 ล้านบาทต่อปี (ศูนย์วิจัยกสิกร, 2548) และรวมถึงมีการลักลอบจับมาจากแหล่งธรรมชาติ โดยเฉพาะวัยเจริญพันธุ์เพื่อเป็นพ่อ-แม่พันธุ์

ดังนั้น อุตสาหกรรมการเพาะและขยายพันธุ์ปลาการ์ตูนของไทยจึงมีการใช้เทคโนโลยีด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวน ให้ได้สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีรูปร่างและลักษณะเด่น มีลวดลายของแถบสีบนลำตัวที่แปลก ใหม่ และหลากหลายมากยิ่งขึ้น ซึ่งปัจจุบันมีความก้าวหน้ามากกับการศึกษาในสายพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ เช่น *A. percula* เป็นต้น ในขณะที่สายพันธุ์พื้นเมืองของไทยเรายังไม่เป็นที่สนใจกันมากนัก และมีข้อมูลสนับสนุนเพื่อการเพาะเลี้ยง และขยายพันธุ์ค่อนข้างน้อย

ในปัจจุบันทราบกันแต่เพียงว่าปลาการ์ตูนที่อาศัยอยู่ในแนวปะการังในธรรมชาตินั้นเป็นสัตว์สังคมที่อยู่กันเป็นครอบครัว มีสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรมเป็นตัวกำหนดบทบาทของเพศ ซึ่งการสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนสืบขาวเป็นแบบกระเทยที่มีการเปลี่ยนเพศ (protandrous hermaphrodite) ในระยะแรกเริ่มหลังจากที่ฟักออกจากไข่ยังไม่สามารถกำหนดได้ว่าเป็นเพศใด จนกว่าจะเป็นวัยรุ่นจึงจะปรากฏเป็นปลาเพศผู้ และในปลารุ่นเดียวกันตัวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นปลาเพศเมียถ้ามีการเข้าคู่ผสมพันธุ์ (Brunner *et al.*, 2001) รวมถึงสภาพภายในสังคมนั้นหากเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น เมื่อขาดเพศเมีย ปลาเพศผู้ที่มีขนาดรองก็จะเจริญพัฒนากลายเป็นเพศเมียทดแทน แต่อย่างไรก็ตามกลไกการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีการควบคุมด้วยยีนชนิดใด ตลอดจนมีความสัมพันธ์กับพัฒนาการของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต (ตั้งแต่วัยอ่อนถึงวัยเจริญพันธุ์) มีแบบแผนของการแสดงออกของยีนดังกล่าวเป็นอย่างไร ยังไม่มีการศึกษาลงลึกถึงระดับพันธุกรรม โดยเฉพาะกับปลาการ์ตูนสืบขาว ซึ่งเป็นชนิดที่มีการแพร่กระจายในน่านน้ำไทย และมีรูปร่างและรูปแบบของสีที่หลากหลายที่เป็นที่นิยมของผู้เลี้ยงปลาทะเลสวยงาม แต่ด้วยปลาชนิดนี้มีพัฒนาการเจริญค่อนข้างช้า และผสมพันธุ์ได้ค่อนข้างยาก จึงยังคงเป็นปัญหาหลักที่สำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงของไทย

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงให้ความสำคัญ ที่จะนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ศึกษา ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและพัฒนาการของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ของปลาการ์ตูนส้มขาว คือ 1) ยีน *dmrt1* ซึ่งยีนนี้มีรายงานการศึกษาแล้วในปลาหลายชนิดที่คาดว่ามีส่วนร่วมในการกำหนดเพศ และมีการแสดงออกในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศผู้ เท่านั้น เช่น ในปลาข้างเงิน (Fernandino *et al.*, 2006) รวมถึงที่รายงานโดย Marchand *et al.* (2000) ในปลาเรนโบว์เทราต์ และในปลาข้าวสารญี่ปุ่นโดย Matsuda *et al.* (2002) พบว่าปลาในกลุ่มนี้มีการกำหนดเพศแบบ XX/XY โดยโครโมโซม Y ของเพศผู้จะมียีน *DMY* ที่มีวิวัฒนาการมาจากยีน *dmrt1* เป็นยีนกำหนดเพศผู้ และ 2) ยีน *cyp19a* ที่ปัจจุบันมีตัวอย่างการศึกษาในปลาหลาย (Danio rerio) (Tong *et al.*, 2001) ปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Trant, 1994) ปลาข้าวสารญี่ปุ่น และปลาเรนโบว์เทราต์ (Kanda *et al.*, 2006) เป็นต้น ซึ่งพบว่ายีน *cyp19a* มีการแสดงออกหลักที่รังไข่ การศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาพัฒนาการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองดังกล่าวด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งความรู้จากการศึกษาในครั้งนี้จักเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาและประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงการเข้าสู่ผสมพันธุ์ของปลาวัยเจริญพันธุ์ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ปลาการ์ตูนทำได้สำเร็จในระยะเวลาสั้น และจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนต่อไปได้อีกหลายด้าน เช่น การสร้างฮอร์โมนสังเคราะห์กระตุ้นการเจริญเติบโตหรือการปลูกถ่ายยีน เพื่อเร่งให้มีพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้เร็วขึ้น เป็นต้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ของปลาการ์ตูนส้มขาวในระยะต่างๆ

## 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

ยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* มีการแสดงออกในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปลาการ์ตูนส้มขาวในแต่ละวัยไม่เท่ากัน

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

ทราบระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* และความสัมพันธ์กับพัฒนาการของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ หรือทราบความจำเพาะของการแสดงออกของยีนกับเพศของปลาการ์ตูนส้มขาว

## 1.5 ขอบเขตของการวิจัย

กระบวนการศึกษาจะใช้ปลาการ์ตูนส้มขาวที่มีอายุหลังฟักออกจากไข่ 1 เดือน จนถึงวัยเจริญพันธุ์ที่มีอายุประมาณ 8 เดือน (ศึกษาเป็นรายเดือน) และศึกษากับตัวเต็มวัย (แยกเพศ) ที่นำมาเข้าคู่กันนานติดต่อกันเป็นระยะเวลา 1-5 เดือน (รายเดือน)

การศึกษาจะเริ่มจากการทำการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะและเพิ่มจำนวนในบริเวณยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* และศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองในปลาการ์ตูนส้มขาวแต่ละระยะดังกล่าวข้างต้นเฉพาะในเนื้อเยื่อ gonad ด้วยวิธี quantitative real-time PCR

#### 1.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่ตุลาคม 2559 ถึงมีนาคม 2561

#### 1.7 สถานที่ศึกษาทดลอง

ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล BS3109 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะ  
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ลักษณะทางชีววิทยาและการแพร่กระจายของปลาการ์ตูน

ปลาการ์ตูน (Anemonefish) เป็นปลาที่นิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม มีสีสัน และลวดลายที่สดใสสะดุดตา เป็นปลาที่ถูกจัดไว้ในกลุ่มปลาสลิคหิน (Damselfishes) ครอบครัว (Family) Pomacentridae ปัจจุบันสำรวจพบทั้งหมด 29 ชนิด แบ่งเป็น 2 สกุล (Genus) คือ สกุล *Amphiprion* ซึ่งในสกุลนี้มี 28 ชนิด และอยู่ในสกุล *Premnas* อีก 1 ชนิด (Fautin and Allen, 1992) ในประเทศไทยมีรายงานการพบปลาการ์ตูนทั้งหมด 7 ชนิด โดยพบในฝั่งทะเลอันดามัน 5 ชนิด ได้แก่ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลาการ์ตูนอินเดีย (*A. akallopisos*) ปลาการ์ตูนลายปล้อง (*A. clarkii*) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง (*A. sebae*) และปลาการ์ตูนแดงดำ (*A. ephippium*) ส่วนปลาการ์ตูนที่อยู่ในฝั่งอ่าวไทยมี 2 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) และปลาการ์ตูนอินเดียแดง (*A. perideraion*) (อุจน์จิต ปาตียเสวี, 2537) แต่ปลาการ์ตูนที่นิยมขายกันในตลาดปลาทะเลสวยงามของประเทศไทยยังคงมีปลาการ์ตูนสายพันธุ์ต่างประเทศอีก 2 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) และปลาการ์ตูนมะเขือเทศ (*A. frenatus*) ซึ่งปลาการ์ตูนแต่ละชนิดมีสีสันและลวดลายที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละชนิด (วรจภูมิ เกิดปราง, 2549)

##### 2.1.1 ปลาการ์ตูนส้มขาว (False Clown Anemonefish; *A. ocellaris*)

ปลาการ์ตูนส้มขาวเป็นปลาการ์ตูนที่ได้รับความนิยมนำมาเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ลักษณะโดยทั่วไปคือลำตัวมีสีส้มเข้ม มีแถบสีขาว 3 แถบ โดยแถบแรกพาดบริเวณส่วนหัวลงทางด้านหลังตา แถบที่ 2 พาดบริเวณกลางลำตัวระหว่างรอยเว้าของครีบทิ้งด้านหลังของแถบนี้ จะโค้งยื่นไปทางแถบแรก ส่วนแถบที่ 3 อยู่บริเวณคอดหางแถบขาวแต่ละแถบจะมีเส้นสีดำตัดบริเวณขอบรวมไปถึงบริเวณขอบของครีบต่าง ๆ ครีบหางของปลาการ์ตูนส้มขาวมีลักษณะกลม ครีบทิ้งมีลักษณะเว้าบริเวณตรงกลางลำตัว จึงทำให้ดูมีลักษณะคล้ายครีบทิ้งแบ่งออกเป็น 2 ตอน มีก้านครีบทิ้ง (dorsal fin spines) จำนวน 11 ก้าน ซึ่งจำนวนก้านครีบทิ้งนี้ใช้ในการจำแนกชนิดระหว่างปลาการ์ตูนส้มขาวกับปลาการ์ตูนเพอคูล่าที่มีรูปร่างลักษณะใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะในช่วงที่ปลายังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ยังมีสีส้มไม่ชัดเจน (ภาพที่ 2-1) ปลาการ์ตูนส้มขาวมีขนาดลำตัวยาวสุด (total length) ประมาณ 11 เซนติเมตร อาศัยอยู่ในบริเวณที่ความลึกตั้งแต่ 1-15 เมตร มักอยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเลชนิด *Heteractis magnifica*, *Stichodactyla gigantea* และ *S. mertensii*

ปลาการ์ตูนส้มขาวถูกจัดลำดับอนุกรมวิธานไว้ดังนี้ (Nelson, 1994)

Class: Actinopterygii

Order: Perciformes

Family: Pomacentridae

Genus: *Amphiprion*

Species: *A. ocellaris*



ภาพที่ 2-1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัย  
(ที่มา : <http://www.flickriver.com>)

## 2.2 พฤติกรรมการสืบพันธุ์ของปลา

โดยทั่วไปปลามีการสืบพันธุ์ 3 แบบขึ้นอยู่กับชนิด ดังนี้

1) การสืบพันธุ์แบบแยกเพศ (bisexual reproduction หรือ dioecious) โดยปลาเพศผู้และเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์แยกกัน การผสมพันธุ์เป็นแบบภายนอกตัว (external fertilization) หรือแบบภายในตัว (internal fertilization) ก็ได้

