



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาคุณลักษณะและการแสดงออกของยีน Metallothionein ในปลาดุกอุย
เพื่อใช้เป็นดัชนีชีวภาพตรวจการสัมผัสโลหะหนัก

โดย ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และสุภาวดี พุ่มพวง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาคูณลักษณะและการแสดงออกของยีน Metallothionein ในปลาตุ๊กต
เพื่อใช้เป็นดัชนีชีวภาพตรวจการสัมผัสโลหะหนัก

ผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
2. รศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาครั้งนี้ภายใต้ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (MRG5180051) และขอขอบคุณ รศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง นักวิจัยที่ปรึกษา ผู้ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5180051

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษาคุณลักษณะและการแสดงออกของยีน Metallothionein ในปลาดุกอุย
เพื่อใช้เป็นดัชนีชีวภาพตรวจการสัมผัสโลหะหนัก

(ชื่อโครงการ)

Investigator : ดร.ดุจดดี ปานพรหมมินทร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ชื่อนักวิจัย) มหาวิทยาลัยพะเยา

E-mail Address : dutrudeep@yahoo.com

Project Period : 5 ปี 4 เดือน

(ระยะเวลาโครงการ)

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 (β และ α) เพื่อทำหน้าที่จับกับโลหะหนักต่าง ๆ เช่น แคดเมียม ปรอท และทองแดง เป็นต้น ยีน MT มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อตับที่มีการแสดงออกสูงที่สุด การศึกษาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ของยีน MT พบว่า ประกอบด้วย 3 เอ็กซอน และ 2 อินทรอน โดยศึกษาจากไพรมเมอร์ที่ออกแบบบริเวณรหัสพันธุกรรมเริ่มต้น และรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน การศึกษาการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอุยเมื่อสัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0, 1, 10 และ 100 ppb) เป็นเวลา 14 วัน โดยวิธี Real-time PCR พบว่า การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับจะขึ้นอยู่กับเวลาที่สัมผัสแต่ไม่ยั่งยืน โดยเพิ่มสูงขึ้นในทุกความเข้มข้นของแคดเมียมในวันที่ 3 และ 7 ของการสัมผัส แล้วหลังจากนั้นจะค่อย ๆ 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: β and α 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

บทนำ

ในปัจจุบันประชากรมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับความเจริญทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทำให้มีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมามากมาย เช่น ปัญหามลพิษในดิน ปัญหามลพิษในอากาศ ปัญหามลพิษทางเสียง เป็นต้น ซึ่งปัญหามลพิษทางน้ำถือว่าเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากน้ำมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ ทั้งเพื่อการอุปโภคบริโภค การเกษตรและอุตสาหกรรม โดยน้ำเสียส่วนใหญ่ถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติโดยตรง ไม่ได้ผ่านการบำบัด ซึ่งในน้ำเสียเหล่านี้ประกอบด้วยสารพิษต่างๆ หลายชนิดที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ หรือผู้บริโภคน้ำหรือสัตว์น้ำจากแหล่งน้ำนั้นๆ ได้ โลหะหนักเป็นสารพิษชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นโลหะที่มีความถ่วงจำเพาะมากกว่าน้ำ 5 เท่าขึ้นไป มีอัตราการขยายตัวค่อนข้างช้า ทำให้สะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานในรูปของตะกอน สิ่งมีชีวิตในน้ำจะได้รับโลหะหนักจากน้ำ พืช น้ำ สัตว์น้ำ จากการกินตามห่วงโซ่อาหาร ดังนั้นจึงเกิดการสะสมโลหะหนักในเนื้อเยื่อสัตว์ และเนื้อเยื่อพืช โดยสะสมสารมลพิษเพิ่มขึ้นตามลำดับขั้นของการบริโภค

โลหะหนักที่พบมากในแหล่งน้ำ ได้แก่ สารหนู ตะกั่วปรอท แคดเมียม โครเมียม สังกะสี ทองแดง แมงกานีส นิเกิล เป็นต้น ซึ่งปรอท ตะกั่ว และแคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีบทบาทต่อภาวะมลพิษทางน้ำมากที่สุด ถ้ามีมากเกินไปจนขีดจำกัดแล้วจะทำให้เป็นพิษต่อร่างกาย ดังเช่นพิษของปรอททำให้เกิดโรคมินามาตะในชาวประมงญี่ปุ่นบริเวณอ่าวมินามาตะ พิษของแคดเมียมทำให้เกิดโรคอิไต-อิไตในประเทศญี่ปุ่น ส่วนในประเทศไทย ประชาชนในอำเภอร้อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นโรคไขดำ เนื่องจากน้ำดื่มมีสารหนูเจือปนอยู่มาก พิษของตะกั่วในชุมชนคลิตี้ จังหวัดกาญจนบุรี เป็นต้น

ในปัจจุบันการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยามีความก้าวหน้ามากขึ้น มีการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ในสัตว์น้ำเพื่อใช้เป็นดัชนีชีวภาพ (Biomarker) ในการประเมินการปนเปื้อนของสารเคมีหรือโลหะหนักได้ เช่น ยีนไวเทลโลจีนิน (Vitellogenin: VTG) ซึ่งโดยปกติจะแสดงออกเฉพาะในปลาเพศเมียที่เจริญพันธุ์แล้วเท่านั้น แต่ถ้ามีการแสดงออกของยีนนี้ในปลาเพศผู้หรือลูกปลาวัยอ่อน แสดงว่าในแหล่งน้ำนั้นมีการปนเปื้อนด้วยสารเอสโตรเจนจากภายนอกตัวปลา (Xenoestrogen substance) ที่เกิดจากยาฆ่าแมลง สารจำพวก polychlorinated biphenyls (Marin and Matozzo, 2004) และมีรายงานว่า ยีนเมทัลโลไธโอนีน (Metallothionein: MT) จะถูกชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้น เมื่อปลาหรือสัตว์น้ำได้สัมผัสกับโลหะหนักในแหล่งน้ำต่างๆ ได้ (He *et al.*, 2007; Cho *et al.* 2008) เป็นต้น

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน MT เมื่อได้สัมผัสกับแคดเมียม โดยศึกษาในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งของไทยและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ประกอบกับในปัจจุบันมีการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ และอณูชีววิทยาของปลาชนิดนี้มากขึ้น สามารถค้นพบยีนต่างๆ มากมายในปลาดุกอุยโดยเทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) พบว่ามี 303 และ 234 ยีนที่สามารถแสดงออกในระดับและกล้ามเนื้อ ตามลำดับ (Panprommin *et al.*, 2007) ทั้งนี้สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน MT ในตับของปลาดุกอุยดังกล่าวด้วย ซึ่งผลจากการศึกษาค้างนี้จะเป็ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญต่อการประยุกต์ใช้ยีน MT ในสัตว์น้ำเพื่อการใช้เป็นดัชนีชีวภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูป cDNA และจีโนมิกดีเอ็นเอของยีนเมทัลโลไธโอนีน (Metallothionein: MT) ในปลาดุกอุย
2. ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาดุกอุย โดยใช้วิธี Semi-quantitative RT-PCR และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนนี้ในปลาและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอุย เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมตามระยะเวลาที่กำหนด โดยวิธี Real-Time PCR
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาที่สัมผัสแคดเมียม

