เครื่องหมายชีวโมเลกุลในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร 17β-estradiol (E_2) ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ

The molecular marker of exposure in the horn snail (*Cerithidea cingulata*) for determining 17β-estradiol (E_2) contamination in aquatic environments

ณัฐกานต์ โพไพจิตร[1,2] ชูตา บุญภักดี[1,2,3]* และ รุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์[3]

Nuttakan Popijit[1,2], Chuta Boonphakdee[1,2,3]* and Rungwit Chaijirawong[3]

[1]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี (อพบ) กรุงเทพฯ 10400

[2]โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาบูรพา ชลบุรี 20131

[1]The Center of Excellence on Environmental Health, Toxicology and Management of Chemicals (ETM), Bangkok 10400, Thailand

[2]Environmental Science Graduate Program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

[3]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

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

บทคัดย่อ

ค้นหาเครื่องหมายชีวโมเลกุลเพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม endocrine disrupting chemicals (EDCs) ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำด้วยเทคนิค cDNA-AFLP กับหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) ตัวเต็มวัยที่ได้รับสาร 17β-estradiol (E_2) โดยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 100 ng/l เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร E_2 สามารถคัดเลือกแถบ cDNA-AFLP ที่ปรากฏในกลุ่มที่ได้รับสาร E_2 คือ “217_AFLP” ผลการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด (46%identity) กับยีน transposase ของปูMarbled crab (*Pachygrapsus marmoratus*) ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ “217_AFLP” เปรียบเทียบกับยีนควบคุมภายใน 28S rRNA จากเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยด้วยวิธี semi-quantitative PCR พบว่าทั้งหอยเจดีย์เพศเมียและเพศผู้ที่ได้รับสาร E_2 ที่ความเข้มข้น 10 ng/l เป็นเวลานาน 7 วัน มีระดับการแสดงออกเท่ากับ 1.45±0.06 และ 1.27±0.18 ตามลำดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.45±0.01 และ 0.61±0.06 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังนั้นเครื่องหมาย “217_AFLP” และหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีความไวสำหรับติดตามตรวจสอบการ

ปนเปื้อนของสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

ABSTRACT

To search for a molecular marker of exposure for the detection of estrogenic-endocrine disrupting chemicals (e-EDCs) contaminated in aquatic environments, cDNA-AFLP method was performed in horn snail (*Cerithidea cingulata*). DNA banding differences between the mature horn snails exposed to 100 ng/l 17β-estradiol (E_2) and the control group (no E_2) were determined. A cDNA-AFLP fragment designated "217_AFLP" appeared only in the E_2-treated animals was then selected. The deduced amino acid sequences of the "217_AFLP" aligned against the GenBank database showed high similarity (46% identities) to a transposase gene of the Marbled crab (*Pachygrapsus marmorats*). Semi-quantitative RT-PCR was analyzed using the relative expression ratio between the "217_AFLP" and the 28S rRNA from foot tissue of mature horn snails. The results showed that the relative expression levels of mature females and males exposed to E_2 at 10 ng/l for 7 days were 1.45±0.06 and 1.27±0.18, respectively, which were significantly higher than that of the control group (0.45±0.01 and 0.61±0.06, respectively, $P<0.05$). Therefore, the "217_AFLP" in mature horn snails can be used as a sensitive biomarker of exposure for detecting E_2 contamination in aquatic environments.

คำสำคัญ: หอยเจดีย์, เครื่องหมายชีวโมเลกุล, *Cerithidea cingulata*,17β-estradiol, E_2

Keywords: horn snail, biomarker, *Cerithidea cingulata*, 17β-estradiol, E_2

บทนำ

17β-estradiol (E_2) เป็นสารเอสโตรเจนในกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนมีคุณสมบัติเป็น endocrine disrupting chemicals (EDCs) E_2 เกิดจากการสังเคราะห์ทางธรรมชาติของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีความสำคัญต่อการพัฒนาการเจริญเติบโตและการสร้างระบบสืบพันธุ์ (Curieux-Belfond *et al*., 2005) แต่บทบาทของ E_2 ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นยังไม่ชัดเจน ปัจจุบัน E_2 ถูกใช้เป็นองค์ประกอบของยาเม็ดคุมกำเนิดของมนุษย์ในปศุสัตว์มีการนำมาใช้ เพื่อเปลี่ยนเพศสัตว์ให้เป็นเพศเมีย หรือเหนี่ยวนำให้เป็นสัด และใช้คุมกำเนิดสัตว์จำพวกวัว ควาย และหมู ภายหลังได้รับการผสมพันธุ์แล้ว (Lucas and Jones, 2006) ทั้งนี้มนุษย์และสัตว์มีการปลดปล่อยของเสียต่างๆ ที่มี E_2 ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำ จากรายงานของ Duong *et al*. (2010) พบว่าสารกลุ่มเอสโตรเจนมีการปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำของประเทศไทยเฉลี่ย 14.4 ng/l โดยมี E_2 ปนเปื้อนอยู่ที่ระดับ 7.5±0.5 ng/l ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

