

การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ osmoregulation ในกุ้งกุลาดำโดยวิธี cDNA cloning

Characterization of genes controlling osmoregulation

in black tiger shrimp by cDNA cloning

สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวิ¹, สิริพร พงษ์สมบูรณ์², ปิติ อ่ำพ่าย², อัญชลี ทศนาขจร²

¹ หน่วยงานวิจัยกุ้ง สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช 80160

² หน่วยปฏิบัติการอนุชีววิทยาและจีโนมกุ้ง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

โครงการจีโนมกุ้งซึ่งค้นหายีนในทุกเยื่อเยื่อของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค cDNA cloning รวมทั้งยีนที่มีการแสดงออกในเหงือกกุ้งปกติและเหงือกกุ้งที่ถูกปรับความเค็มลงต่ำ จากลำดับเบสของโคลนที่ได้จาก Hemocyte และ Ovary พบโคลนที่เป็นยีน beta-subunit Na⁺/K⁺-ATPase และยีน carbonic anhydrase I ตามลำดับ เมื่อนำลำดับเบสที่ได้และลำดับเบสของยีน alpha-subunit Na⁺/K⁺-ATPase ที่ได้จากเหงือก (acc. [CN641254](#)) ออกแบบไพรเมอร์เพื่อศึกษา Expression patterns ของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ในตัวอย่างกุ้ง พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความเฉพาะเจาะจงและสามารถทำ multiplex PCR ที่ให้ผลดีในทั้ง 3 ยีน เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ พบว่ายีน β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase มีปริมาณน้อยมาก ส่วนยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase มีการแสดงออกมากกว่า และยังพบอีกว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันในระยะ Nauplius, Mysis, Postlarva 5, Postlarva 15 และกุ้งหลังปล่อยลงบ่อดินอายุ 1 เดือน แต่ลูกกุ้งในระยะ Zoea พบการแสดงออกทั้ง 2 ยีนมากกว่าลูกกุ้งในระยะอื่น ส่วนปริมาณ mRNA ของ α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, carbonic anhydrase ในกุ้งกุลาดำที่ตอบสนองต่อการลดความเค็มน้ำแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่อยู่ในสภาวะดังกล่าวของกุ้งไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นและลดลงในช่วงระยะเวลาต่างๆกัน นอกจากจากการศึกษา Genetic variation ของยีน Carbonic anhydrase ยังแสดงให้เห็นความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของยีนในกุ้งตัวอย่างที่สามารถมีชีวิตรอดได้ถึง 1 เดือนที่ระดับความเค็ม 3 ppt กับตัวอย่างกุ้งที่ตายก่อน 48 ชั่วโมงและตัวอย่างที่เก็บที่เวลา 1 และ 2 อาทิตย์ ซึ่งควรจะมีการยืนยันผลอีกครั้งด้วยการใช้ตัวอย่างกุ้งหลายๆ ชุดเพื่อให้แน่ใจว่าความแตกต่างดังกล่าวเกี่ยวข้องกับความสามารถในการปรับตัวของกุ้งจริงและสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

In order to identify and characterize genes controlling osmoregulation in *P. monodon*, cDNA libraries were constructed from gills of normal shrimps and low-salinity-stressed shrimps. However, the cDNA sequences of beta-subunit Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase I were obtained from cDNA libraries of hemocytes and ovary, respectively. The specific primers designed from cDNA sequences of those genes and alpha-subunit Na⁺/K⁺-ATPase (acc. [CN641254](#)) were successfully amplified by multiplex RT-PCR with elongation factor I primers as the internal control. Semi-quantitative RT-PCR revealed the alpha-subunit Na⁺/K⁺-ATPase, beta-subunit Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase I genes were expressed predominantly in gills, hemocytes and gills, respectively. In the developmental stages of *P. monodon* from nauplius to 1 month grow-out, the level of beta-subunit Na⁺/K⁺-ATPase mRNA was very low compared to alpha-subunit Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase I. The expression of alpha-subunit Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase I genes were also found in significant difference in the zoea stage that possibly being the stage of the development of tissues that those genes located. Although, a correspondence between the expression of genes involving osmoregulation and the time courses of low-salinity acclimation was not apparently clear, however, both alpha-subunit Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase I mRNA in gills were slightly decreased at the beginning of low-salinity exposure and become increased at longer time courses. This provides a reasonable evidence of transcription changes of alpha-subunit Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase I genes upon salinity challenge. However, the other sets of samples or real-time PCR technique would be further used to verify the correlation and to construct the cDNA library from gill tissue is the alternative approach to obtain other genes involving osmoregulation in *P. monodon*.

