บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BGJ/19/2544

ชื่อโครงการ : การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยเป๋าฮื้อเขตร้อน ชนิด *Haliotis asinina*

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: รองศาสตราจารย์ ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย กรุงเทพฯ

e-mail : dirarri@chula.ac.th

นาย ปิติ อ่ำพายัพ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ e-mail : amparyup@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 28 กันยายน 2544 ถึง 27 กันยายน 2546

จากการค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค RT-PCR , amplified fragment length polymorphism (AFLP), expressed sequence taq (EST) and subtractive cDNA เมื่อทำการค้นหายีน DMRT1 ของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบยีนนี้มีการแสดงออกเฉพาะในอัณฑะ แต่ไม่แสดงออกในรังไข่ของหอยเป๋าฮื้อ และจากการใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 224 คู่ผสมของ *Eco*RI / *Mse* I ไพรเมอร์ โดยใช้ดีเอ็นเอเพศผู้ 2 กลุ่ม (M1 = 10 และM2 = 8) และเพศเมีย 2 กลุ่ม (F1 = 10 และF2 = 8) พบเครื่องหมาย AFLP ที่จำเพาะต่อเพศผู้จำนวน 7 เครื่องหมาย และเพศเมียจำนวน 7 เครื่องหมาย และนำเครื่องหมายทั้งหมดไปโคลน หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และได้คัดเลือกโคลนมาออกแบบเครื่อง SCAR ของเพศผู้จำนวน 2 เครื่องหมาย และเพศเมียจำนวน 4 เครื่องหมาย จากผลพบว่าเครื่องหมาย SCAR ทั้งหมดสามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งในดีเอ็นเอของหอยเป๋าฮื้อทั้งเพศผู้ และเพศเมีย.

จากการสร้างห้องสมุด cDNA ทั้งห้องสมุด Normal cDNA และห้องสมุด subtractive cDNA จากรังไข่ และอัณฑะของ *H. asinina* เพื่อหาครื่องหมาย EST โดยจำนวนโคลนทั้งหมดที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 588 โคลน ประกอบด้วย 200 โคลน และ 118 โคลน จากห้องสมุด normal cDNA และ 110 โคลน และ 160 โคลน จากห้องสมุด subtractive cDNA ของรังไข่ และอัณฑะ ตามลำดับ พบยีน vitelline coat proteins มีการแสดงออกมากถึง 20.5% ในรังไข่ ส่วนในอัณฑะพบ sperm lysine มีการแสดงออกมากประมาณ 8.5% และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวของกับเพศด้วย RT-PCR พบว่ายีน vitelline coat protein homologue (VCPg1, VCPg3, VCPg7, VCPHa49 และ VCPHa75) และ vitellogenin-1 homologue มีการแสดงออกจำเพาะในหอยเป๋าฮื้อเพศเมีย และยีน axonemal p66.0 protein homologue, tektin A1 homologue และ sperm lysin homologue มีการแสดงออกจำเพาะในหอยเป๋าฮื้อเพศผู้

คำหลัก : หอยเป๋าฮื้อ , เครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศ, EST และ cDNA subtraction

Executive summary

วัตถุประสงค์

เพื่อค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยเป๋าฮื้อเขตร้อนชนิด *H. asinina* ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค AFLP, EST, cDNA subtraction และ PCR

ผลการดำเนินการ

1. จากการค้นหายีน DMRT1 ในหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีนนี้เหมือนกับยีน DMRT1 ใน *Oryzias curvinotus* อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ายีน DMRT1 homologue มีการแสดงออกเฉพาะในอัณฑะของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

2. จากการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเพศในหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ AFLP primers ทั้งหมด 224 คู่ผสมของไพรเมอร์ พบชิ้น AFLP ที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ ซึ่งให้เครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศ จำนวน 14 ชิ้น จาก 12 คู่ผสมของไพรเมอร์ ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศผู้จำนวน 7 ชิ้น และเพศเมียจำนวน 7 ชิ้น และได้สุ่มคัดโคลนจาก AFLP markers มาออกแบบไพรเมอร์เพื่อเปลี่ยนเป็น SCAR markers ที่จำเพาะต่อเพศผู้ จำนวน 2 คู่ และจำเพาะต่อเพศเมีย จำนวน 4 คู่ ผลจากการทำ PCR พบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป๋าฮื้อได้ในทั้งสองเพศ ซึ่งไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเพศได้ด้วย SCAR markers

3. จากการค้นหายีนที่แสดงออกจำเพาะต่อเพศด้วยเทคนิค EST และ cDNA subtraction โดยสร้างห้องสมุด cDNA จำนวน 4 ห้องสมุด เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับเพศ ประกอบด้วย Normal cDNA library ของรังไข่ และ ของอัณฑะ และ Subtractive cDNA library จากรังไข่ และ จากอัณฑะของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* โดยได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งหมด 588 โคลน ประกอบด้วย Normal cDNA library รังไข่ จำนวน 200 โคลน Normal cDNA library จากอัณฑะ จำนวน 118 โคลน และ Subtractive cDNA library จากรังไข่ จำนวน 110 โคลน Subtractive cDNA library จากอัณฑะ จำนวน 160 โคลน

4. จากการสร้างห้องสมุด cDNA ทั้งห้องสมุด normal cDNA และ subtractive cDNA จากรังไข่ของหอยเป๋าฮื้อ พบยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศ คือ vitelline coat protein (VCP) มากถึงประมาณ 20 % ยีน vitelline envelope sperm lysin receptor ยีน hydroxysteroid dehydrogenase -like protein ยีน vitellogenin-1 (VTG-1) และยีน ADAMTS-9 และจากอัณฑะของหอยเป๋าฮื้อ คือ sperm lysin ยีน gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 (GIOT1) ยีน axonemal p66.0 ยีน tektin ยีน fertilization protein และยีน small androgen receptor-interacting protein (SARIP)

5. จากการตรวจการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศในอัณฑะ รังไข่ และเม็ดเลือด พบว่าไพรเมอร์ VCPg1 VCPg3 VCPg7 และ VCPHa49 และไพรเมอร์ VTG-1 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะต่อรังไข่ของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ได้ นอกจากนั้นไพรเมอร์ VCPHa75 สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างเพศได้ โดยในรังไข่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 169 bp แต่ในอัณฑะจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 160 bp และจากการใช้ไพรเมอร์ axonemal p66.0 , tektin และ sperm lysin พบว่าสามารถใช้ 3 ไพรเมอร์นี้มาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่ออัณฑะของหอยเป๋าฮื้อได้