



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ " การพัฒนาเครื่องมือทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลในหอยเป่าอื้อ  
เขตร้อนชนิด *Haliotis asinina* "

โดย รศ.ดร. เติมศักดิ์ จารยะพันธ์ และคณะ

กันยายน 2543

สัญญาเลขที่ BGJ/19/2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ" การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยป่าอี้อ  
เขตร้อนชนิด *Haliotis asinina* "

ผู้วิจัย: รศ.ดร. เสดิมศักดิ์ ขารชะพันธุ์

สังกัด: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัย: นายปิติ ชำพาศัย

สังกัด : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร. ศีราวุธ กลิ่นบุหงา ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และช่วยติดตามดูแลงานวิจัยครั้งนี้อย่างใกล้ชิด และขอขอบคุณ Professor Dr. Takashi Aoki และ Associate Professor Dr. Ikuo Hirano ที่ให้คำแนะนำ และสถานที่การทำวิจัยที่ภาควิชา Aquatic Biosciences มหาวิทยาลัย Tokyo University of Fisheries ประเทศญี่ปุ่น และขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก และทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ในการสร้างนักวิจัยระดับปริญญาเอก (วปก.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

## Executive summary

### วัตถุประสงค์

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

### ผลการค้นพบ

1. จากการค้นหา DMRT1 ในหอยเป่าสี *H. asinina* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีนนี้เหมือนกับยีน DMRT1 ใน *Oryzias latipes* อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ายีน DMRT1 homologue มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะของหอยเป่าสี *H. asinina*
2. จากการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเพศในหอยเป่าสี *H. asinina* ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ AFLP primers ทั้งหมด 224 คู่ผสมของไพรเมอร์ พบยีน AFLP ที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ ซึ่งให้เครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศ จำนวน 14 ยีน จาก 12 คู่ผสมของไพรเมอร์ ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศผู้จำนวน 7 ยีน และเพศเมียจำนวน 7 ยีน และได้คู่เบสโคดอนจาก AFLP markers มาออกแบบไพรเมอร์เพื่อเปลี่ยนเป็น SCAR markers ที่จำเพาะต่อเพศผู้ จำนวน 2 คู่ และจำเพาะต่อเพศเมียจำนวน 4 คู่ ผลจากการทำ PCR พบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าสีได้ในทั้งสองเพศ ซึ่งไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเพศได้ด้วย SCAR markers
3. จากการค้นหายีนที่แสดงออกจำเพาะต่อเพศด้วยเทคนิค EST และ cDNA subtraction โดยสร้างห้องสมุด cDNA จำนวน 4 ห้องสมุด เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับเพศ ประกอบด้วย Normal cDNA library ของรังไข่ และ ของอวัยวะ และ Subtractive cDNA library จากรังไข่ และ จากอวัยวะของหอยเป่าสี *H. asinina* โดยได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งหมด 588 โคดอน ประกอบด้วย Normal cDNA library รังไข่ จำนวน 200 โคดอน Normal cDNA library จากอวัยวะ จำนวน 118 โคดอน และ Subtractive cDNA library จากรังไข่ จำนวน 110 โคดอน Subtractive cDNA library จากอวัยวะ จำนวน 160 โคดอน
4. จากการสร้างห้องสมุด cDNA ทั้งห้องสมุด normal cDNA และ subtractive cDNA จากรังไข่ของหอยเป่าสี 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 และจากอวัยวะของหอยเป่าสี 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. จากการตรวจการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศในอวัยวะ รังไข่ และเม็ดเลือด พบว่าไพรเมอร์ VCPg1 VCPg3 VCPg7 และ VCPHa49 และไพรเมอร์ VTG-1 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะต่อรังไข่ของหอยเป่าสี *H. asinina* ได้ นอกจากนี้ไพรเมอร์ VCPHa75 สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างเพศได้ โดยในรังไข่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 169 bp แต่ในอวัยวะจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 160 bp และจากการใช้ไพรเมอร์ axonemal p66.0 , tektin และ sperm lysin พบว่าสามารถใช้ 3 ไพรเมอร์นี้มาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่ออวัยวะของหอยเป่าสีได้

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BGJ/19/2544

ชื่อโครงการ : การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยเป่าชื่อเซตรอน  
ชนิด *Haliotis asinina*

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: รองศาสตราจารย์ ดร. เติมศักดิ์ จารยะพันธุ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

e-mail : dirarri@chula.ac.th

นาย ปิติ อ่ำพ่ายพิท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ e-mail : ampanyup@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 28 กันยายน 2544 ถึง 27 กันยายน 2546

จากการค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค RT-PCR , amplified fragment length polymorphism (AFLP), expressed sequence tag (EST) and subtractive cDNA เมื่อทำการค้นหายีน DMRT1 ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบยีนนี้มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะเพศ แต่ไม่แสดงออกในรังไข่ของหอยเป่าชื่อ และจากการใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 224 คู่ผสมของ *EcoRI* / *Mse* I ไพรเมอร์ โดยใช้ดีเอ็นเอเพศผู้ 2 กลุ่ม (M1 = 10 และ M2 = 8) และเพศเมีย 2 กลุ่ม (F1 = 10 และ F2 = 8) พบเครื่องหมาย AFLP ที่จำเพาะต่อเพศผู้จำนวน 7 เครื่องหมาย และเพศเมียจำนวน 7 เครื่องหมาย และนำเครื่องหมายทั้งหมดไปโคลน ทำลำดับนิวคลีโอไทด์ และได้คัดเลือกโคลนมาออกแบบเครื่อง SCAR ของเพศผู้จำนวน 2 เครื่องหมาย และเพศเมียจำนวน 4 เครื่องหมาย จากผลพบว่าเครื่องหมาย SCAR ทั้งหมดสามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งในดีเอ็นเอของหอยเป่าชื่อทั้งเพศผู้ และเพศเมีย.

จากการสร้างห้องสมุด cDNA ทั้งห้องสมุด Normal cDNA และห้องสมุด subtractive cDNA จากรังไข่ และอวัยวะเพศของ *H. asinina* เพื่อหาเครื่องหมาย EST โดยจำนวนโคลนทั้งหมดที่ทำลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 588 โคลน ประกอบด้วย 200 โคลน และ 118 โคลน จากห้องสมุด normal cDNA และ 110 โคลน และ 160 โคลน จากห้องสมุด subtractive cDNA ของรังไข่ และอวัยวะเพศ ตามลำดับ พบยีน vitelline coat proteins มีการแสดงออกมากถึง 20.5% ในรังไข่ ส่วนในอวัยวะเพศ sperm lysine มีการแสดงออกมากประมาณ 8.5% และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศด้วย RT-PCR พบว่าเป็น vitelline coat protein homologue (VCPg1, VCPg3, VCPg7, VCPHa49 และ VCPHa75) และ vitellogenin-1 homologue มีการแสดงออกจำเพาะในหอยเป่าชื่อเพศเมีย และเป็น axonemal p66.0 protein homologue, tektin A1 homologue และ sperm lysin homologue มีการแสดงออกจำเพาะในหอยเป่าชื่อเพศผู้

คำหลัก : หอยเป่าชื่อ , เครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศ, EST และ cDNA subtraction

## Abstract

**Project Code :** BGJ/19/2544

**Project Title :** Development of genetic markers involving with sex in the tropical abalone (*Haliotis asinina*)

**Investigator:** Dr. Padermsak Jarayabhand Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University e-mail : dirarri@chula.ac.th

Mr. Piti Amparyup Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University e-mail : amparyup@yahoo.com

**Project Period :** 28 September 2544 to 27 September 2546

Sex-determination markers of the tropical abalone *H. asinina* were identified and characterized by RT-PCR , amplified fragment length polymorphism (AFLP), expressed sequence tag (EST) and subtractive cDNA approaches. DMRT1 homologue of *H. asinina* was identified by RT-PCR analysis. This gene expressed in testes but not in ovaries. Two bulked genomic DNA of male (M1=10 and M2=8) and female (F1=10 and F2=8) abalone were tested against 224 AFLP primer combinations of *EcoRI* / *Mse* I. Fourteen candidate sex-specific AFLP markers of female (7 markers) and male (7 markers) abalone were cloned and characterized. Two SCAR markers of male and four SCAR markers of female were developed and tested with genomic DNA of male and female. Results indicated these SCAR markers can be amplify genomic DNA both male and female.

Normal and subtractive cDNA libraries from ovaries and testes of *H. asinina* were established for isolation of EST markers. In a total, 588 randomly selected clones (200 and 118 transcripts for normal and 110 and 160 transcripts for subtractive libraries from ovaries and testes, respectively) were unidirectional sequenced. The vitelline coat proteins (41 clones, 20.5%) were abundantly expressed in ovaries of *H. asinina*. In contrast, the most abundant transcripts in testes of *H. asinina* was sperm lysine (10 clones, 8.5%). Tissue-specific expression of sex-related genes were examined by RT-PCR. Sex-specific expression was found from vitelline coat protein homologue (VCPg1, VCPg3, VCPg7, VCPHa49 and VCPHa75) and vitellogenin-1 homologue in female abalone and axonemal p66.0 protein homologue, tektin A1 homologue and sperm lysin homologue in male abalone.

**Keywords:** Abalone , sex-specific markers, EST and cDNA subtraction

## บทนำ

หอยเป่าฮือ เป็นหอยทะเลฝาเดียวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แพร่กระจายอยู่ทั่วไป พบได้ทั้งในซีกโลกเหนือและซีกโลกใต้ โดยชนิดที่มีขนาดใหญ่จะอยู่ในเขตอบอุ่น และชนิดที่มีขนาดเล็กจะอยู่ในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน (Hahn, 1989) หอยเป่าฮือที่พบทั่วโลกมีทั้งหมด 75-100 ชนิด ในจำนวนนี้มีประมาณ 20 ชนิด ที่สามารถเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ได้ (Uki, 1989) สำหรับในประเทศไทย สามารถพบหอยเป่าฮือในธรรมชาติ 3 ชนิดด้วยกัน คือ *Haliotis asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* หอยเป่าฮือพันธุ์ไทยเหล่านี้มีขนาดค่อนข้างเล็ก เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีจำหน่ายทั่วโลก โดย *H. asinina* มีขนาดใหญ่ที่สุดในหอยเป่าฮือที่พบในประเทศไทย โดยมีความยาวของเปลือกประมาณ 7 ถึง 10 เซนติเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 250 ถึง 280 กรัม (Jarayabhand และ Paphavasit, 1996) หอยเป่าฮือพันธุ์นี้ได้รับความสนใจสำหรับการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีขนาดใหญ่ มีสัดส่วนของเนื้อที่สามารถใช้เป็นอาหารมากกว่า *H. ovina* และ *H. varia* (Singhagraiwan และ Doi, 1993) โดยหอยเป่าฮือพันธุ์สามารถนำมาผลิตสำหรับขนาดcocktail (cocktail size) เช่นเดียวกับหอยเป่าฮือ ชนิด *H. diversicolor supertexta* ของประเทศไต้หวัน

จากแนวโน้มความต้องการหอยเป่าฮือ *H. asinina* ในประเทศไทยเพื่อการบริโภคมีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณหอยเป่าฮือชนิดนี้ที่จับจากธรรมชาติมีไม่เพียงพอ จึงมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง และการผลิตหอยเป่าฮือชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น (Singhagraiwan และ Doi, 1993) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮือแบบครบวงจรจะสำเร็จได้ จำเป็นที่จะต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับอนุพันธุศาสตร์ (molecular genetics) และพันธุศาสตร์เชิงประชากร (population genetics) ของหอยเป่าฮือ เพื่อประโยชน์ในการจัดการทรัพยากรหอยเป่าฮือในธรรมชาติ ตลอดจนการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง และการผลิตหอยเป่าฮืออย่างยั่งยืน โดยวัตถุประสงค์ดังกล่าวจะสำเร็จได้จะต้องอาศัยเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers) ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือที่ระดับต่าง ๆ ได้

หอยเป่าฮือเป็นสัตว์ที่มีอวัยวะเพศผู้และอวัยวะเพศเมียอยู่แยกจากกัน และมีการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย โดยหอยเป่าฮือสามารถแยกเพศได้เมื่อโตเต็มวัยพร้อมที่จะผสมพันธุ์โดยดูสีของอวัยวะเพศ ถ้าเป็นเพศผู้จะเห็นอวัยวะนี้เป็นสีขาว ครีมน ขัดเจน ส่วนรังไข่ของเพศเมียจะเห็นเป็นสีเขียวเข้ม ซึ่งมองเห็นไม่ชัดเจนนัก เพราะจะคล้ายคลึงกับสีของอวัยวะภายใน (Singhagraiwan และ Doi, 1993)

Shepherd และ Hearn (1983) พบว่า หอยเป่าฮือ *H. lavigata* เพศเมียในธรรมชาติจะมีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่าหอยเป่าฮือเพศผู้ประมาณ 25% นอกจากนี้คณะผู้วิจัย พบว่าหอยเป่าฮือ *H. asinina* เพศเมียที่เพาะเลี้ยง อายุ 1 ปี จะมีน้ำหนักสุทธิสูงกว่าเพศผู้ประมาณ 20% ดังนั้นในอนาคตจึงมีความเป็นไปได้ ที่จะทำการทดลองเลี้ยงหอยเป่าฮือเพศเดียว (monosex culture) เพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น

ความเข้าใจชีววิทยาเกี่ยวกับเพศของสิ่งมีชีวิตเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการจัดการ โปรแกรมการผสมพันธุ์ที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาของโครโมโซมเพศ (sex chromosome system) ในหอยเป่าถือว่าเป็นระบบการควบคุมเพศแบบใด เช่น XY, ZW หรือ ระบบอื่นๆ

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ (sex-determining genes) ในสิ่งมีชีวิตแบ่งได้เป็นสองประเภทหลักคือ กลุ่มแรก ยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ที่พบในเกือบทุกสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่น DMRT1 เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่มีส่วนของ DNA-binding motif ที่เรียกว่า DM domain โดย DM domain นี้เป็นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศที่พบในสัตว์หลายชนิด (Brunner และคณะ, 2001) ในมนุษย์จะพบอยู่บนตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับ XY sex reversal (Raymond และคณะ, 1999) ในไก่จะพบอยู่บน sex chromosome Z (Nanda และคณะ, 2000) ใน *Caenorhabditis elegans* พบใน mab3 gene (Shen และ Hodgkin, 1988) และในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* พบใน doublesex (dxx) gene (Baker และ Ridge, 1980) กลุ่มที่สอง เป็นยีนที่พบเฉพาะในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีสายวิวัฒนาการมาด้วยกัน เช่น sex determining region Y (Sry) ซึ่งพบบน Y chromosome ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Raymond และคณะ, 1998) และ sex-lethal (Sxl) gene พบในแมลงหวี่ *D. melanogaster* (Bell และคณะ, 1988)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานโครโมโซมเพศ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในหอยเป่า ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะกับเพศ (sex-specific markers) ในหอยเป่าชนิด *H. asinina* โดยเทคนิคที่ใช้ในการหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะกับเพศทั้งในระดับ genomic DNA และ cDNA ซึ่งมีอยู่หลายวิธี

เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos และคณะ, 1995) ใช้หลักการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ selective amplification ทั้งนี้ได้มีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ในการหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะกับเพศในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น ปลา three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Giffith และคณะ, 2000) นกกระจอกเทศ *Struthio camelus* (Giffith และ Orr, 1999) เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาดังกล่าว สามารถนำมาใช้ในการประเมินความสำเร็จในการทำ genetic manipulation แบบต่าง ๆ เช่น การทำ gynogenesis, androgenesis และ polyploidy production

สำหรับการแยก และศึกษาการแสดงออกของยีนในสภาวะต่าง ๆ นั้น ได้มีการนำเทคนิค Expressed Sequence Tag (EST) มาใช้ ซึ่งเทคนิค EST คือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนสั้น ๆ ของ cDNA ที่ได้โดยการสุ่มคัดเลือกโคลนจากห้องสมุด cDNA เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ ยีนที่มีหน้าที่ใหม่ ๆ ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เทคนิค EST สามารถนำมาใช้ศึกษารูปแบบการแสดงออกและความจำเพาะของยีนในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่นำมาเตรียมห้องสมุด cDNA นอกจากนี้เทคนิค cDNA subtraction ยังสามารถนำมาใช้ในการค้นหาและเปรียบเทียบยีนที่แสดงออกในกลุ่มประชากร mRNA ที่แตกต่างกัน

## วัตถุประสงค์

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

## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างหอยเป่าสี *H. asinina* ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย จากโรงเพาะที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำหอยเป่าสีมาตัดอวัยวะสืบพันธุ์ (รังไข่ และ อัณฑะ) และเนื้อเยื่อส่วนเท้า ทั้งตัวผู้และตัวเมียเก็บไว้ใน liquid nitrogen และ/หรือ  $-70^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

### 2. การสกัดดีเอ็นเอของหอยเป่าสี

เตรียมดีเอ็นเอของหอยเป่าสีจากส่วนเท้า โดยวิธี Phenol-Chloroform proteinase K method ที่บรรยายไว้ใน Klinbunga และคณะปี 1996 โดยนำเนื้อเยื่อของหอยเป่าสีมาบดให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ทำให้เซลล์แตกด้วย SDS และบ่มที่  $65^{\circ}\text{C}$  นาน 30 นาที ทำลายอาร์เอ็นเอด้วย RNase บ่มที่  $65^{\circ}\text{C}$  นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย่อยโปรตีนด้วย Proteinase K บ่มที่  $65^{\circ}\text{C}$  นาน 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสมาสกัดแยกโปรตีนออกด้วยฟีนอล คลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค spectrophotometry และ agarose gel electrophoresis โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3. เตรียม total RNA จาก รังไข่ และ อัณฑะ ของหอยเป่าสี

สกัด total RNA จากรังไข่ และ อัณฑะ ของหอยเป่าสีโดยใช้ TRI REAGENT (MOLECULAR RESEARCH CENTER, INC) โดยนำเนื้อเยื่อของตัวอย่างมาบดโดยเติม liquid nitrogen และบดตัวอย่างให้ละเอียด นำเนื้อเยื่อที่ถูกบดมาใส่ในหลอด 1.5 ml และเติม TRI REAGENT ในอัตราส่วน 1 ml ของ TRI REAGENT ต่อ เนื้อเยื่อประมาณ 50-100 mg ใช้แท่งแก้วบดให้ละเอียดอีกครั้ง และนำไป vortex เป็นเวลา 2-5 นาทีต่อตัวอย่าง นำไปปั่นที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เพื่อกำจัดเศษเซลล์ ค่อยจากนั้นดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด 1.5 ml ใหม่ และเติม 0.2 ml ของ chloroform ต่อ 1 ml ของ TRI REAGENT และนำไป vortex เป็นเวลา 2-5 นาทีต่อตัวอย่าง นำไปปั่นที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด 1.5 ml ใหม่ นำไปไว้บนน้ำแข็ง ตกตะกอน RNA โดยเติม 0.5 ml ของ isopropanol ต่อ 1 ml ของ TRI REAGENT บ่มที่  $-20^{\circ}\text{C}$  นาน 30 นาที นำไปปั่นที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ที่สารละลายส่วนบน ถ้าง RNA pellet โดยเติม 1 ml ของ 75% ethanol นำไปปั่นที่ 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ที่สารละลายส่วนบน นำ RNA pellet ไป air-dried โดยใช้ vacuum เป็นเวลา 3-5 นาที

ละลาย pellet ด้วย RNase-free water เก็บ RNA ที่ได้ไว้ที่  $-70^{\circ}\text{C}$  วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของ RNA ด้วยเทคนิค spectrophotometry

#### 4. เทคนิค RT-PCR

##### 4.1 เพิ่มจำนวนยีนที่สนใจที่เกี่ยวข้องกับเพศโดยใช้เทคนิค RT-PCR

ออกแบบไพรเมอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศที่มีรายงานไว้ใน GenBank คือ ยีน doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1)

สร้าง First-stand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) และ นำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ โดยทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาณ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 , 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> , 100 μM ของ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP, 0.4 μM ของแต่ละ primer และ 1 U ของ Taq DNA Polymerase ทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดยมี PCR profiles คือ Predenaturation  $94^{\circ}\text{C}$  นาน 3 นาที และตามด้วย Denaturation  $94^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที Annealing  $48^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที Extension  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 2 นาที จำนวน 5 รอบ และ Denaturation  $94^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที Annealing  $58^{\circ}\text{C}$  นาน 1 นาที Extension  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Final extension  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ วิเคราะห์ PCR products ใน 1.4% agarose gel electrophoresis

#### 5. เทคนิค AFLP

##### 5.1 Bluked segregant analysis (BSA)

ทำ DNA bulks ของหอยเป่าสีเพศผู้และ DNA bulks ของหอยเป่าสีเพศเมีย โดยนำดีเอ็นเอของหอยเป่าสีเพศผู้ หรือ หอยเป่าสีเพศเมีย แต่ละตัวมารวมกันให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 250 ng ในแต่ละ DNA bulk โดย DNA bulk ชุดที่หนึ่งของหอยเป่าสีเพศผู้ (MB1) หรือ หอยเป่าสีเพศเมีย (FB1) จะประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง และ DNA bulk ชุดที่สอง (MB2 และ FB2) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่าง นำ DNA bulks เก็บไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$

##### 5.2 AFLP analysis

นำ DNA bulks ของหอยเป่าสีเพศผู้ (MB1) และหอยเป่าสีเพศเมีย (FB1) มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดคือ *EcoRI* และ *MseI* และบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทำลาย เอนไซม์ตัดจำเพาะโดย บ่มที่  $70^{\circ}\text{C}$  นาน 15 นาที จากนั้นนำ *EcoRI* adaptor และ *MseI* adaptor มาเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัด ด้วย T4 DNA ligase และบ่มที่  $16^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำ ligation products มาเจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลาย TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA) และนำ products จำนวน 5 ไมโครลิตร จากที่เจือจางมาทำ PCR โดยใช้ *EcoRI* primer (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC-3') และ *MseI* primer (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3') ซึ่งเป็น preselective primers โดยปฏิกิริยา PCR จะทำใน ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 , 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ,

200  $\mu$ M ของ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP, และ 0.5 U ของ *Taq* DNA Polymerase และมี PCR profiles คือ Predenaturation 94 °C 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย Denaturation 94 °C 30 วินาที Annealing 56 °C 60 วินาที Extension 72 °C 60 วินาที จำนวน 20 รอบ และ Final extension 72 °C 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำ PCR products มาเจือจาง 50 เท่าด้วย TE และนำ products จำนวน 5 ไมโครลิตร จากที่เจือจางมาทำ PCR ครั้งที่สอง โดยใช้ *Eco*RI primer และ *Mse*I primer (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็น selective primers คือที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์จะมีนิวคลีโอไทด์ขึ้น 3 นิวคลีโอไทด์ ทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่วนประกอบทั้งหมดจะเหมือนกับที่ทำ PCR ครั้งแรก ยกเว้นใช้ *Taq* DNA Polymerase จำนวน 1.5 U และใช้ไพรเมอร์ ปริมาณ 30 ng โดยมี PCR profiles คือ Predenaturation 94 °C 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย Denaturation 94 °C 30 วินาที Annealing 65 °C 30 วินาที Extension 72 °C 60 วินาที จำนวน 1 รอบ และทำ touchdown PCR โดยลด annealing temperature รอบละ 0.7 °C ในระหว่าง 12 รอบ และตามด้วย Denaturation 94 °C 30 วินาที Annealing 56 °C 30 วินาที Extension 72 °C 60 วินาที จำนวน 23 รอบ และ Final extension 72 °C 7 นาที จำนวน 1 นำ PCR products มาวิเคราะห์ใน 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมด้วยวิธี Silver staining

### 5.3 การโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย AFLP

คัดแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะกับเพศผู้ หรือเพศเมียมาทำการโคลน โดยวิธี TA-cloning และนำโคลนที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ automated DNA sequencer

### 5.4 ตรวจสอบความจำเพาะต่อเพศของ SCAR markers

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่แสดงความจำเพาะต่อเพศมาออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International) และนำตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเพศในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ที่รู้เพศแน่นอน

### 5.5 ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างเพศด้วยเทคนิค SSCP analysis

นำ PCR products มาวิเคราะห์ความแตกต่างของการเกิด single-strand conformation ที่เกิดขึ้นระหว่างเพศผู้ และเพศเมีย ใน 15% หรือ 17.5% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมด้วยวิธี Silver staining

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *EcoRI* primer และ *MseI* primer ที่ใช้ในการทำ selective amplification

<i>EcoRI</i> primer	Sequence	<i>MseI</i> primer	Sequence
EcoRI 01	5'GACTGCGTACCAATTCAAC3'	MseI 01	5'GATGAGTCCTGAGTAACAA3'
EcoRI 02	5'GACTGCGTACCAATTCAAG3'	MseI 02	5'GATGAGTCCTGAGTAACAC3'
EcoRI 03	5'GACTGCGTACCAATTCACA3'	MseI 03	5'GATGAGTCCTGAGTAACAG3'
EcoRI 04	5'GACTGCGTACCAATTCACT3'	MseI 04	5'GATGAGTCCTGAGTAACAT3'
EcoRI 05	5'GACTGCGTACCAATTCACC3'	MseI 05	5'GATGAGTCCTGAGTAACTA3'
EcoRI 06	5'GACTGCGTACCAATTCACG3'	MseI 06	5'GATGAGTCCTGAGTAACTC3'
EcoRI 07	5'GACTGCGTACCAATTCAGC3'	MseI 07	5'GATGAGTCCTGAGTAACTG3'
EcoRI 08	5'GACTGCGTACCAATTCAGG3'	MseI 08	5'GATGAGTCCTGAGTAACTT3'
EcoRI 09	5'GACTGCGTACCAATTCAGT3'	MseI 09	5'GATGAGTCCTGAGTAACGA3'
EcoRI 10	5'GACTGCGTACCAATTCAGA3'	MseI 10	5'GATGAGTCCTGAGTAACGT3'
EcoRI 11	5'GACTGCGTACCAATTCATG3'	MseI 11	5'GATGAGTCCTGAGTAACGC3'
EcoRI 12	5'GACTGCGTACCAATTCATC3'	MseI 12	5'GATGAGTCCTGAGTAACGG3'
EcoRI 13	5'GACTGCGTACCAATTCATA3'	MseI 13	5'GATGAGTCCTGAGTAACCA3'
EcoRI 14	5'GACTGCGTACCAATTCATT3'	MseI 14	5'GATGAGTCCTGAGTAACCT3'
		MseI 15	5'GATGAGTCCTGAGTAACCG3'
		MseI 16	5'GATGAGTCCTGAGTAACCC3'

## 6. การค้นหาชิ้นที่แสดงออกจำเพาะต่อเพศของ *H. asinina* ด้วยการวิเคราะห์ EST และ cDNA subtraction

### 6.1 การสร้างห้องสมุด EST จากรังไข่ และอวัยวะของ *H. asinina*

สกัด total RNA จากรังไข่ และอวัยวะของหอยเป่าสีโดยใช้ TRI-REAGENT (Molecular Research Organic) และแยก mRNA โดยใช้ QuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia) และนำ mRNA ที่แยกได้มา สร้าง cDNA library โดยใช้ SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning Kit (GIBCO BRL) โดยนำ 3 ug ของ mRNA มาสร้าง first strand cDNA โดยใช้เอนไซม์ SuperScript II reverse transcriptase และใช้ *Not I*-oligo dT primer-adaptor เป็นไพรเมอร์ ค่อยจากนั้นสร้าง second stranded cDNA และเชื่อมต่อกับ *Sal I*-adapters โดยใช้ T4 DNA ligase จากนั้นทำการตัด cDNA ที่ได้ด้วยเอนไซม์ *Not I* นำ double

stranded cDNA ที่ได้มาคัดเลือกขนาดโดยใช้ column chromatography เพื่อคัดเลือกชิ้น cDNA ที่มีขนาดมากกว่า 500 bp และนำ cDNA ที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pSPORT1 ที่ตัดด้วย *Not I* และ *Sal I* โดยใช้ T4 DNA ligase และ transform เข้าสู่ *E.coli* JM109 คัดเลือกโคลนที่มีขนาดมากกว่า 500 bp โดยการทำให้ colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pUC1 (CCG GCT CGT ATG TTG TGT GGA) และไพรเมอร์ pUC2 (GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT GG) และเตรียมพลาสมิดที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้วิธี Alkaline lysis method

## 6.2 การสร้างห้องสมุด subtractive EST

นำ mRNA ที่แยกได้จากรังไข่และอวัยวะมาสร้าง cDNA จากนั้นทำ Forward subtraction และ Reverse subtraction ของ cDNA ที่ได้ ด้วย PCR Select cDNA Subtraction kit (CLONTECH) จากนั้นนำ subtracted products ที่ได้มาโคลนโดยวิธี TA-cloning และ transform เข้าสู่ *E.coli* JM109 คัดเลือกโคลนที่มีขนาดมากกว่า 200 bp โดยการทำให้ colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pUC1 และไพรเมอร์ pUC2 สกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline lysis method

## 6.3 ทาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนในห้องสมุด cDNA

สุ่มเลือกโคลนของแต่ละห้องสมุด EST จากรังไข่ และอวัยวะ และโคลนที่ได้จาก forward และ reverse subtractive libraries มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ชิ้น cDNA insert ด้วย automated DNA sequencer นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับชิ้นที่รายงานไว้ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์) และ BLASTX (เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์) โดยชิ้นที่เป็น homologue กับชิ้นในฐานข้อมูลควรมี sequence homology มากกว่า 50% โดยบริเวณที่คล้ายกันควรมีขนาดยาวมากกว่า 100 bp สำหรับดีเอ็นเอ และ 10 กรดอะมิโนสำหรับโปรตีน และมีค่า probability value น้อยกว่า  $1 \times 10^{-4}$

## 6.4 ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน เพื่อพัฒนาการตรวจที่จำเพาะต่อเพศของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* โดยใช้เทคนิค PCR

