

## การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไวเทลโลจีนิน (*vtg*) ของปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*)

### Cloning and Partial Sequencing of Vitellogenin Gene (*vtg*) of Sea Bass (*Lates calcarifer*)

ศศิธร ฝอยหิรัญ และ ชุตตา บุญภักดี\*

Sasithorn Foyhirun 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

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างบางส่วนของยีนไวเทลโลจีนิน (*vtg*) ในปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ผ่านการโคลนและอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน *vtg* ที่เพิ่มจำนวนได้นั้นมีขนาดเท่ากับ 733 คู่เบส โครงสร้างของยีนประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *vtg* ที่สมบูรณ์ของปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) ตรงกับ exon ที่ 29, 30, 31 และ 32 ตามลำดับ และมีความเหมือนสูงสุด 90% (360/400; E-value = 5e-52) กับ vitellogenin Ab mRNA ของปลา *Dicentrarchus labrax* (GenBank accession no. JQ283442) (ข้อมูล ณ วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2556) และยืนยันชนิดของยีนได้เป็น *vtg B* จากแผนผัง phylogenetic tree ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะและขยายพันธุ์ปลากระพงขาว รวมถึงการวัดระดับการแสดงออกของยีน และประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพติดตามการปนเปื้อนของสารในกลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals; e-EDCs) ในแหล่งน้ำได้

#### ABSTRACT

The aim of the present work was to study partial nucleotide sequences and structure of the amplified vitellogenin gene (*vtg*) of sea bass (*Lates calcarifer*) by Polymerase Chain Reaction (PCR). The *vtg* amplicons were cloned and then sequenced revealing that the obtained *vtg* gene was 733 bp in length. The partial *vtg* gene structure comprises 4 exons and 3 introns compared to the complete *vtg* gene of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The amplified exonic DNA regions were correlately revealed in exons 29, 30, 31 and 32 of the rainbow trout *vtg* gene. The sea bass *L. calcarifer* *vtg* sequences showed highly similarity (90% identity (360/400; E-value = 5e-52)) with the vitellogenin Ab mRNA of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (GenBank accession no. JQ283442; retrieved on February 25, 2013). The *vtg* gene of sea bass was later confirmed by phylogenetic tree showing the obtained gene is *vtg B*. This study can be applied to improve fish breeding and propagation of cultivated fish and gene expression studies. The *vtg* gene can be used as a genetic biomarker for early screening of the estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals (e-EDCs) contamination in the aquatic environment.

คำสำคัญ: ปลากระพงขาว, ไวเทลโลจีนิน, *vtg*

Keywords: *Lates calcarifer*, vitellogenin, *vtg*

## บทนำ

โปรตีนไวเทลโลจีนิน (vitellogenin; VTG) เป็นองค์ประกอบตั้งต้นในการสร้างโปรตีนไข่แดงหรือโปรตีนโยล์ค (yolk protein) ในสิ่งมีชีวิตที่ออกลูกเป็นไข่โปรตีน VTG สังเคราะห์ขึ้นที่เนื้อเยื่อตับภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะลำเลียงผ่านกระแสเลือดไปสะสมที่เซลล์ไข่เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการพัฒนาของเอ็มบริโอ กระบวนการสร้างและสะสมโปรตีนโยล์คจะทำให้เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อถึงสภาวะที่เหมาะสมจึงทำการวางไข่ (Wang and Lou, 2006) ดังนั้นโปรตีน VTG จึงมีความสำคัญอย่างมากสำหรับการสืบพันธุ์ของปลาโดยปลากะพงขาว (*Latescal carifer* Bloch; Sea bass) เป็นปลากะตุกแข็งจัดอยู่ในครอบครัว Latidae เป็นปลาน้ำกร่อยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากว่าปลากะพงขาวเลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดีและขายได้ราคา ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีผู้สนใจทำการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นจำนวนมาก ทำให้ลูกพันธุ์ปลาที่รวบรวมได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติไม่เพียงพอกับความต้องการและไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้ (กรมประมง, 2531) ดังนั้นการศึกษาข้อความทางพันธุกรรมในส่วนของยีน *vtg* ในปลากะพงขาวจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในด้านการเพาะและขยายพันธุ์และใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสาร e-EDCs (estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals) ได้

