

## การโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cyp19a* ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

### Cloning and Partial Sequencing of *cyp19a* of Sea Bass (*Lates calcarifer*)

พิจิตรา ศรีพัฒน์ยศ และ ชุตตา บุญภักดี\*

Pijitra Sripudyo and Chuta Boonphakdee\*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

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

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

#### บทคัดย่อ

การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cyp19a* (Cytochrome P450 Aromatase A) ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ทำโดยการสกัดดีเอ็นเอจากตับของปลากะพงขาวตัวเต็มวัย เพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *cyp19a* ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ได้ผลผลิตมีขนาดเท่ากับ 629 คู่เบส เมื่อทำการโคลน อ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าส่วนของยีนที่เพิ่มจำนวนได้ประกอบด้วยแอกซอน (exon) จำนวน 3 แอกซอน ขนาด 90, 154 และ 162 คู่เบส ตามลำดับ และอินทรอน (intron) จำนวน 2 อินทรอน ขนาด 96 และ 127 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำเฉพาะส่วนของแอกซอนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (ณ วันที่ 25 ธันวาคม 2555) พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 92% กับ mRNA ของยีน *cyp19a* ของปลา *Dicentrarchus labrax* (GenBank accession no. AJ311177) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับยีน *cyp19a* ของปลาชนิดอื่นด้วยแผนผัง Phylogenetic tree สามารถระบุว่ายีนที่เพิ่มจำนวนได้เป็นบางส่วนของยีน *cyp19a* ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้ศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์และประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons และสารเอสโตรเจนได้

#### ABSTRACT

Cloning and partial sequencing of *cyp19a* (Cytochrome P450 Aromatase A) of sea bass (*Lates calcarifer*) were studied. DNA was extracted from liver tissue of adult sea bass and *cyp19a* was then amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). The *cyp19a* amplicons were cloned and subsequently sequenced revealing that the obtained *cyp19a* gene was 629 bp in length. The partial *cyp19a* gene structure comprises 3 exons (90, 154 and 162 bp, respectively) and 2 introns (96 and 127 bp, respectively). The amplified exonic DNA regions compared to the GenBank database revealed highly similarity (92% identity) with the *cyp19a* mRNA of *Dicentrarchus labrax* (GenBank accession no. AJ311177; retrieved on December 25, 2012). Analysis of the *cyp19a* and those of the other teleosts by phylogenetic tree confirmed that the amplified DNA fragment is *cyp19a*. The result from this study provides information that will lead in further analysis of the complete *cyp19a* gene structure. The *cyp19a* gene segment can also be applied to use as a molecular biomarker for screening of the estrogenic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in the aquatic environment.

**คำสำคัญ:** ยีน *cyp19a*, ไซโตโครม พี450 อะโรมาเตส เอ, ปลากะพงขาว

**Keywords:** *cyp19a*, cytochrome P450 aromatase A, *Lates calcarifer*/ sea bass

## บทนำ

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch; Sea bass) เป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในบริเวณปากแม่น้ำ จึงมีโอกาสสัมผัสกับสารที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำโดยเฉพาะสารเคมีบางชนิด เช่น polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) และสารในกลุ่มเอสโตรเจน (Humphrey *et al.*, 2007) ซึ่งสาร PAHs เป็นสารเริ่มต้นของสารก่อมะเร็ง (Precarcinogen) และเป็นสารเคมีที่จัดอยู่ในกลุ่ม Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) ที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในสัตว์น้ำที่อาศัยในแหล่งปนเปื้อน คือ ยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้การแบ่งเซลล์ผิดปกติ มนุษย์ที่ได้รับสัมผัสสารดังกล่าวที่ผิวหนังและปอดจะเป็นมะเร็งได้ (วิสิฐศักดิ์ วุฒิอดิเรก, 2543) ดังนั้นจึงสามารถขับปลากะพงขาวที่อาศัยอยู่ในน้ำเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเมื่อมีการปนเปื้อนของสารชนิดดังกล่าวในแหล่งน้ำได้

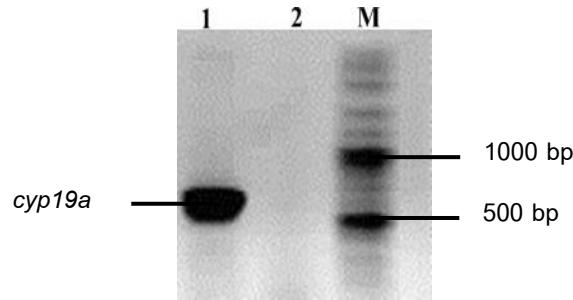
ยีน *cyp19a* (Cytochrome P450 Aromatase A) เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารสเตียรอยด์ที่พบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งแสดงออกในรูปของเอนไซม์อะโรมาเตส (aromatase) เอนไซม์ตัวสุดท้ายในวิถีของการสร้างสารสเตียรอยด์ มีทำหน้าที่เปลี่ยนแอนโดรเจน (androgen) ไปเป็นเอสโตรเจน (estrogen) (Kanda *et al.*, 2006) ดังนั้นการเริ่มศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างของยีน *cyp19a* ในปลากะพงขาว จึงเป็นขั้นเริ่มต้นก่อนที่จะทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของยีน และประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของแหล่งน้ำต่อไปได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