บทนำ

กุ้งกุลาดำเป็นสินค้าส่งออกทำรายได้ให้กับประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาทแต่ในปัจจุบันปริมาณกลับลดน้อยลงเนื่องจากปัญหาการเลี้ยงโดยมีสาเหตุมาจากเรื่องโรค การจัดการและพันธุกรรม เป็นต้น การศึกษาวิจัยเพื่อนำไปสู่การเพาะเลี้ยงกุ้งที่ยั่งยืนคือการค้นหาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวกุ้งเองและบ่อเลี้ยงซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของกุ้ง การปรับปรุงพันธุ์ การพัฒนาอาหาร การค้นหาอื่นต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบต่างๆของกุ้งจึงเป็นแนวทางหลักของการศึกษาวิจัยของตัวกุ้ง ซึ่งจะทำให้มีความเข้าใจและนำไปสู่การเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพต่อไป ความสามารถในการปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำก็มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของกุ้งกุลาดำทั้งในระยะวัยอ่อนและโตเต็มวัย เนื่องจากกุ้งจะมีการปรับสมดุลของเกลือแร่ภายในตัวอยู่ในบริเวณที่

มีความเค็มเจือจางกว่าปกติ (ประจวบ, 2537; Mantel and Farmer, 1983) จากการศึกษาความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของลูกกุ้งกุลาดำ โดยยอนต์ และวรรณมา (2525) พบว่าความทนทานต่อการลดระดับความเค็มน้ำของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและตายหมดที่ความเค็ม 1ppt. สอดคล้องกับผลการศึกษา โดย Cawthorne et al. (1983) รายงานความทนทานต่ำสุดที่ระดับความเค็ม 1.7 ppt. นอกจากนี้ยังพบว่าลูกกุ้งมีอัตราการรอดตายต่ำในน้ำที่มีความเข้มข้นของเกลือแร่ชนิดเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลูกกุ้งมีความต้องการส่วนผสมของเกลือแร่หลายชนิดในน้ำเพื่อการเจริญเติบโตที่ดีซึ่งในน้ำจืดมีปริมาณและชนิดเกลือแร่น้อยกว่าในน้ำทะเล

ระบบ osmoregulation ของกุ้งทะเลคล้ายกับระบบของปูทะเลคือส่วนของ branchiae เป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนเกลือแร่ระหว่างภายนอกตัวและภายในตัวเป็นหลัก (Lucu, 1990; Morris, 2001) โดยจากการศึกษาในปูชนิด *Carcinus maenas*, *Hemigrapsus nudus*, *Leptograpsus variegates* พบว่ากลไกการแลกเปลี่ยนเกลือแร่เกิดขึ้นที่ gill epithelium cells ซึ่งมีการแลกเปลี่ยนระหว่าง Na^+/H^+ และ $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ทำให้ Na^+ และ Cl^- เข้ามาอยู่ในเซลล์ และยังพบว่าเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (Corotto and Holliday, 1996; Cooper and Morris, 1997; Lucu and Flik, 1999) นอกจากนี้ในกระบวนการแลกเปลี่ยนออกซิเจนที่เกิดขึ้นจะมีการขับ CO_2 ออกโดยมีเอนไซม์ carbonic anhydrase (CA) เปลี่ยนให้อยู่ในรูป HCO_3^- ซึ่งจะเป็นอิออนสำคัญในการนำ Cl^- เข้าสู่เซลล์และมีการขับ NH_4 ออกโดยกระบวนการแลกเปลี่ยนอิออนกับ K^+ ซึ่งเป็นผลของเอนไซม์ $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (Henry and Wheatly, 1992; Morris, 2001) ในการปรับตัวเมื่อสภาพ hypoosmotic ยังพบว่าในปูทะเลมีการหลั่งฮอร์โมนควบคุมให้เกิดการปรับตัวซึ่งฮอร์โมนดังกล่าวเป็น neuroamines หลั่งมาจาก pericardial organs ประกอบด้วย dopamine และ 5-hydroxytryptamine (5-HT) มีผลในกระบวนการ cAMP-mediated phosphorylation ที่กระตุ้นการทำงานของ $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ และ NaCl uptake และยังพบว่าฮอร์โมน Crustacean Hyperglycaemic Hormone (CHH) มีผลควบคุมการทำงานของ neuropeptides ที่เกี่ยวข้องกับระบบ osmoregulation (Morris, 2001)

การค้นหาค้นหาและศึกษายีนของกุ้งโดยวิธี EST sequencing จากส่วนของ whole cephalothorax, eyestalk, pleopod, hemocyte และ branchiae ในกุ้งกุลาดำ (Lehnert et al., 1999; Supungul et al., 2002; Wuthisuthimethavee et al., 2005) พบยีนที่เกี่ยวข้องในระบบต่างๆของกุ้งได้แก่ gene/protein expression, metabolism, cell/organism defense, cell structure/motility และ cell signaling and communication.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ osmoregulation ในกุ้งกุลาดำโดยการสร้าง cDNA library จากเหงือกกุ้งกุลาดำ ตลอดจนการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ และ carbonic anhydrase ในการปรับตัวของกุ้งกุลาดำในน้ำที่มีความเค็มลดลงอย่างฉับพลัน ซึ่งการค้นพบดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ได้

วัสดุและวิธีการ

1. การศึกษาการแสดงออกของยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ในกิ้งกูดดำ

Primer design

ยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ซึ่งพบว่าเกี่ยวข้องกับระบบ osmoregulation ได้นำมาศึกษาในกิ้งกูดดำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาได้จากลำดับเบสบางส่วนของ α - และ β -subunits ของยีน Na⁺/K⁺-ATPase และยีน carbonic anhydrase จากรายงานวิจัยของ Wuthisuthimethavee et al. (2005) และโครงการจีโนมกิ้ง (<http://pmonodon.biotec.or.th>)