ปัจจุบันดัชนีทางชีวภาพที่บ่งชี้การปนเปื้อนของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำนั้น นิยมใช้สัตว์มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะสัตว์จำพวกปลา เช่น gilt-head seabream (*Sparus aurata*) มาใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่ผลิตโปรตีน transthyretin และ vitellogenin โดยเปรียบเทียบแหล่งอาศัยระหว่างสภาพปกติและสภาวะที่มี E_2 ปนเปื้อน (Funkenstein *et al*., 2000) แต่สำหรับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นนิยมใช้หอยหลายชนิดเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของสารเอสโตรเจน เช่น หอยนางรม และหอยแมลงภู่ เป็นต้น เนื่องจากมีจำนวนประชากรมาก มีขนาดเล็ก ง่ายที่จะนำมา

ทดลองศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Canesi *et al*., 2004)หอยเจดีย์(horn snail; *Cerithidea cingulatea*) เป็นหอยฝาเดียวที่มีขนาดเล็ก พบแพร่กระจายบริเวณหาดโคลน ชายฝั่งที่อยู่ระหว่างน้ำขึ้นน้ำลง ปากแม่น้ำ และแนวป่าชายเลนในประเทศไทย ดังนั้นจึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโอกาสได้รับสัมผัสกับน้ำเสียที่ถูกปล่อยลงสู่ทะเล หอยเจดีย์จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบสารในกลุ่มของ EDCs ที่ปนเปื้อนมากับน้ำเสีย ร่วมกับการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่มีรายงานว่า สามารถตรวจสอบได้แม้มีการปนเปื้อนปริมาณน้อยประมาณ 0.1 ng/l (Canesi *et al*., 2004) ได้

งานวิจัยนี้จะค้นหาเครื่องหมายชีวโมเลกุลในหอยเจดีย์ ที่ตอบสนองต่อสาร E_2 โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP โดยยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายดังกล่าว ด้วยการวัดระดับการแสดงออกในหอยเจดีย์ที่แช่สาร E_2 ความเข้มข้น 10 และ 100 ng/l เป็นเวลา 7 วัน เพื่อจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างหอยเจดีย์

ตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัย (ความยาวของเปลือกประมาณ 2 เซนติเมตร มีจำนวนวงของเปลือกตั้งแต่ 5 วงขึ้นไป) เก็บจากหาดจ้าวหลาว ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2554 แยกเพศเป็นเพศผู้และเพศเมียกลุ่มละ 270 ตัวอย่าง นำมาพักโดยเลี้ยงไว้ในตู้กระจกขนาด 20x20x20 cm^3 ตู้ละ 40 ตัว รวมเพศละ 3 ตู้ โดยแต่ละตู้นำมาทดสอบดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเลี้ยงในน้ำทะเลที่มี 0.08% DMSO (E_2 0 ng/l) (เตรียม stock ของสารละลาย E_2 โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย) กลุ่มที่ 2 และ 3 ได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/l ตามลำดับและเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 7 วัน โดยนำหอยเจดีย์แต่ละกลุ่มทดลองมาแยกเนื้อเยื่อส่วนเท้ากลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ (n=3) ในแต่ละซ้ำใช้ตัวอย่างหอยเจดีย์ 5 ตัวรวมกัน แล้วนำมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสำเร็จ RNeasy Mini Kit ตามวิธีที่แนะนำโดย Qiagen (Germany) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอ 500 ng มาสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ในปริมาตรสุทธิ 20 µl โดยใช้ชุด AMV-Reverse Transcriptase ตามวิธีที่แนะนำโดย Vivantis Technologies (Malaysia)