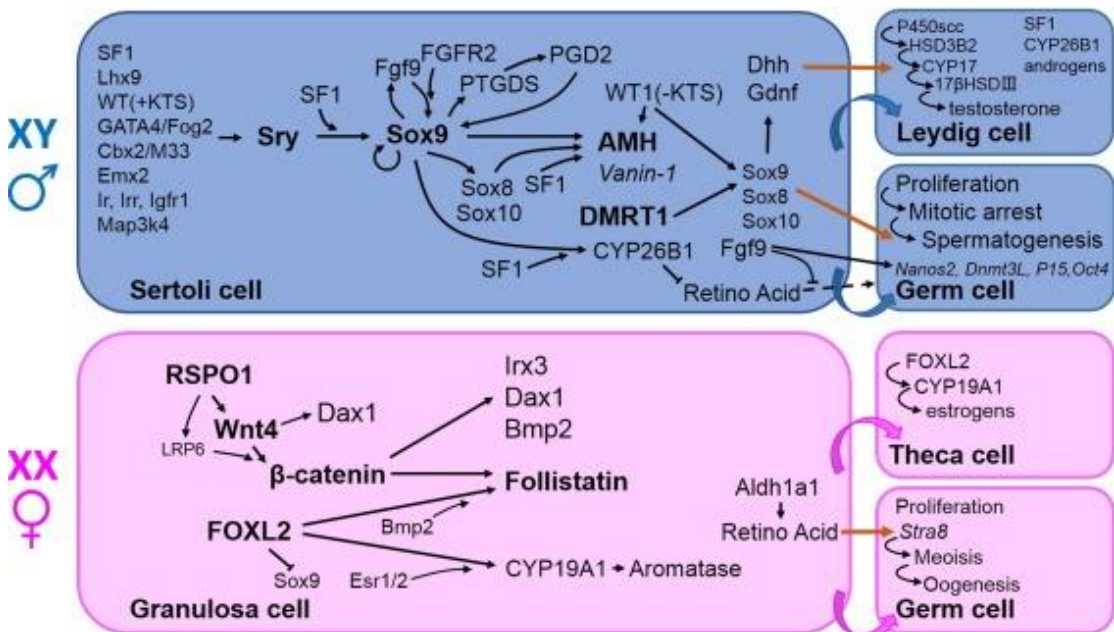
2) การสืบพันธุ์แบบกะเทย (hermaphroditism หรือ monoecious) พบเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (testicular tissue) และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovarian tissue) อยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ตัวเดียวกัน อาจพบเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในเวลาเดียวกันหรือคนละช่วงเวลาก็ได้ การผสมพันธุ์อาจเกิดขึ้นภายในตัวเดียวกัน (self-fertilization) เมื่อพบเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศสุกพร้อมกัน หรือมีการผสมพันธุ์ข้ามตัว (cross-fertilization) เมื่อพบเซลล์สืบพันธุ์เพียงเพศเดียวที่สุกและพร้อมทำงานได้ การผสมพันธุ์ข้ามตัวสามารถแบ่งได้ 2 แบบแบบที่ 1 คือกะเทยแบบ protandrous hermaphrodite หมายถึงปลาที่มีอวัยวะสืบพันธุ์ที่ทำหน้าที่เป็นอณฑะก่อนจึงทำหน้าที่เป็นรังไข่ พบในปลาทะเลกลุ่มปลานกแก้ว *Sparus auratus* ปลาหัวแบน *Inegocia crocodila* และปลาการ์ตูน แบบที่ 2 คือกะเทยแบบ protogynous hermaphrodite หมายถึงปลาที่ช่วงแรกมีอวัยวะสืบพันธุ์เป็นรังไข่ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นอณฑะ พบในปลาทะเล เช่น ปลานกแก้ว (*Dentex tumifrons*) ปลากะรัง สกุล *Epinephelus*

3) การสืบพันธุ์แบบไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (parthenogenesis หรือ gynogenesis) ไข่สามารถเจริญเป็นตัวอ่อนได้โดยเชื้อตัวผู้เป็นเพียงตัวกระตุ้นไข่ให้เกิดการเจริญและพัฒนาเท่านั้น โดยไม่ต้องผสม ลูกที่ได้จะมีโครโมโซมชุดเดียว (n) และเป็นเพศเมียทั้งหมด พบในพวกปลาถิ่นยูง เช่น ปลาสอด และปลาหางนกยูง (สุขใจ รัตนยุวกร และคณะ, 2548)

## 2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

### 2.3.1 ยีน Doublesex/male abnormal-3-related transcription factor-1 (*dmrt1*)

ยีน *dmrt1* จัดเป็นยีนในครอบครัว (gene family) Doublesex/mab-3 DNA-binding motif (*DM* domain) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัส (transcription factor) มีความเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Hong *et al.*, 2007) ในมนุษย์ที่มีระบบเพศเป็นแบบ XX และ XY มีรายงานพบว่าเพศชายถูกกำหนดไว้โดยยีน *SRY* ที่อยู่บนโครโมโซม Y ในขณะที่ปลาบางชนิดที่มีระบบเพศเป็นแบบ XX และ XY พบยีนที่กำหนดเพศเช่นกัน เช่น ปลาข้าวสารญี่ปุ่น (*Oryzias latipes*) ในขณะที่ปลาชนิดอื่นยังไม่มีรายงานการค้นพบยีนที่กำหนดเพศ มีการค้นพบว่าปลาเพศผู้ถูกกำหนดด้วยยีน *DMRT1bY* ในสัตว์ปีก สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลานที่มีระบบควบคุมเพศเป็น ZZ และ ZW เช่น ไก่เพศผู้ถูกกำหนดด้วยยีน *dmrt1* ที่อยู่บนโครโมโซม Z และในกบ (*Xenopus Laevis*) มียีน *DMW* ควบคุมการพัฒนาของรังไข่ (Redi *et al.*, 2007) ในเพศผู้จะมีกลไกการกำหนดเพศร่วมกับยีน *Sox9* เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของอัณฑะ (ภาพที่ 2-2)



ภาพที่ 2-2 กลไกระดับชีวโมเลกุลในการกำหนดเพศของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (She and Yang, 2017)

สิ่งมีชีวิตทั่วไปที่มีเพศแยก คือ เพศผู้ และเพศเมีย การมีเพศต่างกันขึ้นอยู่กับกลไกการกำหนดเพศ (sex determination) อันเนื่องมาจากโครโมโซมเพศและจำนวนชุดของโครโมโซม การกำหนดเพศในสิ่งมีชีวิตที่มีโครโมโซมเพศสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระบบ (บุญวัฒนา บุญธรรม, 2545) คือ

#### 1) ระบบ XY

ระบบ XY เป็นระบบที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น คน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด แมลงหวี่ และพืชบางชนิด การกำหนดเพศในคน คนเราสามารถระบุเพศได้ด้วยโครโมโซม Y ซึ่ง

โครโมโซม Y จะทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์ให้ตัวอ่อนมีการสร้างอวัยวะ (Testis) แต่ถ้าไม่มีโครโมโซม Y แต่มีโครโมโซม X ก็จะมีการกระตุ้นเซลล์ให้สร้างรังไข่แทน เพราะฉะนั้นสามารถสรุปได้ว่า ในคน XY จะเป็นเพศชาย และ XX จะเป็นเพศหญิง

### 2) ระบบ XO

ระบบ XO เป็นระบบที่พบในแมลงอันดับ (Order) Orthoptera เช่น ตั๊กแตน จิ้งหรีด และอันดับ Hemiptera เช่นพวกมวนต่างๆ ซึ่งเพศผู้จะมีโครโมโซม X เพียงโครโมโซมเดียว แต่เพศเมียจะมีโครโมโซมเป็น XX ดังนั้น เพศผู้จะมีโครโมโซมเป็น XO ส่วนเพศเมียก็จะเป็น XX

### 3) ระบบ ZW

ระบบ ZW เป็นระบบที่พบในสัตว์ปีก เช่น นก ไก่ สัตว์เลื้อยคลาน และปลาบางชนิด การกำหนดเพศระบบนี้ เพศเมียจะมีโครโมโซม ZW และเพศผู้จะเป็น ZZ ซึ่งเพศเมียจะสามารถผลิตไข่ได้ 2 ชนิดคือ ไข่ที่มีโครโมโซม Z กับไข่ที่มีโครโมโซม W ซึ่งเพศผู้จะผลิตสเปิร์มที่มีโครโมโซม Z อย่างเดียว เมื่อทำการผสมกันก็จะได้โครโมโซมในรูปแบบเดิมออกมา

การกำหนดเพศโดยอาศัยชุดของโครโมโซม เป็นการกำหนดเพศที่พบในแมลงอันดับ Hymenoptera เช่น ผึ้ง ต่อ และมด ซึ่งเพศผู้จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว ( $n$ ) แต่เพศเมียจะมีเป็นสองเท่าของตัวผู้ ( $2n$ ) เช่น ผึ้งเพศผู้มี 16 โครโมโซม แต่ผึ้งเพศเมียจะมี 32 โครโมโซม

## 2.4 การตรวจวัดการแสดงออกของยีน

การตรวจวัดระดับการสังเคราะห์ยีนมีหลายวิธีที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อวิเคราะห์ในตัวอย่าง สัตว์ทดลอง เช่น การใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา ที่ทดสอบหาแอนติบอดีหรือแอนติเจน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน เช่น radioimmunoassay (RIA) ซึ่งมีความไวสูงแต่อาศัยแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี และ immunohistochemistry ซึ่งต้องอาศัยทักษะการเตรียมเนื้อเยื่อตัวอย่างและความเชี่ยวชาญในการตรวจวัด ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต มีขั้นตอนการศึกษายุ่งยากและใช้เวลานานในการผลิตแอนติบอดี ส่วนการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนนั้นเป็นขั้นตอนการศึกษาในระดับการทรานสคริปชัน ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอเพื่อนำรหัสพันธุกรรมไปสังเคราะห์โปรตีนต่อไป ดังนั้นการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของเอ็มอาร์เอ็นเอจะมีความไวและเกิดการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าระดับโปรตีน และด้วยเทคโนโลยี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มชิ้นส่วนหรือปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง โดยเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติ โดยอาศัย DNA polymerase, co-enzyme, co-factors ต่างๆ สามารถสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (complementary DNA: cDNA) (ภาพที่ 2-3) ได้จากเอ็มอาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase หรือ RNA dependent DNA polymerase ซึ่งมีประโยชน์มากสำหรับการเปลี่ยนตัวอย่างที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแต่เปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นซีดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนมากเพื่อตรวจวัดปริมาณหรือระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Reverse transcription - Polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นวิธีการวัดปริมาณของเอ็มอาร์เอ็นเอเพื่อบ่งชี้ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายโดยการเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิง (reference gene) ได้แก่  $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulin, rpl8, 18S ribosomal RNA (18S rRNA) และ

28S ribosomal RNA (28S *rRNA*) เนื่องจากยีนดังกล่าวมีระดับการแสดงออกคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมที่ได้รับ (Arukwe, 2006)

การวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR จึงกลายเป็นวิธีที่มีบทบาทสำคัญในปัจจุบันที่สามารถเข้าใจกลไกการทำงานของเซลล์ขั้นพื้นฐาน ซึ่งสามารถทำได้ 3 วิธีคือ semi-quantitative RT-PCR, competitive RT-PCR และ real-time -PCR ซึ่ง 2 วิธีแรก การทำพีซีอาร์ต้องหาจำนวนรอบที่ทำการเพิ่มปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการวัดการแสดงออกของยีนจากปริมาณของเอ็มอาร์เอ็นเอ (m-RNA) ที่อยู่ในเซลล์ แต่วิธีนี้อาจต้องใช้เวลาเนื่องจากต้องหาจำนวนรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม และในการวัดปริมาณของดีเอ็นเอทำได้เมื่อกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จสิ้นก่อนจึงจะสามารถตรวจสอบได้ด้วย gel electrophoresis จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีพีซีอาร์ขึ้นไปอีกระดับคือ real-time RT-PCR ซึ่งมีความไวสูงสามารถตรวจสอบในระดับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือต่ำกว่าได้ (Arukwe and Goksoyr, 2003) และติดตามการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้ตลอดกระบวนการ วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องหาจำนวนรอบที่เหมาะสม สามารถติดตามการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไปพร้อมๆ กับการเพิ่มปริมาณโดยใช้สารเรืองแสงเป็นตัวติดตาม แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค real-time RT-PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงจึงเป็นข้อจำกัดในการปฏิบัติสำหรับบางห้องปฏิบัติการ ดังนั้น เทคนิค semi-quantitative RT-PCR จึงยังได้รับความนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

