โครงสร้างบางส่วนของยีน *cyp1a* ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

The Partial Structure of *cyp1a* Gene of Sea Bass (*Lates calcarifer*)

วราลี งามดี และ ชูตา บุญภักดี*

Varalee Ngamdee 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

คณะผู้วิจัยทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cyp1a* (cytochrome P450, family 1, subfamily A) ของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตับ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ผลผลิตที่ได้มีขนาด 649 คู่เบส เมื่อนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* DH5α และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความเหมือนมากที่สุด 95% (127/134, E value = 2e-50) (ข้อมูล ณ วันที่ 15 เมษายน 2556) กับยีน *cyp1a* ของปลา *Lateolabrax japonicus* ในฐานข้อมูล GenBank (GenBank accession no. GU373806) โครงสร้างของยีน *cyp1a* ที่เพิ่มจำนวนได้ประกอบด้วยแอกซอน (exon) จำนวน 3 แอกซอน ขนาด 134, 88 และ 126 คู่เบส ตามลำดับ และอินทรอน (intron) จำนวน 2 อินทรอน ขนาด 91 และ 210 คู่เบส ตามลำดับ การทราบโครงสร้างและลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาวจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำไปศึกษาต่อในระดับการแสดงออกของยีนและประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ในแหล่งน้ำได้

ABSTRACT

In this study, the DNA fragment of *cyp1a* (cytochrome P450, family 1, subfamily A) gene of sea bass (*Lates calcarifer*) was cloned and sequenced. DNA was isolated from liver and amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). The *cyp1a* amplicons, 649 bp in length were then inserted into pGEM®-T Easy plasmid and transformed into *Escherichia coli* DH5α competent cells. The partial *cyp1a* gene sequences of sea bass showed highly similarity (95% identity (127/134, E value = 2e-50)) (retrieved on April 15, 2013) with sea perch (*Lateolabrax japonicus*) (GenBank accession no. GU373806). The *cyp1a* gene structure comprises 3 exons (134, 88 and 126 bp, respectively) and 2 introns (91 and 210 bp, respectively). This partial structure and sequences of *cyp1a* gene can apply to study the expression levels and used as a useful biomarker of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons contaminated in the aquatic environment.

คำสำคัญ: ปลากะพงขาว, *cyp1a*, *Lates calcarifer*

Keywords: sea bass, *cyp1a*, *Lates calcarifer*

บทนำ

CYP (cytochrome P450) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ขนาดใหญ่ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาทางเคมีหลายชนิด เช่น hydroxylation, epoxidation และ oxidative/reductive dehalogenation สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ พืช และสัตว์ ทั้งนี้มีรายงานการพบยีน *cyp1a* (cytochrome P450, family 1,subfamily A) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบยีน *cyp1a* จำนวน 2 ชนิด คือ ยีน *cyp1a1* และ *cyp1a2* (Goldstone and Stegemen, 2006) โดยยีน *cyp1a* มีหน้าที่หลักในการเปลี่ยนสารเคมีที่ได้รับจากแหล่งภายนอก เช่น สารในกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) ที่ปนเปื้อนในแหล่งอาศัยไปเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำและสามารถขับออกจากร่างกายได้ง่าย ยีน *cyp1a* จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพถึงการปนเปื้อนของสาร PAHs ในแหล่งน้ำ (สุดา อิทธิสุภรณ์รัตน์, 2552)

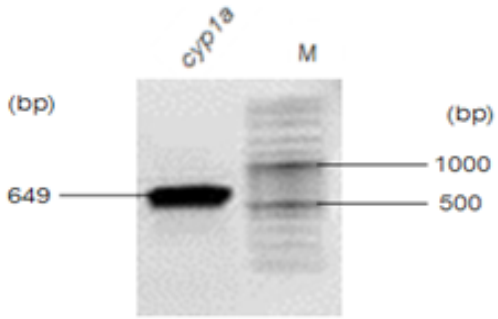
ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch; Sea bass) เป็นปลากระดูกแข็งชนิดหนึ่งที่อาศัยทั้งในน้ำกร่อยและน้ำทะเล ปลาชนิดนี้จัดว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยและเป็นที่นิยมบริโภค แต่ในปัจจุบันนี้ เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงประสบปัญหาเรื่องพ่อ-แม่พันธุ์ที่มีคุณภาพและประชากรของปลากะพงขาวในแหล่งน้ำธรรมชาติลดจำนวนลง สาเหตุประการหนึ่งคือ แหล่งเพาะเลี้ยงได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของมลพิษที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรม (ปราโมทย์ แก้วมณี, 2555) ดังนั้นการเริ่มต้นศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างบางส่วนของยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาวที่ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อนจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพได้