การค้นหาเครื่องหมายชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP

นำ cDNA ของตัวอย่างหอยเจดีย์ในแต่ละกลุ่มจากขั้นแรก 8 ไมโครลิตร มาตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ 65 ºC เป็นเวลา 20 นาที นำมาต่อกับ adapter บ่มที่ 4ºC ข้ามคืน แล้วนำไปใช้ในการทำ PCR 2 ครั้ง คือครั้งที่ 1 (pre-selective amplification) เริ่มจากอุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR 20 รอบที่ 94°C นาน 30 วินาที, 54°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาที ตามด้วยที่ 72°C นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาครั้งที่2(selective amplification) โดยเจือจาง ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาแรก 20 เท่า นำมาทำ PCR 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 ทำ touch-down PCR เริ่มจากอุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR 11 รอบ ที่ 94°C นาน 30 วินาที, 65°C นาน 1 นาที (อุณหภูมิในขั้นนี้ลดลงรอบละ 0.7°C) และที่ 72°C นาน 40 วินาที จากนั้นเข้าสู่ช่วงที่ 2 โดยทำปฏิกิริยา PCR 25 รอบที่ 94°C นาน 30 วินาที, 60°C นาน 1 นาที และ 72°C

นาน 40 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิที่ 72°C นาน 3 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 3% ใน Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 2.30 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml นาน 15 นาที ถ่ายภาพเพื่อคัดเลือกแถบของดีเอ็นเอที่เหมือนกันในตัวอย่างที่แช่ E_2 แต่ไม่ปรากฏในกลุ่มควบคุม จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอมาโคลน นำไปหาลำดับเบส แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำมาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่มีความจำเพาะมากขึ้น

ระดับการแสดงออกของเครื่องหมาย 217_AFLP ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของเครื่องหมาย “217_AFLP” ด้วยวิธี semi-quantitative PCR โดยเทียบเคียงเป็นสัดส่วนระหว่าง “217_AFLP” กับยีนควบคุม 28S rRNA ทำโดยนำ cDNA ของหอยเจดีย์เพศเมียและเพศผู้ แต่ละกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสาร E_2 โดยแช่ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ng/l และกลุ่มควบคุม (0 ng/l) เป็นระยะเวลา 7 วัน มาเพิ่มปริมาณ cDNA โดยวิธี PCR และวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 % ภายใต้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที และวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Gene Tool (USA) ระดับการแสดงออก (expression ratio) คำนวณได้จากสูตร

$$\text{Expression ratio} = \frac{\text{ความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย}}{\text{ความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีนควบคุม}}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

การค้นหาเครื่องหมายชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของผลผลิต cDNA-AFLP ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสจากเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสัมผัสสาร E_2 ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ng/l เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มที่แช่ E_2 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส (Figure 1) เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปโคลนและหาลำดับเบสแล้วเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด (46% identity) กับยีน transposase ของปูMarbled crab (*Pachygrapsus marmoratus*) (accession no. CAJ76996) จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับใช้ตรวจสอบศักยภาพของเครื่องหมายต่อไป ซึ่งผลผลิตที่ได้มีขนาดเท่ากับ 217 คู่เบส จึงให้ชื่อเครื่องหมายชีวโมเลกุลที่ได้นี้ว่า “217_AFLP”

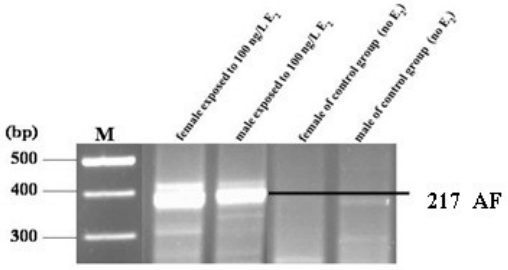

Figure 1 Appearance of the distinct cDNA-AFLP bands of the female and the male mature horn snails exposed to 100 ng/l 17β-estradiol (E_2) and their absence in the control groups (no E_2).

ผลของ E_2 ต่อระดับการแสดงออกของ 217_AFLP

เมื่อทดสอบให้หอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทั้งเพศเมียและเพศผู้ได้รับ E_2 แตกต่างกัน 3 ระดับความเข้มข้นนาน 7 วัน พบว่า E_2 ชักนำระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ทั้งสองระดับความเข้มข้นคือ 10 และ 100 ng/l ที่ 1.45±0.06 และ 0.9±0.18 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.45±0.01) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกันในเพศผู้ที่ได้รับ E_2 ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ng/l มีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.27±0.18 และ 1.75±0.16 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.61±0.06) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Figure 2)