เลือกยีนที่สนใจที่เกี่ยวข้องกับเพศ มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวใน อวัยวะ รังไข่ และเลือดของใน *H. asinina* โดยใช้เทคนิค RT-PCR และ ตรวจสอบยีนที่สนใจใน genomic DNA ของหอยเป่าชื่อเพศผู้ และเพศเมียด้วยเทคนิค PCR

### ผลการทดลอง

#### 1. การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการออกแบบ Degenerated primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีรายงานไว้ใน GenBank และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำ PCR และ nested PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน DMRT1 โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบคือ cDNA ของ testis โดยใช้ไพรเมอร์ DMF1 (CCC AAG TGC KCC CGC TGCC GGA AYC A) และ ไพรเมอร์ DMR (CGC CAG CTC CTC CTC YTG AGC CTG) ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์จีอาร์ขนาด 177 bp และได้ทำการ elute ขึ้นดีเอ็นเอและนำมาทำทำพีจีอาร์ครั้งที่สองโดยใช้ไพรเมอร์ DMF2 (CTA AAG GGM CAC AAG CAC TWC TG) และไพรเมอร์ DMR ได้ผลิตภัณฑ์จีอาร์ขนาด 135 bp ทำการ elute ขึ้นดีเอ็นเอและโคลน โดยใช้ pGEM-Teasy vector นำโคลนที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือน โดยใช้ BLASTX program พบว่ามีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับ DMRT1 ใน *Oryzias curvinotus*

>gi|29027651|dbj|BAC65996.1| DMRT1 protein [*Oryzias curvinotus*] Length = 276

Score = 65.9 bits (159), Expect = 2e-10 Identities = 28/44 (63%), Positives = 37/44 (84%)

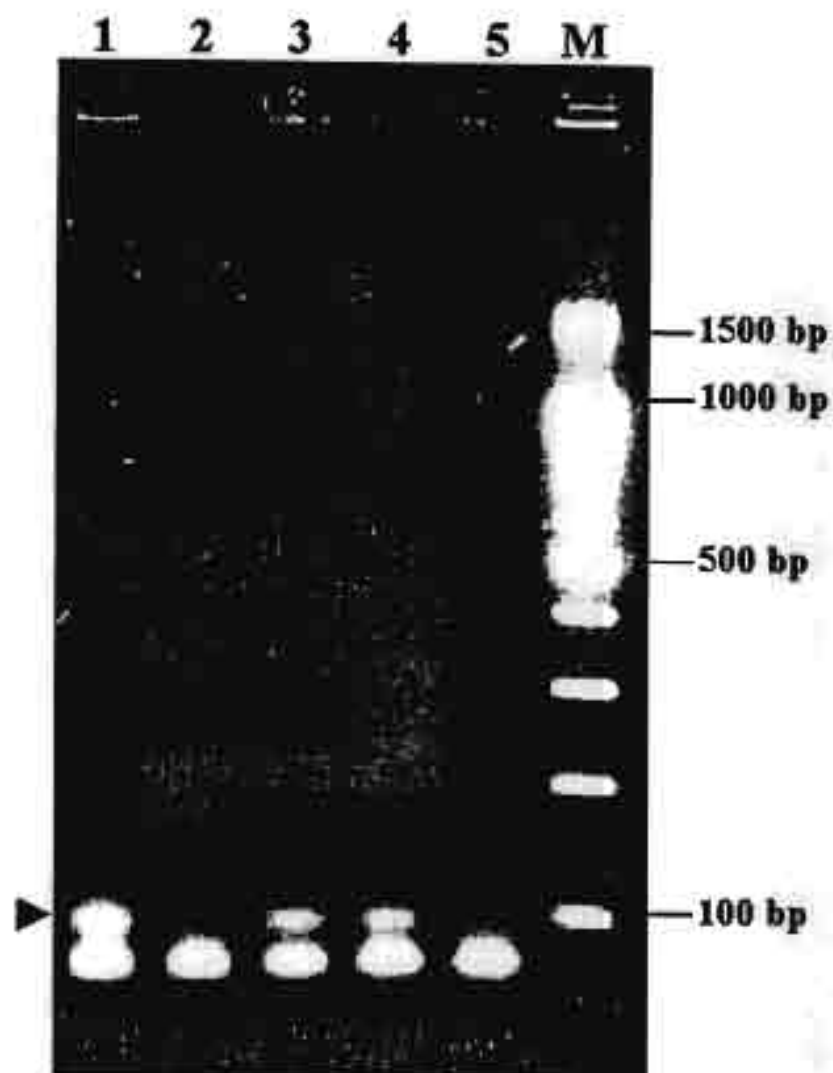
Frame = +1

Query: 1 LKGHKRYCLFANCSLSSCRLSAQRQKVSREQIALRRRQAQBEEL 132

LKGHKR+C + +C+C+ CRL A+RQ+V Q+ALRR+QAQBEEL

Sbjct: 39 LKGHKRPCRWKDCACAKCRLIAERQRVMAAQVALRRQAQBEEL 82

จึงออกแบบไพรเมอร์จากโคลนที่ได้ และนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DMRT1HaF (GTC TGT TCG CCA ACT GCA GCT G) และไพรเมอร์ DMRT1HaR (GTC GAC GAC GGA GGG CAA TCT G) เพิ่มจำนวนยีน DMRT1 ใน cDNA ของ testes และ ovaries และ ในดีเอ็นเอของหอยเพศผู้ และหอยเพศเมียในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* จากผลพบว่าไพรเมอร์ DMRT1HaF/R สามารถเพิ่มจำนวนยีนให้ผลิตภัณฑ์จีอาร์ขนาด 90 bp ใน cDNA ของ testis แต่ไม่พบใน cDNA ของ ovary (รูปที่ 1 แถวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) และ พบผลิตภัณฑ์ของพีจีอาร์ในดีเอ็นเอของทั้งหอยเพศผู้ และเพศเมีย (รูปที่ 1 แถวที่ 3 และ 4 ตามลำดับ) แสดงว่ายีน DMRT1 homologue นี้มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* และพบยีนนี้ทั้งใน genomic DNA ของหอยเป่าชื่อในทั้งสองเพศ



**รูปที่ 1** การเพิ่มจำนวน DMRT1 homologue โดยใช้ไพรเมอร์ DMRTHa1

แถวที่ 1 = ผลที่ได้จากการใช้ 1<sup>st</sup> stranded cDNA ของอิมซะเป็นต้นแบบ

แถวที่ 2 = ผลที่ได้จากการใช้ 1<sup>st</sup> stranded cDNA ของรังไข่

แถวที่ 3 = ผลที่ได้จากการใช้ genomic DNA ของ หอยเป่าสีเหลืองเป็นต้นแบบ

แถวที่ 4 = ผลที่ได้จากการใช้ genomic DNA ของ หอยเป่าสีชมพูเป็นต้นแบบ

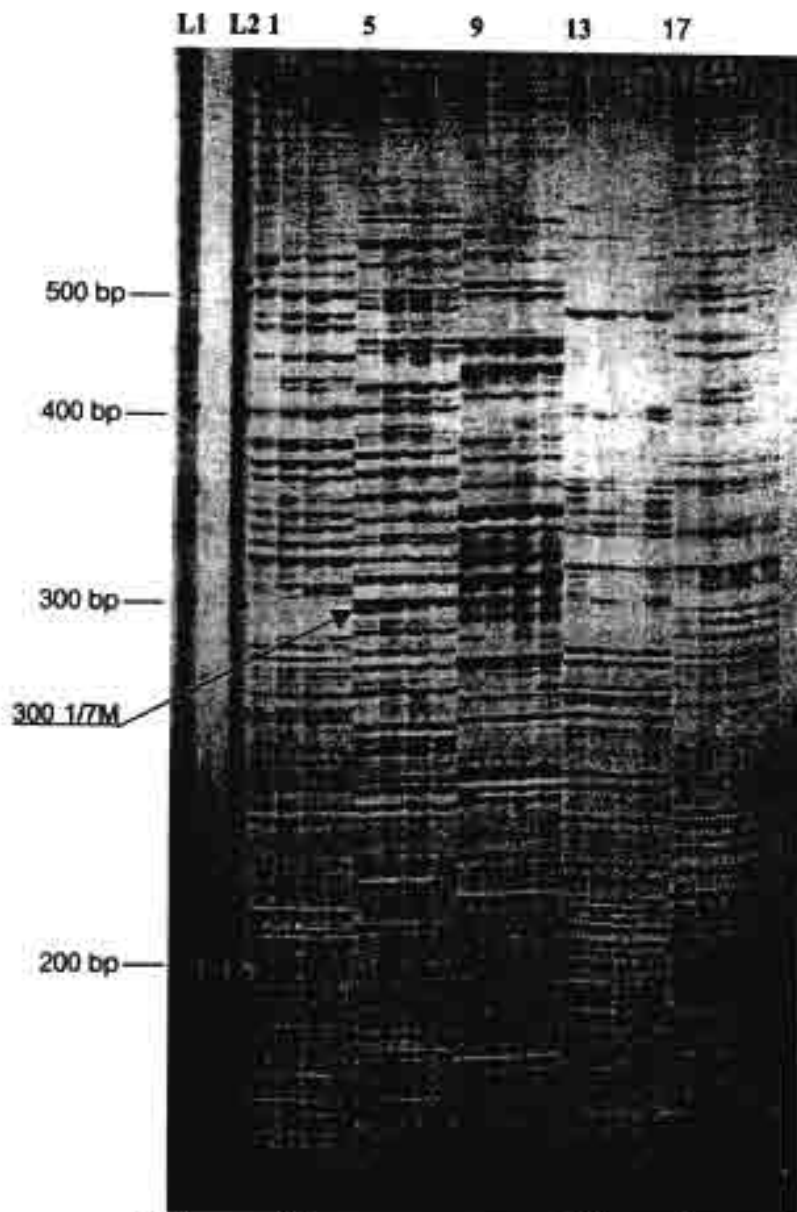
แถวที่ 5 = Negative control (ไม่ใช่ซีเอ็นเอ)

## 2. การค้นหา และพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค AFLP

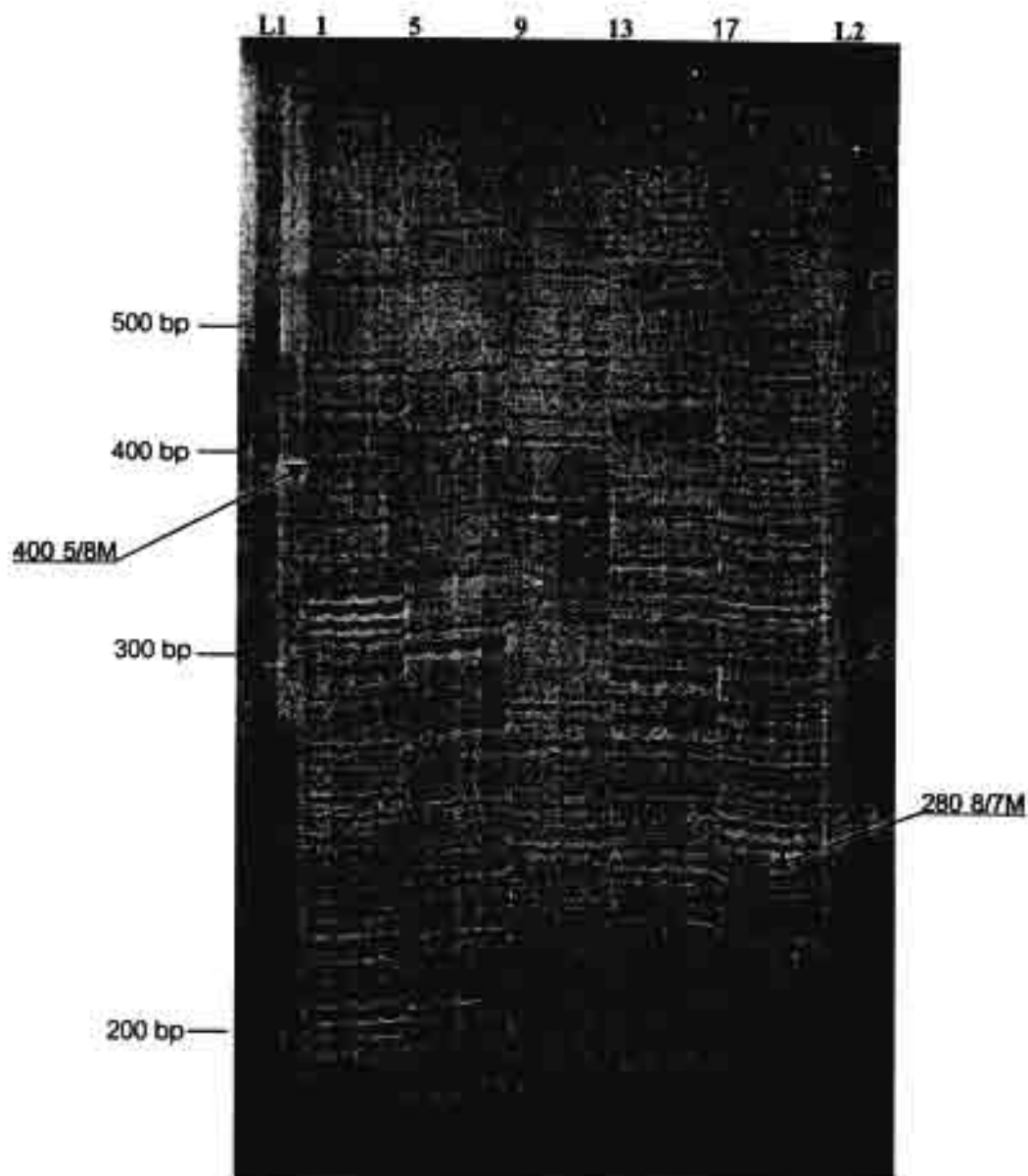
### 2.1 AFLP analysis

จากการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเพศในหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ AFLP primers ทั้งหมด 224 คู่ผสมของไพรเมอร์ ประกอบด้วย *EcoRI* primer จำนวน 14 คู่ และ *MseI* primer จำนวน 16 คู่ พบชิ้น AFLP ที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ ซึ่งให้เครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศ จำนวน 14 ชิ้น จาก 12 primers ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศผู้จำนวน 7 ชิ้น และเพศเมียจำนวน 7 ชิ้น ดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