Sample preparation

ตัวอย่างกิ้งกูดดำที่ใช้ในการศึกษามีอายุประมาณ 4 เดือนซึ่งนำมาจากบ่อเลี้ยงเกษตรกร โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลในน้ำที่ระดับความเค็มเดิมที่กิ้งกูดอยู่ในบ่อเลี้ยงแล้วค่อยปรับความเค็มขึ้นวันละ 3 ppt จนถึงระดับความเค็ม 30 ppt หลังจากนั้นเลี้ยงต่อไปอีกประมาณ 1 สัปดาห์ โดยให้อากาศตลอดเวลา เปลี่ยนถ่ายน้ำ 50% ทุกวันและให้อาหารเม็ดวันละ 2 ครั้งในตอนเช้าและเย็นในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัว เมื่อครบกำหนดก็ปรับลดความเค็มน้ำที่ใช้เลี้ยงกิ้งให้เป็น 3 ppt โดยการย้ายตัวอย่างกิ้งไปใส่ถังใหม่และเหลือไว้จำนวน 3 ตัวสำหรับเป็นกิ้งกลุ่ม control และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแต่ละตัวประกอบด้วย gill, eyestalk, antennal gland และ haemolymph แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลวก่อนที่จะนำไปใส่ในตู้แช่แข็งที่ -80°C ส่วนตัวอย่างกิ้งที่อยู่ในระดับความเค็ม 3 ppt จะเก็บตัวอย่างเหมือนกับกิ้งกลุ่ม control ครั้งละ 3 ตัวหลังจากเปลี่ยนความเค็ม 1, 6, 24 และ 168 ชั่วโมง

Total RNA isolation

ตัวอย่างเนื้อเยื่อกิ้งกูดดำทั้งหมดจะนำไปสกัด Total RNA โดยใช้ชุดสำเร็จ TRI REAGENT (Molecular Research) และทำลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยใช้เอ็นไซม์ DNase I (Promega) หลังจากนั้นวัดปริมาณโดยใช้ spectrophotometer

cDNA synthesis

สร้าง cDNA โดยนำ Total RNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อเดียวกันของตัวอย่างกิ้งในกลุ่มเดียวกันรวมกันในปริมาณที่เท่ากันโดยใช้ Total RNA ปริมาณ 1 μ g มาสร้างเป็น single-strand cDNA ด้วยชุดสำเร็จ Improm-II Reverse Transcription System (Promega) โดยใช้ Oligo (dT) เป็นตัวเริ่มต้นตามวิธีการที่อธิบายไว้ในคู่มือของชุดสำเร็จ

Expression profiling by semi-quantitative RT-PCR

cDNA ที่ได้นำมาเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำ ultrapure แล้วใช้เป็น template ในปฏิกิริยา multiplex-PCR ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 μ l ประกอบด้วย 10-50 ng cDNA, 2.5 pmol primers (โดยเป็น primer ของ α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase หรือ β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase หรือ carbonic anhydrase และ primer ของ elongation factor I alpha สำหรับเป็น internal standard), 200 μ M dNTP, 90 mM Tris-Cl (pH 9), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, และ 0.5 unit Taq DNA polymerase โดยมีการควบคุมอุณหภูมิตั้งนี้คือ 94 °C

2 นาที หลังจากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบของอุณหภูมิ 94°C เวลา 30 วินาที, 55°C เวลา 30 วินาที และ 72 °C เวลา 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นก็วิเคราะห์ PCR product โดย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide และวิเคราะห์ความเข้มของ DNA band โดยอ่านค่าเป็น relative fluorescent unit (RFU) ด้วยโปรแกรม GeneTools (SynGene) ของแต่ละตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์ one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ LSD ด้วยโปรแกรม SPSS-PC (SPSS Inc) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยดีเอ็นเอกุ้งกุลาดำกับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา RT-PCR ทั้ง 3 คู่ คือไพรเมอร์สำหรับยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase และมีการทดลองหาความสัมพันธ์ของ Genotype ต่อความสามารถในการปรับตัวได้ดีในสภาพความเค็มต่ำของกุ้งกุลาดำ โดยเก็บตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงในสภาพความเค็มต่ำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่ได้ทดลอง RT-PCR แต่ในครั้งนี้ได้เพิ่มเวลาจนถึง 1 เดือน ซึ่งตัวอย่างที่ได้นี้ก็ให้นำมาใช้ในการยืนยันผล RT-PCR ที่ได้จากการทดลองที่แล้วและเก็บดีเอ็นเอของกุ้งแต่ละตัวด้วยเพื่อใช้ในการศึกษา Genotype ของยีนทั้ง 3 โดยหลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะได้แก่ Alu I และ Rsa I แล้วทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นกับความสามารถในการปรับตัวต่อความเค็มของกุ้งกุลาดำ