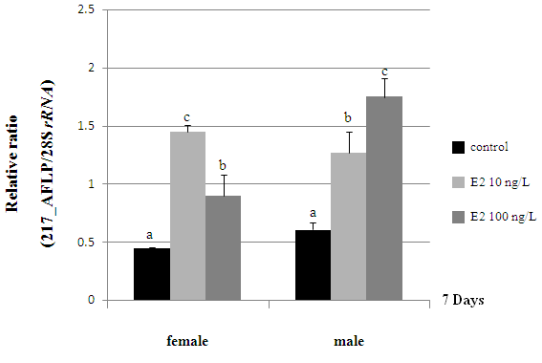

Figure 2 Expression of 217_AFLP normalized by 28S *rRNA* of female and male mature horn snails exposed to E_2 at 0 (control), 10 and 100 ng/l for 7 days. Error bars are standard deviation. Different letters within the same group indicate that data are significantly different at P<0.05.

การพัฒนาเครื่องหมายชีวโมเลกุลเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสาร E_2 ในครั้งนี้ เลือกหอยเจดีย์เป็นต้นแบบ เนื่องจากหอยเจดีย์เป็นหอยฝาเดียวที่มีขนาดเล็กเป็นสัตว์ประจำท้องถิ่น มีการแพร่กระจายในบริเวณชายฝั่งที่อยู่ระหว่างน้ำขึ้นน้ำลง ปากแม่น้ำ และแนวป่าชายเลน (Richard, 1984) จึงจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสัมผัสกับน้ำเสียที่ปล่อยสู่แหล่งน้ำ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของสารใน estrogenic compound ที่ปนมากับน้ำเสีย กอปรกับหอยเจดีย์มีปริมาณมากและกระจายตัวอยู่ทั่วไป ดังนั้นหอยเจดีย์จึงเหมาะสมในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในปัจจุบันเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ศึกษากับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพมีด้วยกันหลากหลายวิธี ทั้งทางเคมี ชีวโมเลกุล เป็นต้น แต่เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่วัดในระดับ mRNA นั้นสามารถตรวจสอบได้ไว ซึ่งเป็นขั้นตอนลอกรหัสก่อนที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ (cell differentiation) ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีตรวจวัดการปนเปื้อนสารในกลุ่ม E_2 ด้วยตัวบ่งชี้ทางชีวภาพโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลหลายวิธี เช่น เทคนิค microarray, real-time PCR และเทคนิค serial analysis of gene expression (SAGE) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายสูง และขั้นตอนการวิเคราะห์ซับซ้อน แต่การวัดในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA แล้วเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ดังการศึกษาในครั้งนี้ให้ประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับเทคนิคอื่นที่มีราคาแพง (Chao *et al*., 2010) การวิเคราะห์ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ จึงทำได้อย่างกว้างขวาง ในการทดลองนี้ใช้ยีน 28S rRNA เป็นยีนควบคุม สำหรับเทียบเคียงวัดระดับการแสดงออกเป็นสัดส่วนในเทคนิค semi-quantitative RT-PCR เนื่องจากรายงานส่วนใหญ่พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน 28SrRNA ไม่มีความแปรปรวนในทุกสภาวะ (Zhong and Simons, 1999) สำหรับ

ในประเทศไทย Duong *et al*. (2010) ได้วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม estrogen และค่า estrogenicity ในบริเวณผิวน้ำของแม่น้ำแม่กลอง ในปี ค.ศ. 2008 พบว่ามี E_2 ปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้น 7.5±0.5 ng/l ถึงแม้จะพบในปริมาณน้อย แต่สาร E_2 ก็สามารถส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตได้ ดังเช่นรายงานของ Hansen et *al.* (1998) ที่พบว่า E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/l มีผลชักนำให้ระบบสืบพันธุ์ของปลาเทราท์เพศผู้มีการพัฒนาก่อนถึงวัยอันควร