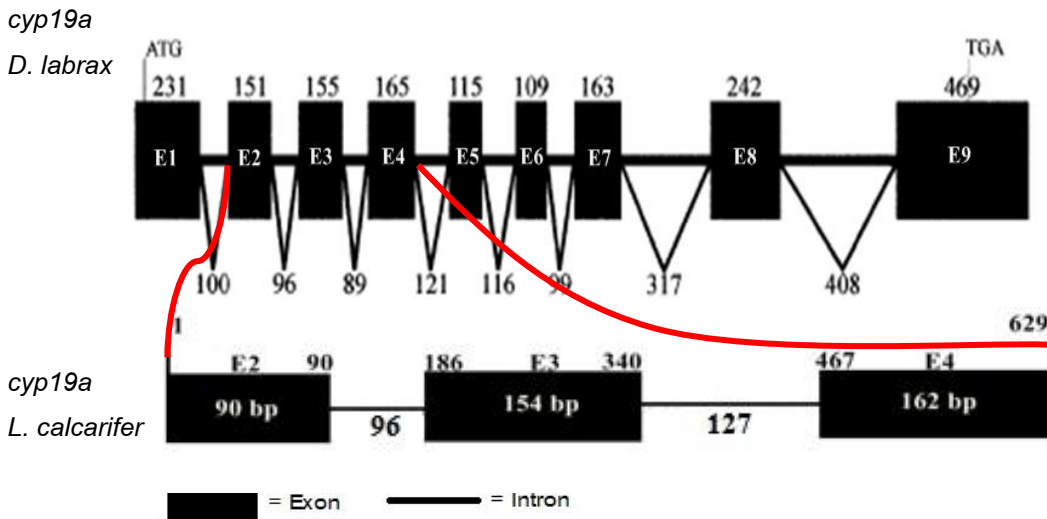
สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับของปลากะพงขาว โดยใช้ GF-I tissue DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ปฏิกริยา PCR เริ่มจากขั้นตอน pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที, denature ที่ 94 °C, 30 วินาที, annealing ที่ 50 °C, 50 วินาที, extension ที่ 72 °C, 30 วินาที จำนวน 35 รอบและ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 15 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis แล้วบันทึกภาพ จากนั้นนำผลผลิต PCR มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T-Easy (Promega, USA) แล้วนำไปทรานสฟอร์มเข้าเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  สกัดพลาสมิดแล้วส่งอ่านลำดับเบสกับบริษัท 1st BASE (Malaysia) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำลำดับเบสที่เทียบเคียงมาศึกษาความสัมพันธ์โดยสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA version 5.05 วิธี Neighbor-Joining โดยใช้โมเดล Kimura-2 parameter และสุ่มข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง

## ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของปลากะพงขาวด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิตขนาดเท่ากับ 629 คู่เบส (รูปที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 92% กับยีน *cyp19a* ของปลา *Dicentrarchus labrax* (GenBank accession No. AJ311177) (ไม่ได้แสดงผล) โครงสร้างของยีน *cyp19a* ที่เพิ่มจำนวนได้ประกอบด้วยแอกซอนจำนวน 3 แอกซอนมีขนาด 90, 154 และ 162 คู่เบสตามลำดับ และอินทรอนจำนวน 2 อินทรอน มีขนาด 96 และ 127 คู่เบสตามลำดับ ทั้งนี้ปรากฏรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (genomic DNA) ของยีน *cyp19a* ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 1,822 คู่เบส ในปลา *D. labrax* ซึ่งอยู่ในอันดับ Perciformes เช่นเดียวกันกับปลากะพงขาว (Valle *et al.*, 2002) มีจำนวนแอกซอน 9 แอกซอนและ 8 อินทรอน เมื่อเทียบเคียงกันพบว่ายีนของปลากะพงขาวที่ศึกษาเป็นบริเวณของแอกซอน 2-4 (รูปที่ 2) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในแอกซอนมีลักษณะเป็นแบบอนุรักษ์ที่สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในขั้นตอนต่อไปได้ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของยีน *cyp19a* ของปลาทั้งสองชนิด พบว่าลำดับเบสในบริเวณอินทรอนนั้นมีความแตกต่างกันซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกในระดับสกุลหรือบ่งชี้ชนิดของปลาในอันดับ Perciformes ได้