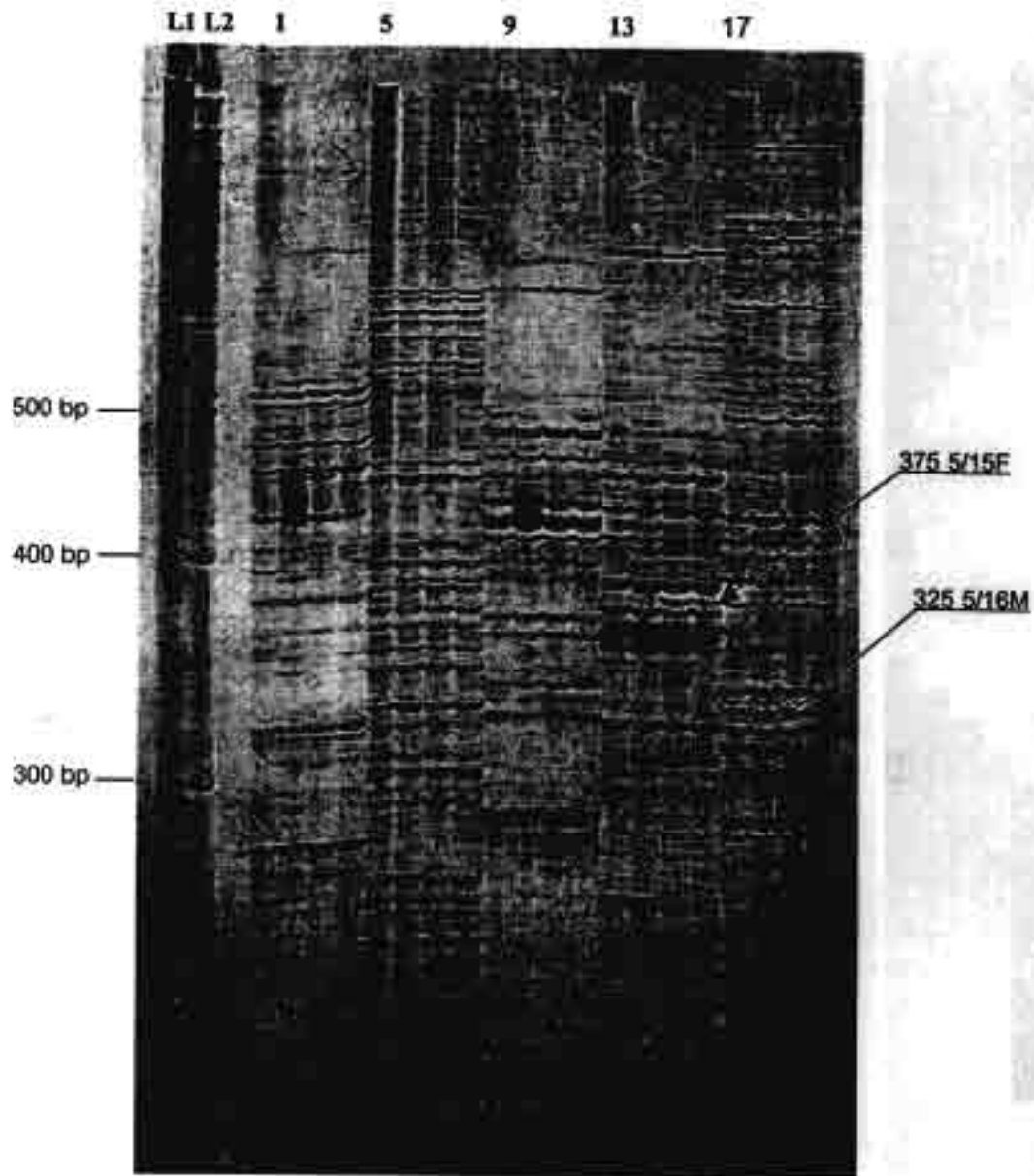
เพศผู้ประกอบด้วย AFLP marker ขนาด 300 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 01 + *MseI* 07 (รูปที่ 2) , AFLP marker ขนาด 280 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 08 + *MseI* 07 (รูปที่ 3), AFLP marker ขนาด 325 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 05 + *MseI* 16 (รูปที่ 4), AFLP marker ขนาด 520 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 07 + *MseI* 16 (รูปที่ 5), AFLP marker ขนาด 280 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 11 + *MseI* 11 (รูปที่ 6), AFLP marker ขนาด 517 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 06 + *MseI* 09 (รูปที่ 7), และ AFLP marker ขนาด 320 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 09 + *MseI* 15 (รูปที่ 6) และเพศเมีย ประกอบด้วย AFLP marker ขนาด 260 bp และ 235 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 04 + *MseI* 13 (รูปที่ 8) , AFLP marker ขนาด 275 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 07 + *MseI* 15 (รูปที่ 9), AFLP marker ขนาด 375 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 05 + *MseI* 15 (รูปที่ 4), AFLP marker ขนาด 400 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 05 + *MseI* 08 (รูปที่ 13), AFLP marker ขนาด 460 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 06 + *MseI* 15 (รูปที่ 10) และ AFLP marker ขนาด 490 bp จากไพรเมอร์ *EcoRI* 11 + *MseI* 15 (รูปที่ 11)



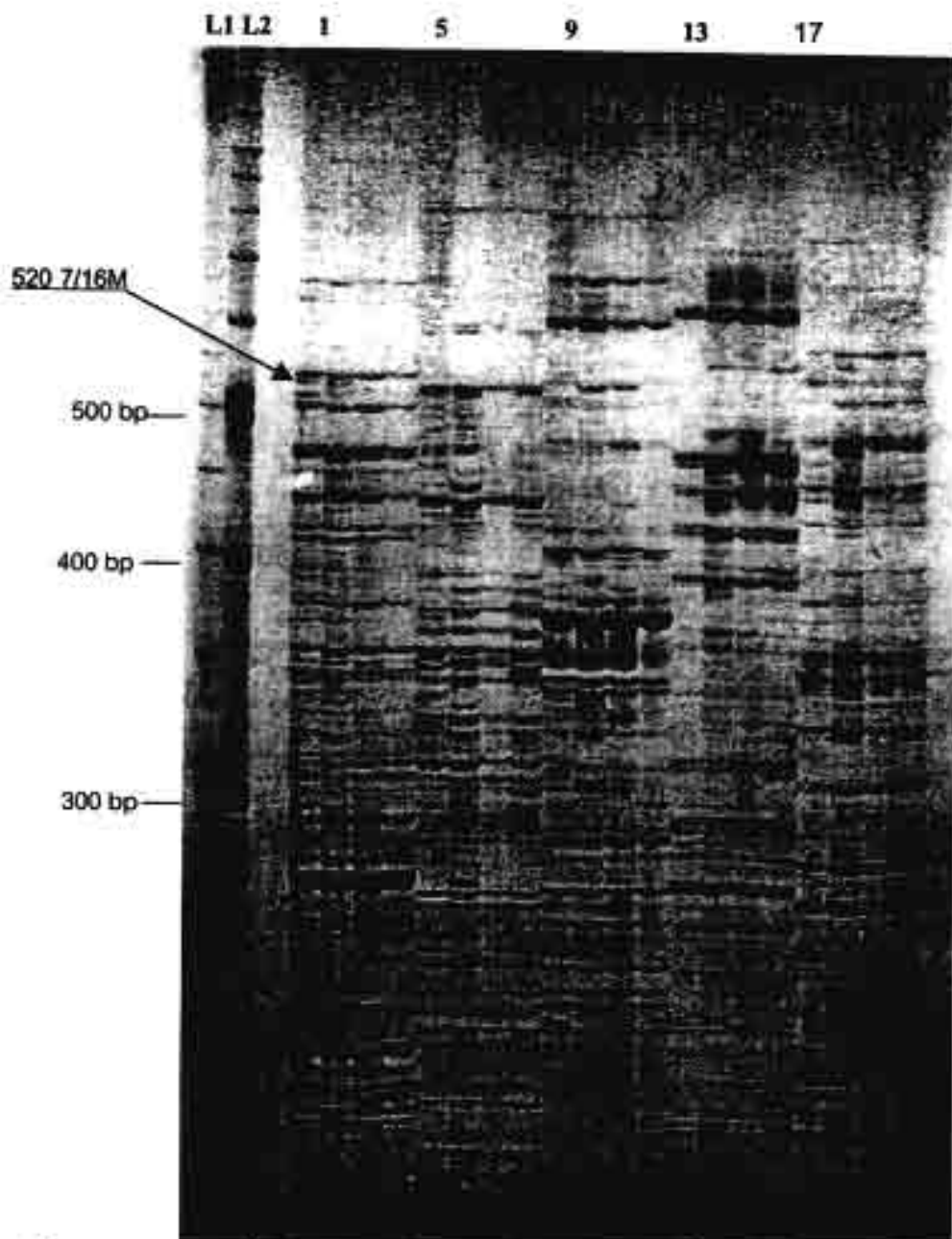
รูปที่ 2 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเป่าสีอพศผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ 17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 01 + MseI 01 (ช่อง 1-4), EcoRI 01 + MseI 07 (ช่อง 5-8) , EcoRI 02 + MseI 05(ช่อง 9-12 ) , EcoRI 02 + MseI 06 (ช่อง 13-16), EcoRI 02 + MseI 08 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกสรแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศผู้



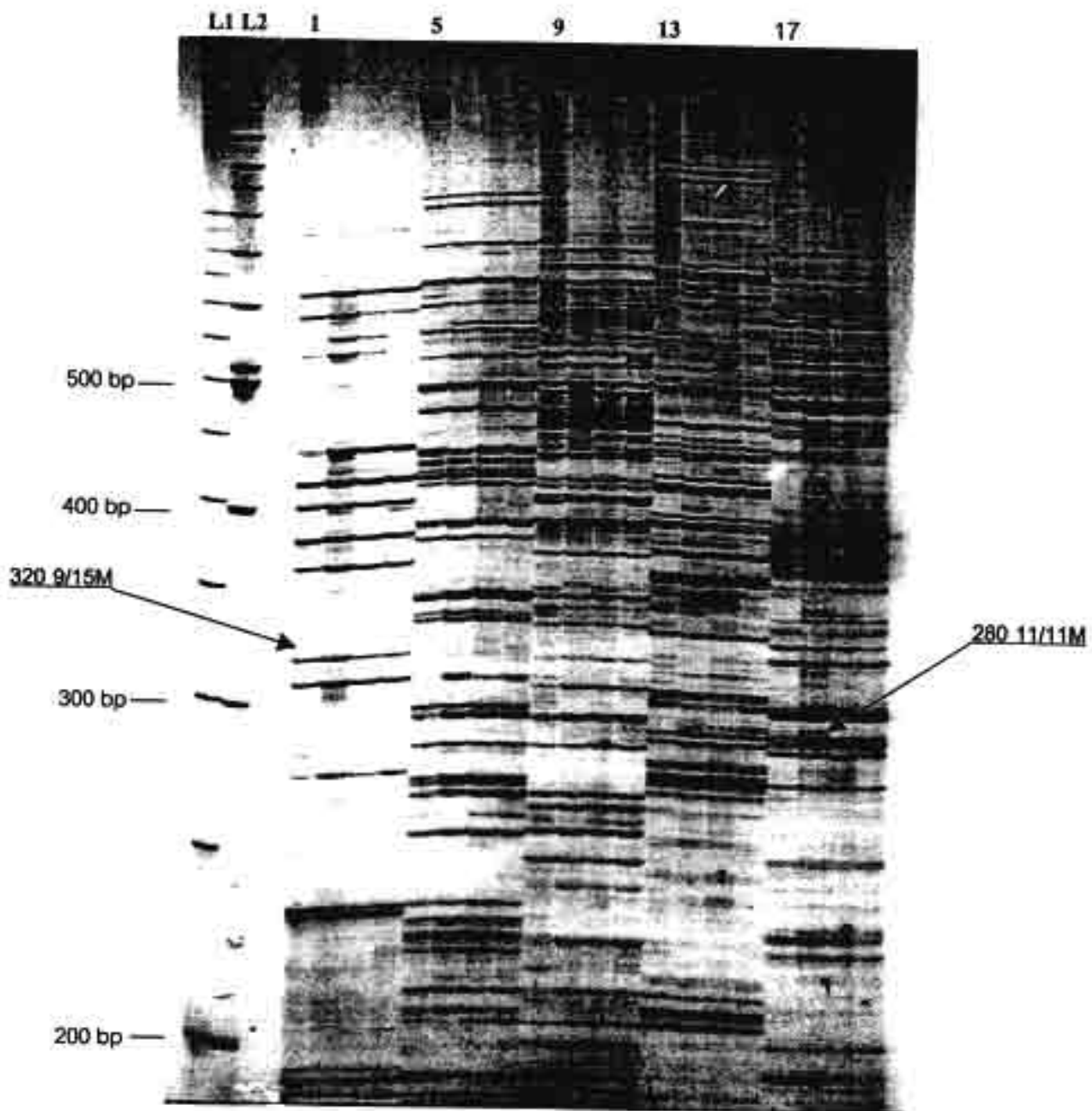
รูปที่ 3 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเมืง้าชื่อเพศผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 05 + MseI 08 (ช่อง 1-4), EcoRI 06 + MseI 05 (ช่อง 5-8), EcoRI 06 + MseI 08 (ช่อง 9-12), EcoRI 07 + MseI 07 (ช่อง 13-16), EcoRI 08 + MseI 07 (ช่อง 17-20), L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกตรึงแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศผู้



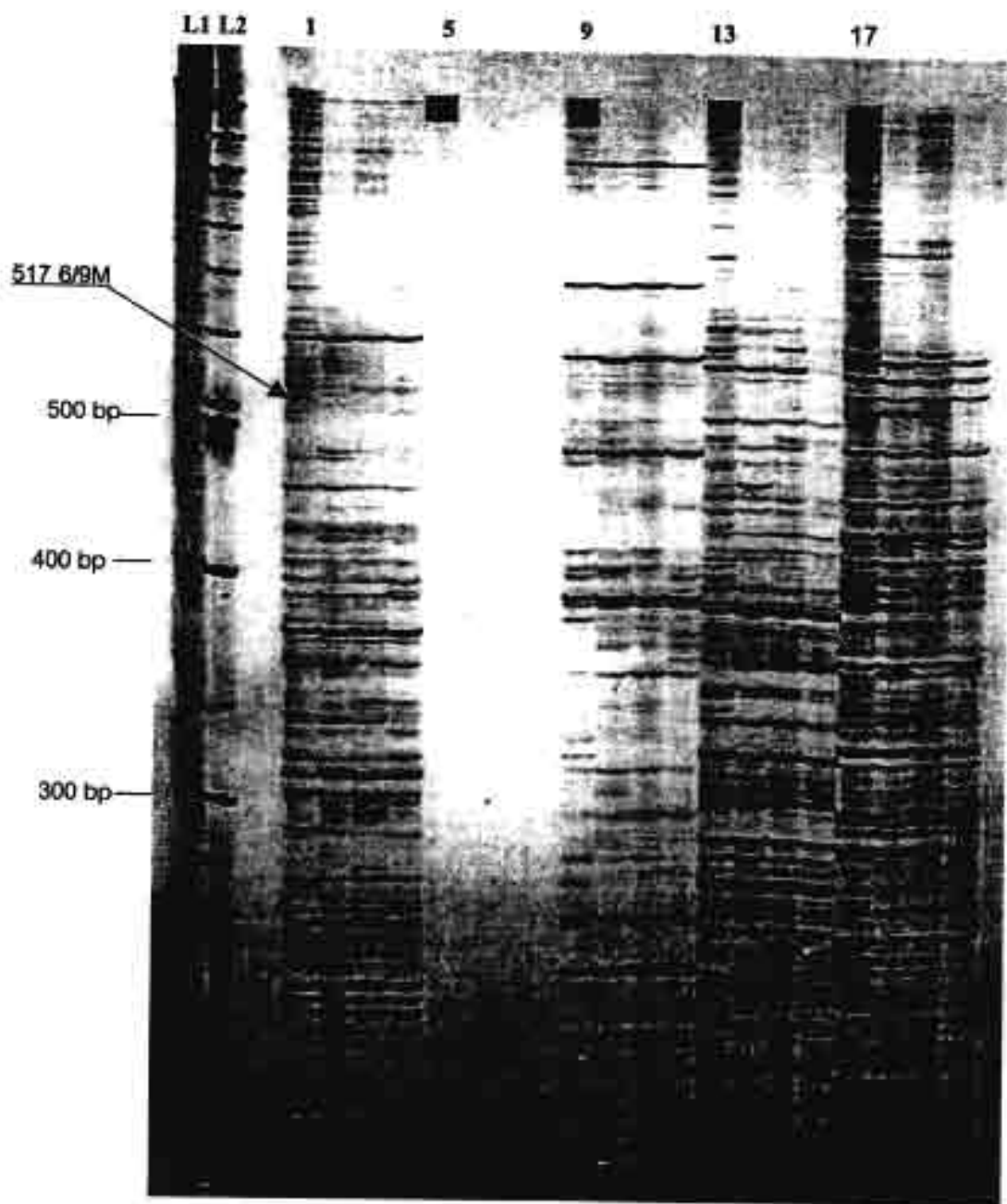
รูปที่ 4 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเป่าสี่เพศผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ 17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 05 + MseI 12 (ช่อง 1-4), EcoRI 05 + MseI 13 (ช่อง 5-8) , EcoRI 05 + MseI 14 (ช่อง 9-12) , EcoRI 05 + MseI 15 (ช่อง 13-16), EcoRI 05 + MseI 16 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกสรแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศผู้ และเพศเมีย



