ระดับการแสดงออกของยีน *transposase* ในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) วัยอ่อนที่ได้รับสาร 17β-estradiol (E_2)

Gene expression of *transposase* in juvenile horn snails (*Cerithidea cingulata*) exposed to 17β-estradiol

ศรีวิกาญจน์ กรุมรัมย์ และ ชูตา บุญภักดี*

Sreewikan Krumram and Chuta Boonphakdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

**Corresponding author: chuta@buu.ac.th*

บทคัดย่อ

ทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *transposase* ในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) วัยอ่อนที่ได้รับสาร 17β-estradiol (E_2) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน (endocrine disrupting chemicals, EDCs) ด้วยวิธีวิเคราะห์ปฏิกิริยาลูกโซ่ย้อนกลับ (RT-PCR) โดยใช้ซีดีเอ็นเอ (complementary DNA; cDNA) ที่ได้จากการลอกรหัสย้อนกลับของเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอ (messenger RNA; mRNA) ที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ได้รับสัมผัสสาร E_2 โดยวิธีการแช่ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม E_2 0 ng/L นาน 8, 16 และ 32 ชั่วโมง วัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR จากสัดส่วนการแสดงออกระหว่างยีน *transposase* กับยีนอ้างอิง 28S *rRNA* พบว่าเมื่อหอยเจดีย์วัยอ่อนสัมผัสสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L นาน 32 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของยีน *transposase* (0.23±0.03) มากกว่ากลุ่มควบคุม (0.18±0.02) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ดังนั้นควรทดสอบหอยเจดีย์วัยอ่อนให้ได้รับสัมผัสสาร E_2 ที่ระยะเวลานานขึ้นหรือใช้เทคนิคตรวจวัดเทคนิคอื่นที่มีความไว เพื่อประยุกต์ใช้ยีน *transposase* และหอยเจดีย์วัยอ่อนเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของสาร E_2 ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้

ABSTRACT

Analysis of gene expression of *transposase* in juvenile horn snails (*Cerithidea cingulata*) exposed to 17β-estradiol (E_2), the endrocrine disrupting chemicals (EDCs), by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was investigated in this study. Horn snail tissue total RNAs were prepared and mRNA (messenger RNA) was subsequently converted into a complementary DNA (cDNA) using a retroviral reverse transcriptase. The horn snails exposed to E_2 by immersion at 10 ng/L compared to the control group, E_2 at 0 ng/L, for 8, 16 and 32 hours were examined. Semi-quantitative RT-PCR was analyzed using the relative expression ratio between *transposase* and the reference gene, 28S *rRNA*. The results showed that the relative expression levels of juvenile horn snails exposed to E_2 at 10 ng/L for 32 hours were 0.23±0.03, higher than that of the control group (0.18±0.02), but no statistically significant difference (P>0.05). Therefore, the E_2 exposure time of the juvenile horn snails should be extended or use other sensitivity techniques. This could be a crucial factor for *transposase* and juvenile horn snails to be used as a sensitive biomarker of exposure for detecting E_2 contamination of the aquatic environments.

คำสำคัญ: หอยเจดีย์, *Cerithidea cingulata*, E_2, semi-quantitative RT-PCR, *transposase*

Keywords: horn snail, *Cerithidea cingulata*, E_2, semi-quantitative RT-PCR, *transposase*

บทนำ

17β-estradiol (E_2) เป็นสารเอสโตรเจน (estrogen) อยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่สังเคราะห์จากระบบสืบพันธุ์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาการเจริญเติบโตและการสร้างอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ (Curieux-Belfond, *et al.*, 2005) โดยเป็นสารสื่อกลางที่มีตัวรับสัญญาณคือ เอสโตรเจนรีเซปเตอร์ อยู่ภายในเซลล์ (Canesi *et al.*, 2004) ทั้งนี้ร่างกายสามารถขับ E_2 ส่วนเกินออกได้ทางปัสสาวะและทางอุจจาระ ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จาก E_2 ในด้านต่าง ๆ เช่นการทำธุรกิจฟาร์มสัตว์ที่นิยมฉีดให้กับสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและให้เนื้อในปริมาณที่มากกว่าปกติ การฉีด E_2 ให้กับกลุ่มปลานิล (*Oreochromis* spp.) เพื่อเร่งการตกไข่ในปลาเพศเมียและใช้ในการแปลงเพศจากเพศผู้ให้กลายเป็นเพศเมีย (เรณู ว่องส่งสาร และนพนันท์ อยู่รอง, 2549) รวมถึงเป็นสารประกอบในยาคุมกำเนิด เป็นต้น ทั้งนี้มนุษย์และสัตว์มีการปลดปล่อยของเสียต่างๆ ที่มี E_2 ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งน้ำ ตามรายงานของ Duong *et al.* (2010) พบว่าสารในกลุ่มเอสโตรเจนมีการปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำของประเทศไทยเฉลี่ย 14.4 ng/L โดยมี E_2 ปนเปื้อนอยู่ที่ระดับ 7.5±0.5 ng/L ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