วิธีทดลอง

1. การโคลน การศึกษาคุณลักษณะของ Complementary DNA และการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในปลาตุ๊กตุย

1.1 การสกัด Total RNA และ mRNA

เก็บเนื้อเยื่อตับจากปลาตุ๊กตุยเพศเมีย อายุประมาณ 1 ปี (130 กรัม) ที่ไม่มีอาการของโรค จากนั้นสกัด Total RNA โดยใช้สารละลาย TRIzol (บริษัท Molecular Research Center เมือง Cincinnati มลรัฐโอไฮโอ ประเทศสหรัฐอเมริกา) และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านฟอร์มาลดีไฮด์-อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

นำ Total RNA มาสกัด mRNA โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป QuickPrep™ Micro mRNA Purification kit (บริษัท Amersham Biosciences เมือง Buckinghamshire ประเทศสหราชอาณาจักร) ตรวจสอบปริมาณโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบ cDNA ของยีน MT โดยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้านปลาย 5' (5'-RACE-Ready cDNA) และปลาย 3' (3'-RACE-Ready cDNA) ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป BD Smart™ RACE cDNA Amplification kit (บริษัท BD Biosciences ClonTech เมือง SanJose มลรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอปลาย 5' ใช้ mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม สารละลาย BD Smart II A oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ (5'-CDS primer: 5'-(T)₂₅ V N-3' โดย N = A, C, G หรือ T และ V = A, G หรือ C) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร การสังเคราะห์ดีเอ็นเอปลาย 3' ใช้ mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม และไพรเมอร์ (3'-CDS primer: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGATAC(T)₃₀ V N-3' โดย N = A, C, G หรือ T และ V = A, G หรือ C) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำขึ้นดีเอ็นเอ 5'-RACE-Ready cDNA และ 3'-RACE-Ready cDNA เป็นต้นแบบสำหรับวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MT ทางด้านปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ

การทำปฏิกิริยา RACE PCR ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร สารละลาย 10x BD Advantage 2 PCR buffer ปริมาตร 5

ไมโครลิตร สารละลาย 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย 50x BD Advantage 2 Polymerase Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย 10x Universal Primer Mix (UPM) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ยาว (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT-3') ความเข้มข้น 0.4 μ M และไพรเมอร์สั้น (5'-CTAATACGACTCACT ATAGGGC-3') ความเข้มข้น 2 μ M ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และไพรเมอร์จำเพาะ (Gene-specific primer: GSP) ความเข้มข้น 10 μ M ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งสภาวะการทำงาน 25 รอบ ดังนี้ 1) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 2) 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 3) 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

สำหรับไพรเมอร์ MT F (5'-GACTGGAACCTGCACTTGTGGAACATC-3') และ MT R (5'-CTCTTGCTGCCCTTCTACCTGCAG-3') ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน MT ได้ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Expressed sequence tags (ESTs) 3 ลำดับ ตามหมายเลขอ้างอิง EB360653 EB360476 และ EB360641 จากรายงานของ Panprommin *et al.* (2007)

จากนั้นนำผลผลิต RACE-PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (บริษัท Promega เมือง Madison มลรัฐวิสคอนซิน ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ได้เข้าไปในเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector (บริษัท Promega เมือง Madison มลรัฐวิสคอนซิน ประเทศสหรัฐอเมริกา) แล้วย้ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียอีโคไล สายพันธุ์ JM109 เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สาร IPTG และสาร X-Gal (LB/ampicillin/IPTG/X-Gal) แล้วเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวซึ่งมีชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการแทรกอยู่ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Colony PCR แล้วเลือกโคโลนีที่ดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (LB-ampicillin broth) จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Aurum™ Plasmid Mini kit (บริษัท Bio-Rad เมือง Hercules มลรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำพลาสมิดที่สกัดได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานแล้วในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul *et al.*, 1990) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้คำสั่ง BLASTn กำหนดความยาวของบริเวณที่เหมือนกันต้องมากกว่า 100 คู่เบส และมีค่าความเหมือนที่คาดหวังว่าจะพบด้วยความบังเอิญ (E-value) น้อยกว่า 10^{-4} และคำสั่ง BLASTx ใช้สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน โดยกำหนดความยาวของบริเวณที่เหมือนกันต้องมากกว่า 10 หน่วย และมีค่าความเหมือนที่คาดหวังว่าจะพบด้วยความบังเอิญ (E-value) น้อยกว่า 10^{-4} เช่นกัน

1.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน MT ระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างๆ

รวบรวมลำดับกรดอะมิโนของยีน MT ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ปลา Japanese medaka *Oryzias latipes* (NM_001104785) ปลา Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (EF406132) ปลา mefugu *Takifugu obscurus* (EF622234) ปลา mummichog *Fundulus heteroclitus* (AB426465) ปลา mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (AY257202) ปลา common carp *Cyprinus carpio* (AF001983) ปลา goldfish *Carassius auratus* (S75039) ปลา zebrafish *Danio rerio* (NM_131075) ปลา European eel *Anguilla anguilla* (DQ493910) ปลา channel catfish *Ictalurus punctatus* (AF087935) มนุษย์ *Homo sapiens* (AF136177) โค *Bos taurus* (BC111615) สุกร *Sus scrofa* (NM_001001266) หนู *Mus musculus* (NM_013602) หนู *Rattus norvegicus* (J00750) และกบอัฟริกกัน *Xenopus laevis* (X69380) จากนั้นทำการเปรียบเทียบที่ละกลุ่ม (Multiple Sequence Alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal W (Thomson *et al.*, 1994) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) โดยกำหนดค่าการทำซ้ำ (bootstrap) เท่ากับ 1000 และใช้หอยนางรม *Crassostrea gigas* (JF781299) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม

1.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน MT ในอวัยวะต่างๆ ในปลาดุกอุย โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลาดุกอุยเพศเมีย จำนวน 3 ตัวที่ไม่มีอาการของโรค โดยเก็บเนื้อเยื่อจากสมอง หัวใจ ลำไส้ ไตส่วนหน้า ไตส่วนหลัง ตับ กล้ามเนื้อ ไข่ ผิวน้ำ และม้าม จากนั้นสกัด Total RNA โดยใช้สารละลาย TRIzol แล้วตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยวิธีอิลคโตรโฟรีซิสผ่านฟอร์มาลดีไฮด์-อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตามลำดับ

นำ Total RNA ที่ได้ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครกรัมจากทุกเนื้อเยื่อ มาสังเคราะห์ cDNA เส้นแรก โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป iScript™ Select cDNA Synthesis kit (บริษัท Bio-Rad เมือง Hercules มลรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย สารละลาย 1x Taq buffer สารละลาย MgCl₂ ความเข้มข้น 1.5 mM สารละลาย dNTPs ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 mM ไพรเมอร์ส่วนหน้า (MT F) และส่วนกลับ (MT R) อย่างละ 1 μ M เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ปริมาณ 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 0.5 μ l และใช้ยีน β -actin ที่ออกแบบไพรเมอร์จากปลา channel catfish (หมายเลขอ้างอิง AY555575 และ DQ399027) เป็นยีน

ควบคุมภายใน (Internal control) และตั้งสภาวะการทำงาน 25 รอบดังนี้ 1) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 2) 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 3) 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากทุกเนื้อเยื่อ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบความเข้มของแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ GenTools version 4.0 (บริษัท SynGene เมือง Cambridge ประเทศสหราชอาณาจักร) แล้วคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีน (relative expression) โดยใช้ความเข้มข้นของ β -actin เป็นยีนเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออก (normalized) และทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 11

2. การโคลน การศึกษาคุณลักษณะของ Genomic DNA ของยีน MT ในปลาตุ๊กต๋อย

เก็บเนื้อเยื่อตับจากปลาตุ๊กต๋อยเพศเมีย อายุประมาณ 1 ปี (130 กรัม) ที่ไม่มีอาการของโรค จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป QIAamp[®] DNA Mini kit (บริษัท QIAGEN เมือง West Sussex ประเทศสหราชอาณาจักร) ออกแบบไพรเมอร์จาก cDNA ของยีน MT คือ บริเวณทางด้านปลาย 5' (MT DF 5'-TCAAAGAGTGAGTACCTGTAG-3') และบริเวณทางด้านปลาย 3' (MT DR 5'-TGGTGCCAATAGTCTTGGAG-3')

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณยีน MT ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย สารละลาย 1x Taq buffer สารละลาย MgCl₂ ความเข้มข้น 1.5 mM สารละลาย dNTPs ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 mM ไพรเมอร์ส่วนหน้า (MT DF) และส่วนกลับ (MT DR) อย่างละ 1 μ M เอนไซม์ Taq DNA polymerase ปริมาณ 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 μ l โดยตั้งสภาวะการทำงาน 30 รอบดังนี้ 1) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 2) 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 3) 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System kit (บริษัท Promega เมือง Madison มลรัฐวิสคอนซิน ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นทำการเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ที่ได้เข้าไปในเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy Vector (บริษัท Promega เมือง Madison มลรัฐวิสคอนซิน ประเทศสหรัฐอเมริกา) แล้วส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าเซลล์แบคทีเรียอีโคไล สายพันธุ์ JM109 ที่อยู่ในสภาวะพร้อม จากนั้นเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สาร IPTG และสาร X-Gal แล้วทำการ

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวซึ่งมีชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการแทรกอยู่ไปตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ และนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin เพื่อสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Aurum™ Plasmid Mini kit (บริษัท Bio-Rad เมือง Hercules มลรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำพลาสมิดที่สกัดได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3. การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอุย โดยวิธี Real-Time PCR เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการทดลอง

นำปลาดุกอุยอายุประมาณ 2 เดือน (0.2-0.3 กรัม) จำนวน 300 ตัว โดยได้รับความอนุเคราะห์จากคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาเลี้ยงรวมกันในบ่อซีเมนต์ขนาดใหญ่ เพื่อทำการปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับการทดลองเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นแยกปลาไปเลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 12 ตู้ ละ 20 ตัว เป็นเวลา 7 วัน ระหว่างการเลี้ยงให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปประมาณ 3% ของน้ำหนักตัวโดยแบ่งให้ 2 ครั้งต่อวัน

แบ่งปลาออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับแคดเมียมเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่สัมผัสกับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 1, 10 และ 100 ppb (Woo *et al.*, 2006) หลังจากทีปลาทดลองได้สัมผัสกับแคดเมียมแล้ว เก็บตัวอย่างปลาตามช่วงเวลาที่กำหนด คือ วันที่ 1, 3, 7 และ 14 หลังการสัมผัสแคดเมียม

3.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ และการสกัด Total RNA

หลังจากที่ปลาทดลองได้สัมผัสกับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาที่กำหนดแล้ว เก็บเนื้อเยื่อตับและเหงือกจากปลาทั้ง 4 กลุ่ม โดยในแต่ละกลุ่มเก็บเนื้อเยื่อจากปลา 3 ตัว แช่ในหลอดพลาสติก 1.5 ml microcentrifuge tube ที่มีสารละลาย TRIzol ทันที สกัด Total RNA ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ Total RNA ที่สกัดได้ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านฟอร์มาลดีไฮด์-อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ตามลำดับ

3.3 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน โดยวิธี Real-Time PCR

3.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอยู่ที่สัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้ยีน 16S ribosomal RNA เป็นยีนควบคุมภายใน

ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบ cDNA ของยีน MT ที่สมบูรณ์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (หมายเลขอ้างอิง JX312865) คือไพรเมอร์ส่วนหน้า (MT-qf) และส่วนกลับ (MT-qr) โดยใช้โปรแกรม Genetyx version 7.0 สำหรับยีน 16S ribosomal RNA (16S qf และ 16S qr) ใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Panprommin *et al.* (2008) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ Real-Time PCR

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ที่มา
MT-qf	GGAACATCCTGCAAATGCTCCAAC	งานวิจัยนี้
MT-qr	CTTGACACACATCCTGAAGCACA	งานวิจัยนี้
16S qf	AACAGCGCAATCCTCTTCCAGAGT	Panprommin <i>et al.</i> (2008)
16S qr	AACCCTTAATAGCGGCTGCACCAT	Panprommin <i>et al.</i> (2008)

3.3.2 การทำ Real-Time PCR

นำ Total RNA ที่ได้ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครกรัมจากทุกตัวอย่าง มาสังเคราะห์ cDNA เส้นแรก โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป iScript™ Select cDNA Synthesis kit และใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้สารเคมี iQ™ SYBR® Green Supermix (บริษัท BIO-RAD) และเครื่อง MiniOpticon™ Real-Time PCR Detection System (บริษัท BIO-RAD)

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร สารเคมี iQ SYBR Green Supermix ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ส่วนหน้าและไพรเมอร์ส่วนกลับอย่างละ 1 ไมโครลิตร โดยมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 40 รอบ ดังนี้ 1) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที 2) 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 3) 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที โดยวิเคราะห์ตัวอย่างทุกตัวอย่างในเนื้อเยื่อตับและเหงือก