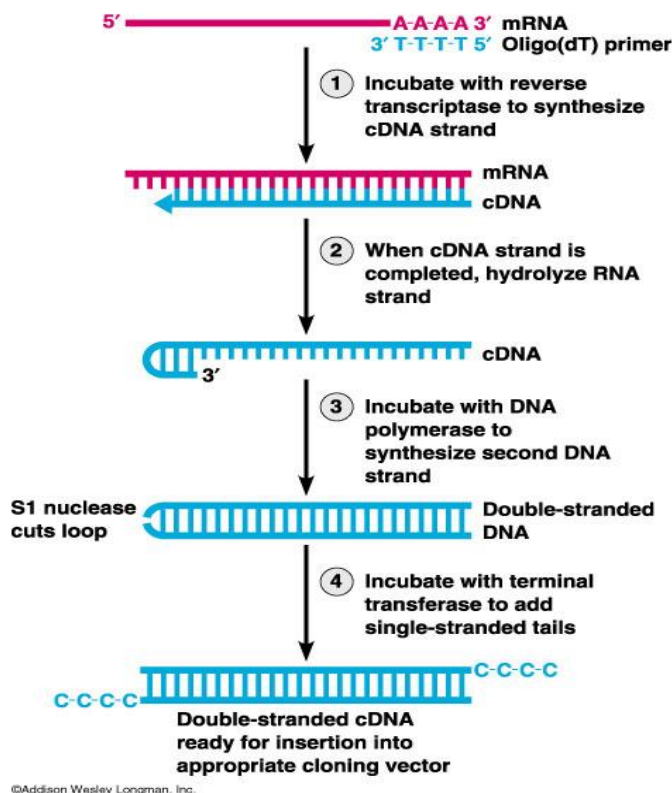
ซีดีเอ็นเอ (complementary DNA: cDNA) เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมาจากเอ็มอาร์เอ็นเอต้นแบบ เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase วิธีการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ จึงเรียกว่า RT-PCR มีขั้นตอนดังภาพที่ 2-4

## 2.5 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR)

เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่าดังภาพที่ 2 -5 จุดเด่นของเทคนิคพีซีอาร์ คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2545)

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมี เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ในปฏิกิริยามีดังนี้





ภาพที่ 2-3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (Longman, 1999)

1) Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP, dCTP

2) DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3) Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำพีซีอาร์จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

4) PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุภาคแมกนีเซียมอยู่ด้วย

5) Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ โดยมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนดังนี้

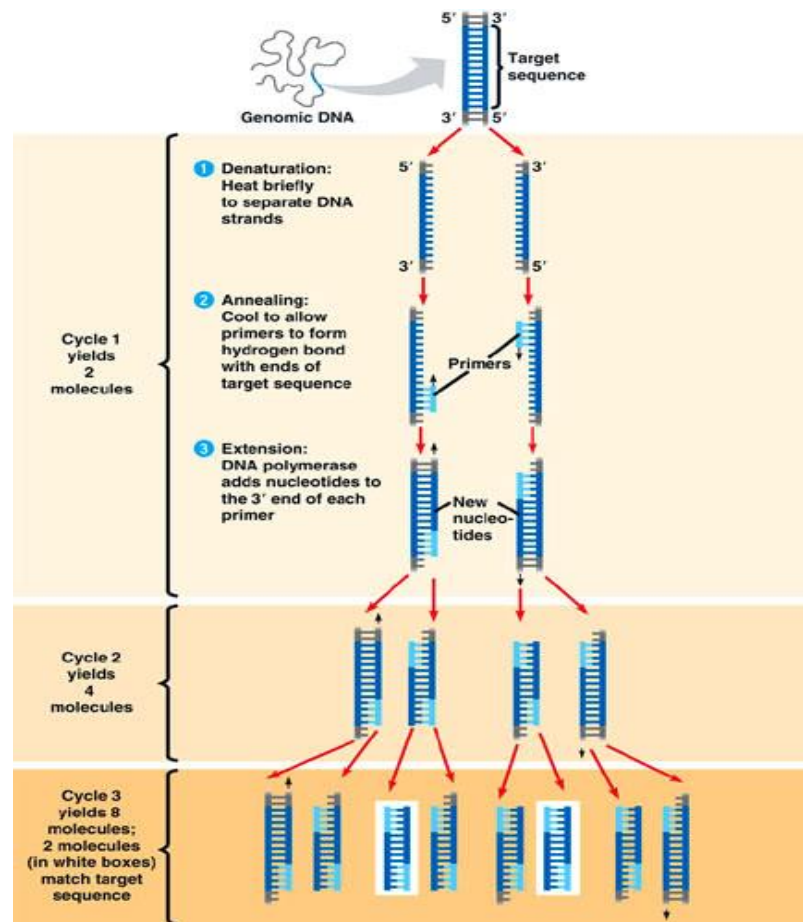
ขั้นตอนที่ 1 Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 2 Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงให้อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 17-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน

ขั้นตอนที่ 3 Extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ (ที่ใส่เข้าไปในขั้นที่สอง) ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดย

อาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม กับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา  $2^{20}$  รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า (ภาพที่ 2-4)



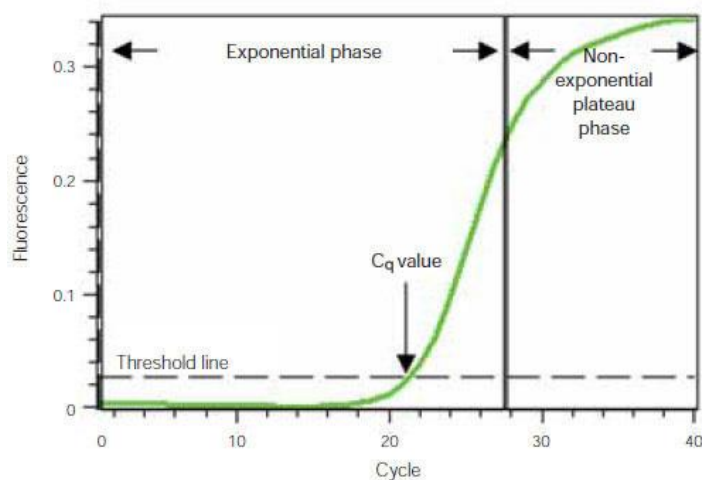
ภาพที่ 2-4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) (Anderson, 2011)

## 2.6 เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR)

เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR หรือ Quantitative PCR, qPCR) เป็นเทคนิคที่พัฒนาจากเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม โดยมีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent หรือ fluorochrome) ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งแต่ต้นและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ทันทีโดยไม่ต้องรอให้ปฏิกิริยาเสร็จสิ้นก่อน เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในแต่ละรอบ ทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (วีระพงศ์ ลุฑิตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, 2551) กราฟแสดงผลจากปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์แสดงในภาพที่ 2-5

### ข้อดีของเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

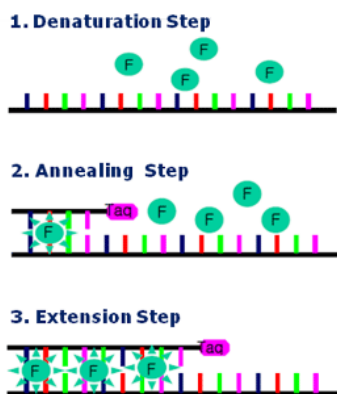
- 1) สามารถติดตามผลของปฏิกิริยาได้ขณะเกิดขึ้นจริง
- 2) ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา จึงได้ผลลัพธ์เร็วขึ้น
- 3) การทำงานในแต่ละรอบปฏิกิริยามักจะเร็วกว่าเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม
- 4) วัดการเพิ่มจำนวนได้มากถึง  $10^{10}$  เท่า (wider dynamic range)
- 5) สามารถตรวจยืนยันผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยการวิเคราะห์ melting point
- 6) สำหรับงานด้าน RNA จะใช้ปริมาณตั้งต้นของ RNA น้อยกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 1,000 เท่า
- 7) ค่าใช้จ่ายไม่ได้แพงกว่าการทำพีซีอาร์แบบดั้งเดิม ยกเว้นค่าอุปกรณ์



ภาพที่ 2-5 กราฟแสดงผลจากปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์ (Bio-rad, n.d.)

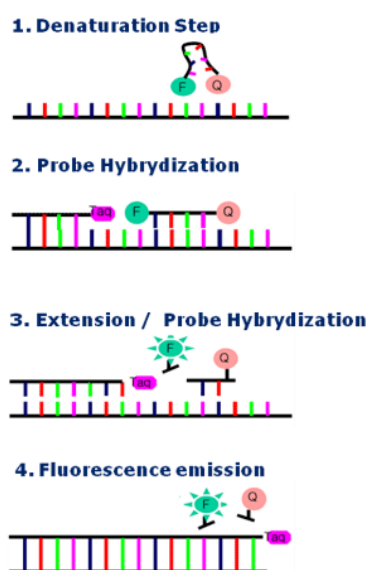
### 2.7 สารเรืองแสงที่ใช้ในเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

1) SYBR-Green I Dye : เป็นสารเรืองแสงที่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งร่องขนาดเล็ก (minor groove) ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ ในช่วงกระบวนการ denature ของปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวนั้น SYBR-Green ยังไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการ annealing และ extension สี SYBR-Green จะแทรกตัวเข้าไปจับกับสายคู่ของดีเอ็นเอและเปล่งแสงในช่วงคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตร เมื่อรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์กลับมาถึงช่วงกระบวนการ denature อีกครั้ง SYBR-Green จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอทำให้การเรืองแสงลดลง (ภาพที่ 2-6)



ภาพที่ 2-6 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย SYBR-Green I Dye (Bioneer, n.d.)

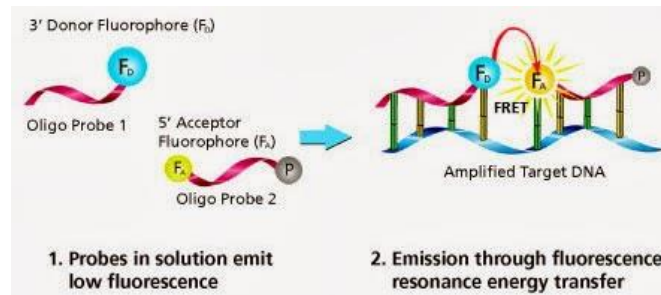
2) Hydrolysis probe : โพรบ (probe) ลักษณะนี้เป็น dual-labeled probe คือมีตัวระงับสัญญาณ (Quencher) และสารเรืองแสง (Reporter dye) อยู่บนโพรบเส้นเดียวกัน ซึ่งขณะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (intact) ตัวระงับสัญญาณจะดูดแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารเรืองแสงไว้ เมื่อมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดขึ้น Taq DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติ 5'-exonuclease จะ hydrolyze probe ทำให้เกิดการแยกตัวของสารเรืองแสงและตัวระงับสัญญาณ จึงสามารถตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์แสงฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้นเพราะมีจำนวนสารเรืองแสงที่เป็นอิสระสะสมมากขึ้นเรื่อย ๆ (ภาพที่ 2-7)



ภาพที่ 2-7 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Hydrolysis probe (Bioneer, n.d.)

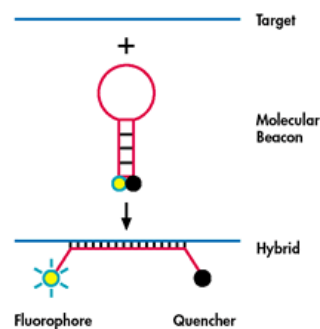
3) Hybridization probe: โพรบเส้นหนึ่งติดด้วย donor fluorophore ที่ 3' end และโพรบอีกเส้นที่ติดกันมี acceptor fluorophore ติดอยู่ เมื่อทั้งสอง fluorophore อยู่ใกล้กัน (ระยะห่าง 1-5 นิวคลีโอไทด์) แสงที่เปล่งออกมาของ donor fluorophore จะกระตุ้น

acceptor fluorophore ทำให้เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent Resonance Energy Transfer, FRET) ที่สามารถวัดได้ในช่วง annealing และช่วงแรกของการ extension ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะมีการเข้าจับของ hybridization probes เพิ่มมากขึ้น ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2-8)



ภาพที่ 2-8 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Hybridization probe (Sigmaaldrich, n.d.)

4) Molecular Beacons : ใช้โพรบที่สามารถโค้งงอเป็น hair pin loop ซึ่งยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนประมาณ 5-7 นิวคลีโอไทด์ และมีคู่เบส G-C มาก ทำให้ปลาย 5' และ 3' ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงและตัวระงับสัญญาณเข้ามาอยู่ใกล้กันจนตัวระงับสัญญาณสามารถดูดซับพลังงานจากสารเรืองแสงได้ ส่วนบริเวณ hair pin จะถูกสร้างให้มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อ Molecular Beacons เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย hair pin จะถูกสลายไป ทำให้สารเรืองแสงอยู่ห่างจากตัวระงับสัญญาณและสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยพลังงานสูง (ภาพที่ 2-9) (วีระพงศ์ ลุกลิตานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, 2551)



ภาพที่ 2-9 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Molecular Beacons (Biosearch technologies, n.d.)