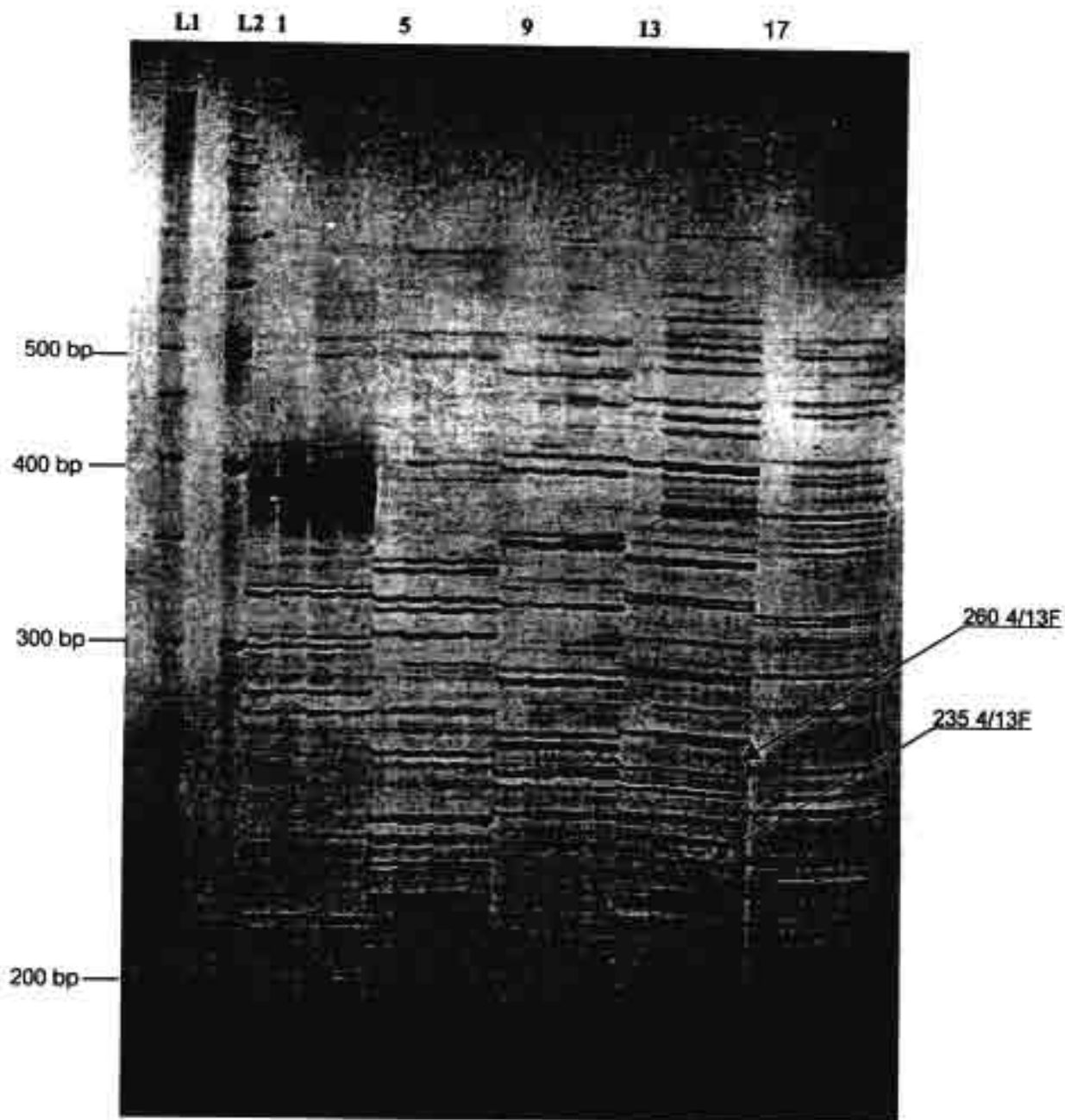
รูปที่ 5 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเป่าชื่อเพศผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FBI (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 07 + MseI 16 (ช่อง 1-4), EcoRI 08 + MseI 09 (ช่อง 5-8) , EcoRI 08 + MseI 10 (ช่อง 9-12) , EcoRI 08 + MseI 11 (ช่อง 13-16), EcoRI 08 + MseI 12 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ลูกศรแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศผู้



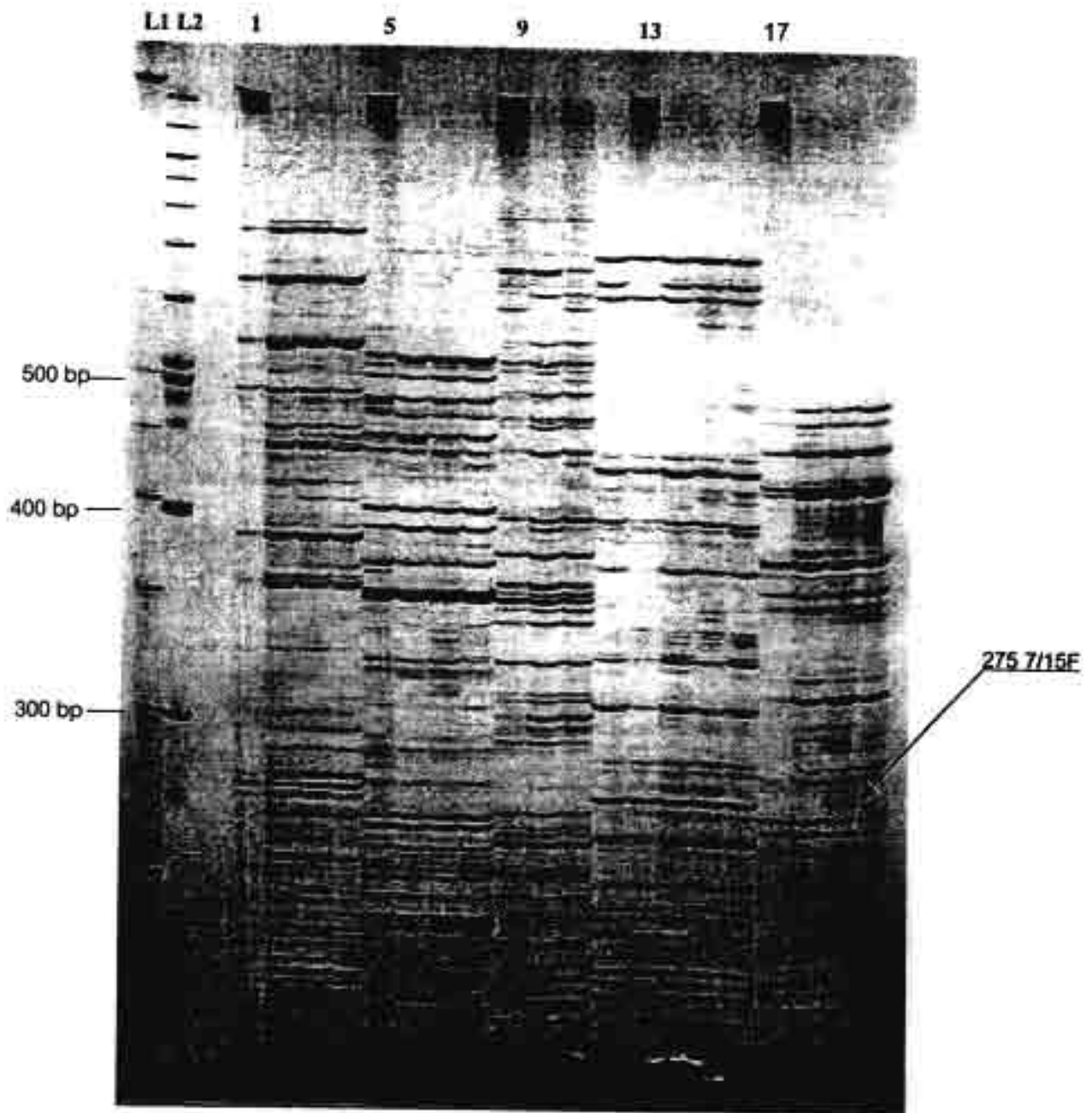
รูปที่ 6 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเป่าสี่แฉกเพศผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 09 + MseI 15 (ช่อง 1-4), EcoRI 09 + MseI 16 (ช่อง 5-8) , EcoRI 11 + MseI 09 (ช่อง 9-12) , EcoRI 11 + MseI 10 (ช่อง 13-16) , EcoRI 11 + MseI 11 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกตรึงแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศผู้



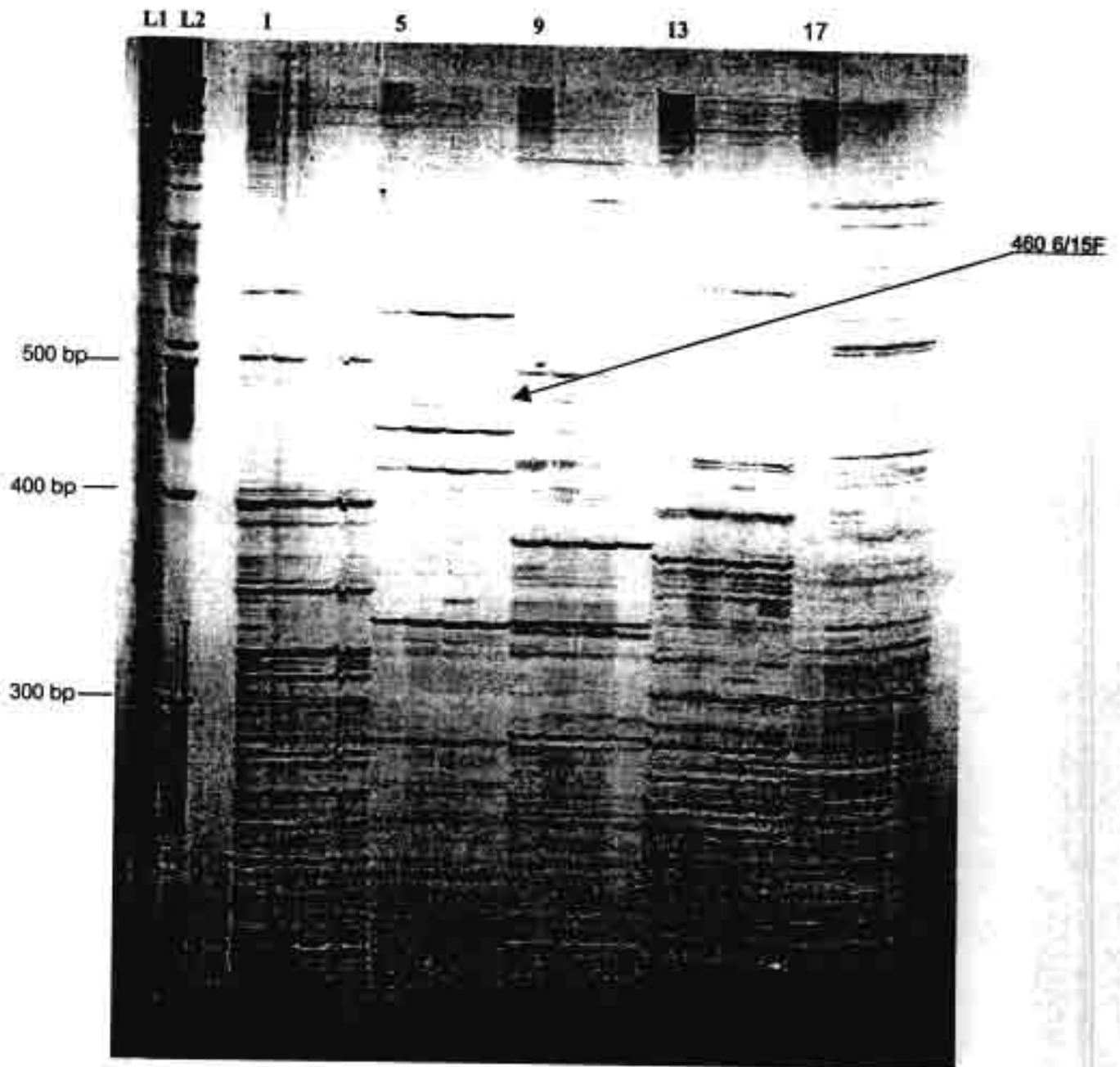
รูปที่ 7 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเป่าสีเพชผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพชเมือ FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 06 + MseI 09 (ช่อง 1-4), EcoRI 06 + MseI 10 (ช่อง 5-8), EcoRI 06 + MseI 11 (ช่อง 9-12), EcoRI 06 + MseI 12 (ช่อง 13-16), EcoRI 06 + MseI 13 (ช่อง 17-20), L1 และ L2 ก็คือเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกตรแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพชผู้