อย่างละ 4 ซ้ำ (ยีน MT และยีน 16S ribosomal RNA อย่างละ 2 ซ้ำ) ซึ่งยีน 16S ribosomal RNA ทำหน้าที่เป็นยีนควบคุมภายใน หรือยีนแม่บ้าน (Housekeeping gene) ที่ถูกนำไปเปรียบเทียบระดับการแสดงออกกับยีน MT

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Relative quantitative และคำนวณตามวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) ค่าความแตกต่างของ Threshold cycle (ΔCT) ระหว่าง mRNA ของยีน MT ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย กับ 16S ribosomal RNA ซึ่งเป็นยีนควบคุมภายในของแต่ละตัวอย่าง จะถูกเปรียบเทียบระดับการแสดงออก

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่า CT ของยีน MT ในทุกตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบระดับการแสดงออกด้วยค่า CT ของยีน 16S ribosomal RNA โดยแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS 11

4. การศึกษาพยาธิสภาพของอวัยวะภายในของปลาดุกอยู่ที่สัมผัสแคดเมียม

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและเหงือก ด้วยวิธีปลอดเชื้อจากปลาดุกอยู่ที่สัมผัสแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 100 ppb เปรียบเทียบกับปลาดุกอยู่ที่ไม่ได้สัมผัสแคดเมียม รักษาสภาพเนื้อเยื่อในสารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ในการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง automatic tissue processor

จากนั้นนำตัวอย่างมาฝังด้วยพาราฟินเพื่อทำเป็นพิมพ์แข็ง แล้วนำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้ไปตัดด้วยเครื่องไมโครทอม ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้ไปลอยในน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อยึดตัวดีแล้วใช้แผ่นสไลด์สะอาดซ้อนเนื้อเยื่อ แล้วนำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อให้ติดแน่นบนสไลด์ นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมด้วยสีย้อมฮีมาทอกซิลิน และอีโอซิน ตามวิธีของ Humason (1979) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายในไตกลอง จุลทรรศน์กำลังขยายสูง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลน การศึกษาคุณลักษณะของ Complementary DNA ของยีน MT ในปลาตุ๊กต๋อย

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน MT ในปลาตุ๊กต๋อยพบว่า มีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 509 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนที่สามารถแสดงออกมาเป็นโปรตีน (open reading frame) ขนาด 183 คู่เบส (ภาพที่ 1) โดยประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของปลายสายส่วนของ 5' และ 3' ที่ไม่แปลรหัส (5' and 3' untranslated region) ที่มีความยาวเท่ากับ 40 และ 286 คู่เบส ตามลำดับ โดย cDNA ของยีนนี้สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 60 หน่วย และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ATG และ TGA ซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรมเริ่มต้น (Start codon) และรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (Stop codon) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 41 และ 221 ตามลำดับ นอกจากนี้ทางด้านปลาย 3' ยังประกอบด้วย Polyadenylation signal (AATAAA) 2 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 292 และ 459

```
ATTTACACCACTCTTAACGAGCTCTATTTGAAAAGCGATAATGGACCCCTGCGAGTGTTCTTC 60
                                     M D P C E C S 7
AAAGACTGGAACCTGCACTTGTGGAACATGCTGCAAATGCTCCAAGTCCAGTGCACAAC 120
K T G T C T C G T S C K C S N C Q C T T 27
CTGCAAGAAAAGTTGCTGCTCTTGCTGCCCTTCTACCTGCAGTAAATGTGCTTCAGGATG 180
C K K S C C S C C P S T C S K C A S G C 47
TGTGTGCAAGGGAGATAGCTGTGATTCCAAGTGCTGTGTCAGTGAACACTCCAAGACTATTG 240
V C K G D S C D S K C C Q * 60
GCACCATGTAAATGTGTCTCATTGGTTTTCTTTTTTTTATGTGGAAATTCCAATAAATCG 300
TCGGTGTACTTAAGCTTAGTCTTGATGTTTTCTTTTTCAATTATTGCTATTTATGCAA 360
AGCATTTATTTTTTTTATTTAACTGTATGTGAAGTCATCTTAAATTTGTTTTCCCCCCC 420
TGACACAAACCAAGGCTGTAATCTTTACCTATATGAATAATAAAAGTTTTCTTGATTCGT 480
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 509
```

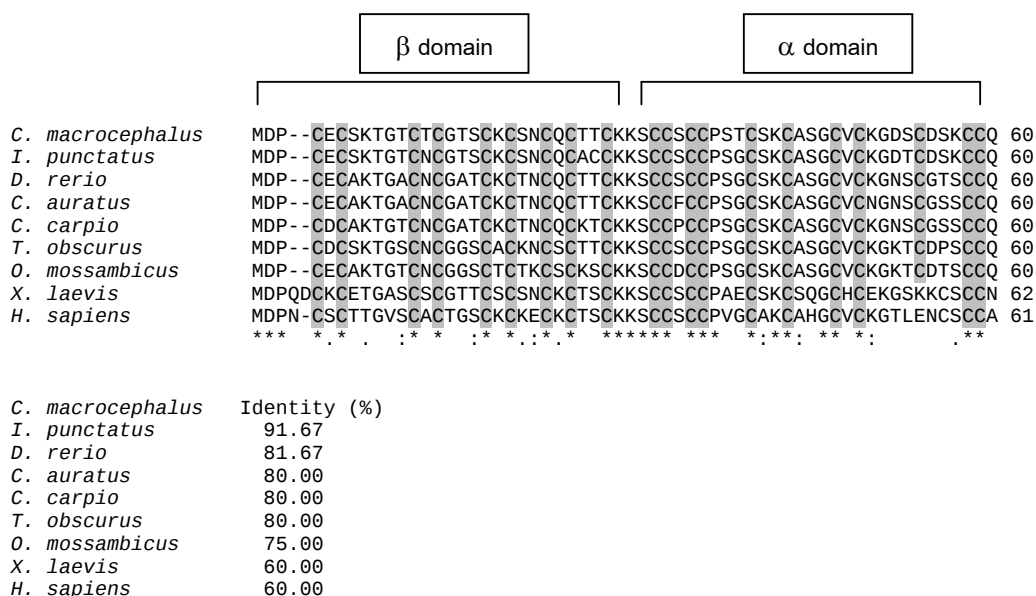
ภาพที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน MT ในปลาตุ๊กต๋อย * แสดงถึงรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน ตำแหน่งของ polyadenylation signals 2 ตำแหน่งถูกขีดเส้นใต้ไว้ ตำแหน่งของไพรเมอร์ (MT F and MT R) อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม และลำดับนิวคลีโอไทด์นี้อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (accession number JX312865)