## 2.8 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงสร้างของโมเลกุลของสาร สำหรับดีเอ็นเอนิยมแยกโดยใช้อะกาโรส หรือพอลิอะคริลาไมด์เป็นตัวกลาง การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แยก บ่งชี้และทำขึ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ทำได้สะดวกและรวดเร็ว การตรวจหาแถบของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันสามารถทำได้โดยการย้อมอะกาโรสด้วยเอธิเทียมโบรไมด์ แล้วตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเทียม

โบรมไนด์กับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซน เมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แลบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัม (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2545)

ในการเตรียมเจลจะนำอะกาโรสมาหลอมในบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH 8.0 แล้วเทลงในภาชนะเจล เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วจึงทำการหยดดีเอ็นเอ ซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆต่อไปนี้

#### 1) ขนาดของดีเอ็นเอ

อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผกผันกับ  $\log_{10}$  ของจำนวนคูเบส ดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าเพราะมีแรงเสียดทานมากกว่า และโมเลกุลจะเคลื่อนที่ผ่านรูของเจลยากกว่า

#### 2) ความเข้มข้นของอะกาโรส

ขณะที่ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ามีขนาดใหญ่ อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะเร็วกว่าเจลที่มีรูขนาดเล็ก ขนาดของรูภายในเจลจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรสยังมีความเข้มข้นมากรูภายในจะมีความเข้มข้นเล็ก การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรส จะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส

#### 3) โครงรูปของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่อยู่ในโครงรูปที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลในอัตราที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล ความแรงของกระแสไฟฟ้าและความแรงออสของบัฟเฟอร์ โดยทั่วไปสำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ โครงรูปแบบ supercoiled DNA จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าแบบ linear DNA ส่วนแบบ relaxed DNA จะเคลื่อนที่ช้าสุด

#### 4) แรงเคลื่อนไฟฟ้า

ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่สูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่เร็ว การแยกตัวจะไม่ดีแต่ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ต่ำดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้า การแยกตัวได้ดี แต่แลบดีเอ็นเอจะไม่ชัดเพราะเกิดการแพร่

#### 5) บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสมีหลายชนิด เช่น Tris-acetate buffer (TAE) pH 8.0, Tris-phosphate buffer (TPE) pH 8.5, Tris-borate buffer (TBE) pH 8.3

## 2.9 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.9.1 ยีน *dmrt1*

การกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิตเป็นกระบวนการทางชีวภาพขั้นพื้นฐาน ที่มีสิ่งเร้าที่เกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ อาหาร สารเคมี เป็นต้น ร่วมกับปัจจัยภายใน เช่น ฮอโมน และยีน *dmrt1* เป็นยีนที่มีความอนุรักษ์แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างคล้ายกันภายในกลุ่มของสัตว์ (Raymond *et al.*, 1999) จากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องที่ผ่านมาได้มีการศึกษาบทบาทของยีน *dmrt1* ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด อาทิเช่น งานวิจัยของ Raymond *et al.* (1999) ทำการศึกษาการแสดงออกและบทบาทของยีน *dmrt1* ใน เอมบริโอของหนู และไก่ Kettlewell

*et al.* (2000) ทำการศึกษาในเต่า (*Trachemys scripta*) และ Moniot *et al.* (2000) ทำการศึกษาในมนุษย์ พบว่ายีน *dmrt1* มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะสืบพันธุ์ และมีการแสดงออกมากในอวัยวะเมื่อเปรียบเทียบกับรังไข่ และที่ระยะเวลาแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ แต่ยีนจะมีการแสดงออกในช่วงที่มีการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์

Marchand *et al.* (2000) ศึกษาในระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) ซึ่งอวัยวะสืบพันธุ์กำลังพัฒนาขึ้น พบว่ายีน *dmrt1* มีการแสดงออกชัดเจนที่อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ Nanda *et al.* (2000) ศึกษาการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในอวัยวะสืบพันธุ์ของไก่ พบว่ายีน *dmrt1* อยู่บนโครโมโซม Z ในอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมีย แต่มีการแสดงออกที่อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ นอกจากนี้ Matsuda *et al.* (2002) ทำการศึกษากับกลุ่มปลาข้าวสารญี่ปุ่น (*Oryzias latipes*) พบว่าปลาในกลุ่มนี้การกำหนดเพศเป็นแบบ XX/XY โดยที่โครโมโซม Y ของเพศผู้จะมียีน *DMY* หรือ *dmrt1bY* (the DM-domain gene on the Y chromosome) เป็นยีนกำหนดเพศผู้ ยีนนี้มีวิวัฒนาการมาจากยีน Doublesex/male abnormal-3-related transcription factor-1 (*dmrt1*)

Kobayashi *et al.* (2004) ทำการศึกษาคอร์คว์ของยีน *DM* domain คือ *DMY* และ *dmrt1* ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาข้าวสารญี่ปุ่นจากการศึกษาล่าสุดค้นพบว่ายีน *DMY* เป็นปัจจัยสำคัญควบคุมพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์โดยเฉพาะของเพศผู้ในปลาข้าวสารญี่ปุ่น จากการศึกษาลักษณะมิถุนวิทยาทั่วไปบริเวณเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น (primordial germ cells: PGCs) ไม่พบการแสดงออกของยีน *dmy* และ *dmrt1* แต่มีการแสดงออกที่ Sertoli cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เกือบหุนกระบวนการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) ในช่วง 20-30 วันหลังจากฟักออกจากไข่ ในขณะที่ Fernandino *et al.* (2006) ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *dmrt1* ในระหว่างกระบวนการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ในปลาข้างเงิน (*Odontesthes bonariensis*) ซึ่งพบว่ายีนนี้ถูกจำกัดการแสดงออกเฉพาะอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis)

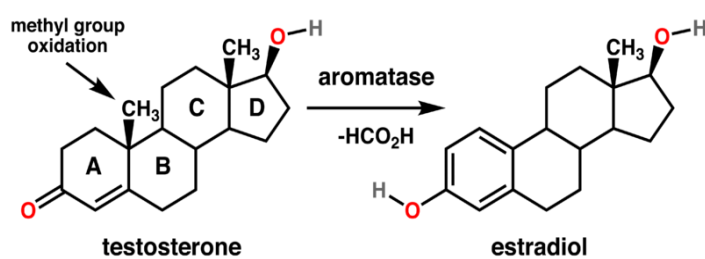
Yamaguchi *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *dmrt* (*dmrt1*, 2A, 2B, 3, 4 และ 5) ในระหว่างการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาปักเป้า (*Takifugu rubripes*) ผลการวิเคราะห์ทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาทั่วไป แสดงให้เห็นว่าหลังจากฟักออกจากไข่ 2 สัปดาห์ยังไม่มีพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ แต่จะมีการพัฒนาและเห็นความแตกต่างของเพศเกิดขึ้นใน 6 สัปดาห์หลังจากที่ฟักออกจากไข่ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ายีน *dmrt1* และ *dmrt3* มีการแสดงออกมากในอวัยวะ แต่ไม่พบการแสดงออกในรังไข่ของปลาที่มีอายุ 3 เดือน ส่วนยีน *dmrt2A*, 2B, 4 และ 5 ไม่สามารถตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงได้ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี *In situ* hybridization พบว่ายีน *dmrt1* มีการแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์ที่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงสมบูรณ์แล้ว และมีการแสดงออกใน Sertoli cells ซึ่งทำหน้าที่ในการแบ่งตัวเพื่อสร้างสเปิร์ม ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ายีน *dmrt1* เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลาข้าวสารญี่ปุ่น

Alam *et al.* (2008) ทำการโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน *dmrt1* และ *foxl2* ในปลาเก๋าตุ๊กแก (*Epinephelus merra*) ในช่วงที่ปลาเปลี่ยนจากเพศเมียไปเป็นเพศผู้ ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR ในส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่ายีน *dmrt1* มีการแสดงออกในอวัยวะ

สปีพันธุ์เพศผู้มากกว่าอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย โดยยีน *dmrt1* จะควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์ สืบพันธุ์เพศผู้ และผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *foxl2* พบว่ามีการแสดงออกมากในต่อม ใต้สมอง อวัยวะสืบพันธุ์ และเหงือก

## 2.9.2 CYP19A หรือ Cytochrome P450 Aromatase A หรือ Aromatase

เอนไซม์อะโรมาเตส (Aromatase) หรือเรียกว่า estrogen synthetase; estrogen synthase จัดเป็นมอนอกซิเจเนส (monooxygenase) ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบภายใน โมเลกุล (heme-binding protein) (Tong *et al.*, 2001) เป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายในวิถีการสร้าง สารสเตียรอยด์ (steroidogenesis pathway) ที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) โดยใช้ฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) เป็นสารตั้งต้น (ภาพที่ 2-10) โดยฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้สำคัญต่อพัฒนาการด้านการเจริญพันธุ์ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยในปลากระดูกแข็ง นั้นพบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีความสำคัญต่อการสร้างโปรตีนไข่แดง (yolk protein) ในตับและ พัฒนาการของ oocyte ในรังไข่ ในสมองมีความสัมพันธ์ต่อหน้าที่ของ neuroendocrine และ พฤติกรรมการสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์ประสาท (neurogenesis) และการซ่อมแซมสมอง (brain repair) ในมนุษย์มีความสำคัญต่อกลไกการเกิด โรคต่างๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านมและโรคการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ เป็นต้น (Wilson *et al.*, 2005) โปรตีน CYP19 แสดงออกมากที่อวัยวะสืบพันธุ์และสมอง นอกจากนี้ยังพบใน รก ตับ กระจุก เล็ดิกเซลล์ (Leydig cells) และเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เป็นต้น (เบญจมาศ คุ ชะนี, 2555) จากรายงานการศึกษาพบว่าโปรตีน CYP19 มี 2 รูปแบบ คือ CYP19A1 และ CYP19A2 ซึ่งทั้ง 2 รูปแบบมีการแสดงออกในตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่ต่างกัน โดยโปรตีน CYP19A1 ส่วนมากแสดงออกที่อวัยวะสืบพันธุ์ และ CYP19A2 แสดงออกมากที่สมอง (Zhang *et al.*, 2004)



ภาพที่ 2-10 การทำงานของเอนไซม์ Aromatase  
(<http://medlibes.com/entry/aromatase-deficiency>)

ทั้งนี้ในปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*) และในปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) พบว่ามีการแสดงออกมากที่สุดที่รังไข่ นอกจากนี้ยังมีรายงาน การศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ยีน *cyp19a* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน CYP19A เป็นตัว บ่งชี้ทางชีวภาพที่มีการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของฮอร์โมนจำพวก nonylphenol (NP), ethinylestradiol (EE) และสารจำพวก Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ในแหล่ง น้ำ โดย Kazeto *et al.* (2004) พบว่าสารดังกล่าวมีผลต่อปลาหม้าลาย (*Danio rerio*) โดยไปยับยั้ง ระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* และส่งผลต่อพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ อีกด้วย



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1 อุปกรณ์

1. T-Personal thermal cycler (Biometra, Germany)
2. Gel documentation and analysis system (Syngene, England)
3. Refrigerated microcentrifuge (J.P. Selecta, Spain)
4. Universal water thermostat BWT-U (Biosan, England)
5. Shaking incubator (Gallenkamp, U.K.)
6. Autoclave (Prestige Medical, England)
7. i-Mupid gel electrophoresis apparatus (Helix Technology, Canada)
8. Vortex REAX 2000 (Heidolph, Germany)
9. Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
10. Disruptor Genie<sup>TM</sup> (Scientific Industries, USA)
11. Micropipette ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000  $\mu$ l
12. Micropipette tips และ filter tips ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000  $\mu$ l
13. Microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5, 1.5 และ 2 ml
14. Isofreezer rack
15. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
16. หลอดแก้วและจานเพาะเชื้อ
17. ปีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร ปากครีบ กรรไกร ใบมีดและแท่งแก้ว
18. ตู้เลี้ยงปลาขนาดบรรจุน้ำ 6 ลิตร
19. อุปกรณ์ให้ออกซิเจน

เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสโดยการนึ่งที่ อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