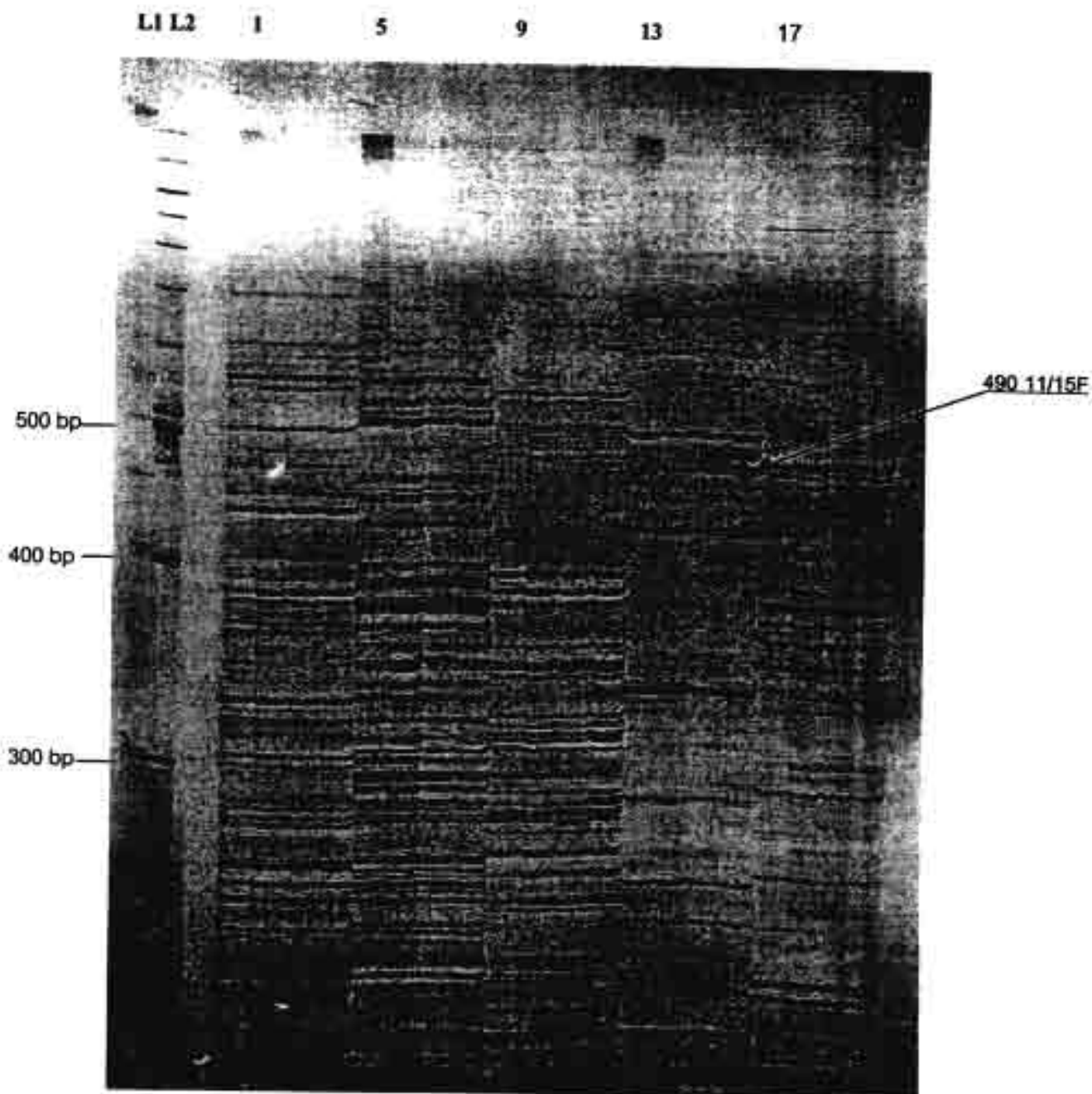
รูปที่ 8 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเมืง้าชื่อเพศผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 04 + MseI 10 (ช่อง 1-4), EcoRI 04 + MseI 11 (ช่อง 5-8) , EcoRI 04 + MseI 12 (ช่อง 9-12 ) , EcoRI 04 + MseI 13 (ช่อง 13-16), EcoRI 04 + MseI 14 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกสรแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศเมีย



รูปที่ 9 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเบ้าสี่เหลี่ยม MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 07 + MseI 11 (ช่อง 1-4), EcoRI 07 + MseI 12 (ช่อง 5-8) , EcoRI 07 + MseI 13 (ช่อง 9-12) , EcoRI 07 + MseI 14 (ช่อง 13-16), EcoRI 07 + MseI 15 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกตรึงแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศเมีย



รูปที่ 10 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหน่อเข้เปื้อนเชื้อเห็ด MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ 17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเห็ดเม็ย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 06 + MseI 14 (ช่อง 1-4), EcoRI 06 + MseI 15 (ช่อง 5-8) , EcoRI 06 + MseI 16 (ช่อง 9-12) , EcoRI 07 + MseI 09 (ช่อง 13-16), EcoRI 07 + MseI 10 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือคี่เอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกสรแสดงด้วยเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเห็ดเม็ย



รูปที่ 11 AFLP pattern ที่ได้จากการใช้ DNA bulks ของหอยเป่าชื่อเพศผู้ MB1 (ช่อง 1,5,9,13 และ 17) และ MB2 (ช่อง 2,6,10,14 และ18) และเพศเมีย FB1 (ช่อง 3,7,11,15 และ19) และ FB2 (ช่อง 4,8,12,16 และ20) กับ EcoRI 11 + MseI 12 (ช่อง 1-4), EcoRI 11 + MseI 13 (ช่อง 5-8) , EcoRI 11 + MseI 14 (ช่อง 9-12) , EcoRI 11 + MseI 15 (ช่อง 13-16), EcoRI 11 + MseI 16 (ช่อง 17-20) , L1 และ L2 คือซีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp และ 100 bp ladders ตามลำดับ ถูกตรวจแสดงตัวอย่างเครื่องหมาย AFLP ที่พบเฉพาะในเพศเมีย

ต่อจากนั้นได้นำ AFLP markers ทั้งหมดจำนวน 14 markers มาโคลนและเลือกโคลน ประมาณ 1-5 clones ต่อหนึ่ง marker รวมทั้งหมดได้ห้าลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งสิ้น 45 clones ประกอบด้วย female markers จำนวน 21 clones และ male markers จำนวน 24 clones และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับอื่นที่มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้ BLASTN และ BLASTX programs ผลที่ได้พบว่าโคลนส่วนใหญ่เป็น Unknown gene (ตารางที่ 2 และ 3) ยกเว้นโคลน 400 5/8F2 ที่ได้มาจากคู่ของไพรเมอร์ EcoRI 05 + MseI 08 จาก female marker พบว่ามีความเหมือนกับ LTR retrotransposable element ใน *Oryzias latipes* โดยมีค่า E-value เท่ากับ 6e-22

ตารางที่ 2 : AFLP markers ที่จำเพาะต่อหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศผู้

	AFLP primer	Male-specific AFLP marker	No. of clone	Clone	Length	BLASTN	BLASTX
1	EcoRI 01 + MseI 07	300 1/7M	3	300 1/7M1 300 1/7M2 300 1/7M3	309 297 296	Unknown gene Unknown gene Unknown gene	Unknown gene Unknown gene Unknown gene
2	EcoRI 08 + MseI 07	280 8/7 M	3	280 8/7 M1 280 8/7 M2 280 8/7 M3	237 238 242	Unknown gene Unknown gene Unknown gene	Unknown gene Unknown gene Unknown gene
3	EcoRI 05 + MseI 16	325 5/16M	4	325 5/16M1 325 5/16M2 325 5/16M3 325 5/16M4	322 322 312 325	Unknown gene Unknown gene Unknown gene Unknown gene	Unknown gene Unknown gene Unknown gene Unknown gene
4	EcoRI 07 + MseI 16	520 7/16M	5	520 7/16M	522	Unknown gene	Unknown gene
5	EcoRI 11 + MseI 11	280 11/11M	3	280 11/11M1 280 11/11M2 280 11/11M3	296 285 289	Unknown gene Unknown gene Unknown gene	Unknown gene Unknown gene Unknown gene
6	EcoRI 06 + MseI 09	517 6/9M	4	517 6/9M1 517 6/9M2	519 520	Unknown gene Unknown gene	Unknown gene Unknown gene
7	EcoRI 09 + MseI 15	320 9/15M	2	320 9/15M	315	Unknown gene	Unknown gene

ตารางที่ 3 : AFLP markers ที่จำเพาะต่อหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศเมีย

	AFLP primer	Female-specific AFLP marker	No. of clone	Clone	Length	BLASTN	BLASTX
1	EcoRI 04 + MseI 13	235 4/13F	2	235 4/13F	220	Unknown gene	Unknown gene
2	EcoRI 04 + MseI 13	260 4/13F	2	260 4/13F1	269	Unknown gene	Unknown gene
				260 4/13F2	263	Unknown gene	Unknown gene
3	EcoRI 07 + MseI 15	275 7/15F	5	275 7/15F1	276	Unknown gene	Unknown gene
				275 7/15F2	271	Unknown gene	Unknown gene
4	EcoRI 05 + MseI 15	375 5/15F	3	375 5/15F	372	Unknown gene	Unknown gene
5	EcoRI 05 + MseI 08	400 5/8F	5	400 5/8F1	372	Unknown gene	Unknown gene
				400 5/8F2	434	Unknown gene	LTR retrotransposable element ( <i>Oryzias latipes</i> )
				400 5/8F3	410	Unknown gene	Unknown gene
6	EcoRI 06 + MseI 15	460 6/15F	1	460 6/15F	472	Unknown gene	Unknown gene
7	EcoRI 11 + MseI 15	490 11/15F	3	490 11/15F1	501	Unknown gene	Unknown gene
				490 11/15F2	474	Unknown gene	Unknown gene

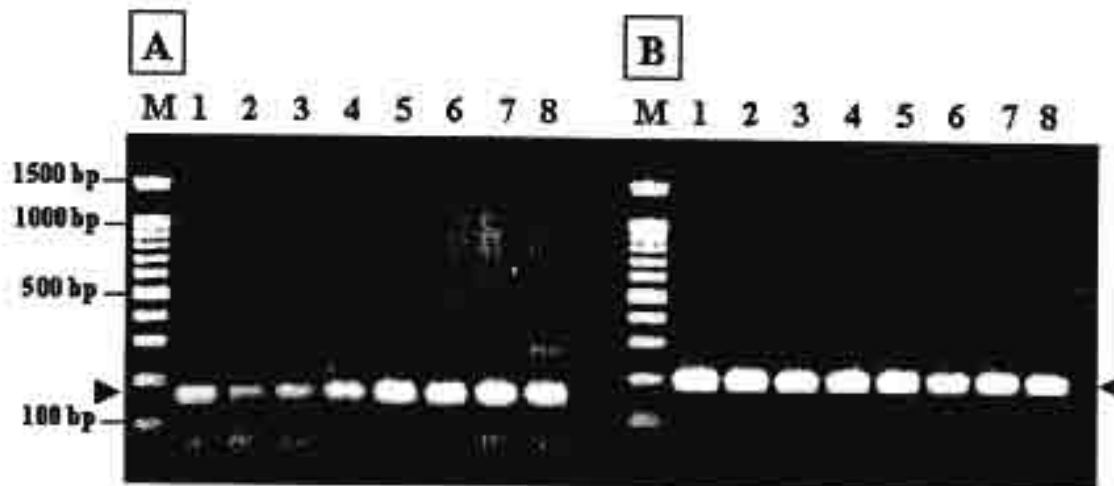
## 2.2 ตรวจสอบความจำเพาะต่อเพศของ SCAR marker

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก AFLP markers จำนวน 6 โคลนประกอบด้วยไพรเมอร์ HaM1F/R และ HaM2F/R จาก male-specific AFLP markers และไพรเมอร์ HaF1F/R , HaF2F/R , HaF3F/R และ HaF4F/R จาก female-specific AFLP markers มาออกแบบไพรเมอร์ (ตารางที่ 4) โดยปฏิกิริยา PCR จะทำในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่ง ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 , 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> , 100 μM ของ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP, 0.4 μM ของแต่ละไพรเมอร์ และ 1 U ของ *Taq* DNA Polymerase ทำการเพิ่มขนาดปริมาณ DNA จากหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศผู้ และเพศเมียอย่างละ 4 ตัวอย่าง โดยมี PCR profiles คือ Predenaturation 94 °C นาน 3 นาที และตามด้วย Denaturation 94 °C นาน 45 วินาที Annealing 48 °C นาน 45 วินาที Extension 72 °C นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย Final extension 72 °C นาน 75 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์มาวิเคราะห์ ใน 1.8% agarose gel electrophoresis

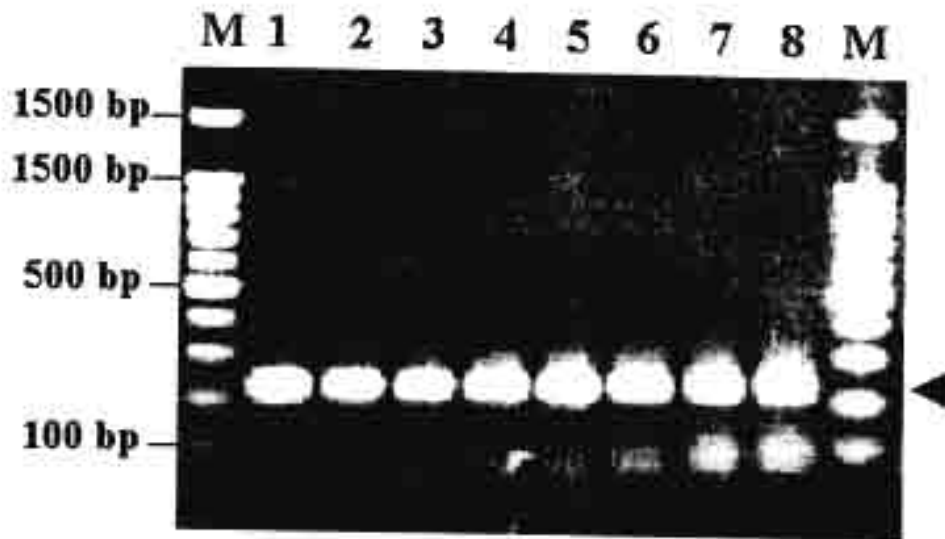
ตารางที่ 4 : ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของ SCAR markers ที่พัฒนาจากเครื่องหมาย AFLP

Primer name	Sequence of primer	ความจำเพาะของ AFLP markers	Clone	Expected size of PCR product
HaM1F/R	Forward:TAGGTTCTGGTGACACTTTGCCCGA Reward: ATGTGTGAGAACTGGAATGTTGCTG	Male	320 9/15M	147 bp
HaM2F/R	Forward:GCCTCATTGAAGCGATTCCCTAT Reward: CCCTTTCGTCTCGTTTAGATTGGTC	Male	520 7/16M	187 bp
HaF1F/R	Forward:AGCTGGGOCCTTTTATGATGAGAC Reward: AGTACGGGGATCGGTGGAACGGGA	Female	275 7/15F1	200 bp
HaF2F/R	Forward:CACAGGCCCCCAAACGTGGAGCAT Reward: CAGCGAGCTTGACCACCCCATCT	Female	275 7/15F2	230 bp
HaF3F/R	Forward:TGTCCGACTAACCACCTTTTGCTA Reward: CCCTCCAAACATTCCACATCTCT	Female	375 5/15F	199 bp
HaF4F/R	Forward:TTCTTGTGCCGAAAAGTGGAG Reward: CCTGAGGTGACATTGTTGACGA	Female	400 5/8F2	350 bp