โครงสร้างของยีน MT ในปลาตุ๊กต๋อย ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดซีส테인จำนวน 20 ตำแหน่งจากกรดอะมิโนทั้งหมด 60 ตัว (30%) โดยมี motif ที่สำคัญคือ Cys-X-Cys จำนวน 6 ตำแหน่ง, Cys-X-X-Cys จำนวน 3 ตำแหน่ง และ Cys-Cys จำนวน 3 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับโลหะหนัก (Kagi and Vallee 1960; Kagi *et al.*, 1979; Kagi and Schaffer 1988)

นอกจากนี้ ยีน MT ในปลาดุกอยู่ที่โคลนได้ในการศึกษารั้งนี้เป็น class I เนื่องจากตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีนมีตำแหน่งเดียวกับ MT-I ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Scudiero *et al.*, 2005)

2. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน MT ระหว่างสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

รวบรวมลำดับกรดอะมิโนของยีน MT ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำเฉพาะส่วนที่สามารถแสดงออกมาเป็นโปรตีนเท่านั้นมาวิเคราะห์การเปรียบเทียบที่ละกลุ่ม โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Clustal W (Thomson *et al.*, 1994) ได้ผลดังภาพที่ 2 พบว่ายีน MT ของปลาดุกมีความคล้ายคลึงกับปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) มากที่สุด คือ ร้อยละ 91.67 เนื่องจากปลาทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ในอันดับเดียวกัน คือ Siluriformes



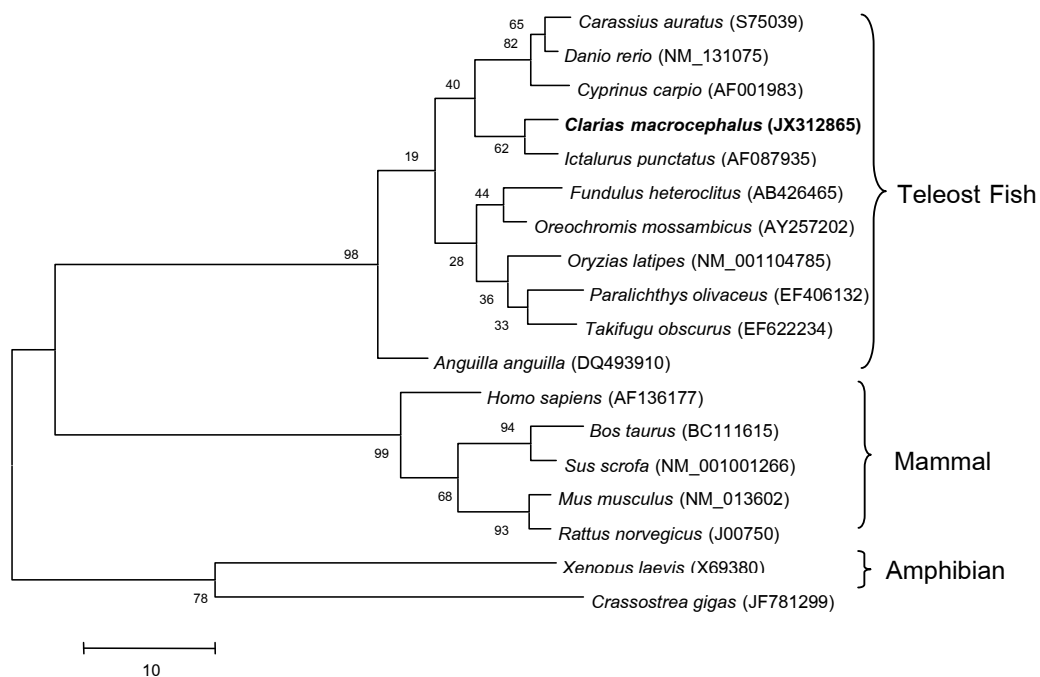
ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน MT ในปลาดุกอยู่กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ปลา channel catfish *Ictalurus punctatus* (AF087935), ปลาหมานลาย *Danio rerio* (NM_131075), ปลาทอง *Carassius auratus* (S75039), ปลาไน *Cyprinus carpio* (AF001983), ปลาปักเป้า *Takifugu obscurus* (EF622234), ปลามอเทศ *Oreochromis mossambicus* (AY257202), กบ African clawed frog *Xenopus laevis* (X69380) และมนุษย์ *Homo sapiens* (AF136177) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีนมีสีเทา

จากการเปรียบเทียบที่ละกลุ่มของยีน MT ของปลาดุกเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่า ในกลุ่มของปลาที่มีตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีนเหมือนกันทุกตำแหน่ง ยกเว้นในกบ

African clawed frog และมนุษย์ที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนเพียง 19 ตำแหน่งเท่านั้น (Woo *et al.*, 2006)

กรดอะมิโนซิสเตอีนทั้งหมดในยีน MT ทำหน้าที่จับกับโลหะหนัก ทำให้มีโครงสร้างสามมิติที่ประกอบด้วยโดเมน 2 โดเมนที่สำคัญ คือ Amino-terminal beta domain (β domain) ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 9 ตัวสามารถจับได้กับ 3 metal equivalents (MII3 Cys9) และ Carboxy-terminal alpha domain (α domain) ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 11 ตัวสามารถจับได้กับ 4 metal equivalents (MII4 Cys11) ซึ่งโดเมนทั้งสองนี้จะเชื่อมต่อกันตรงกลางของยีน MT บริเวณ Lys-Lys segment (กรดอะมิโนตัวที่ 29 และ 30) (Vašák, 2005)

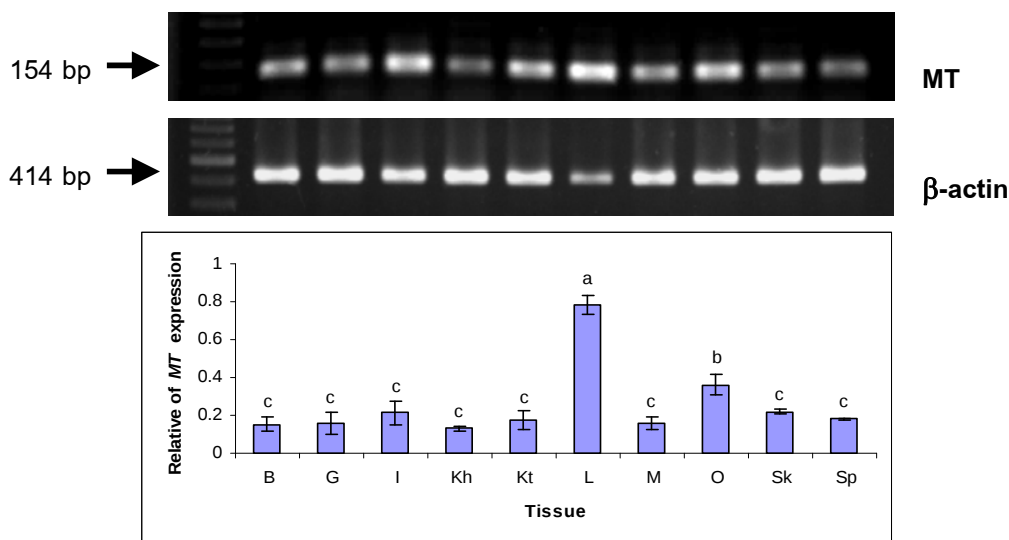
จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน MT ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับกรดอะมิโน พบว่า สามารถแบ่งความสัมพันธ์ของยีนนี้ได้เป็น 3 กลุ่มสิ่งมีชีวิต ได้แก่ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มของปลา โดยกรดอะมิโนของยีน MT ของปลาดุกอูยมีความเหมือนและใกล้ชิดกับยีน MT ในปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) มากที่สุด กลุ่มที่สองคือ กลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม และกลุ่มของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ โดยใช้หอยนางรม (*Crassostrea gigas*; JF781299) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน MT ระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างๆ