หอยเจดีย์ *(Cerithidea cingulata)* เป็นหอยฝาเดียวขนาดเล็ก กินสิ่งเล็กๆ ที่กำลังเติบโตหรือตกตะกอนอยู่บนพื้นโคลนเช่น ไดอะตอม แบคทีเรียและเศษซากเป็นอาหาร พบแพร่กระจายมากในบริเวณที่มีน้ำตื้นในบริเวณหาดโคลนของป่าชายเลนจึงมีโอกาสได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสาร E_2 จากแหล่งน้ำโดยตรง (Kim and Lee, 2009) เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาในส่วนของยีนที่สร้างเอนไซม์ Transposase (Tnp) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อมีปัจจัยภายนอกมากระตุ้นนำไปใช้ในกระบวนการ transposition เคลื่อนย้ายและสอดแทรกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอให้อยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ บนโครโมโซม (Carpentier *et al.*, 2011) โดยใช้หอยเจดีย์วัยอ่อนทดสอบความไวเพิ่มเติมจากที่รายงานโดยณัฐกานต์ โพไพจิตร และคณะ (2555) เพื่อนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของ E_2 ในแหล่งน้ำ โดยให้หอยเจดีย์รับสัมผัสสาร E_2 นาน 8, 16 และ 32 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 ng/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มี E_2 วัดระดับการแสดงออกของยีน *transposase* โดยใช้ยีน 28S *rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. **การเตรียมตัวอย่างหอยเจดีย์ที่ใช้ในการทดลอง**

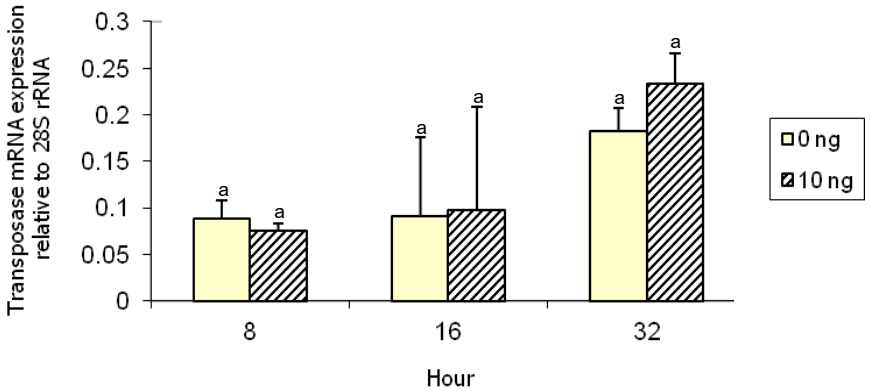
เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์วัยอ่อนความยาวของเปลือก 1.3 - 1.5 เซนติเมตร ที่กระจายอยู่ตามหาดโคลนบริเวณหาดเกาะลอย ตำบลเกาะลอย อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ทำความสะอาดหอยเจดีย์แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำทะเลสังเคราะห์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพแล้วแบ่ง 2 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว นำมาทดสอบโดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมเลี้ยงในน้ำทะเลไม่มี E_2 (0 ng/L) และกลุ่มที่ 2 ได้รับสัมผัสสาร E_2 ความเข้มข้น 10 ng/L แช่ไว้เป็นเวลา 8, 16 และ 32 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นนำหอยเจดีย์มากะเทาะเปลือกออก ศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. **วัดระดับการแสดงออกของยีน *transposase* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR**

สกัดอาร์เอ็นเอจากหอยเจดีย์ตัวอย่างทดสอบ ด้วยสารละลาย TRIzol reagent (Invitrogen, USA) ใช้อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัมสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเตส (reverse transcriptase) เพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *tranposase* และยีนอ้างอิง 28S *rRNA* ด้วยเทคนิค PCR เริ่มจากขั้นตอน predenature ที่อุณหภูมิ 94 °C, 3 นาที denature ที่ 94 °C, 30 วินาที annealing ที่ 50 °C, 50 วินาที extension ที่ 72 °C, 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extention ที่ 72 °C นาน 15 นาที ผลผลิต PCR ที่ได้นำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสและบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตด้วยชุดอุปกรณ์ gel documentation (Syngene, USA) วัดระดับการแสดงออกของยีนโดยเทียบสัดส่วนการแสดงออกระหว่างยีน *transposase* กับยีนอ้างอิง 28S *rRNA* วิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tool (Syngene, USA) และความแปรปรวนทางสถิติเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มทดลองใช้วิธี Paired-Samples T-Tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

เมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *transposase* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR เทียบเคียงจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของหอยเจดีย์วัยอ่อน (n = 3-6) ที่แช่สาร E_2 10 ng/L เป็นเวลา 8, 16 และ 32 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับหอยเจดีย์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ E_2 (0 ng/L) พบว่าในกลุ่มที่สัมผัสสาร E_2 ที่ระดับ 10 ng/L เป็นระยะเวลานาน 32 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกของยีน *transposase* เท่ากับ 0.23±0.03 มากกว่ากลุ่มควบคุม 0.05±0.01 เท่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.18 ±0.02 แต่พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เช่นเดียวกับที่ระดับการแสดงออกของยีนจากการวัดที่ระยะเวลา 8 และ 16 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับสาร E_2 10 ng/L และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 สัดส่วนการแสดงออกของยีน *transposase* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 28S *rRNA* ของหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ได้รับสาร E_2 ความเข้มข้น 0 และ 10 ng/L เป็นระยะเวลา 8, 16 และ 32 ชั่วโมง (a= ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P>0.05 ทดสอบด้วยวิธี Paired-Samples T-Tests)

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *transposase* ในหอยเจดีย์วัยอ่อนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร E_2 (0 ng/L) กับกลุ่มที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลา 8, 16 และ 32 ชั่วโมง พบว่าหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L เป็นเวลานาน 32 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *transposase* สูงกว่ากลุ่มควบคุม0.05±0.01เท่า แต่ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) อาจเป็นเพราะช่วงเวลาที่ทดสอบให้หอยเจดีย์สัมผัสสาร E_2 นี้สั้นเกินไป ดังรายงานของณัฐกานต์ โพไพจิตร และคณะ (2555) ที่ทดสอบกับหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ระยะเวลา 7 วัน ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR เหมือนกันนี้ พบว่า E_2 ความเข้มข้น 10 ng/L สามารถชักนำให้ยีน *transposase* แสดงออกเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ E_2 เท่ากับ 0.16±0.05 เท่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังนั้น การยืนยันว่าหอยเจดีย์วัยอ่อนและยีน *transposase* จะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสาร E_2 ได้ที่ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 10 ng/L นั้นควรให้หอยเจดีย์ได้รับสัมผัสสาร E_2 มากกว่า 32 ชั่วโมง หรือควรทำการทดสอบซ้ำด้วยเทคนิคที่มีความไวมากกว่าเทคนิค semi-quantitative RT-PCR เช่น real-time PCR ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน *transposase* ที่วัดได้จะสามารถใช้เป็นสัญญาณเตือนถึงระดับการปนเปื้อนของ E_2 ที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำได้

เอกสารอ้างอิง

เรณู ว่องส่งสาร และนพนันท์ อยู่รอง. คู่มือการผลิตปลานิลแปลงเพศ. 2549. อุดรธานี: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี.

ณัฐกานต์ โพไพจิตร, ชูตา บุญภักดี และรุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์. เครื่องหมายชีวโมเลกุลในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร 17β-estradiol (E_2) ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ. Thai Journal of Genetics. 2555;5(2):159-165.

Canesi L, Ciacci C, Betti M, Lorusso LC, Marchi B, Burattini S, Falcieri E, Gallo G. Rapid effects of 17β-estradiol on cell signaling and function of *Mytilus hemocytes.* General and Comparative Endocrinology. 2004;136:58-71.

Carpentier G, Jaillet J, Pflieger A, Adet J, Renault S, Auge-Gouillou C. Transposase-transposase interactions in MOS1 complexes: A biochemical approach. Journal of Molecular Biology. 2011; 405:892-908.

Curieux-Belfond OL, Fievet B, Seralini GE, Mathieu M. Short-term bioaccumulation, circulation and metabolism of 17β-estradiol in the oyster *Crassostrea gigas.* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2005;325:125-133.

Duong CN, Ra JS, Cho J, Kim SD, Choi HK, Park JH, Kim KW, Inam E, Kim SD. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven asian countries. Chemosphere. 2010;78:286-293.

Kim E K, Lee JS. Ultrastructural description on oogenesis of the melania snail, *Semisulcospira libertine* (Gastropoda: Pleuroceridae). Korean Journal Malacology. 2009;25:145-151.