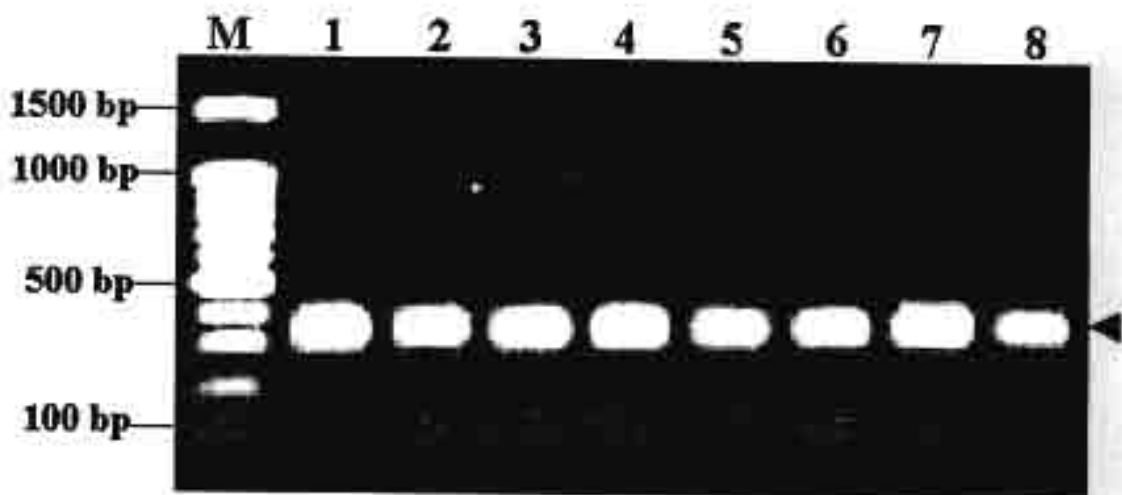
ผลจากการทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอหอยเป่าอื้อเพศผู้ จำนวน 4 ตัวอย่าง และหอยเพศเมียจำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ HaM1F/R (รูปที่ 12 A) ไพรเมอร์ HaM2F/R (รูปที่ 12 B) ไพรเมอร์ HaF2F/R(รูปที่ 13) และไพรเมอร์ HaF4F/R(รูปที่ 14) สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดตามที่คาดคะเนทั้งในหอยเป่าอื้อเพศผู้ และหอยเป่าอื้อเพศเมีย



รูปที่ 12 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าอื้อเพศผู้ (แถวที่ 1-4 ) และเพศเมีย (แถวที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ HaM1F/R (A) และ ไพรเมอร์ HaM2F/R (B)

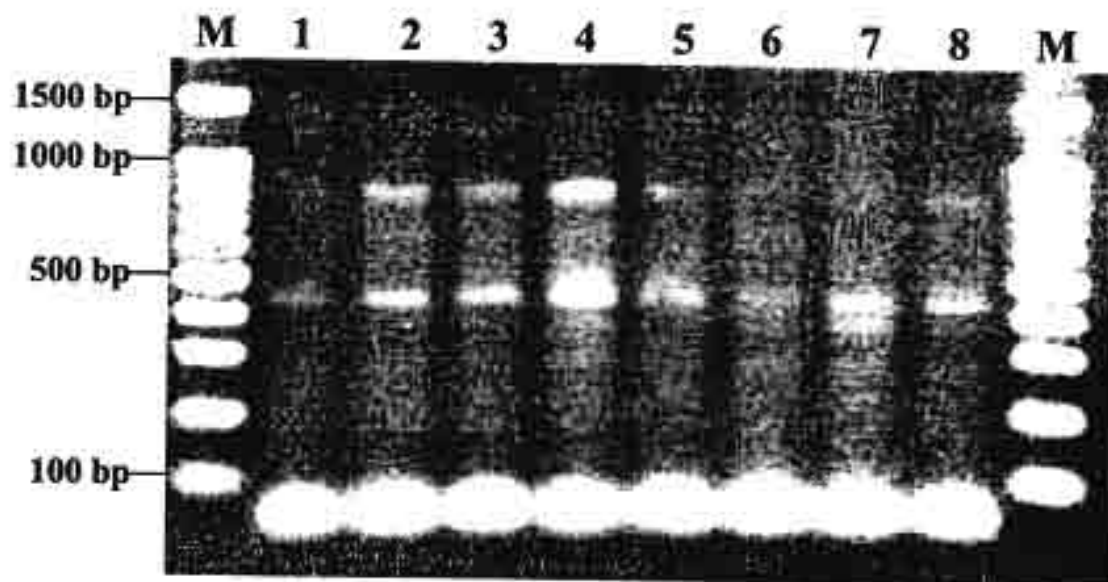


รูปที่ 13 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในทอยเป้าเชื้อเพศผู้ (แถวที่ 1-4 ) และเพศเมีย (แถวที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ HaF2F/R

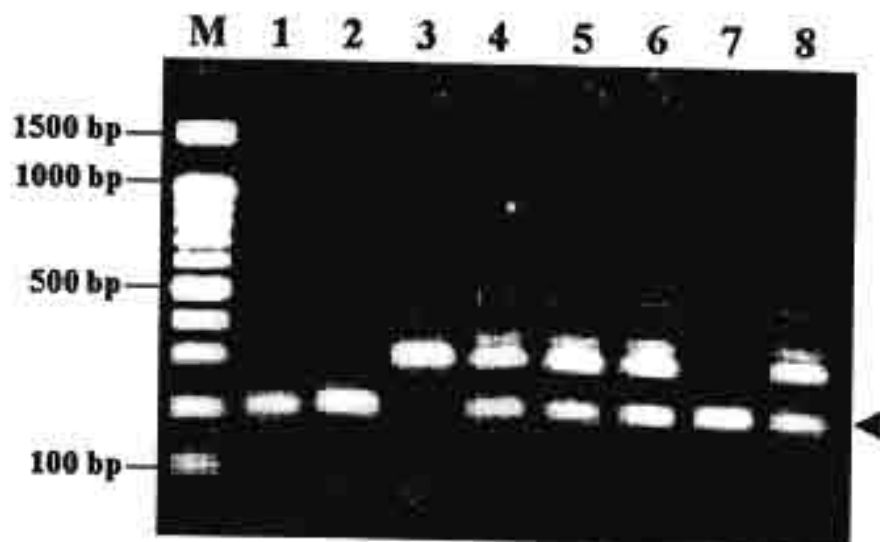


รูปที่ 14 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในทอยเป้าเชื้อเพศผู้ (แถวที่ 1-4 ) และเพศเมีย (แถวที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ HaF4F/R

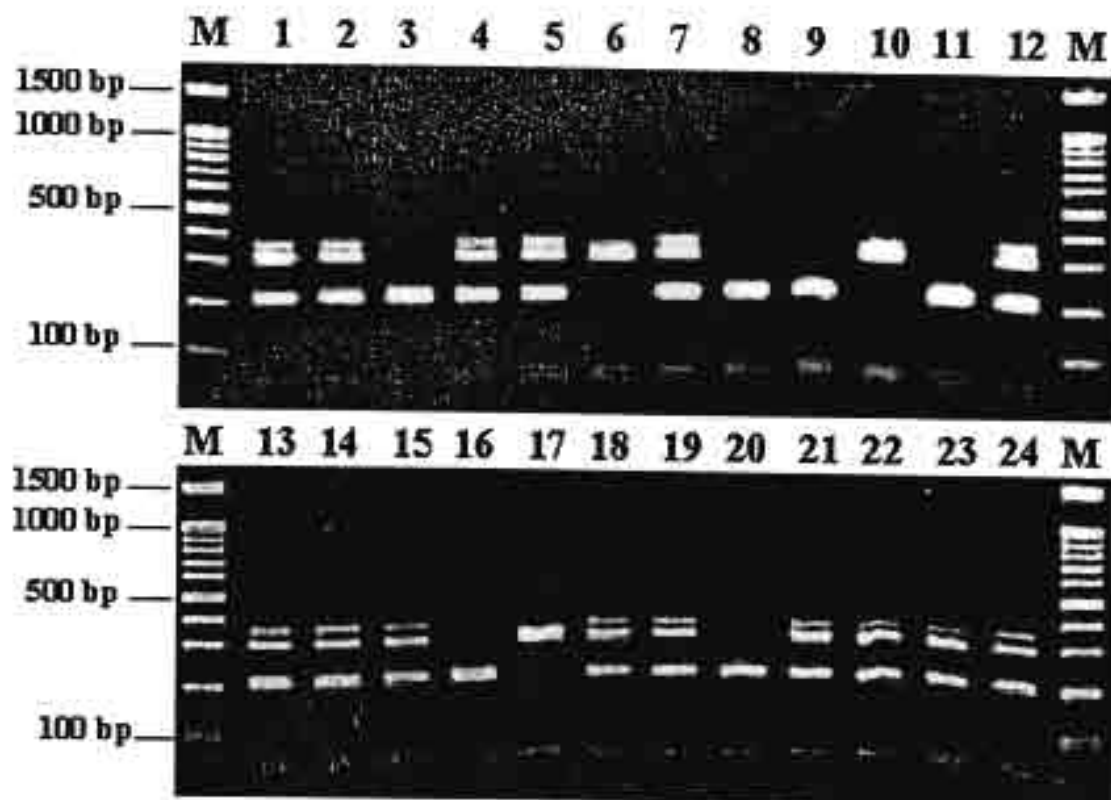
ในส่วนผลของไพรเมอร์ HaF1F/R (รูปที่ 15) พบว่าเมื่อใช้ตรวจดีเอ็นเอของหอยเพศผู้และหอยเพศเมีย ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp และ 900 bp ทั้งในหอยเพศผู้ และเพศเมีย และผลของไพรเมอร์ HaF3F/R (รูปที่ 16) พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ คือ 199 bp (แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังไว้) 300 bp และ 340 bp โดยขึ้นครบทุกแถบ หรือบางแถบทั้งในหอยเพศผู้ ( 4 ตัวอย่าง) และหอยเพศเมีย ( 4 ตัวอย่าง) และได้ทดลองเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น โดยใช้ตัวอย่างหอยเพศผู้ 12 ตัวอย่าง และหอยเพศเมีย 12 ตัวอย่าง ผลพบว่า ทั้ง 3 แถบดีเอ็นเอที่พบขึ้นกระจายทั้งหอยเพศผู้ และหอยเพศเมีย (รูปที่ 17)



รูปที่ 15 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าฮือเพศผู้ (แถวที่ 1-4 ) และเพศเมีย (แถวที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ HaF1F/R



รูปที่ 16 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ในหอยเป่าสีอเพศผู้ (ช่องที่ 1-4) และเพศเมีย (ช่องที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ HaF3F/R



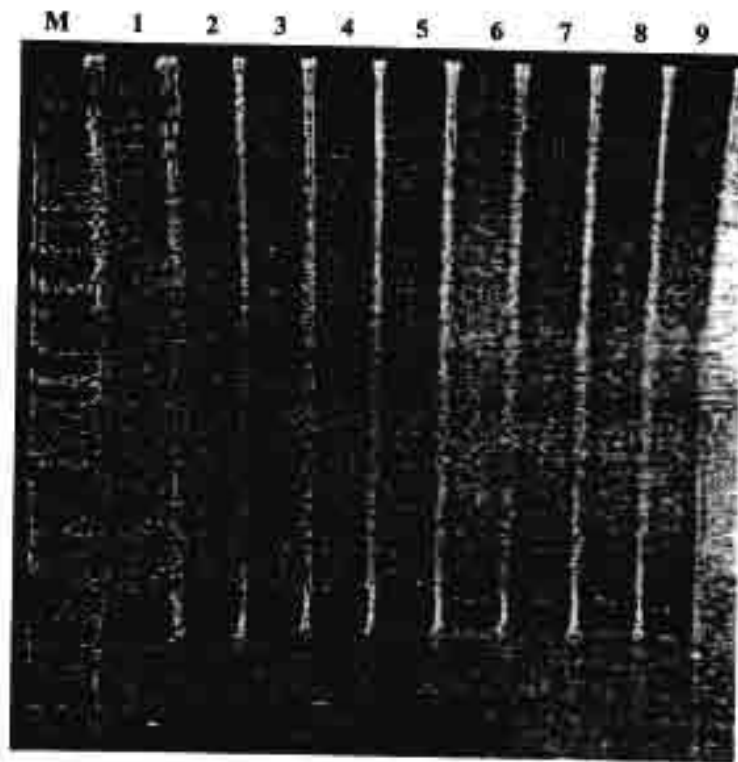
รูปที่ 17 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ในหอยเป่าสีอเพศผู้ (ช่องที่ 1-6 และ 13-18) และเพศเมีย (ช่องที่ 7-12 และ 19-24) โดยใช้ไพรเมอร์ HaF3F/R

### 2.3 SSCP analysis

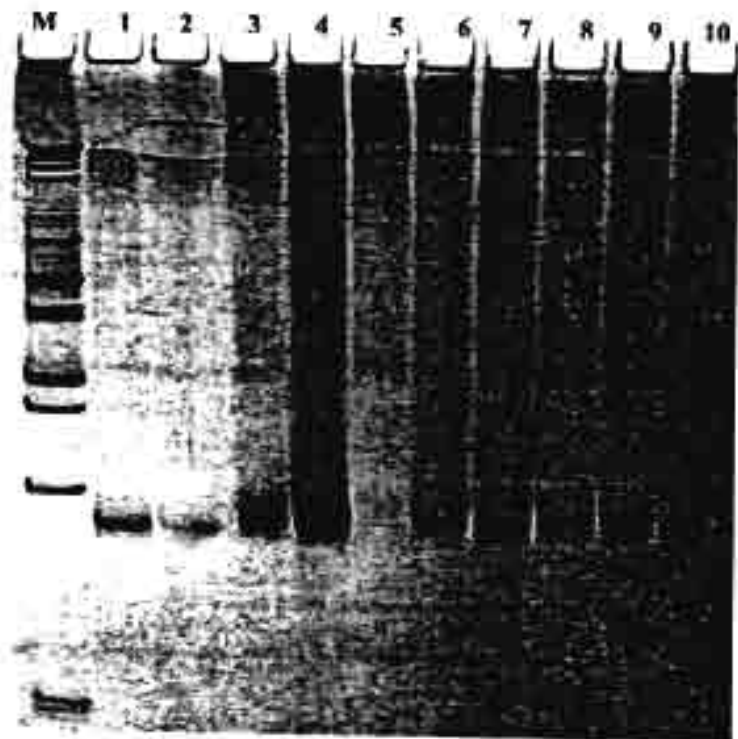
คัดเลือกไพรเมอร์ HaM1F/R ไพรเมอร์ HaM2 F/R ไพรเมอร์ HaF2 F/R ไพรเมอร์ HaF4 F/R ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เพียงแถบเดียวมาวิเคราะห์ด้วย เทคนิค SSCP เพื่อหาความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ภายในสายดีเอ็นเอนั้น จากผลการทดลองเมื่อนำ PCR products ของแต่ละไพรเมอร์มาวิเคราะห์พบว่า ไม่พบความหลากหลายของการเกิด single-stranded conformation ขึ้นในทั้ง 4 ไพรเมอร์ (รูปที่ 18, 19, 20 และ 21)



รูปที่ 18 รูปแบบ SSCP pattern ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าสีเพชผู้ (ช่องที่ 2-7) และหอยเป่าสีเพชมือ (ช่องที่ 8-13) โดยใช้ไพรเมอร์ HaM1F/R



รูปที่ 19 รูปแบบ SSCP pattern ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าสีเทสดู (ช่องที่ 2-5) และหอยเป่าสีเทคมือ (ช่องที่ 6-9) โดยใช้ไพรเมอร์ HaM2F/R



รูปที่ 20 รูปแบบ SSCP pattern ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าสีเทสดู (ช่องที่ 2-6) และหอยเป่าสีเทคมือ (ช่องที่ 7-10) โดยใช้ไพรเมอร์ HaF2F/R