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน MT ในอวัยวะต่าง ๆ ในปลาตุ๊กตาคูย โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน MT ในอวัยวะ 10 ชนิด ของปลาตุ๊กตาคูยเทศเมีย จำนวน 3 ตัว ได้แก่ สมอ เหงือก ลำไส้ ไตส่วนหน้า ไตส่วนหลัง ตับ กล้ามเนื้อ รังไข่ ผิวหนัง และม้าม โดยใช้ยีน β -actin เป็นยีนควบคุมภายใน พบว่า ยีน MT มีระดับการแสดงออกมากที่สุด ในเนื้อเยื่อตับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kim *et al.*, (2008) เนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลักในการผลิต MT รองลงมาคือ รังไข่ ลำไส้ เหงือก และไต (ภาพที่ 4) โดยการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับมีระดับสูงกว่าในรังไข่ประมาณ 2 เท่า ลำไส้และผิวหนังประมาณ 3 เท่า และเนื้อเยื่ออื่นๆ ประมาณ 7 เท่า



ภาพที่ 4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน MT ในอวัยวะ 10 ชนิด ของปลาตุ๊กตาคูยเทศเมีย โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR ได้แก่ สมอ (B), เหงือก (G), ลำไส้ (I), ไตส่วนหน้า (Kh), ไตส่วนหลัง (Kt), ตับ (L), กล้ามเนื้อ (M), รังไข่ (O), ผิวหนัง (Sk) และม้าม (Sp) โดยใช้ยีน β -actin เป็นยีนควบคุมภายใน

4. การโคลน การศึกษาคุณลักษณะของ Genomic DNA ของยีน MT ในปลาตุ๊กตาคูย

จากการศึกษาโครงสร้างของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน MT ในปลาตุ๊กตาคูย พบว่า ประกอบด้วยส่วนที่สร้างโปรตีน (Exon) 3 ส่วนและส่วนที่ไม่ได้สร้างโปรตีน (Intron) 2 ส่วน เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาหลายชนิด เช่น ปลา ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Lin *et al.*,

2004) ปลา crucian carp (*Carassius auratus*) (Bae *et al.*, 2005) และปลา *Hemibarbus mylodon* (Cho *et al.*, 2008) ดังภาพที่ 5

```

ATGGACCCCTGCGAGTGTCAAAGA GTGAGTACCTGTAGGATTTTATGTTAATATTGTTT 60
M D P C E C S K T
ATTTCTCTTTATCTTTGTCCTGACTTAAATTTTAAACAATTGTTAACGGTATTGTGTTTTT 120
TCTCTCTCTCTGCTTTCTGCAGCTGGAACCTGCACTTTGTGGAACATCCTGCAAATGCTCC 180
G T C T C G T S C K C S
AACTGCCAGTGCAACCTGCAAGAAAAGTAAGCTCTTATATATTTCCCAAATGAAGGAA 240
N C Q C T T C K K S
ATTTTGCTTTAATCCCTGATTATTGTATTGCTCACAAGTACCTTTTCCTTTTCATCTCCCC 300
AGGTTGCTGCTCTTGCTGCCCTTCTACCTGCAGTAAATGTGCTTCAGGATGTGTGTGCAA 360
C C S C C P S T C S K C A S G C V C K
GGGAGATAGCTGTGATTCCAAGTGCTGTCAAGTGAACACTCCAAGACTATTGGCACCA 417
G D S C D S K C C Q *

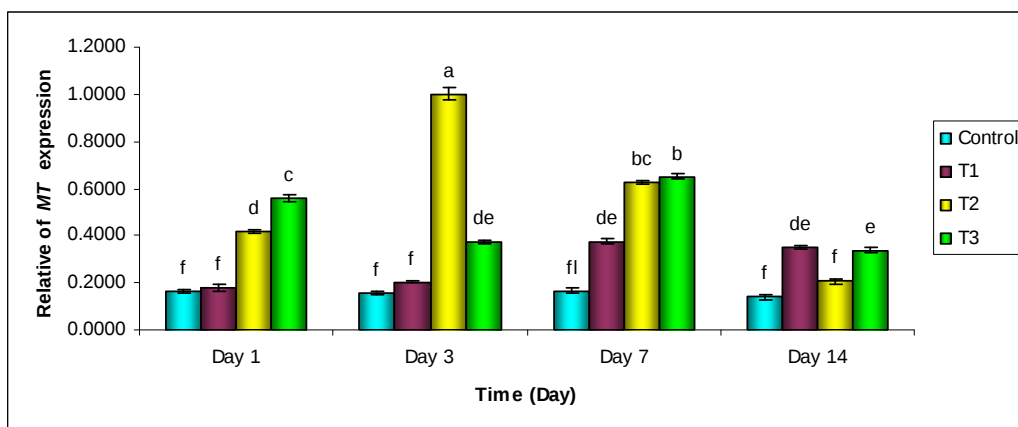
```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน MT ในปลาดุกอุย * แสดงถึงรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วยส่วนที่สร้างโปรตีน 3 ส่วน (สีเหลือง) และส่วนที่ไม่ได้สร้างโปรตีน 2 ส่วน (สีขาว) ส่วนสีชมพูคือ splice sites โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ MT F และ MT R อยู่ในกรอบสีเหลี่ยม และลำดับนิวคลีโอไทด์นี้อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (accession number JX312866)

5. การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอุย โดยวิธี Real-Time PCR เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

5.1 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุย

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยเมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับในช่วงเวลาต่างๆ หลังการสัมผัส คือ วันที่ 1, 3, 7 และ 14 พบว่า ในวันที่ 1 หลังการสัมผัสแคดเมียม ระดับการแสดงออกของยีน MT ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ppb สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และในวันที่ 3 และ 7 หลังการสัมผัส ทุกความเข้มข้นของแคดเมียมมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน MT สูงมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และจะค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 14 หลังการสัมผัส ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน MT สูงที่สุด คือเมื่อสัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10 ppb ในวันที่ 3 หลังการสัมผัส (ภาพที่ 6)