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลากะพงขาว

นำปลากะพงขาวเพศเมียตัวเต็มวัยมาตัดแยกเนื้อเยื่อตับแล้วบดให้ละเอียดจากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 tissue DNA extraction kit ตามวิธีของบริษัท Vivantis (Malaysia)

### 2. การเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน *vtg* ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

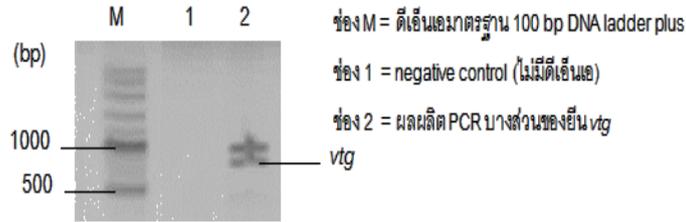
นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยขั้นตอน predenature ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที, denature ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 50 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที

### 3. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *vtg* และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

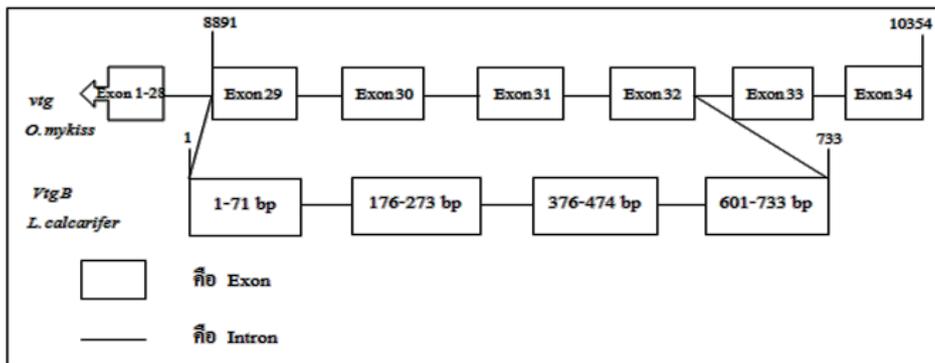
นำผลผลิต PCR มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T easy ของบริษัท Promega (USA) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* แล้วจึงคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ High speed plasmid mini kit ตามคำแนะนำของบริษัท Geneaid (Taiwan) แล้ววิเคราะห์ลำดับเบสโดยบริษัท 1<sup>st</sup> BASE (Malaysia) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรวจสอบเพื่อยืนยันผลและเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลากะตุกแข็งที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST และสร้างแผนผัง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.05 ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter ด้วยการสุ่มข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง

## ผลการทดลองและวิจารณ์

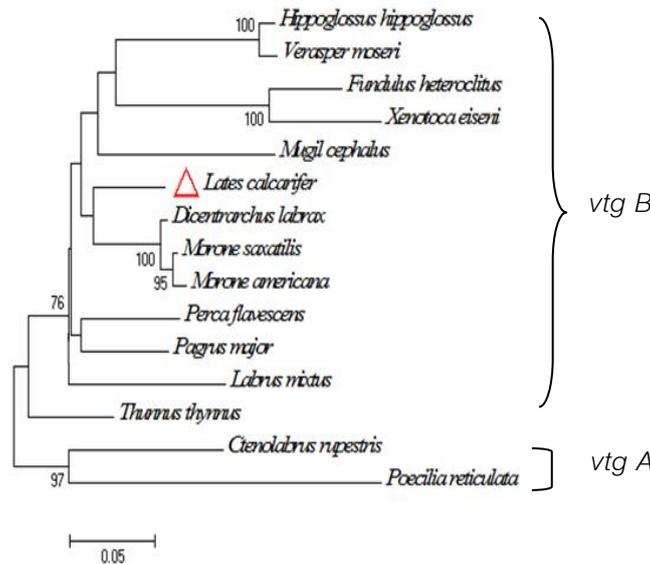
เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *vtg* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิต PCR จำนวน 2 แถบ นำเฉพาะแถบล่างซึ่งมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส ไปวิเคราะห์ต่อ (รูปที่ 1) เมื่ออ่านลำดับเบสแล้วเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 90% (360/400; E-value = 5e-52) กับ vitellogenin Ab mRNA ของปลา *Dicentrarchus labrax* ซึ่งโครงสร้างของยีน *vtg* ที่เพิ่มจำนวนได้ประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron ทั้งนี้ ในฐานข้อมูล GenBank มีรายงานโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน *vtg* เฉพาะในปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*) ประกอบด้วย 34 exon (GenBank accession no. X92804) เมื่อเทียบเคียงกับปลาเรนโบว์เทราต์ พบว่าโครงสร้างของยีน *vtg* ที่เพิ่มจำนวนได้ในปลากะพงขาวตรงกับ exon ที่ 29-32 ของปลาเรนโบว์เทราต์ (รูปที่ 2) และเมื่อยืนยันชนิดของยีนอีกครั้งด้วยการทำ phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลากะพงขาวที่ศึกษาครั้งนี้ร่วมกับข้อมูลของยีน *vtg* ของปลากะตุกแข็งชนิดอื่นยืนยันได้ว่าในส่วนของยีน *vtg* ที่ศึกษานี้เป็นยีน *vtg B* (รูปที่ 3)