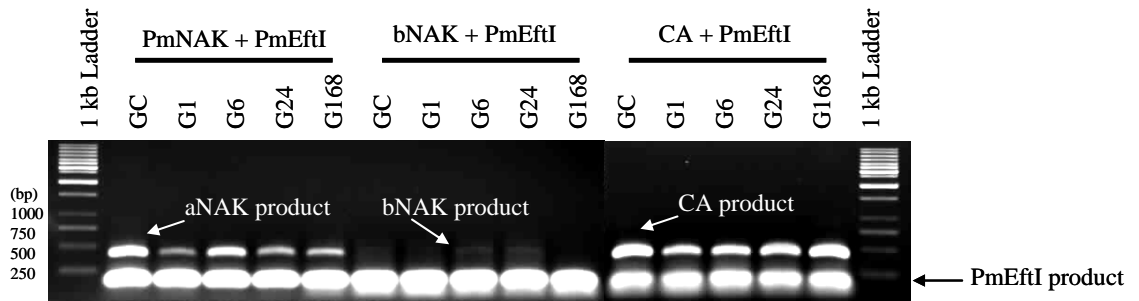
ผลการทดลอง

1. การศึกษาการแสดงออกของยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ในกุ้งกุลาดำ

การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase

การศึกษาแสดงออกของยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ด้วยเทคนิค RT-PCR นั้นประกอบด้วย 4 gene-specific primers คือ α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase (PmNAK-F 5'-TGT GGT TCG ACA ACA CCA T-3' and PmNAK-R 5'-TTG ATG TAG ATG GTG GAG CA-3'; Wuthisuthimethavee et al., 2005), β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase (bNAK-F 5' TCA AAT TTC CCC AAT GCT TC 3' and bNAK-R 5' CGT ACA CGA GCA AAG ATC TCC 3'), carbonic anhydrase (CA-F 5' GCG ACA TAT CAA GAC ATC AGG A 3' and CA-R 5' CTG CTG TAA CTG GAT CA 3') และ elongation factor I alpha (PmEftI-F 5'-GGT GCT GGA CAA GCT GAA GGC-3' PmEftI-R 5'-CGT TCC GGT GAT CAT GTT CTT GAT G-3') ซึ่งใช้เป็น internal standard จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบส cDNA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนได้อย่างเฉพาะเจาะจงและให้ผลชัดเจน โดย PmNAK ให้ PCR product ขนาด 400 bp, bNAK ให้ PCR product ขนาด 393 bp, CA ให้ PCR product ขนาด 400 bp และ PmEftI ให้ PCR product ขนาด 148 bp นอกจากนี้การทดสอบทำปฏิกิริยา multiplex PCR ระหว่าง α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase +

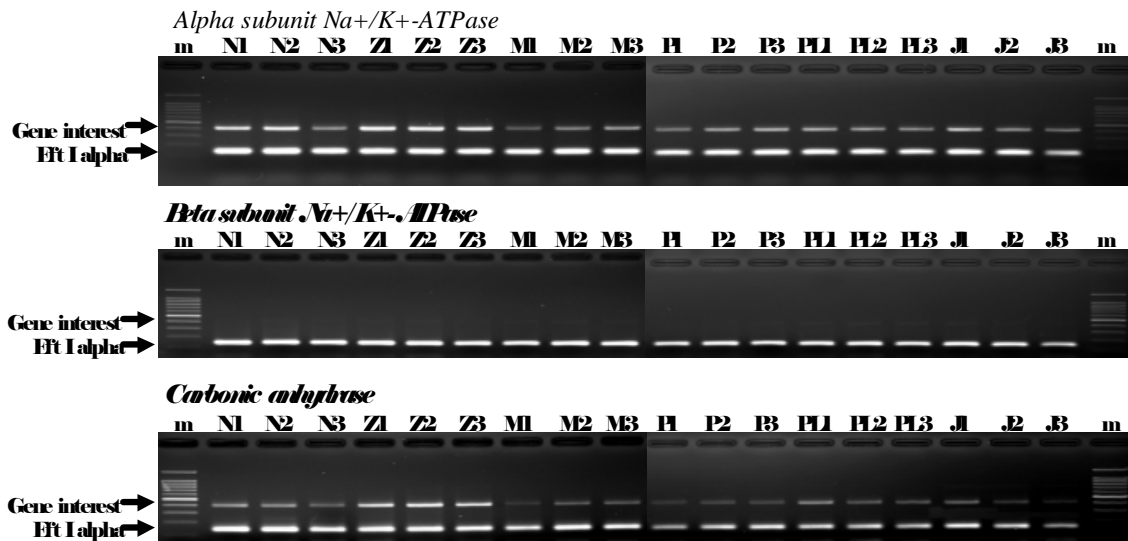
elongation factorI, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase + elongation factorI และ carbonic anhydrase + elongation factorI พบว่าให้ผลที่ดีเนื่องจากขนาดของ PCR product แตกต่างกันและไม่พบการเกิด primer-dimer ระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองคู่ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบ multiplex PCR เพื่อใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase (PmNAK + PmEftI), β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase (bNAK + PmEftI) และ carbonic anhydrase (CA + PmEftI) ในกุ้งกุลาดำ

2. การศึกษาการแสดงออกของยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase
การแสดงออกของยีนในช่วงการพัฒนาของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ

จากการเก็บตัวอย่างลูกกุ้งกุลาดำตั้งแต่ระยะ Nauplius3, Zoea3, Mysis3, PL5, PL15 และ กุ้งที่เลี้ยงในบ่ออายุ 1 เดือน มาศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, carbonic anhydrase และ elongation factor I alpha (Control) พบว่ายีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase มีการแสดงออกมากกว่า β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ elongation factor I alpha อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังพบอีกว่าในลูกกุ้งระยะ Zoea มีการแสดงออกของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase มากกว่ากุ้งในระยะอื่น (Nauplius – 1 month old) (ภาพที่ 2)