อนึ่งเครื่องหมาย 217_AFLP ที่คัดเลือกได้เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนมากที่สุดกับยีน transposase ของปู Marbled crab (*Pachygrapsus marmoratus*) ที่ 46% ทั้งนี้ปู Marbled crab และหอยเจดีย์นั้นจัดอยู่ในไฟลัมที่ต่างกัน จึงทำให้มีค่าความเหมือนต่ำเครื่องหมาย 217_AFLP ที่พบจึงยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีนชนิดใด และบนฐานข้อมูล GenBank มีข้อมูลของหอยเจดีย์น้อยมาก ถ้ามีการศึกษาในระดับจีโนมของสิ่งมีชีวิตมากขึ้น ก็น่าจะสามารถระบุประเภทของ 217_AFLP ได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ยีน transposase ที่เทียบเคียงได้ใกล้เคียงมากที่สุดนี้ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ transposase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ transposition แทรกสอดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่จากตำแหน่งหนึ่งในโครโมโซม ไปยังตำแหน่งใหม่ของโครโมโซมเดียวกันหรือต่างกันได้ (Carpentier *et al*., 2011) Siah *et al*. (2011) พบว่าในหอยกาบ soft-shell (*Mya arenaria*) เมื่อยีน transposase มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้เกิดโรค “Disseminated Neoplasis” โดยเซลล์มีการทำงานผิดปกติ มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มสูงกว่าสภาวะปกติ และเกิดกระบวนการไมโทซิสมากกว่าสภาวะปกติ ส่งผลให้เกิดเนื้องอกและมีความเป็นไปได้ที่อาจจะเกิดผลกระทบดังกล่าวกับสัตว์ชนิดอื่นๆ รวมถึงมนุษย์ที่นำสัตว์ดังกล่าวไปบริโภค หรืออาจเกิดขึ้นโดยตรงกับมนุษย์

การศึกษาครั้งนี้ ในเบื้องต้นพบว่าเครื่องหมาย 217_AFLP ในหอยเจดีย์มีความเหมาะสมต่อการใช้บ่งชี้การปนเปื้อนของสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ โดยทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA จากเนื้อเยื่อเท้าของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับ E_2 เนื่องจากเท้าเป็นอวัยวะแรกที่รับสัมผัสกับสาร E_2 สามารถตัดแยกออกจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ และสกัดอาร์เอ็นเอได้ง่าย อนึ่ง การที่พบว่า 217_AFLP ในหอยเจดีย์เพศเมียมีการแสดงออกลดลงเมื่อได้รับ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/l นาน 7 วัน แตกต่างจากหอยเจดีย์เพศผู้ อาจเนื่องมาจากหอยเจดีย์เพศเมียมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่ได้รับ E_2 ปริมาณมากในช่วงระยะเวลา 7 วันนี้ หรืออาจเกิดจาก E_2 ก่อให้เกิดการเสียหายต่อการทำงานในระดับเซลล์ ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ลดลง ดังนั้นในขั้นต่อไปควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อร่วมด้วย จะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย 217_AFLP และ E_2 ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น รวมถึงทำการทดลองเพิ่มเติมในช่วงระยะเวลาสั้นลง ใช้หอยเจดีย์ตัวเต็มวัยไม่ต้องแยกเพศซึ่งไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ชำนาญ ก็จะเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในภาคสนามต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการจัดการบริหารสารเคมี และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนส่วนหนึ่งอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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

Carpentier, G., Jaillet, J., Pflieger, A., Adet, J., Renault, S. and Auge-Gouillou, C. 2011. Transposase-transposase interactions in MOS1 complexes: abiochemical approach. *Mol Biol* 405: 892–908.

Chao, Y., Zhang, M., Feng, Y., Yang, X. and Islam, E. 2010. cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in zinc hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance under zinc induction. *Environ Exp Bot.* 68: 107–112.

Curieux-Belfond, O.L., Fievet, B., Seralini, G.E. and Mathieu, M. 2005. Short-term bio accumulation, circulation and metabolism of 17β-estradiol in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Bio Ecol* 325: 125–133.

Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, S.D., Choi, H.K., Park, J.H., Kim, K.W., Inam, E. and Kim, S.D. 2010. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere* 78: 286–293.

Funkenstein, B., Bowman, C.J., Denlow, N.D., Cardinali, M. and Carnevali, O. 2000. Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. *Mol Cell Endocrinol* 16: 33–41.

Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M. and Blaise, C.H. 1998. Vitellogenin-a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Analyt Chem* 17:448–451.

Lucas, S.D. and Jones, D.L. 2006. Biodegradation of estrone and 17β-estradiol in grassland oils amended with animal wastes. *Soil Biol Biochem* 38: 2803–2815.

Richard, S.H. 1984. Revision of higher taxa in genus *Cerithidea* (mesogastropoda: potamididae) based on comparative morphology and biological data. *Am Malacol Bull* 2: 1–20.

Siah, A., McKenna, P., Danger, J.M., Johnson, G.R. and Berthe, F.C.J. 2011. Induction of transposase and polyprotein RNA levels in disseminated neoplastic hemocytes of soft-shell clams: *Myaarenaria*. *Dev Comp Immunol* 35: 151–154.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. and Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291–295. Daddy

Zhong, H. and Simons, J.W. 1999. Direct comparison of GAPDH, beta-Actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 523–526.