##### 3.1.2 สารเคมี

1. Ethyl 3-aminobenzoate (MS-222) (Sigma Aldrich, Germany)
2. Trizol reagent (Invitrogen, USA)
3. Chloroform (APS finechen, Australia)
4. Isopropanol (2-Propanol) (Sigma Aldrich, Germany)
5. Absolute ethanol (VWR Prolabo, France)
6. DNase I (AppliChem, Germany)
7. RevertAid M-MuLV reverse transcriptase, 200 U/ $\mu$ l (Fermentas, USA)
8. Nuclease free water (GIBCO<sup>TM</sup> Invitrogen Corporation, USA)

9. RiboLock RNase inhibitor (Fermentas, USA)
10. GoTaq green master mix, 2X (Promega, USA)
11. 100 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas, Germany)
12. SeaKem<sup>®</sup> LE agarose (Cambrex Bio Science, USA)
13. 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Germany)
14. Tris base (Invitrogen<sup>™</sup> life technologies, USA)
15. Boric acid (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia)
16. EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) (Amresco, USA)
17. Ethidium bromide 10 mg/ml (Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies, USA)
18. Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan)
19. SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific)
20. อาหารปลา (Ocean nutrition, protein 41.1%, fat 9%, fiber 2.4%, moisture 14.5%, ash 10.5%)

### 3.2 สัตว์ทดลอง

#### 3.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนอายุประมาณ 1-8 เดือน โดยเลี้ยง 5 ตัวต่อตู้ รวมทั้งสิ้น 20 ตู้ และปลาการ์ตูนอายุ 8 เดือนเข้าคู่กันนานเป็นระยะเวลา 1-5 เดือน เลี้ยงในตู้ขนาดเดียวกันกับปลา วัยอ่อน ( 1 คู่/ตู้) ทำ 3 ซ้ำแต่ละเดือน แต่ละตู้บรรจุน้ำทะเลธรรมชาติจำนวน 40 ลิตร โดยนำ ทะเลนํามาจากช่องแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี แล้วนำมาพักในบ่อกักเก็บ น้ำเค็มของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (รายงานของกรมควบคุม มลพิษ ปี พ.ศ. 2552 ในสถานีตรวจวัดช่องแสมสาร พบว่า น้ำทะเลมีคุณภาพดี) โดยนำทะเลที่ใช้ ในการทดลองมีความเค็มประมาณ 30 ppt อุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยประมาณ 28 °C ให้อาหารปลา วันละ 2 มื้อ ทั้งนี้ทำการปรับสภาพของปลาก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกว่าปลา จะกินอาหารปกติ สถานที่ทดลองคือ โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

#### 3.2.2 การสกัด RNA

การเตรียม RNA ปฏิบัติตามคู่มือของบริษัท Invitrogen Life Technologies โดยมี ขั้นตอนดังนี้ คือ นำตัวอย่างปลามาสับด้วยสารละลาย MS222 และตัดแยกเนื้อเยื่อ โดยนำ เนื้อเยื่อสมองและตับที่แยกได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี Trizol จำนวน 300 µl เติม glass beads acid washed จำนวน 15 เม็ดเขย่าด้วยเครื่อง disruptor genie นาน 5 นาที ตั้ง ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม chloroform จำนวน 200 µl เขย่าอย่างแรงให้ สารละลายเข้ากันนาน 15 วินาที ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูดสารละลายจำนวน 100 µl ส่วนบนใส่ในหลอด ทดลองขนาด 1.5 ml แล้วทำการตกตะกอน RNA โดยการเติม isopropanol จำนวน 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 3-5 ครั้งแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปปั่นตกที่ อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม

75% ethanol จำนวน 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 5 นาที ตูด ethanol ที่แห้งแล้วเติม 75% ethanol จำนวน 500  $\mu$ l อีกครั้งเพื่อล้างตะกอน RNA แล้วนำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 5 นาที ตูด ethanol ที่แห้งจากนั้น air dry ให้ ethanol ที่อยู่ใน RNA ระเหยจนแห้งโดยใช้เวลา 30 นาที จึงละลายตะกอน RNA ด้วย RNA storage solution จำนวน 50  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที เติม 10U/ $\mu$ l Dnase I จำนวน 2  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณ RNA ด้วย NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer

### 3.2.3 การสังเคราะห์ cDNA

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

### 3.2.4 การเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *dmrt1*, *cyp19a* และ *rpl8* ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *dmrt1*, *cyp19a* และ *rpl8* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีองค์ประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3-1 และ 3-2

ตารางที่ 3-1 สารผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณของยีน *dmrt1*, *cyp19a* และ *rpl8*

สารผสม	ปริมาณที่ใช้ในแต่ละยีน ( $\mu$ l)		
	<i>dmrt1</i>	<i>cyp19a</i>	<i>rpl8</i>
GoTag green master mix	7	7	7
10 $\mu$ M Primer L	0.5	1	0.2
10 $\mu$ M Primer R	0.5	1	0.2
cDNA	2	2	2
Nuclease free water	3	3	4.6
ปริมาตรรวม	14	14	14

ตารางที่ 3-2 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ทำในบริเวณยีน *dmrt1*, *cyp19a* และ *rpl8*

ยีน	ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR					จำนวนรอบ
	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final-extension	
<i>dmrt1</i>	94°C, 3 min	94°C, 30 s	51°C, 20 s	72°C, 20 s	72°C, 5 min	35
<i>cyp19a</i>	94°C, 3 min	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	72°C, 5 min	35
<i>rpl8</i>	94°C, 3 min	94°C, 30 s	58°C, 20 s	72°C, 20 s	72°C, 5 min	30

### 3.2.5 การตรวจสอบขนาดผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X Tris Borate EDTA (TBE) buffer เปรียบเทียบกับ DNA marker 100 bp ladder plus จำนวน 250 ng ภายใต้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml แล้วบันทึกภาพโดยส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

### 3.2.6 การวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

#### a) ออกแบบไพรเมอร์

การวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *dmrt1*, *cyp19a* และ *rpl8* ของปลาการ์ตูนส้มขาว การสังเคราะห์ไพรเมอร์ทำโดยบริษัท Sigma-Proligo (Singapore)

#### b) การวัดระดับการแสดงออกของยีน

ทำการแยกสกัด RNA จากเนื้อเยื่อสมองและตับของปลาการ์ตูน โดยในปลาการ์ตูนอายุ 2 เดือนนั้นใช้จำนวนปลาการ์ตูน 2 ตัว รวมเนื้อเยื่อทั้ง 2 แต่ที่อายุ 4 เดือนจะแยกสกัดจากแต่ละตัว นำ RNA ที่สกัดได้จำนวน 400 ng มาสังเคราะห์ให้เป็น cDNA โดยมีวิธีปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.5 สารผสมในปฏิกิริยา real-time PCR ทำในปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วยน้ำยา Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) 10 µl, sense primer และ anti-sense primer ความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 0.5 µl น้ำกลั่น 5.5 µl และ cDNA template จำนวน 3 µl จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง StepOnePlus™ (Applied Biosystems) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation ที่อุณหภูมิ 95 °C 10 นาที Amplification 95 °C 15 วินาที และ 50 °C 60 วินาที จำนวน 45 รอบ เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์คำนวณค่าความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มทดลองที่มีความสัมพันธ์เป็นเท่า ด้วยวิธี Relative Quantitation (RQ) เท่ากับ  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl, 2006) ด้วยโปรแกรมในเครื่อง StepOnePlus™ (Applied Biosystems) โดยคำนวณจากสูตร

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene test}} - Ct_{\text{endogenous control (18S rRNA)}} \text{ เมื่อ } Ct = \text{PCR cycle}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{calibrator (0 } \mu\text{g)}}$$

$$\text{Relative quantification (RQ)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

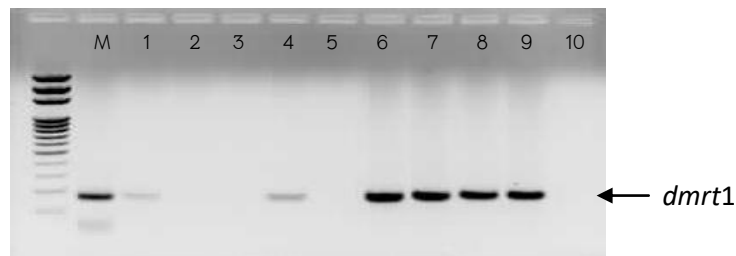
### 3.3 การศึกษาลักษณะทางมิถุนวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนระยะต่างๆ

เก็บตัวอย่างปลาที่มีอายุ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 เดือน และเข้าคู่เมื่ออายุ 8 เดือนเป็นเวลานาน 1-5 เดือน) ช่วงอายุละ 3-5 ตัว ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวจากนั้นสลับปลาด้วย MS222 ถ้าปลามีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร แบ่งตัวอย่างปลาเป็นส่วนหัวและส่วนหาง นำตัวอย่างที่ได้ไปรักษาสภาพด้วยสารละลาย Bouin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างตัวอย่างด้วย 70% เอทานอล จนกระทั่งตัวอย่างไม่มีสีเหลือง จากนั้นดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล 80%, 90% และ 100% ตามลำดับ โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างแช่ในไดออกเซน 2 ครั้งๆ ละ 12 ชั่วโมง และฝังตัวอย่างในพาราพลาสต์ ตัดตัวอย่างให้บางที่ความหนา 5-6 ไมครอน ติดเซคชั่นบนสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ที่มีเซคชันไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีนและอีโอซินตามลำดับ แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

### 4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอบริเวณยีน *dmrt1* และ *cyp19a* ด้วยคูโพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้จากซีดีเอ็นเอที่มาจากเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ของตัวอย่างปลาการ์ตูนส้มขาวมีขนาดเท่ากับ 187 และ 168 คู่เบส แสดงในภาพที่ 4-1 และ 4-2 ตามลำดับ โดยยืนยันขนาดของผลผลิตได้จากผลการส่งอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบส (ภาพที่ 4-3) และผลการเทียบเคียงบนฐานข้อมูล GenBank ยืนยันได้ถึงผลการศึกษว่าเป็นยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* ดังแสดงในตารางที่ 4-1

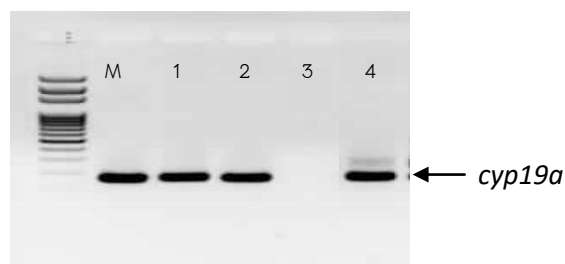


ภาพที่ 4-1 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *dmrt1* จากเนื้อเยื่อ gonad ของปลาการ์ตูนส้มขาว วิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% ภายใต้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

ช่อง M = 100 bp DNA ladder

ช่อง 1, 2 = ปลาเพศเมียและเพศผู้ ตามลำดับ

ช่อง 3-10 = ปลาอายุ 2-8 เดือน (8 เดือนซ้ำ 2 ตัว) ตามลำดับ



ภาพที่ 4-2 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *cyp19a* จากเนื้อเยื่อ gonad ของปลาการ์ตูนส้มขาว

ช่องที่ M = 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 1, 2, 3 และ 5 = ปลาการ์ตูนอายุ 8 เดือน แต่ละตัวอย่าง

ช่อง 4 = ไม่มีดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์

LOCUS *Amphiprion ocellaris dmrt1* (gonad) 187 bp  
 1 TGCCAGTGTC CCAAATGTAA GCTGATAGCG GAGCGACAGA GGGTCATGGC GGCGCAGGTT  
 61 GCTTTGAGGA GGCAGCAGGC TCAGGAGGAG GAGCTTGGA TTTGTAGTCC AGTGACTIONATG  
 121 TCTGTCCCAG ATGTGATGGT GAAGAATGAA ACTGGAGCCG ACTGCCTGTT TTCTGTGGAG  
 181 GCACGAT

LOCUS *Amphiprion ocellaris cyp19a* (gonad) 168 bp  
 1 CGGATCTTCT TCCACAGAGC CACGTTGTTG TTAATATGA TGCCTCTCTC GTTCATACCA  
 61 ATGCAGCTGA GTCCCTGTTT GCTCCCAAAA CGTGAAGTGT AATGTCCATT CTTTAGCACG  
 121 TGATGCACAG CTGATGCCCT GCTGAGTATT AGTGTCTCCT CCCCATCG

ภาพที่ 4-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *dmrt1* และ *cyp19a* ของปลาการ์ตูนส้มขาว