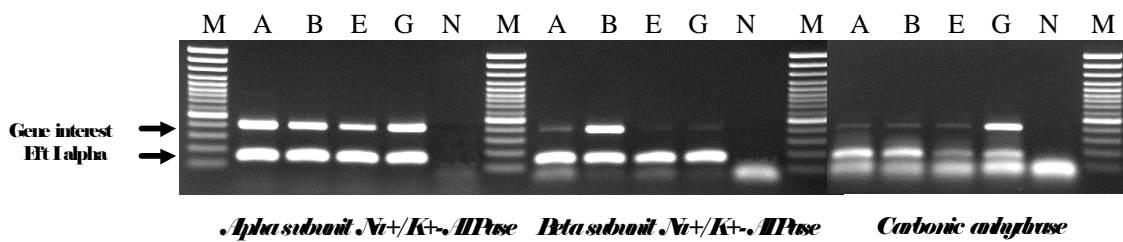
ภาพที่ 2 ผลการการแสดงออกของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ในช่วงการพัฒนารูปของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (m= DNA marker; N = Nauplius 3; Z= Zoea 3; M= Mysis 3; P= Postlarva 5; PL= Postlarva 15; J= กุ้งอายุ 1 เดือน)

การแสดงออกของยีนในกุ้งกุลาดำที่มีการปรับความเค็มสูงไปอยู่ในความเค็มต่ำ

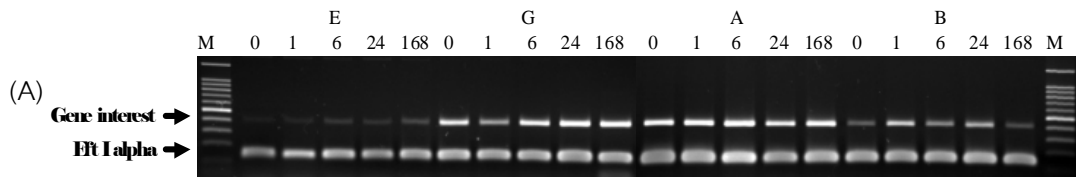
ตัวอย่างกุ้งกุลาดำสำหรับใช้ในการศึกษานี้พบว่ามีการตายสูงในระยะแรกของการเลี้ยงคือประมาณ 40-50% โดยกุ้งที่ตายส่วนใหญ่เป็นกุ้งที่มีการลอกคราบ หลังจากปรับความเค็มให้อยู่ที่ประมาณ 25 ppt อยู่ประมาณ 2 อาทิตย์ก็เปลี่ยนความเค็มไปที่ 3 ppt โดยทันที ซึ่งพบว่าในขณะที่กุ้งอยู่ในน้ำที่มีความเค็มต่ำมากนั้นในช่วงแรกไม่ค่อยมีการว่ายน้ำส่วนใหญ่อยู่กับที่ แต่หลังจากนั้นประมาณ 24 ชั่วโมงกุ้งก็มีการเคลื่อนที่ปกติสำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บได้สามารถสกัด total RNA ได้ในปริมาณเพียงพอสำหรับการทดลอง แต่ก็มีเนื้อเยื่อบางส่วนสกัดได้น้อยหลังจากรวมตัวอย่างแล้วก็ทำให้มีปริมาณมากพอสำหรับการสร้าง cDNA สำหรับการทำปฏิกิริยา RT-PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ในเนื้อเยื่อ Antennal gland, Haemocytes, Eystalk และ Gill ของกุ้งกุลาดำ (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่ายีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อโดยเฉพาะ Antennal gland และ Gill พบการแสดงออกมากกว่า Haemocytes และ Eystalk เพียงเล็กน้อย ส่วนยีน β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase นั้นมีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนคือพบการแสดงออกมากใน Haemocytes โดยในเนื้อเยื่ออื่นนั้นพบน้อยมาก สำหรับยีน carbonic anhydrase มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเช่นกันคือพบการแสดงออกมากใน Gill รองลงมาคือ Antennal gland โดยในเนื้อเยื่ออื่นก็พบน้อยมาก

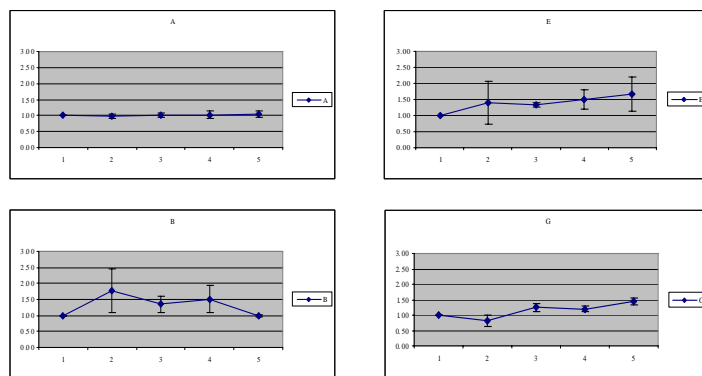
รูปแบบการแสดงออกของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ในเนื้อเยื่อ Antennal gland, Haemocytes, Eystalk และ Gill ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำในเวลาต่างๆกันพบว่ายีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase มีการเพิ่มขึ้นและลดลงในแต่ละช่วงเวลาโดยเฉพาะในส่วนของ Antennal gland และ Gill (ภาพที่ 4 และ 6) อย่างไรก็ตามผลที่ได้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่กุ้งอยู่ในน้ำความเค็มต่ำคือเวลานานขึ้นก็มีการแสดงออกมากขึ้น ส่วนยีน β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase นั้นก็พบการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 5) แต่ก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่กุ้งอยู่ในน้ำความเค็มต่ำเช่นกัน