วิธีการทดลอง

นำปลากะพงขาวเพศเมียตัวเต็มวัย จากสะพานปลา ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี มาตัดแยกเนื้อเยื่อตับ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จ GF-1 tissue DNA extraction kit ตามวิธีของบริษัท Vivantis (Malaysia) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cyp1a* ด้วยเทคนิค PCR ที่ประกอบด้วยขั้นตอน initial denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที, denaturation อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, annealing อุณหภูมิ 48°C นาน 50 วินาที, Extension อุณหภูมิ 72°C นาน 30 วินาที และ final extension อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที โดยมีจำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำผลผลิต PCR มาต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM®T-easy ตามวิธีของบริษัท Promega (USA) ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* DH5α จากนั้นคัดเลือกและสกัดพลาสมิดสายผสม และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st BASE (Malaysia) นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.1.3.0 ตรวจสอบและยืนยันชนิดของยีนที่เพิ่มจำนวนได้ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ณ วันที่ 15 เมษายน 2556 ด้วยโปรแกรม BLAST จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เทียบเคียงมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter ให้ค่าการสุ่ม (bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5

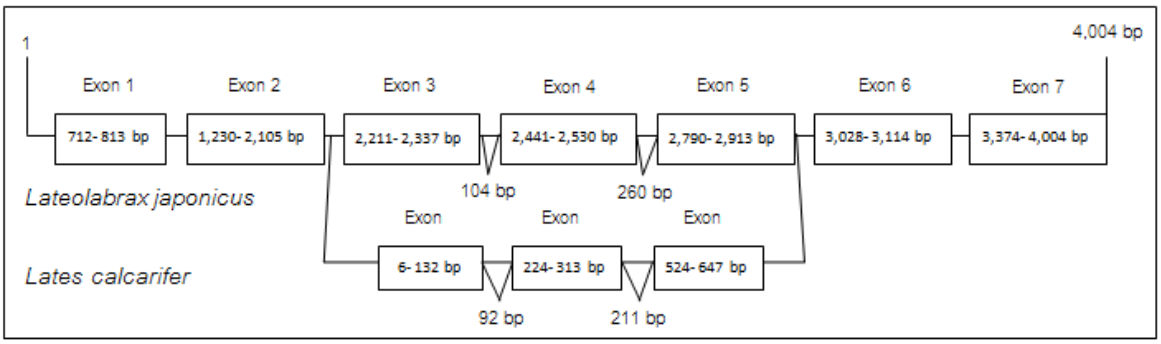
ผลการทดลอง

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของยีน *cyp1a* ที่สกัดจากปลากะพงขาวด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิตขนาดเท่ากับ 649 คู่เบส (รูปที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าเป็นส่วนของยีน *cyp1a* โดยเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank เหมือนสูงที่สุด 95% (E value = 2e-50) กับยีน *cyp1a* ของปลาซีเพิร์ช *Lateolabrax japonicus* GenBank accession no. GU373806 (ไม่ได้แสดงผล) โครงสร้างของยีนในส่วนที่เพิ่มจำนวนได้นี้ประกอบด้วยแอกซอน (exon) จำนวน 3 แอกซอน ขนาด 134, 88 และ 126 คู่เบส ตามลำดับ และอินทรอน (intron) จำนวน 2 อินทรอน ขนาด 91 และ 210 คู่เบส ตามลำดับ โดยแอกซอนแรกและลำดับถัดไปอีก 2 แอกซอนของยีน *cyp1a* ที่เพิ่มจำนวนได้นี้ตรงกับแอกซอนที่ 3, 4 และ 5 ของยีน *cyp1a* ที่สมบูรณ์ของปลา *L. japonicus* ที่มีขนาด 4,004 คู่เบส ประกอบด้วย 7 แอกซอน และ 6 อินทรอน