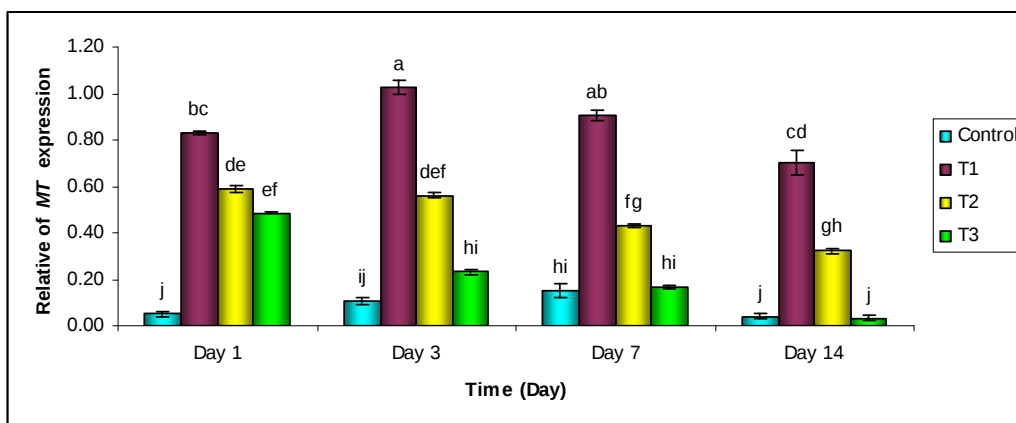


ภาพที่ 6 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุย โดยวิธี Real-Time PCR เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อ Control คือ 0 ppb, T1 คือ 1 ppb, T2 คือ 10 ppb และ T3 คือ 100 ppb

โลหะหนักที่มีความเป็นพิษสามารถกระตุ้นระดับการแสดงออกของยีน MT ได้ เพื่อลดความเป็นพิษ โดยเฉพาะแคดเมียม (Woo *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008) ซึ่งเมื่อสัมผัสแคดเมียมที่มีระดับความเข้มข้นสูงๆ ระดับการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับก็สูงขึ้นด้วยเช่นกัน แต่เมื่อเวลาผ่านไป ระดับการแสดงออกจะค่อยๆ ลดลง (Kim *et al.*, 2008) โดยระดับการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับจะขึ้นอยู่กับช่วงเวลาในการสัมผัส แต่ไม่ยั่งยืน กล่าวคือในช่วงเวลาสั้นๆ ระดับการแสดงออกของยีนจะสูงมาก และหลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงเมื่อสัมผัสนานขึ้น (Cho *et al.*, 2008)

5.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน MT ในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกอุย

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกอุยเมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับในช่วงเวลาต่างๆ หลังการสัมผัส คือ วันที่ 1, 3, 7 และ 14 พบว่า ในวันที่ 1 หลังการสัมผัสแคดเมียม ทุกความเข้มข้นของแคดเมียมมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน MT สูงขึ้นอย่างรวดเร็วและมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1 ppb และหลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ 14 หลังการสัมผัส ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน MT สูงที่สุด คือเมื่อสัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1 ppb ในวันที่ 3 หลังการสัมผัส (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน MT ในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุก อยุ่ โดยวิธี Real-Time PCR เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อ Control คือ 0 ppb, T1 คือ 1 ppb, T2 คือ 10 ppb และ T3 คือ 100 ppb

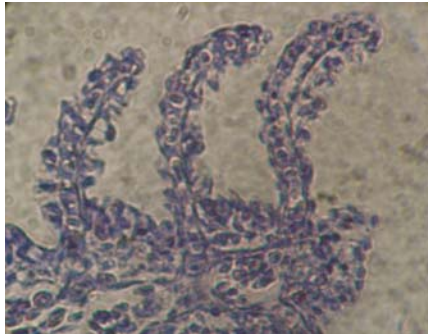
นอกจากยีน MT ในเนื้อเยื่อตับจะถูกกระตุ้นด้วยแคดเมียมแล้ว เนื้อเยื่อเหงือกก็ถูกกระตุ้นด้วยเช่นกัน (Kim *et al.*, 2008) จึงทำให้ยีน MT ในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกอยุ่มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นในทุกๆระดับความเข้มข้นของแคดเมียม โดยเฉพาะในวันที่ 1 หลังการสัมผัส โดยอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากเหงือกเป็นอวัยวะควบคุมสมดุลน้ำและแร่ธาตุ (osmoregulatory organ) ของปลาน้ำจืด จึงทำให้ช่วงแรกของการสัมผัสแคดเมียม ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อเหงือกสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว

6. การศึกษาพยาธิสภาพของอวัยวะภายในของปลาดุกอยุ่ที่สัมผัสแคดเมียม

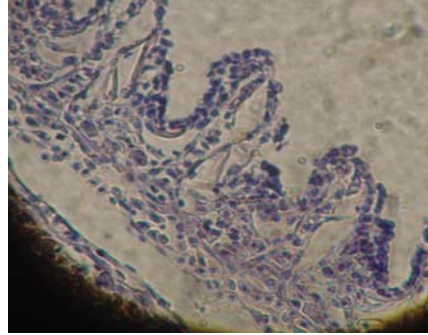
แคดเมียมสามารถเข้าไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อเหงือกและตับของปลาดุกอยุ่ได้จากกระบวนการดูดซึมจากน้ำโดยตรง และถ่ายทอดเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ทางการกินตามห่วงโซ่อาหารได้ ซึ่งเมื่อแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายปลาแล้ว นอกจากจะไปสะสมที่เหงือกและตับแล้ว ยังสามารถสะสมที่ลำไส้ และไตได้อีกด้วย (Kumar and Singh, 2010) โดยแคดเมียมมีผลต่ออวัยวะต่างๆ ดังนี้

จากการศึกษาพยาธิสภาพในเหงือกของปลาดุกอยุ่ที่สัมผัสแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 100 ppb พบอาการบวมหน้า (edema) เซลล์เยื่อบุเหงือกยกตัวขึ้น (epithelial cell lifting) และกิ่งเหงือกเชื่อมติดกัน (ภาพที่ 8)

สำหรับในตับของปลาดุกอยู่ที่สัมผัสแคดเมียม พบอาการเลือดคั่ง (congestion) เซลล์
ตับเสื่อมแบบมีแวคิวโอล (vacuolization) และเซลล์ตับมีการตาย (necrosis) (ภาพที่ 9)