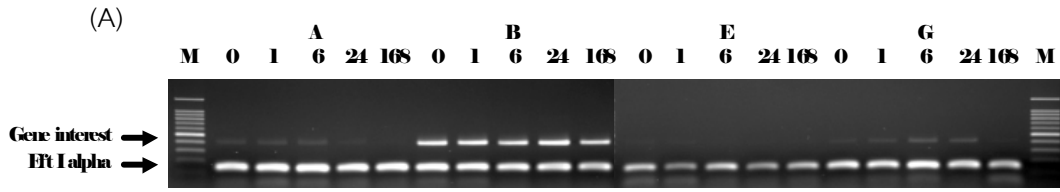
ภาพที่ 3 การแสดงของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ carbonic anhydrase ในเนื้อเยื่อ Antennal gland (A), Haemocytes (B), Eystalk (E) และ Gill (G) ของกุ้งกุลาดำ; M= DNA marker



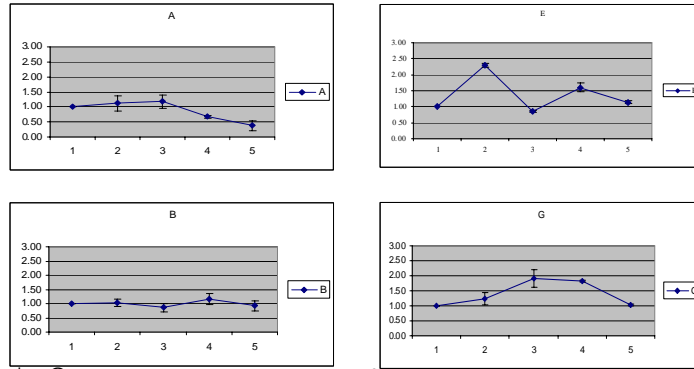
(B)



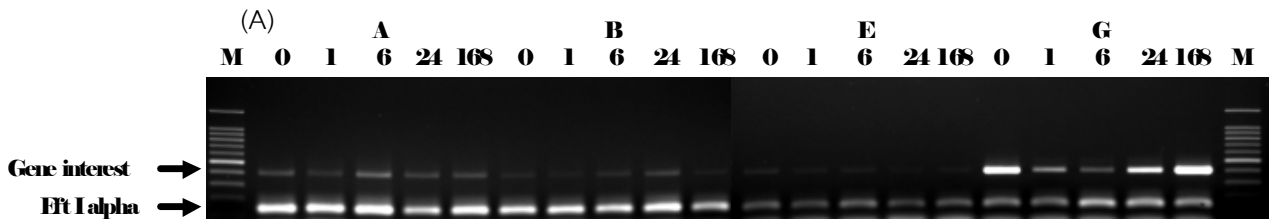
ภาพที่ 4 (A), การแสดงของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase ในเนื้อเยื่อ Antennal gland (A), Haemocytes (B), Eystalk (E) และ Gill (G) ของกุ้งกุลาดำที่อยู่ในน้ำความเค็มต่ำเป็นเวลา 0, 1, 6, 24 และ 168 ชั่วโมง; M= DNA marker; (B), รูปแบบการแสดงออกของยีนในเวลาต่างๆกัน



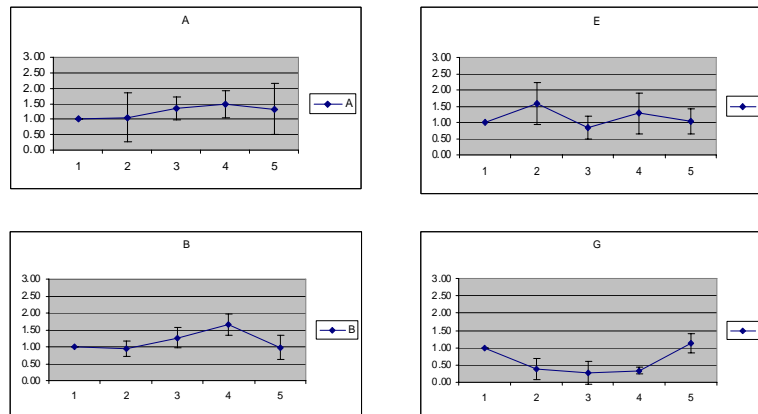
(B)



ภาพที่ 5 (A), การแสดงของยีน β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase ในเนื้อเยื่อ Antennal gland (A), Haemocytes (B), Eyestalk (E) และ Gill (G) ของกุ้งกุลาดำที่อยู่ในน้ำความเค็มต่ำเป็นเวลา 0, 1, 6, 24 และ 168 ชั่วโมง; M= DNA marker; (B), รูปแบบการแสดงออกของยีนในเวลาต่างๆกัน