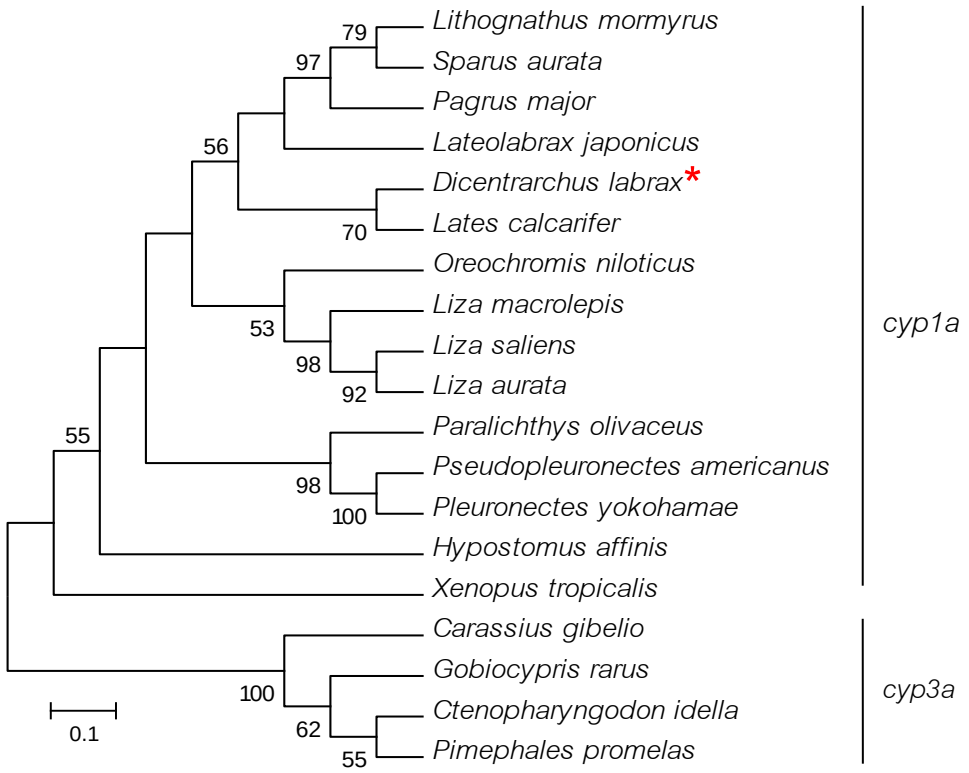


รูปที่ 1 ผลผลิต PCR บริเวณยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาวขนาด 649 คู่เบส เมื่อทำอิเล็กโตรโฟริซีสโดยใช้เจลความเข้มข้น 0.7% ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (M = 100 bp Plus DNA Marker)

เนื่องจากผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาวกับฐานข้อมูล GenBank มักเทียบเคียงได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น cDNA ซึ่งถอดรหัสย้อนกลับมาจาก mRNA ที่ไม่มีส่วนของอินทรอนเหมือนกับข้อความทางพันธุกรรมบนสายดีเอ็นเอ ดังนั้นการยืนยันชนิดของยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาวที่ยังไม่มีรายงานศึกษานี้จึงต้องใช้ข้อมูลเฉพาะส่วนที่เป็นแอกซอนของปลากะพงขาวที่มีขนาดทั้งหมด 348 คู่เบส (รูปที่ 2) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cyp1a* จาก mRNA ของปลากระดูกแข็งชนิดอื่นจำนวน 13 ข้อมูล และของกบจำนวน 1 ข้อมูล (*Xenopus tropicalis*) และยีน *cyp3a* ของกระดูกแข็งชนิดอื่นอีกจำนวน 4 ข้อมูล ไปสร้างแผนผังความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งสามารถระบุได้ว่า ยีน *cyp1a* ที่เพิ่มจำนวนได้นี้เป็นยีน *cyp1a* โดยจะเห็นว่ายีน *cyp1a* ของปลากะพงขาวจัดอยู่ในเคลด (clade) เดียวกับยีน *cyp1a* ของปลากระดูกแข็งชนิดอื่นและของกบ และแยกออกจากเคลดของยีน *cyp3a* ของปลา กระดูกแข็งชนิดอื่นๆ (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ขนาด 649 คู่เบส กับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน *cyp1a* ของปลาซีเพิร์ช (*L. japonicas*, GenBank accession no. GU479924) ขนาด 4,004 คู่เบส (▭ หมายถึง exon และ —— หมายถึง intron)



รูปที่ 3 แผนผัง phylogenetic tree ของยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาว (*) ปลากระดูกแข็งชนิดอื่น กบ (*X. tropicalis*) (HQ018040) และยีน *cyp3a* ของปลากระดูกแข็งชนิด จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยวิธี Neighbor-Joining จากโปรแกรม MEGA version 5 โดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter.