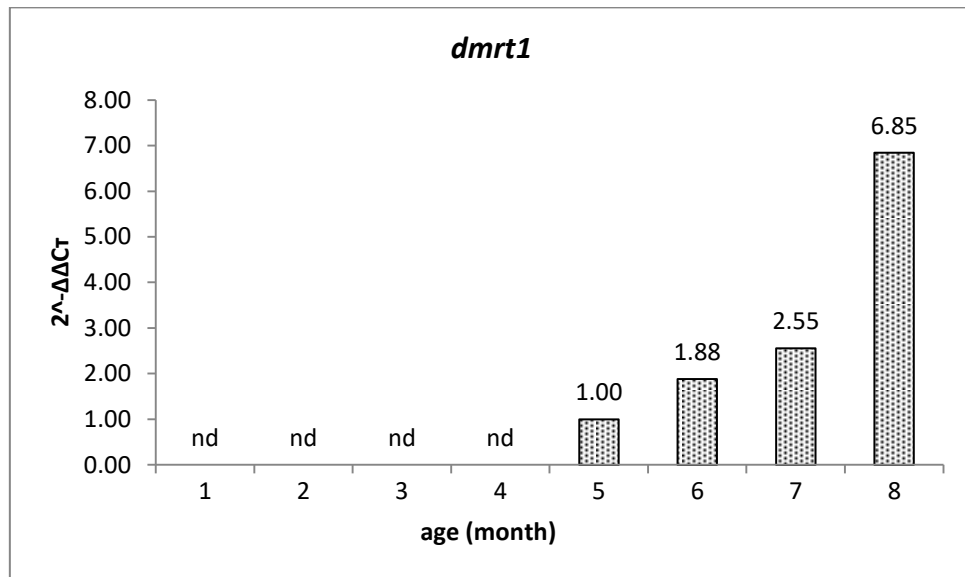
ตารางที่ 4-1 รายละเอียดการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Dmrt1* และ *cyp19a* ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ศึกษาครั้งนี้กับข้อมูลที่มีการบันทึกไว้บน GenBank

GenBank accession number	Description	Target gene/ % Identities/ E-value
XM008276401	<i>Stegastes partitus doublesex-and mab-3 Related transcription factor 1 like mRNA</i>	<i>dmrt1</i> /89/ 8e-132
AB918721	<i>Amphiprion ocellaris cyp19a1a gonad aromatase mRNA</i>	<i>cyp19a</i> / 100/ 5e-79

#### 4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *dmrt1*

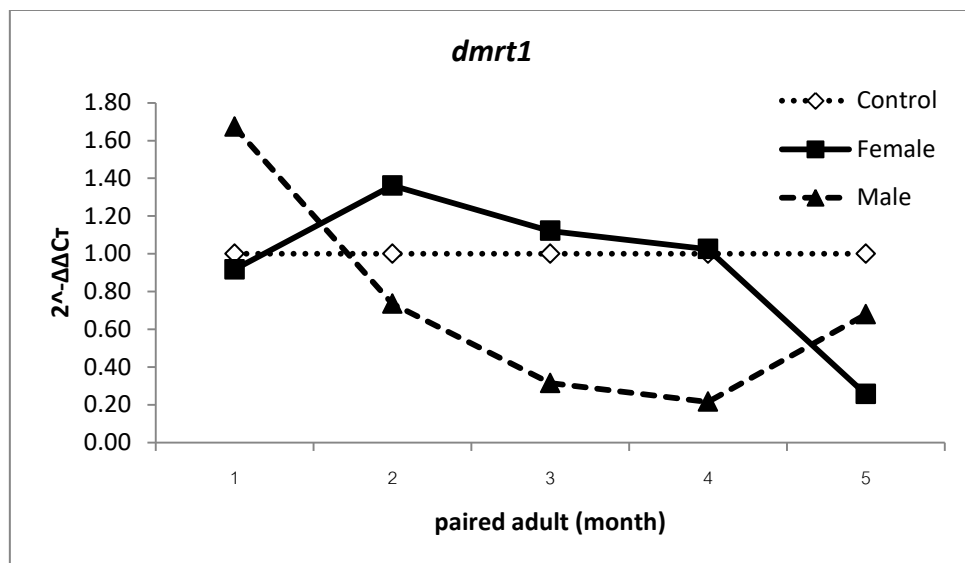
เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในตัวอย่างปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน ที่มีวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขนาดเล็กในวัยอ่อน พบว่าไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในปลาที่มีอายุ 1-4 เดือน แต่มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อปลาการ์ตูนมีอายุมากขึ้น ตรวจพบได้สูงสุดที่ปลาอายุ 8 เดือน โดยระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* ที่อายุ 8 เดือนนี้สูงกว่าปลาการ์ตูนที่มีอายุ 5, 6 และ 7 เดือน เท่ากับ 6.85, 1.88 และ 2.55 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 4-4)

เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในปลาตัวเต็มวัยอายุ 8 เดือน นำมาเข้าคู่กันนาน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในปลาตัวเต็มวัยเพศเมียจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อเข้าคู่กันนาน 2 เดือน จากนั้นระดับการแสดงออกของยีนเริ่มลดลง แต่ยังคงสูงกว่าปลาตัวเต็มวัยที่ไม่ได้เข้าคู่ที่อายุเท่ากัน และลดต่ำสุดต่างจากปลากลุ่มควบคุม (ไม่เข้าคู่) เมื่อเข้าคู่กัน 5 เดือน (ภาพที่ 4-5)



nd = not detectable

ภาพที่ 4-4 ระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1- 8 เดือน



\*control = unpaired adult

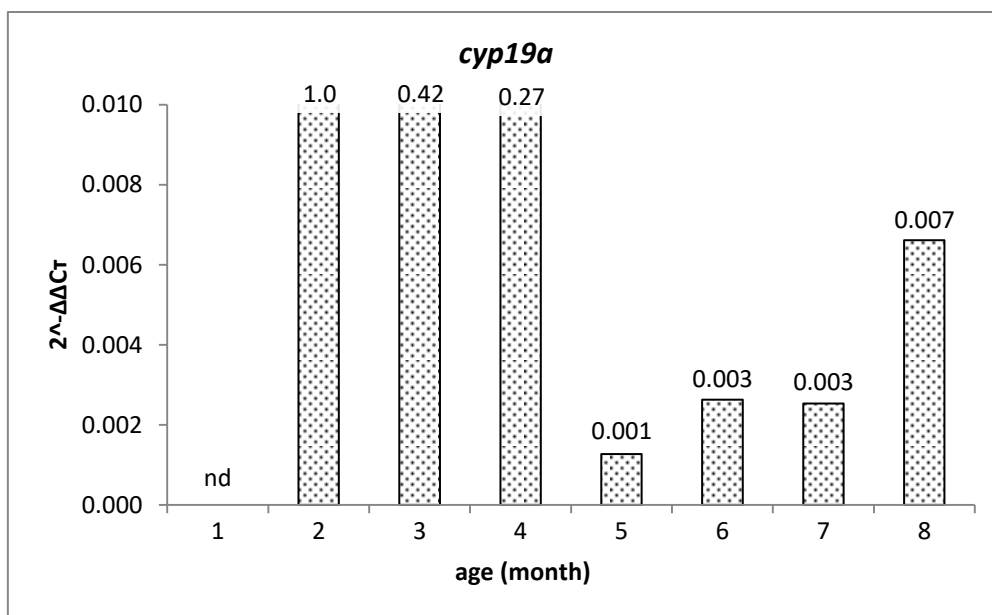
ภาพที่ 4-5 ระดับการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัยเข้าคู่กันนาน 1-5 เดือน แยกเพศศึกษา



### 4.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *cyp19a*

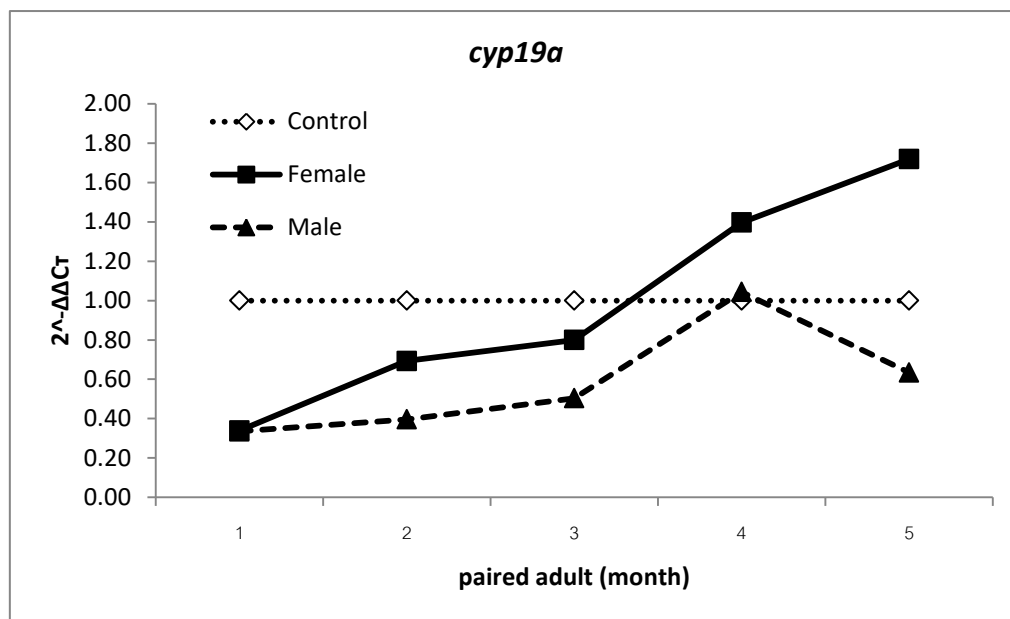
เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* ในตัวอย่างปลาการ์ตูนส้มขาว อายุ 1-8 เดือน ถึงแม้ว่าในวัยอ่อนอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดเล็ก แต่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* สูงสุดในปลาที่มีอายุ 2 เดือน และการแสดงออกของยีนลดต่ำลงเล็กน้อยในปลาอายุ 3 และ 4 เดือน (แต่ตรวจไม่พบในอายุ 1 เดือน) และพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* ลดต่ำสุดในปลาที่เข้าสู่วัยรุ่นในช่วงอายุ 5 เดือน จนถึงอายุ 8 เดือน (ภาพที่ 4-6)

เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในปลาตัวเต็มวัยอายุ 8 เดือนที่นำมาเข้าคู่กันนาน 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่เข้าคู่กันต่างกัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* ในปลาตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้จะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเข้าคู่กันนาน 2-3 เดือน แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีนยังคงต่ำกว่าปลาตัวเต็มวัยปกติที่ไม่ได้เข้าคู่ และระดับการแสดงออกของยีนทั้งเพศผู้และเมียขึ้นสูงสุดที่เข้าคู่กันนานตั้งแต่ 4 เดือน โดยเฉพาะในปลาเพศเมียระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* สูงมากกว่ากลุ่มควบคุมและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเข้าคู่กันขึ้น แตกต่างจากปลาเพศผู้ที่ระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* มีแนวโน้มลดลงเมื่อเข้าคู่กันนานมากกว่า 4 เดือน (ภาพที่ 4-7)



nd = not detectable

ภาพที่ 4-6 ระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน



\*control = unpaired fish

ภาพที่ 4-7 ระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* ในปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัยเข้าคู่กันนาน 1-5 เดือน แยกเพศศึกษา