**รูปที่ 1** ผลผลิต PCR ในส่วนของยีน vtg ของปลากะพงขาวภายหลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ความเข้มข้น 0.7% ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที



**รูปที่ 2** โครงสร้างของยีน vtg ขนาด 733 bp ของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron เทียบเคียงตรงกับ exon ที่ 29-32 ของยีน vtg ที่สมบูรณ์ของปลาเรนโบว์เทราต์ (*O. mykiss*)



**รูปที่ 3** Phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน vtg ของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*;  $\Delta$ ) กับยีน vtg B ของปลากะตักเข้บนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ยีน vtg A ของปลา *Ctenolabrus rupestris* และ *Poecilia reticulata* เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม สร้างโดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.05 วิธี Neighbor-Joining โมเดล Kimura 2-parameter ตัวเลขบนกิ่ง = ค่าความเหมือนแสดงเป็น % ในการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

### สรุปผลการทดลอง

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *vtg* ของปลากะพงขาวด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิตขนาด 733 คู่เบส ประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron เป็นบริเวณที่ตรงกับ exon ที่ 29-32 ของปลาเรนโบว์เทราต์เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ exon กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนสูงสุด 90% ( $E\text{-value} = 5e\text{-}52$ ) กับ vitellogenin Ab mRNA ของปลา *D. labrax* ทั้งนี้จากการศึกษาของ Reading *et al.* (2009) พบว่าโปรตีน VTG ที่พบในปลากะพงขาวมีหลายรูปแบบ เช่น VTG A, VTG B และ VTG C และมีหน้าที่ต่างกัน ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าส่วนของยีนที่เพิ่มจำนวนได้เป็นยีน *vtg B* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน VTG B ชนิดที่พบได้ทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีหน้าที่ช่วยในการลอกตัวในน้ำของเซลล์ไข่ และจะสลายไปในระหว่างที่ไข่กำลังพัฒนา ข้อมูลบางส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะและขยายพันธุ์ปลากะพงขาว นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหรือ biomarker ในการตรวจสอบติดตามการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม e-EDCs ในแหล่งน้ำ (ธนากร แสงสง่า และ ชูตา บุญภักดี, 2554) ดังที่มีการศึกษาแล้วในปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) ซึ่งยีน *vtg* ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของการปนเปื้อน e-EDCs ในแหล่งน้ำที่เป็นแหล่งรองรับน้ำทิ้งจากโรงพยาบาลน้ำเสีย โดยพบว่า e-EDCs ที่ปนเปื้อนทำให้ปลาคาร์พ มีระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เพิ่มมากขึ้น (Solé *et al.*, 2001)

### เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว. ฝ่ายประมงสารนิเทศ กองส่งเสริมประมง. 2531. หน้า 62.
- ธนากร แสงสง่า และชูตา บุญภักดี. ยีนที่สร้างไวเทลโลจีนินและโปรตีนโซนาเรติเอต้าในปลา: ตัวชี้วัดทางชีวภาพของสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน (e-EDCs) ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์ มช. 2554;39(3):364-74.
- Reading BJ, Hiramatsu N, Sawaguchi S, Matsubara T, Hara A, Lively MO, Sullivan CV. Conserved and variant molecular and function features of multiple egg yolk precursor proteins (vitellogenins) in white perch (*Morone americana*) and other teleosts. *Marine Biotechnology*. 2009;11:169-87.
- Solé M, Porte C, Barceló D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving water using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trends in Analysis Chemistry*. 2001;20:518-25.
- Wang YS, Lou SW. Structural and expression analysis of hepatic vitellogenin gene during ovarian maturation in *Anguilla japonica*. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2006;100:193-201.