

## บทคัดย่อ

Metallothioneins เป็นโปรตีนที่จับกับโลหะหนัก โดยมีมวลโมเลกุลต่ำและประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนสูง ทำหน้าที่รักษาสสมดุลของร่างกาย ป้องกันเซลล์จากโลหะหนักที่อันตรายและสภาวะความเครียด การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาคูณลักษณะของยีน MT ชนิดหนึ่งจากเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุย โดยใช้เทคนิค RACE พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีนนี้ของปลาดุกอุยมีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 509 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วน Open reading frame 183 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 60 หน่วย ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวน 20 ตำแหน่ง ทำให้มีโครงสร้างทุติยภูมิประกอบด้วย 2 โดเมนที่สำคัญ ( $\beta$  และ  $\alpha$ ) เพื่อทำหน้าที่จับกับโลหะหนักต่างๆ เช่น แคดเมียม ปรอท และทองแดง เป็นต้น ยีน MT มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อตับที่มีการแสดงออกสูงที่สุด การศึกษาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ของยีน MT พบว่า ประกอบด้วย 3 เอ็กซอน และ 2 อินทรอน โดยศึกษาจากไพรมเมอร์ที่ออกแบบบริเวณรหัสพันธุกรรมเริ่มต้น และรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน การศึกษาการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอุยเมื่อสัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 10 และ 100 ppb ) เป็นเวลา 14 วัน โดยวิธี Real-time PCR พบว่า การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับจะขึ้นอยู่กับเวลาที่สัมผัสแต่ไม่ยั่งยืน โดยเพิ่มสูงขึ้นในทุกความเข้มข้นของแคดเมียมในวันที่ 3 และ 7 ของการสัมผัส แล้วหลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 14 โดยสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10 ppb ในวันที่ 3 ของการสัมผัส ในขณะที่เนื้อเยื่อเหงือกจะมีระดับการแสดงออกของยีน MT สูงที่สุดในวันแรกของการสัมผัส ดังนั้นการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกสามารถใช้เป็นดัชนีชีวภาพการสัมผัสแคดเมียมในน้ำได้ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาที่สัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 100 ppb พบว่า เนื้อเยื่อเหงือกมีอาการบวม น้ำ เซลล์เยื่อบุเหงือกยกตัวขึ้น และกิ่งเหงือกเชื่อมติดกัน และเนื้อเยื่อตับพบอาการเลือดคั่ง เซลล์ตับเสื่อมแบบมีแวคิวโอล และเซลล์ตับมีการตายเกิดขึ้น

**Keywords :** ยีน Metallothionein, ปลาดุกอุย, แคดเมียม

(คำหลัก)

## Abstract

Metallothioneins are heavy-metal binding proteins with low molecular mass and high cysteine content. They are responsible for homeostasis, defense against harmful heavy metals and protection from stress condition. A metallothionein (MT) gene was characterized from liver tissue of Günther's walking catfish, *Clarias macrocephalus* using RACE technique. The complete cDNA sequence of MT was 509 bp, including a 183 bp open reading frame encoding 60 amino acids. The twenty cysteine positions were conserved. All the cysteine residues are formed secondary structure (2 domains:  $\beta$  and  $\alpha$  domains) for bounding to heavy metals such as cadmium, mercury, copper. The expression of MT was detected in all tissues with high levels of transcript in liver tissue. The complete genomic DNA sequence of MT was cloned using primers located at the start and stop codon positions for amplification. Genomic DNA of MT was 394 bp, comprised 3 exons and 2 introns. Induced expression of walking catfish MT gene was quantified in liver and gills by Real-time PCR after the exposure to different concentrations of cadmium (0, 1, 10 and 100 ppb) for 14 days. The expression of hepatic MT by cadmium exposure was time-dependent but transient. The MT transcript levels in the liver tissue significantly increased at all concentrations of cadmium ( $P<0.05$ ) after three and seven days of exposure and gradually decreased until 14 days, with the highest expression levels at 10 ppb on day 3. The MT expression in gills tissue was increased rapidly after one day of exposure. The MT expression in liver and gills of walking catfish provides a potential biomarker for cadmium exposure. The effects of cadmium on histological changes in gills and liver of fish exposed to 100 ppb cadmium were examined using light microscopy. Edema, epithelial cell lifting and slight fusion of secondary lamellae were observed in the gills of the treated fish compared with the normal structure of the control fish. The liver of fish exposed to cadmium showed numerous hepatocytes with vacuolization of the cytoplasm.

**Keywords:** Metallothionein, *Clarias macrocephalus*, cadmium