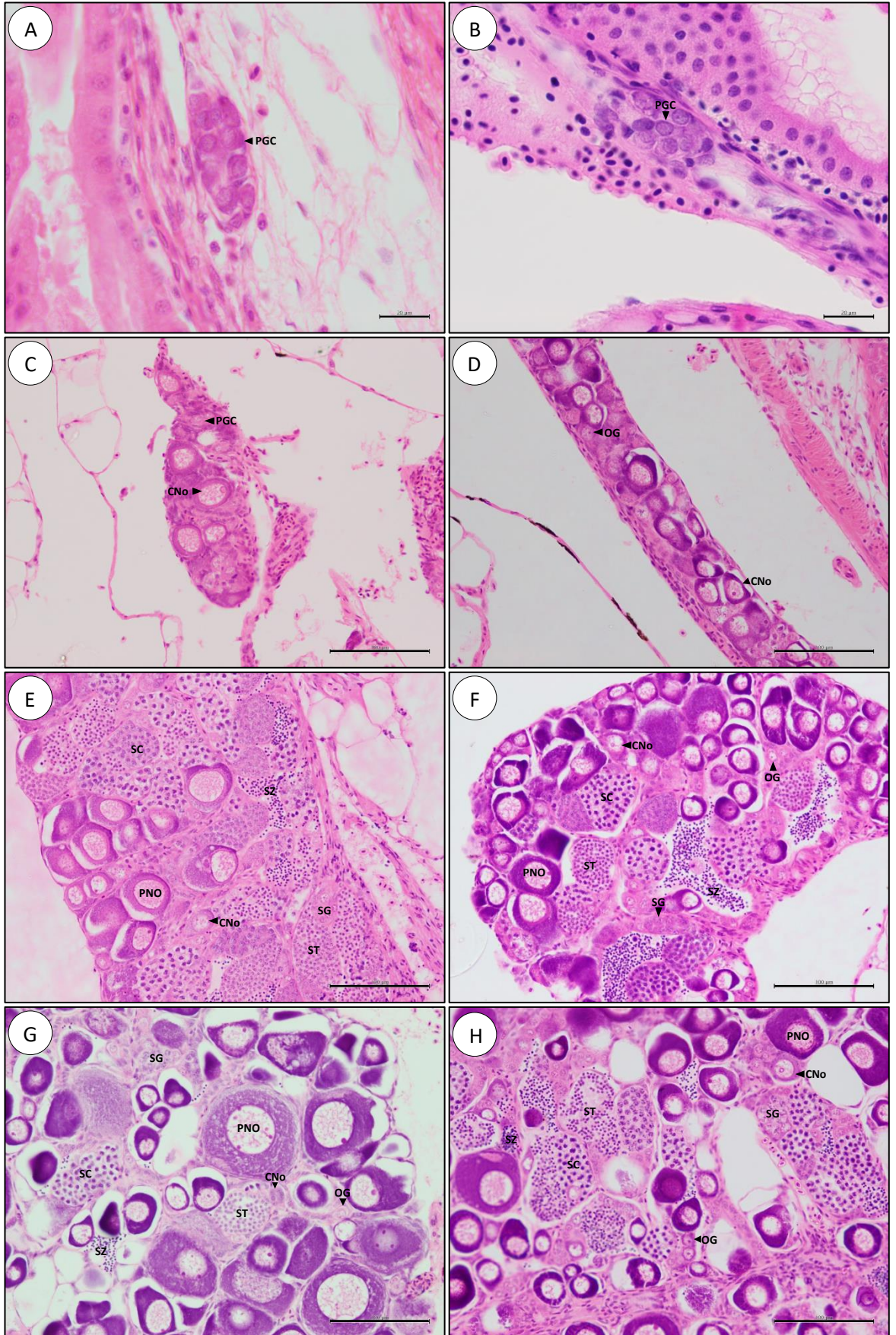
#### 4.4 การศึกษาลักษณะทางมิถุนวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8

ยังไม่พบการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไข่หรือเซลล์สเปิร์มในเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1 และ 2 เดือน แต่พบเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สืบพันธุ์ (PGC, primary germ cell) (ภาพที่ 4-8A,B) เมื่ออายุ 3 และ 4 เดือน พบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็นเซลล์ไข่ (OG, oogonia) และยังพบเซลล์ระยะ chromatin nucleolar oocyte (CNo) แต่ยังไม่พบ spermatogonia (SG) (ภาพที่ 4-8C, D) ซึ่ง spermatogonia จะตรวจพบได้เมื่อปลาอายุ 5 เดือน ไปจนถึงอายุ 8 เดือน นอกจากนี้ยังพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะ spermatocytes (SC), spermatids (ST) และ spermatozoa (SZ) และพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ perinucleolar oocytes (PNO) (ภาพที่ 4-8E,F,G,H) ซึ่งพบปะปนกันในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนส้มขาว

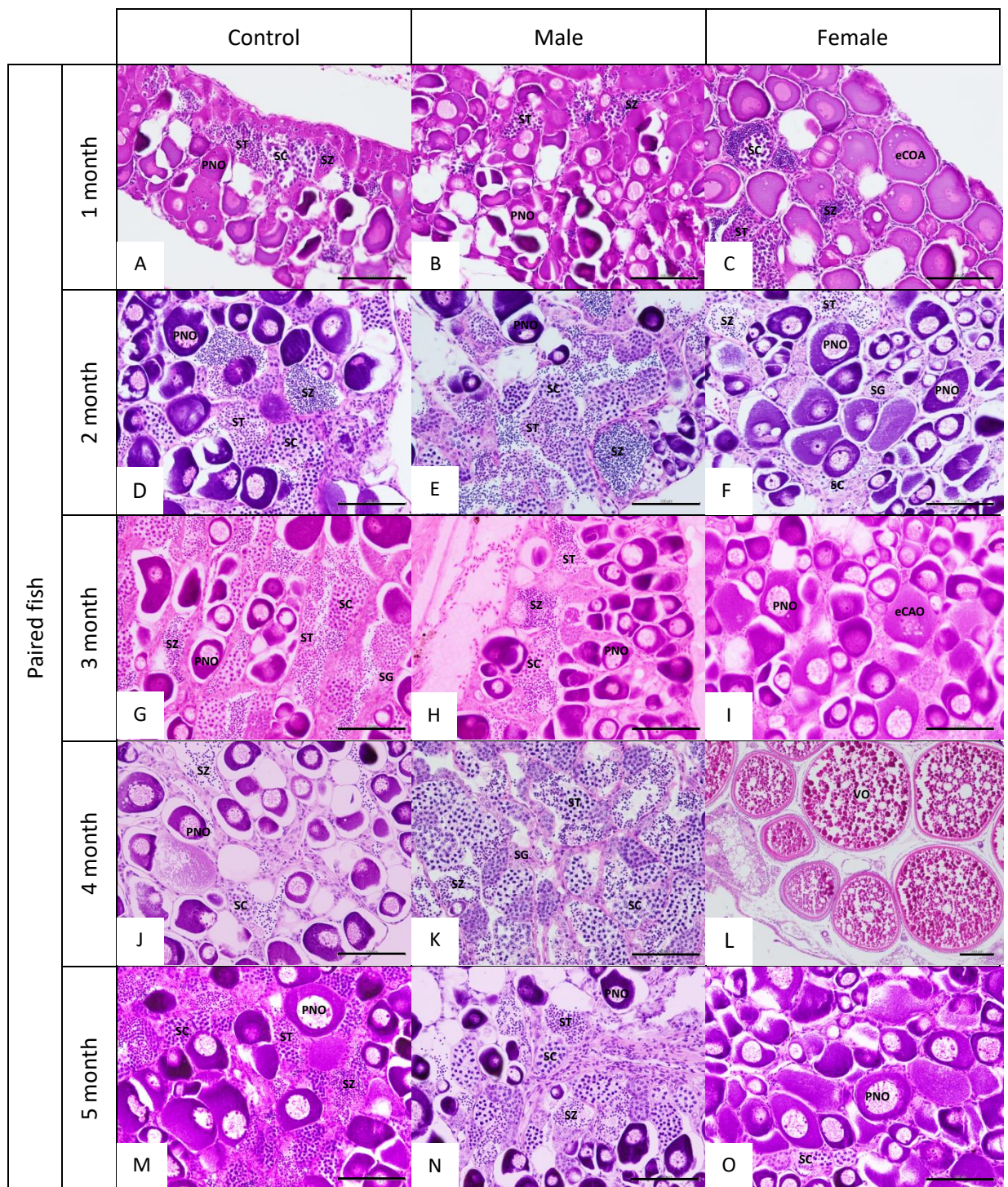
#### การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนส้มขาวตัวเต็มวัยเข้าคู่ 1-5 เดือน

เนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาตัวเต็มวัยที่เข้าคู่กันนาน 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มควบคุม (ไม่เข้าคู่) และทั้งปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย (เข้าคู่) โดยพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะ spermatocytes (SC), spermatids (ST) และ spermatozoa (SZ) และพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ perinucleolar oocytes (PNO) (ภาพที่ 4-9A, B, C) ส่วนการตรวจพบพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมียนั้นพบในปลาการ์ตูนส้มขาวที่เข้าคู่เป็นเวลานานตั้งแต่ 2, 3 และ 5 เดือน โดยพบว่าในเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ของปลาเพศเมียจะพบจำนวนเซลล์สืบเพศเมียมากกว่าเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และเริ่มพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ early cortical alveolar oocytes (eCAO) ในปลาเพศเมียที่เข้าคู่มานาน 3 เดือน ในขณะที่ปลากลุ่มควบคุมที่ไม่เข้าคู่ นั้น พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียปะปนกันมีจำนวนไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4-9D,E,F,G,H,I,J,K,L,O) แต่ในปลาที่เข้าคู่มานาน 4 เดือนพบว่าในเนื้อเยื่อวัยสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศเมียมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์แตกต่างจากเพศผู้ ซึ่งพบเซลล์ไข่ในระยะ vitellogenic oocytes (VO) (ภาพที่ 4-6L) ซึ่งมีระยะการพัฒนาของไข่มากกว่าเพศเมียในเดือนอื่น ๆ และในปลาเพศผู้ที่เข้าคู่มานานตั้งแต่ 4 เดือนนี้ก็จะพบเซลล์สืบพันธุ์ครบทุกระยะ (spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa) และมีจำนวนมากกว่าเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย



ภาพที่ 4-8 ภาพตัดขวาง gonad ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน ตามลำดับ (A-H); CNo, chromatin nucleolar oocyte; SG, spermatogonia; SC, spermatocytes; ST, spermatids; SZ, spermatozoa; PGC, primary germ cell; PNO, perinucleolar oocytes; OG, oogonia (scale bar =20  $\mu\text{m}$  (A, B); 100  $\mu\text{m}$  (C-H))



ภาพที่ 4-9 ภาพตัดขวาง gonad ของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 8 เดือน (control) และเข้าคู่นาน 1-5 เดือน (แยกเพศ male/ female); SG, spermatogonia; SC, spermatocytes; ST, spermatids; SZ, spermatozoa; eCAO, early cortical alveolar oocytes; PNO, perinucleolar oocytes; VO, vitellogenic oocytes (scale bar = 100  $\mu$ m (A-K, M-O) และ = 200  $\mu$ m (L))

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

#### 5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ปลาการ์ตูนมีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เป็นแบบกระเทยที่มีการเปลี่ยนไปเป็นเพศผู้หรือเมียได้ ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาถึงยีนที่กำหนดเพศหรือยีนที่มีการแสดงออกจำเพาะที่อวัยวะสืบพันธุ์ในกลุ่มของปลาการ์ตูนแต่อย่างใด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเริ่มต้นศึกษา ยีน *dmrt1* ซึ่งยีนนี้มีรายงานแล้วในปลาหลายชนิด ที่พบว่ามีส่วนร่วมในการกำหนดเพศ และมีการแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้เท่านั้น (Fernandino *et al.*, 2006) ดังเช่นที่รายงานโดย Marchand *et al.* (2000) ในปลาเรนโบว์เทราต์ และ Fernandino *et al.* (2006) ในปลาข้างเงิน ที่พบว่ายีน *dmrt1* มีการแสดงออกชัดเจนที่อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ในรายงานวิจัยของ Matsuda *et al.* (2002) ศึกษาในปลาข้าวสารญี่ปุ่น พบว่าปลาในกลุ่มนี้มีการกำหนดเพศแบบ XX/XY โดยโครโมโซม Y ของเพศผู้จะมียีน *dmy* เป็นยีนกำหนดเพศผู้ ยีนนี้มีวิวัฒนาการมาจากยีน *dmrt1* ในการทดลองครั้งนี้จึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือ gonad ของปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยใช้สาร SYBR green ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะของปลาการ์ตูนส้มขาว และทำกับยีน *cyp19a* ด้วยซึ่งยีนชนิดหลังนี้มีรายงานว่ามีการแสดงออกมากที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศเมีย (Zhang *et al.*, 2004) นอกจากนี้ในการทดลองได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับเพิ่มจำนวนยีนอ้างอิง (reference gene) ยีน *rpl8* เพื่อใช้เทียบเคียงด้วยเทคนิค real-time PCR ที่มีความไวในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย เนื่องจากยีน *rpl8* มีระดับการแสดงออกคงที่ในทุกเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมที่ได้รับ (Arukwe, 2006) เหมาะสมที่จะใช้เป็นยีนอ้างอิง