(B)

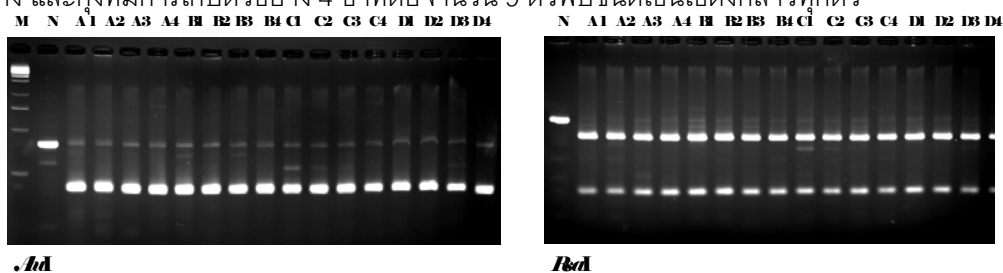


ภาพที่ 6 (A), การแสดงของยีน Carbonic anhydrase ในเนื้อเยื่อ Antennal gland (A), Haemocytes (B), Eyestalk (E) และ Gill (G) ของกุ้งกุลาดำที่อยู่ในน้ำความเค็มต่ำเป็นเวลา 0, 1, 6, 24 และ 168 ชั่วโมง; M= DNA marker; (B), รูปแบบการแสดงออกของยีนในเวลาต่างๆกัน

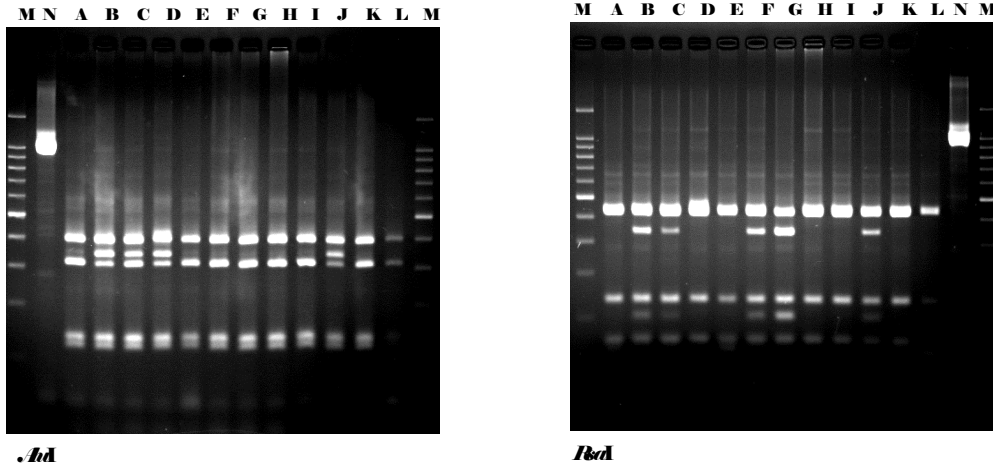
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase โดยใช้ Genomic DNA กุ้งกุลาดำเป็น template ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา RT-PCR ทั้ง 3 คู่ นั้นมี 1 คู่คือไพรเมอร์สำหรับยีน β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase นั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase ในการทดลอง ซึ่งจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยPCR ได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 400 bp และ 1,080 bp สำหรับยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase ตามลำดับ และจากการศึกษาเบื้องต้นของความหลากหลายทางพันธุกรรมกุ้งกุลาดำโดยใช้วิธี Restriction digestion ด้วย Restriction enzyme Alu I และ Rsa I พบว่ายีน Carbonic anhydrase มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่ายีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase (ภาพที่ 7 และ 8)

นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองหาความสัมพันธ์ของ Genotype ต่อความสามารถในการปรับตัวได้ดีในสภาพความเค็มต่ำของกุ้งกุลาดำ โดยเก็บตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงในสภาพความเค็มต่ำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่ได้ทดลอง RT-PCR แต่ในครั้งนี้ได้เพิ่มเวลาจนถึง 1 เดือน ซึ่งตัวอย่างที่ได้นี้ก็จะเป็นนำมาใช้ในการยืนยันผล RT-PCR ที่ได้จากการทดลองที่แล้วและเก็บดีเอ็นเอของกุ้งแต่ละตัวด้วยเพื่อใช้ในการศึกษา Genotype ของยีน ผลการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำแต่ละตัวไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase เมื่อตัดด้วย Restriction enzyme Alu I และ Rsa I แต่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน Carbonic anhydrase เมื่อตัดด้วย Restriction enzyme Rsa I (ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมที่มีนัยสำคัญเมื่อตัดด้วย Restriction enzyme Alu I) โดยเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 350 bp ซึ่งตัวอย่างกุ้งที่มีการตายก่อนครบ 48 ชั่วโมงจำนวน 9 ตัวพบชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว 6 ตัวอย่าง กุ้งที่มีการเก็บตัวอย่าง 1 อาทิตย์จำนวน 9 ตัวพบชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว 4 ตัวอย่าง กุ้งที่มีการเก็บตัวอย่าง 2 อาทิตย์จำนวน 9 ตัวพบชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว 6 ตัวอย่าง และกุ้งที่มีการเก็บตัวอย่าง 4 อาทิตย์จำนวน 9 ตัวพบชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวทุกตัว