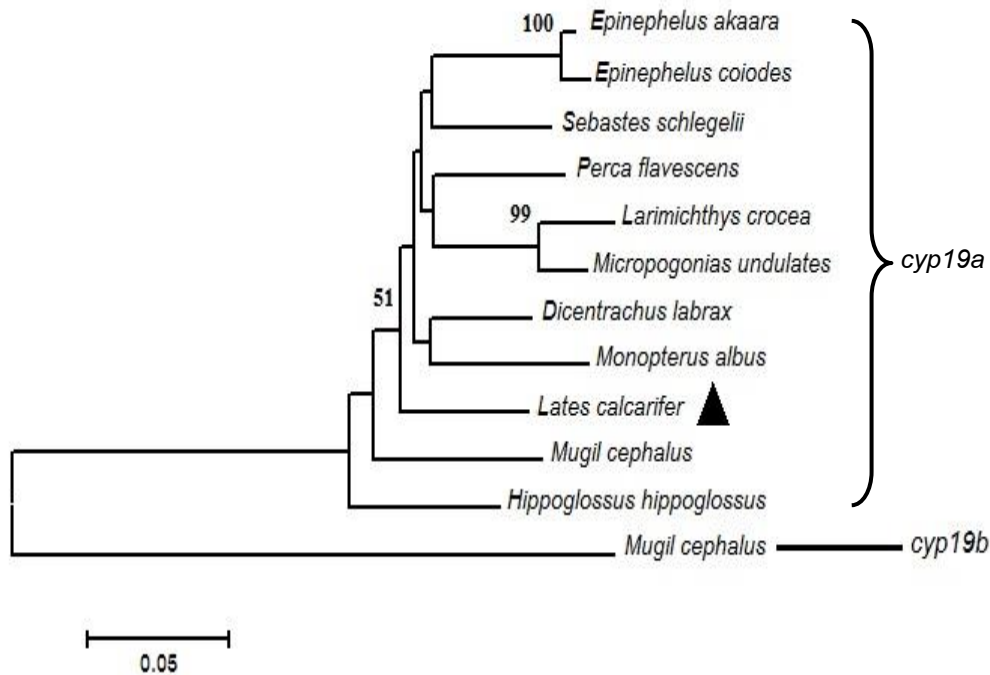


**รูปที่ 1** ผลผลิต PCR บริเวณยีน *cyp19a* ของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ตรวจสอบ ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7% ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที (1 = *cyp19a*, 2 = negative control, M = 100bp DNA ladder)



**รูปที่ 2** เปรียบเทียบส่วนของยีน *cyp19a* ของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ศึกษา กับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน *cyp19a* ของปลา *D. labrax* (GenBank accession no. AJ311177)

เมื่อยืนยันชนิดของยีน ด้วยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ของยีน *cyp19a* ของปลากะพงขาวเทียบกับยีนอื่นจำนวน 11 ข้อมูลร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้และยีน *cyp19b* ของปลา *Mugil cephalus* สร้าง phylogenetic tree พบว่ายีน *cyp19a* ของปลากะพงขาวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน *cyp19a* ของปลากะพงขาวทั้ง 11 ข้อมูล และแยกออกจากยีน *cyp19b* ของปลา *M. cephalus* อย่างชัดเจน (รูปที่ 3) ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าเป็นยีน *cyp19a* ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cyp19a* ที่ทราบจากการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ และประยุกต์ใช้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนสำหรับเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารในกลุ่มเอสโตรเจนหรือ petroleum hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons ในแหล่งน้ำดังกล่าวงานการศึกษาของ Humphrey *et al.* (2007) ได้ เป็นต้น



**รูปที่ 3** แผนผัง phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสในส่วนของยีน *cyp19a* ที่ศึกษา ตัวเลขบนกิ่ง = ค่าความเหมือนในการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง แสดงค่า >50%; ▲ = ข้อมูลของปลากะพงขาวที่ได้จากศึกษา

**สรุปผลการทดลอง**

สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *cyp19a* จาก genomic DNA ของปลากะพงขาวมีขนาดเท่ากับ 629 คู่เบส โครงสร้างของยีนประกอบไปด้วยแอกซอนจำนวน 3 แอกซอนที่มีขนาด 90, 154 และ 162 คู่เบส ตามลำดับ และอินทรอนจำนวน 2 อินทรอน ที่มีขนาด 96 และ 127 คู่เบส ตามลำดับ

**เอกสารอ้างอิง**

วิไลรัฐศักดิ์ วุฒิมิตเรก. สารก่อมะเร็งจากอาหารปิ้งย่าง ทอด. 2554. วันที่สืบค้นข้อมูล 11 มกราคม 2556. เข้าถึงได้จากเว็บไซต์ [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_toxic/a\\_tx\\_1\\_001c.asp?info\\_id=77](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=77).

Humphrey CA, King CS, Klumpp WDA. multibiomarker approach in barramundi (*Lates calcarifer*) to measure exposure to contaminants in estuaries of tropical North Queensland. Marine Pollution Bulletin. 2007;54:1569-1581.

Kanda H, Okubo T, Omori N, Niihara H, Matsumoto N, Yamada K, Yoshimoto S, Ito M, Yamashita S, Shiba T, Takamatsu N. Transcriptional regulation of the rainbow trout *CYP19a* gene by FTZ-F1 homologue. Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2006;99:85-92.

Valle DL, Lunardi L, Colombo L, Belvedere P. European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization. Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2002;80:25-34.