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *dmrt1* พบการแสดงออกที่เนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนช่วงเข้าสู่วัยรุ่นอายุ 5-8 เดือนโดยเฉพาะที่อายุ 8 เดือนพบสูงสุด ซึ่งผลการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาที่พบพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ spermatogonia เริ่มมีตั้งแต่อายุ 5 เดือนเป็นต้นไป จึงเป็นไปได้ว่า *dmrt1* น่าจะแสดงออกมากตามพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งตรงกันข้ามกับยีน *cyp19a* ที่จะมีความจำเพาะกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียที่พบมาตั้งแต่อายุ 1-4 เดือน และระดับการแสดงออกของยีนลดต่ำเมื่ออายุตั้งแต่ 5 เดือน สอดคล้องกับ Marchand *et al.* (2000) ที่รายงานว่า การแสดงออกของยีน *dmrt1* ในปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) มีระดับการแสดงออกสูงในอวัยวะสืบพันธุ์ที่กำลังพัฒนาขึ้น และมีการแสดงออกชัดเจนที่อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เช่นกันกับที่รายงานโดย Fernandino *et al.* (2006) วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *dmrt1* ในระหว่างกระบวนการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ในปลาข้างเงิน (*Odontesthes bonariensis*) ซึ่งพบว่ายีนนี้ถูกจำกัดการแสดงออกเฉพาะอวัยวะในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) สอดคล้องกับในปลาการ์ตูนที่การศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของสุโข รัตนยุวกร และคณะ (2548) ใน

ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polygnus*) ที่พบว่าลูกปลาอายุ 1 เดือนยังไม่มีมีการแยกเพศ พบเพียง primordial germ cells อยู่กันเป็นกลุ่ม ในขณะที่ปลาอายุ 2-3 เดือนแสดงเพศเป็นกะเทย คือ มีเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกของทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ด้วยกัน กระบวนการสร้างอสุจิจะเริ่มพบเมื่อปลามีอายุ 4 เดือน ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ และเนื้อเยื่ออวัยวะประกอบด้วยเซลล์ทุกระยะของกระบวนการสร้างอสุจิ ในขณะที่เนื้อเยื่อรังไข่พบว่าประกอบด้วย oogonia และ oocytes ระยะ chromatin nucleolus และระยะ perinucleolar และในการศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนเพศจากกะเทยเป็นเพศเมียเกิดขึ้นสมบูรณ์เมื่อปลาอายุ 8 เดือนที่เข้าคู้มานาน 4 เดือน (รวมมีอายุ 12 เดือน) สอดคล้องกับที่รายงานโดยสุโขทัย รัตนยุวกร และคณะ (2548) โดยพบลักษณะการเสื่อมสลายของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ การสะสมของสารสีเหลืองอมน้ำตาล และมี vitellogenic oocytes ซึ่งพบจำนวนมากขึ้นก่อนที่จะมีการวางไข่ ซึ่งตรวจพบระดับการแสดงออกของยีน *cyp19a* เพิ่มมากขึ้นในปลาเพศเมียซึ่งเข้าคู้มานาน 4 เดือน ปลาที่ทำหน้าที่เพศผู้อย่างสมบูรณ์จะมีทั้งเนื้อเยื่ออวัยวะและเนื้อเยื่อรังไข่ประกอบกันเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ ในขณะที่ปลาเพศเมียมีเพียงเนื้อเยื่อรังไข่อย่างเดียว ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างของยีนที่สมบูรณ์ทั้งยีน *dmrt1* และยีน *cyp19a* ต่อจากงานวิจัยครั้งนี้จะช่วยยืนยันบ่งชี้ความจำเพาะและหน้าที่ของยีน และการแสดงออกในเนื้อเยื่อได้ถูกต้องต่อไป และควรทำการศึกษาควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In situ* hybridization จะทำให้ทราบตำแหน่งของการแสดงออกของยีนและกลไกการทำงานในเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ชัดเจนและถูกต้อง

## 5.2 สรุปผลการทดลอง

5.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน และตัวเต็มวัยที่อายุ 8 เดือนที่เข้าคู้กันนาน 1-5 เดือน พบการแสดงออกของยีน *dmrt1* ในปลาการ์ตูนตั้งแต่อายุ 5 เดือนซึ่งเป็นช่วงอายุที่มีกระบวนการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis)

5.2.2 จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *cyp19a* ในปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 1-8 เดือน และตัวเต็มวัยอายุ 8 เดือนเข้าคู้กันนาน 1-5 เดือน พบการแสดงออกของยีน *cyp19a* ในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมากกว่าปลาที่มีพัฒนาการของเพศผู้ โดยพบการแสดงออกมากในปลาเพศเมียที่เข้าคู้กันนานตั้งแต่ 4 เดือนซึ่งเป็นระยะที่ตรวจพบ vitellogenic oocytes

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาควบคู่กับการวิเคราะห์โดยวิธี *In situ* hybridization ในส่วนของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ และทำการศึกษากับตัวอย่างในปลาตัวเต็มวัยที่เข้าคู้กันนานมากกว่า 5 เดือนจนถึงระยะที่มีการวางไข่เพิ่มเติมด้วย



## เอกสารอ้างอิง

- บุญวัฒนา บุญธรรม. (2545). *การกำหนดเพศ*. วันที่สืบค้นข้อมูล 05 กรกฎาคม 2561, เข้าถึงได้จาก [www.balaghah.net/nahj-htm/thi/id/maqalat/01/009.htm](http://www.balaghah.net/nahj-htm/thi/id/maqalat/01/009.htm).
- เบญจมาศ คุชนะนี้. (2555). บทบาทของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในการรักษามะเร็ง. *ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ* 7(1), 44-51.
- วรวิมล เกิดปราง. (2549). การเพาะพันธุ์และการเลี้ยงปลาการ์ตูน. พิมพ์ลักษณ์, กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์
- วีระพงศ์ ลุติตานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. (2551). พื้นฐานเทคนิค polymerase chain reaction. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- ศูนย์วิจัยกสิกรรม, บจก. (2548). *ปลาทะเลสวยงาม : การเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์...สร้างโอกาสเติบโตสูง*. วันที่สืบค้นข้อมูล 05 กรกฎาคม 2561, เข้าถึงข้อมูลจาก <http://www.positioningmag.com/prnews/prnews.aspx?id=38583>, 5/7/2561.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุขใจ รัตนยุวกร, กรรณิกา ชัชวาลวานิช, พิสุทธิ มังกรกาญจน์ และอมรา ทองปาน. (2548). *พัฒนาการของเอมบริโอในปลาการ์ตูนอานม้า (Amphiprion polymnus Linnaeus (1758)) ที่เพาะเลี้ยงได้จากห้องปฏิบัติการ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์* 41, 320-328.
- Alam, M.A., Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Hirai, T. and Nakamura, M. (2008). Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. *General and Comparative Endocrinology* 157, 175-185.
- Anderson, P. (2011). *PCR: Uses, Steps, Purpose*. วันที่สืบค้นข้อมูล 05 กรกฎาคม 2561, เข้าถึงได้จาก <http://schoolworkhelper.net/2011/06/pcr-uses-steps-purpose/>.
- Arukwe, A. (2006). Toxicological housekeeping gene: Dothey really keep the house. *Environmental Science and Technology* 40, 7944-7949.
- Arukwe, A. and Goksoyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk protein in fish: hepatic protein for the next generation: oogenetic, population and evolution implication of end endocrinc disruption. *Comparative Hepatology* 2, 1-21.
- Brunner, B., Hornung, U., Shan, Z., Nanda, I., Kondo, M., Zend-Ajus, E., Haaf, T., Ropers, H.H., Shima, A., Schmid, M., Kalscheuer, V.M. and Schartl, M. (2001). Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT1*. *Genomics* 77, 8-17.
- Fautin, D., G. and Allen. (1992). *Field Guide to Anemonefishes and their Host Sea Anemones*. Perth: Western Australian Museum.

- Fernandino, J.I., Guilgur, L.G. and Somoza G.M. (2006). Dmrt1 expression analysis during spermatogenesis in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem* 32, 231-240.
- Kanda, H., Okubo, T., Omori, N., Niihara, H., Matsumoto, N., Yamada, K., Yoshimoto, S., Ito, M., Yamashita, S., Shiba, T. and Takamatsu, N. (2006). Transcriptional regulation of the rainbow trout *CYP19a* gene by FTZ-F1 homologue. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 99, 85–92.
- Kazeto, Y., Place, A.R. and Trant, J.M. (2004). Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 69, 25-34.
- Kettlewell, J.R., Raymond, C.S. and Zarkower, D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis* 26, 174-178.
- Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura, H.K., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N. and Nagahama, Y. (2004). Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* 231, 518-526.
- Longman, W. (1999). *Sexual Reproduction, Meiosis, and Genetic Recombination*. วันที่สืบค้นข้อมูล 06 มีนาคม 2555, เข้าถึงได้จาก [www.balaghah.net/nahj-http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/CB18\\_31.html](http://www.balaghah.net/nahj-http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/CB18_31.html).
- Marchand, O., Govoroun, M., D’Cotta, H., McMeel, O., Lareyre, J., Bernot, A., Laudet, V. and Guiguen, Y. (2000). *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 180-187.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2002). *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the Medaka fish. *Nature* 417, 559-563.
- Moniot, B., Berta, P., Scherer, G., Sudbeck, P. and Poulat, F. (2000). Male specific expression suggests role of *DMRT1* in human sex determination. *Mech. Dev.*, 91, 323-325.
- Nanda, I., Zend-Ajusich, E., Shan, Z., Grutzner, F., Schartl, M., Burt, DW., Koehler, M., Fowler, V.M., Goodwin, G., Schneider, W.J., Mizuno, S., Dechant, G., Haaf, T. and Schmid, M. (2000). Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet. Cell Genet* 89, 67-78.
- Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the world* (Eds. 3<sup>rd</sup>). New York: John Wiley and Sons.

- Pfaffl, M.W. (2006). Relative quantification, Real Time PCR (BIOS advanced methods). Taylor and Francis, pp. 63-82.
- Raymond, C.S., Kettlewell, J.R., Hirsh, B., Bardwell, V.J. and Zarkower, D. (1999). Expression of *Dmrt1* in genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol* 215, 208-220.
- Redi, C.A., Garagna, S., Zuccotti, M. and Capanna, E. (2007). Genome size: a novel genomic signature in support of Afrotheria. *Journal of Molecular Evolution* 64, 484-487
- She, Z.-Y. and Yang, W.-X. (2016). *Sry* and *SoxE* genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? *Seminars in Cells & Developmental Biology* 63, 13-22.
- Tong, S.K., Chiang, E.F., Hsiao, P.H. and Chung, B. (2001). Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 79, 299-303.
- Trant, J.M. (1994). Isolation and Characterization of the cDNA Encoding the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Form of Cytochrome P450arom. *General and Comparative Endocrinology* 95, 155-168.
- Wilson, J.Y., McArthur, A.G. and Stegeman, J.J. (2005). Characterization of a cetacean aromatase (CYP19) and the phylogeny and functional conservation of vertebrate aromatase. *General and Comparative Endocrinology* 140, 74-83.
- Yamaguchi, A., Lee, K.H., Fujimoto, H., Kadomura, K., Yasumoto, S and Matsuyama, M. (2006). Expression of the *DMRT* gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 59-68.
- Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, L., Zhu, T., Tian, J., Li, X. and Lin, H. (2004). Two distinct cytochrome P450 aromatase in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 92, 39-50.

ภาคผนวก

## วิธีเตรียมสารเคมี

1. 5X TBE buffur
 

Tris base	54.0 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
Na <sub>2</sub> EDTA	3.75 กรัม

เติมน้ำกลั่นแล้วละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร
  
2. 6X loading dye
 

เตรียมสารละลายปริมาตร 60 มิลลิลิตร	
6X loading dye solution	45 ไมโครลิตร
6X orange loading dye solution	15 ไมโครลิตร
  
3. TE buffer pH 8.0 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)
 

เตรียมสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร	
10mM Tris-HCl, pH 8.0	0.12 กรัม
1mM EDTA	0.037 กรัม
  
2. 100bp DNA ladder plus (250 นาโนกรัม/ 8 ไมโครลิตร)
 

Stock (100bp DNA ladder plus) 500 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	0.5 กรัม
6X loading dye	1.5 กรัม
TE buffer	6.0 กรัม