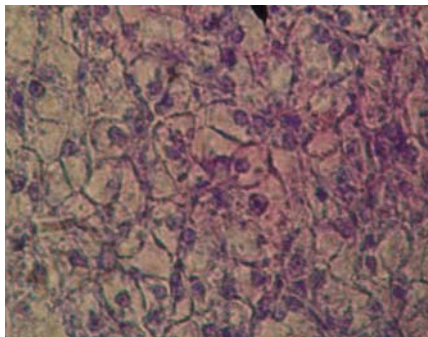


Control fish

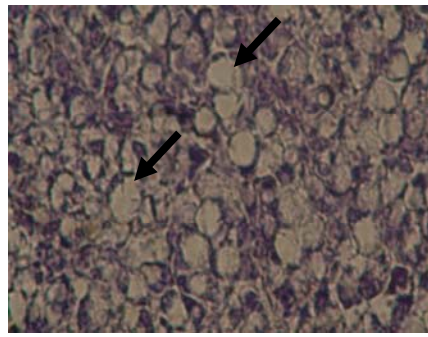


Treated fish

ภาพที่ 8 พยาธิสภาพในเหงือกของปลาดุกอยู่ที่สัมผัสแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 100 ppb



Control fish



Treated fish

ภาพที่ 9 พยาธิสภาพในตับของปลาดุกอยู่ที่สัมผัสแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 100 ppb พบ
เซลล์ตับเสื่อมแบบมีแวคิวโอล (ลูกศรชี้)

สรุปผลการทดลอง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน MT ในปลาดุกอุยประกอบด้วยส่วนที่สร้างโปรตีน 3 ส่วนและส่วนที่ไม่ได้สร้างโปรตีน 2 ส่วน โดยส่วนที่สร้างโปรตีนทั้ง 3 ส่วนนี้ประกอบด้วยส่วนที่สามารถแสดงออกมาเป็นโปรตีน (open reading frame) ขนาด 183 คู่เบส และสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 60 หน่วย โดยเป็นกรดอะมิโนซิสเทอีนทั้งหมด 20 หน่วย (30%) ทำหน้าที่ในการจับกับโลหะหนัก เพื่อลดความเป็นพิษ

เมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอุย เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามช่วงเวลาที่กำหนด พบว่า ในวันแรกของการสัมผัสแคดเมียม จะมีระดับการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อเหงือกสูงที่สุด และสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และในเนื้อเยื่อตับจะมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดในวันที่ 3 หลังการสัมผัส ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้สามารถใช้ยีน MT เป็นดัชนีชีวภาพในการสัมผัสแคดเมียมในน้ำได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Bae, H., S.S. Nam, H.-S. Park and K. Park. 2005. Metallothionein mRNA sequencing and induction by cadmium in gills of the crucian carp, *Carassius auratus*. *Journal of Health Science* 51(3): 284-290.
- Cho, Y.S., S.Y. Lee, K.Y. Kim, I.C. Bang, D.S. Kim and Y.K. Nam. 2008. Gene structure and expression of metallothionein during metal exposures in *Hemibarbus mylodon*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 71(1): 125-37.
- He, P., M. Xu and H. Ren. 2007. Cloning and functional characterization of 5'-upstream region of metallothionein-I gene from crucian carp (*Carassius cuvieri*). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 832-841.
- Humason, G.L. 1979. *Animals Tissue Techniques*. 4th ed., W.H. Freeman, San Francisco.
- Kagi, J.H.R. and A. Schaffer. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*. 27: 8509.
- Kagi, J.H.R. and B.L. Vallee. 1960. Metallothionein: A cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem.* 235: 3460-3465.
- Kagi, J.H.R., Y. Kojima, M.M. Kissling and K. Lerch. 1979. Metallothionein: An exceptional metal thiolate protein. *Ciba Found Symp.* 72: 223-237.
- Kim, J.-H., S.-Y. Wang, Il-C. Kim, J.-S. Ki, S. Raisuddin, J.-S. Lee and K.-N. Han. 2008. Cloning of a river pufferfish (*Takifugu obscurus*) metallothionein cDNA and study of its induction profile in cadmium-exposed fish. *Chemosphere* 71: 1251-1259.
- Kumar, P. and A. Singh. 2010. Cadmium toxicity in fish: An overview. *GERF Bulletin of Biosciences* 1(1): 41-47.
- Lin, C.-H., J.A.C. John, L.W. Ou, J.-C. Chen, C.-H. Lin and C.-Y. Chang. 2004. Cloning and characterization of metallothionein gene in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Aquatic Toxicology* 66: 111-124.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta Ct) method. *Methods*. 25: 402-408.
- Marin, M.B. and V. Matozzo. 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Mar. Poll. Bull.* 48: 835-839.

- Panprommin, D., S. Poompuang and P. Srisapoome. 2007. Characterization of expressed sequence tags from liver and muscle tissues of walking catfish, *Clarias macrocephalus*. *ScienceAsia* 33: 461-468.
- Panprommin, D., S. Poompuang and P. Srisapoome. 2008. Molecular characterization and seasonal expression of the vitellogenin gene from Günther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. *Aquaculture* 276: 60-68.
- Scudiero, R., P.A. Temussi and E. Parisi. 2005. Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. *Gene* 345(1): 21-26.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thomson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Vašák, M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19: 13-17.
- Woo, S., S. Yum, J.H. Jung, W.J. Shim, C.-H. Lee and T.-K. Lee. 2006. Heavy metal-induced differential gene expression of metallothionein in Javanese Medaka, *Oryzias javanicus* Volume. *Mar. Biotech.* 8(6): 654-662.

Output จากโครงการ

1. การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการนานาชาติ 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture ณ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 22-26 มิถุนายน 2552

Dutrudi Panprommin and Supawadee Poompuang. 2009. Molecular Cloning and Characterization of Metallothionein Gene from Günther's Walking Catfish, *Clarias macrocephalus*. p 184. In the 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture on Roles of Aquaculture Genetics in Addressing Global Food Crisis, 22-26 June, 2009. Bangkok, Thailand.

2. การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการนานาชาติ 9th Asian Fisheries & Aquaculture Forum (9AFAF) ณ มหาวิทยาลัย Shanghai เมือง Shanghai ประเทศจีน ระหว่างวันที่ 21-25 เมษายน 2554

Dutrudi Panprommin and Supawadee Poompuang. 2011. Induced Expression of Metallothionein Gene by Cadmium Exposure in Walking Catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864). In 9th Asian Fisheries & Aquaculture Forum (9AFAF), 21-25 April, 2010. Shanghai, China.

3. การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการนานาชาติ Genetic Improvement of Livestock and Aquatic Animals in the Topics: Challenge and Reward ณ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 24-26 กันยายน 2555

Dutrudi Panprommin and Supawadee Poompuang. 2555. Effects of Cadmium Exposure on Hepatic Changes in Walking Catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864). Genetic Improvement of Livestock and Aquatic Animals in the Topics: Challenge and Reward, September 24-26, 2012, Bangkok, Thailand.