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของยีน *cyp1a* ขนาด 649 คู่เบส ด้วยเทคนิค PCR มีความเหมือนสูงสุด 95 % กับ mRNA ของปลาซีเพิร์ช *L. japonicus* GenBank accession no. GU373806 แต่เมื่อนำไปทำแผนผัง phylogenetic tree จะเห็นได้ว่าปลากะพงขาวมีความใกล้ชิดมากที่สุดกับปลา *Dicentrarchus labrax* ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการนำเฉพาะส่วนที่เป็นแอกซอนของทุกข้อมูลซึ่งมีขนาด 348 คู่เบส มาสร้างแผนผัง phylogenetic tree โครงสร้างของยีน *cyp1a* ประกอบด้วยแอกซอนจำนวน 3 แอกซอน ขนาด 134, 88 และ 126 คู่เบส ตามลำดับ และอินทรอนจำนวน 2 อินทรอน ขนาด 91 และ 210 คู่เบส ตามลำดับ โดยแอกซอนแรกและลำดับถัดไปอีก 2 แอกซอนของยีน *cyp1a* ที่เพิ่มจำนวนได้นี้ตรงกับแอกซอนที่ 3, 4 และ 5 ของยีน *cyp1a* ที่สมบูรณ์ของปลาซีเพิร์ช *L. japonicus* ที่มีขนาด 4,004 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยแอกซอนจำนวน 7 แอกซอน และอินทรอนจำนวน 6 อินทรอน เหมือนกับปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลานิล *Oreochromis niloticus*, *Platichthys flesus* และ *Anguilla japonica* (Aoki *et al*., 1999; Williams *et al*., 2000; Hassanin *et al*., 2009) บริเวณแอกซอนมีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอนุรักษ์ที่สามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมต่อไปได้ ดังเช่น An *et al*. (2011) ที่เพิ่มจำนวนบางส่วนของยีน *cyp1a* ในปลา *Liza haematocheila* ได้จาก cDNA ที่มีขนาด 580 คู่เบส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของปลาชนิดอื่น ๆ ร่วมกัน ดังนั้นการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนนี้สามารถนำไปศึกษาต่อ เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน *cyp1a* ของปลากะพงขาวต่อไปได้ในอนาคต รวมถึงระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับสารในกลุ่ม PAHs เช่น β-Naphthoflavone (BNF) ที่ระดับความเข้มข้น 50 mg/kg สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *cyp1a* ในปลา *Salvelinus fontinalis* และ *Salvelinus namaycush* มากกว่าปกติ (Rees and Li, 2004) และนำไปประยุกต์ใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของ PAHs ในแหล่งน้ำ

เอกสารอ้างอิง

ปราโมทย์ แก้วมณี. สิ่งแวดล้อมเป็นพิษทำ "ปลากะพงขาว" ในกระชัง ต.เกาะยอ ตายเกลื่อน. 2555. วันที่ค้นข้อมูล 28 ธันวาคม 2555, เข้าถึงได้จาก http://www.matichon.co.th.

สุดา อิทธิสุภรณ์รัตน์. *CYP1A* ดัชนีตรวจวัดการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตเลียมในสิ่งแวดล้อม. Green Research. 2552; 6(12):26-29.

An L, Hu J, Yang M, Zheng B, Wei A, Shang J, Zhao X. *cyp1a* mRNA expression in red eye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay, China. Marine Pollution Bulletin 2011; 62:718-725.

Aoki J, Takao I, Hironori K, Mamoru S. Isolation and sequence analysis of the eel cytochrome P450 1A1. Gene. Mar. Biotechnol. 1999;1:371-375. Goldstone HM, Stegeman JJ. A revised evolutionary history of the CYP1A subfamily: gene duplication, gene conversion, and positive selection. J Mol Evol. 2006; 62:708-717.

Hassanin IAA, Kaminishi Y, Osman MMM, Abdel-Wahad HZ, El-Kady HA Itakura T. Cloning and sequence analysis of benzo-a-pyrene-inducible cytochrome P450 1A in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). African Journal of Biotechnology. 2009; 8(11):2545-2553.

Rees BC, Li W. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. Aquatic Toxicology. 2004; 66:357-368.

Williams DT, Lee JS, Sheader LD, Chipman KJ. The cytochrome P450 1A gene (CYP1A) from European flounder (*Platichthys flesus*), analysis of regulatory regions and development of a dual luciferase reporter gene system. Marine Environmental Research. 2000; 50:1-6.