ภาพที่ 7 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase ในดีเอ็นเอกุ้งกุลาดำเมื่อตัด PCR product (N) ด้วย Restriction enzyme Alu I และ Rsa I; M= DNA marker, A-D =ตัวอย่างดีเอ็นเอกุ้งกุลาดำ



ภาพที่ 8 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน Carbonic anhydrase ในดีเอ็นเอกุ้งกุลาดำเมื่อตัด PCR product (N) ด้วย Restriction enzyme Alu I และ Rsa I; M= DNA marker, A-M =ตัวอย่างดีเอ็นเอกุ้งกุลาดำ

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาปริมาณ mRNA ของ α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, carbonic anhydrase ในกุ้งกุลาดำที่ตอบสนองต่อการลดความเค็มน้ำโดยเทคนิค RT-PCR นั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความเฉพาะเจาะจงและสามารถทำ multiplex PCR ที่ให้ผลที่ดีในทั้ง 3 ยีน เมื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระยะเวลาพัฒนาของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำพบว่ายีน β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase มีปริมาณน้อยมาก ส่วนยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase มีการแสดงออกมากกว่า และยังพบอีกว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันในระยะ Nauplius, Mysis, Postlarva 5, Postlarva 15 และกุ้งหลังปล่อยลงบ่อดินอายุ 1 เดือน แต่ลูกกุ้งในระยะ Zoea พบการแสดงออกทั้ง 2 ยีนมากกว่าลูกกุ้งในระยะอื่น ซึ่งในระยะดังกล่าวอาจมีการพัฒนาอวัยวะที่ทำหน้าที่ในระบบ Osmoregulation หรืออวัยวะที่ยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับในระบบอื่นๆ ส่วนรูปแบบการแสดงออกของยีน α -subunit Na⁺/K⁺-ATPase, β -subunit Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase ในกุ้งกุลาดำที่ตอบสนองต่อการลดความเค็มน้ำโดยเทคนิค RT-PCR แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่อยู่ในสภาวะดังกล่าวของกุ้งไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นและลดลงในช่วงระยะเวลาต่างๆกัน ซึ่งควรจะมีการยืนยันผลอีกครั้งโดยการวัด Enzyme activity ของยีน Na⁺/K⁺-ATPase และ Carbonic anhydrase ในกุ้งกุลาดำที่อยู่ในน้ำความเค็มต่ำ นอกจากนี้ผลการศึกษา Genetic variation ของยีน Carbonic anhydrase ยังแสดงให้เห็นความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของยีนในกุ้งตัวอย่างที่สามารถมีชีวิตรอดได้ถึง 1 เดือนที่ระดับความเค็ม 3 ppt กับตัวอย่างกุ้งที่ตายก่อน 48 ชั่วโมงและตัวอย่างที่เก็บที่เวลา 1 และ 2 อาทิตย์ ซึ่งควรจะมีการยืนยันผลอีกครั้งด้วยการใช้ตัวอย่างกุ้งหลายๆชุดเพื่อให้แน่ใจว่าความแตกต่างดังกล่าวเกี่ยวข้องกับความสามารถในการปรับตัวของกุ้งจริงและสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการจีโนมกุ้งและทุนวิจัยหลังปริญญาเอกศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- ประจวบ หล้าอุบล. 2537. สรีรวิทยาของกุ้ง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. ISBN 974-553-105-7. 11 หน้า
- ยนต์ มุสิก และวรรณภา รัตนโกสีย์กิจ. 2525. ความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำของลูกกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2525 กองประมงน้ำจืด กรมประมง. 12 หน้า
- Cawthorne, D.F., Beard, T., Davenport, j. and Wickins, J.F. 1983. Responses of juvenile *Penaeus monodon* Fabricius to natural and artificial sea waters of low salinity. *Aquaculture*, 32: 65-174.
- Cooper, A. R. and Morris, S. 1997. Osmotic and ionic regulation by *Leptograpsus variegates* during hyposaline exposure and in response to emersion. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 214, 263-282.
- Corotto, F. S. and Holliday, C. W. 1996. Branchial Na, K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp. Biochem. Physiol.* 113A, 361-368.
- Henry, R. P. and Wheatly, M. J. 1992. Interaction of respiration, ion regulation and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Amer. Zool.* 32, 407-416.
- Lehnert, S. A., Wilson, K. J., Byrne, K. and Moore, S. S. 1999. Tissue-specific expressed tags from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 1, 465-476.
- Lucu, C. 1990. Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 97,297-306.
- Lucu, C. and Flik, G. 1999. Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *American Physiological Society* 0363-6119/99, R490-R499.
- Mantel, L., Farmer, L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In : Mantel, L. H. (Ed.), *The Biology of Crustacea*. Vol. 5. Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, New York, pp. 54-161.
- Morris, S. 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 979-989.
- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Jitrapakdee, S., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajorn, A. 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar. Biotechnol.* 4, 487-494.

Wuthisuthimethavee, S., P. Lumobol, A. Vanavichit and S. Tragoonrung. 2005. EST-based identification of genes expressed in the branchiae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *ScienceAsia* 31(2), 137-144.