รูปที่ 21 รูปแบบ SSCP pattern ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าชื่อเทศผู้ (ช่องที่ 2-5) และหอยเป่าชื่อเทศเมีย (ช่องที่ 6-9) โดยใช้ไพรเมอร์ HaF4F/R

3. การค้นหายีนที่แสดงออกจำเพาะต่อเพศของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ด้วยเทคนิค EST และ cDNA subtraction

3.1 เทคนิค EST และ cDNA subtraction

จากการสร้าง Normal cDNA library ของอวัยวะ และรังไข่ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* พบโคลนที่มี insert มากกว่า 500 bp ใน normal cDNA library ของอวัยวะ มีประมาณ 80% และใน normal cDNA library ของรังไข่ มีประมาณ 65%

ส่วน Subtractive cDNA libraries ของอวัยวะ และรังไข่ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* พบว่าโคลนที่มี insert มากกว่า 200 bp ใน Subtractive cDNA libraries ของทั้งอวัยวะ และรังไข่ มีประมาณ 70%

โดยจำนวนโคลนทั้งหมดที่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากทั้ง 4 cDNA libraries คือ 588 โคลน (ตารางที่ 5) ซึ่งประกอบด้วย Normal cDNA library ของรังไข่ จำนวน 200 โคลน Normal cDNA library ของอวัยวะ จำนวน 118 โคลน และ Subtractive cDNA library ของรังไข่ จำนวน 110 โคลน Subtractive cDNA library ของอวัยวะ จำนวน 160 โคลน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน GenBank พบว่าใน Normal cDNA library ของรังไข่ มีจำนวนยีนที่ Homologue จำนวน 101 โคลน (50.5%) Unidentified function จำนวน 8 โคลน (4.0%) และ Unknown จำนวน 91 โคลน (45.5%) และใน Normal cDNA library ของอัณฑะ มีจำนวนยีนที่ Homologue จำนวน 61 โคลน (51.7%) Unidentified function จำนวน 12 โคลน (10.2%) และ Unknown จำนวน 45 โคลน (38.1%)

ในส่วนของ Subtractive cDNA library ของรังไข่ มีจำนวนยีนที่ Homologue จำนวน 65 โคลน (59.0%) Unidentified function จำนวน 6 โคลน (5.5%) และ Unknown จำนวน 39 โคลน (35.5%) และใน Subtractive cDNA library ของอัณฑะ มีจำนวนยีนที่ Homologue จำนวน 52 โคลน (32.5%) Unidentified function จำนวน 4 โคลน (2.5%) และ Unknown จำนวน 104 โคลน (65.0%)

ตารางที่ 5 จำนวน EST clones ทั้งหมดจาก Normal cDNA libraries และ Subtractive cDNA libraries ของรังไข่ และอัณฑะหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis astnina*

Library	No. of clones	Homologue	Unidentified function	Unknown
Normal ovaries	200 clones	101 (50.5%)	8 (4.0%)	91 (45.5%)
Normal testes	118 clones	61 (51.7%)	12 (10.2%)	45 (38.1%)
Subtractive ovaries	110 clones	65 (59.0%)	6 (5.5%)	39 (35.5%)
Subtractive testes	160 clones	52 (32.5%)	4 (2.5%)	104 (65.0%)
<b>Total</b>	588 clones	279	30	279

เมื่อนำข้อมูลมาแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ของยีน สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ ๆ (ตารางที่ 6) ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 คือ Sex-related genes กลุ่มที่ 2 คือ Stress response, detoxification and cell defense protein กลุ่มที่ 3 คือ Protein synthesis and ribosomal protein กลุ่มที่ 4 คือ Cell division and DNA replication กลุ่มที่ 5 คือ Metabolism กลุ่มที่ 6 คือ Unidentified function

ตารางที่ 6 กลุ่มของยีนที่แบ่งตามหน้าที่จาก abalone EST clones

Category	Normal ovary	Normal testis	Subtractive ovary	Subtractive testis
Sex-related genes	43	11	40	20
Stress response, detoxification and cell defense protein	18	8	1	0
Protein synthesis and ribosomal protein	31	16	5	10
Cell division and DNA replication	0	16	8	11
Metabolism	9	10	11	11
Unidentified function	8	12	6	4
Unknown	91	45	39	104
Total	200	118	110	160

จากการแบ่งประเภทของยีนพบยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศ (Sex-related transcripts) ที่พบใน Normal cDNA library ของรังไข่ พบยีน Vitelline coat protein (ตารางที่ 7) ซึ่งพบประมาณ 21 % หรือ 42 โคลน (Vitelline coat protein 41 , Vitelline coat protein 42 และ Vitelline envelope sperm lysin receptor) เป็นโปรตีนที่หุ้มเปลือกไข่ และยีน Hydroxysteroid dehydrogenase -like protein เป็น Steroid biosynthesis enzyme

ส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับ Stress response, detoxification, และ cell defense proteins (ตารางที่ 8) เช่น Stress-inducible chaperone mt- GrpE#1 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด IgE-dependent histamine release factor ทำให้เกิดการ Allergic inflammation

นอกจากนั้นยังพบยีนในกลุ่ม metabolism (ตารางที่ 9) ที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของเซลล์เป็นจำนวนมาก เช่น ADP/ATP carrier, Phosphate carrier member 3, ATP-binding protein, Mitochondrial ATPase inhibitor, Cytochrome c oxidase subunit III, Arginine kinase และ Mitochondrial long-chain enoyl-CoA hydratase/3-hydroxycyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit

ตารางที่ 7 กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Sex-related transcripts ของ normal cDNA library ของรังไข่

Gene	Closest species	Accession number	No. of clones
Vitelline coat protein 41	<i>Tegula pfeifferi</i>	BAB15843	38
Vitelline coat protein 42	<i>Tegula pfeifferi</i>	BAB15930	2
Vitelline envelope sperm lysin receptor	<i>Haliotis rufescens</i>	AAL50827	2
Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein	<i>Homo sapiens</i>	AAM14670	1

ตารางที่ 8 กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Stress response, detoxification, และ cell defense proteins ของ normal cDNA library ของรังไข่

Gene	Closest species	Accession number	Length	E-value
Stress-inducible chaperone mt- GrpE#1	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_077813.1	752	7e-51
Chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1)	<i>Homo sapiens</i>	CAB90433	672	2e-10
Tumor-specific transplantation antigen P198 homolog p23	<i>Bos taurus</i>	A44367	716	3e-58
IgE-dependent histamine release factor	<i>Dermacentor variabilis</i>	AAL75585	729	4e-13
Translationally controlled tumor protein homolog (TCTP)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9VGS2	861	1e-08
Variable region-containing chitin-binding protein 5	<i>Branchiostoma floridae</i>	AAN62911.1	492	3e-07
T-cell activation WD repeat protein	<i>Homo sapiens</i>	AAM43838	725	9e-40

ตารางที่ 9 กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolisms ของ normal cDNA library ของรังไข่

Gene	Closest species	Accession number	Length	E-value
ADP/ATP carrier	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	AAC23561	923	4e-44
Phosphate carrier, member 3	<i>Homo sapiens</i>	AAH01328	955	e-119
ATP-binding protein	<i>Ralstonia solanacearum</i>	CAD14642	715	7e-25
Mitochondrial ATPase inhibitor	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AAG49389	669	2e-13
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Melanocetus murrayi</i>	BAC23352.1	650	1e-44
Arginine kinase	<i>Nordotis madaka</i>	BAA05100.1	665	1e-68
Mitochondrial long-chain enoyl-CoA hydratase/3-hydroxycyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit	<i>Rattus norvegicus</i>	AA03939.1	B785	9e-75

ยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศที่พบใน normal cDNA library ของอิมซะ คือ Sperm lysin (16 kDa acrosomal protein) , Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 , Axonemal p66.0 และ Tektin A1 (ตารางที่ 10) และกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Stress response, detoxification, และ cell defense proteins (ตารางที่ 11) เช่น Heat shock protein70, HLA-B associated transcript 1, Tumor-specific transplantation antigen P198 homologue p23, High mobility group protein 1 และ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ส่วนในกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolisms (ตารางที่ 12) ที่พบคือ ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 , ADP/ATP carrier , Arginine kinase, Fructosamine 3 kinase, Alpha-methylacyl-CoA racemase และ Carnitine palmitoyltransferase I alpha

ตารางที่ 10 กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Sex-related transcripts ของ normal cDNA library ของ  
อ้นจระ

Gene	Closest species	Accession number	No. of clones
Sperm lysin (16 kDa acrosomal protein)	<i>Hallotis ovina</i>	L26276	9
Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1	<i>Rattus norvegicus</i>	XP_230906	1
Axonemal p66.0	<i>Ciona intestinalis</i>	BAB88833	1
Tektin A1	<i>Ciona intestinalis</i>	BAB86298	1

ตารางที่ 11 กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Stress response, detoxification, และ cell defense proteins  
ของ normal cDNA library ของอ้นจระ

Gene	Closest species	Accession number	Length	E-value
Heat shock protein 70	<i>Danio rerio</i>	AAH4806 35	505	e-36
HLA-B associated transcript 1; DEAD-box protein	<i>Homo sapiens</i>	AAP3678 8	789	e-106
Importin 9	<i>Homo sapiens</i>	NP_060555	763	1e-04
Tumor-specific transplantation antigen P198 homolog p23	<i>Bos taurus</i>	A44367	670	4e-69
High mobility group protein 1; HMG1	<i>Biomphalaria glabrata</i>	AAN31640	702	3e-48
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O42993	668	6e-32

ตารางที่ 12 กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolisms ของ normal cDNA library ของอัมเจาะ

Gene	Closest species	Accession number	Length	E-value
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	<i>Mus musculus</i>	NP_663402	802	2e-71
ADP/ATP carrier	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	AAL79525	818	3e-48
Arginine kinase	<i>Haliotis Madaka</i>	D26104	800	e-130
Fructosamine 3 kinase	<i>Mus musculus</i>	NP_071297	850	5e-09
Alpha-methylacyl-CoA racemase	<i>Homo sapiens</i>	Q9UHK6	726	2e-52
Carnitine palmitoyltransferase 1 alpha	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_113747	729	3e-68

จากการสร้าง Subtractive cDNA library จากรังไข่ และอัมเจาะเพื่อหาอินที่แสดงออกเฉพาะในรังไข่ คือ Subtractive cDNA library ของรังไข่ (ตารางที่ 13) และหาอินที่แสดงออกเฉพาะในอัมเจาะ คือ Subtractive cDNA library ของอัมเจาะ (ตารางที่ 14) พบอินที่เกี่ยวข้องกับเพศที่พบใน Subtractive cDNA library ของรังไข่ เช่น อิน Vitelline coat protein 41, Vitelline coat protein 42, Vitelline envelope sperm lysin receptor และ Vitellogenin-1 เป็นต้น และพบอินที่เกี่ยวข้องกับเพศที่พบใน Subtractive cDNA library ของอัมเจาะ เช่น Sperm lysin (16 kDa acrosomal protein), Fertilization protein (18 kDa acrosomal protein) และ Small androgen receptor-interacting protein (sarip)

ตารางที่ 13 แสดง Differentially expressed genes ของ subtractive cDNA จาก ovaries

Gene	Closest species	Accession number	No. of clones
Vitelline coat protein 41	<i>Tegula pfeifferi</i>	BAB15843	21
Vitelline coat protein 42	<i>Tegula pfeifferi</i>	BAB15930	2
Vitelline envelope sperm lysin receptor	<i>Haliotis rufescens</i>	AAL50827	15
Vitellogenin-1	<i>Plautia stali</i>	BAA88075	1

ADAMTS-9	<i>Homo sapiens</i>	Q9P2N4	1
Alpha tubulin 2	<i>Aplysia californica</i>	AF481056	2
Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	<i>Homo sapiens</i>	AAP36790	1
Peptide elongation factor 1-beta	<i>Gallus gallus</i>	AAD16874	2
G2/Mitotic-specific cyclin A	<i>Chlorohydra viridissima</i>	P51986	1
Mitotic apparatus protein P62	<i>Lytechinus pictus</i>	P91753	1
Myc homolog	<i>Crassostrea virginica</i>	AAB34577	1
40S ribosomal protein S9	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAK95191	1
Ribosomal protein L18	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	AAN73381	2
Ribosomal protein L19	<i>Argopecten irradians</i>	AF526203	1
Alanyl tRNA synthetase	<i>Mesocricetus auratus</i>	BAC44844	1
Chaperonin containing t-complex polypeptide 1	<i>Danio rerio</i>	AAD48818	1
ATP synthase	<i>Mus musculus</i>	BC003854	1
Fatty acid synthase	<i>Gallus gallus</i>	AAA48767	1
Ligase family member (60.3 kD)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_505451	2
Isocitrate dehydrogenase (NADP)	<i>Homo sapiens</i>	S57499	2
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 4	<i>Mus musculus</i>	NP062293	2
Microsatellite DNA	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	AJ420893	1
unnamed protein product	<i>Mus musculus</i>	BAC29193	1
hypothetical protein FLJ11196	<i>Homo sapiens</i>	AAH06082	1
ENSANGP00000021006 [ <i>Anopheles gambiae</i> ]	<i>Anopheles gambiae</i>	XP_312251	1
KIAA1412 protein [ <i>Homo sapiens</i> ]	<i>Homo sapiens</i>	BAA92650	1
CG10211-PA [ <i>Drosophila melanogaster</i> ]	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_609883	1

ตารางที่ 14 แสดง Differentially expressed genes ของ subtractive cDNA ใน testes

Gene	Closest species	Accession number	No. of clone
Sperm lysin (16 kDa acrosomal protein)	<i>Haliotis laevigata</i>	L262741	7
Fertilization protein (18 kDa acrosomal protein)	<i>Haliotis rufescens</i>	AAC37229	2
Small androgen receptor-interacting protein (sarip)	<i>Rattus norvegicus</i>	NM 147146.1	1
Alpha-tubulin 1	<i>Urechis caupo</i>	U30467.1	4
Histone H1	<i>Mytilus chilensis</i>	CAC94905.1	4
Histone H2A	<i>Mytilus edulis</i>	CAD37821.1	2
Polyadenylate binding protein	<i>Petromyzon marinus</i>	AAB88449	1
40S ribosomal protein S26-2	<i>Ictalurus punctatus</i>	AF402835.1	1
23S and 5S rRNA	<i>Calamus finmarchicus</i>	X06056.1	2
28S rRNA gene	<i>Salvelinus namaycush</i>	U17965.1	1
Internal transcribed spacer 1	<i>Hydrolagus colletii</i>	AF061799.1	3
Internal transcribed spacer 2, 28S rRNA	<i>Episiphon yamakawai</i>	AB103133.1	3
Cytochrome c oxidase subunit IV	<i>Urechis caupo</i>	AAA7439	1
microsatellite VNTR sequence	<i>Haliotis rubra</i>	AF302830.1	1
microsatellite DNA	<i>Cocos nucifera</i>	CNU458311	1
hypothetical protein MGC26778	<i>Danio rerio</i>	AAH49447.1	1
ENSANGP00000014144 [Anopheles gambiae str. PEST]	<i>Anopheles gambiae</i>	EAA10186.1	1

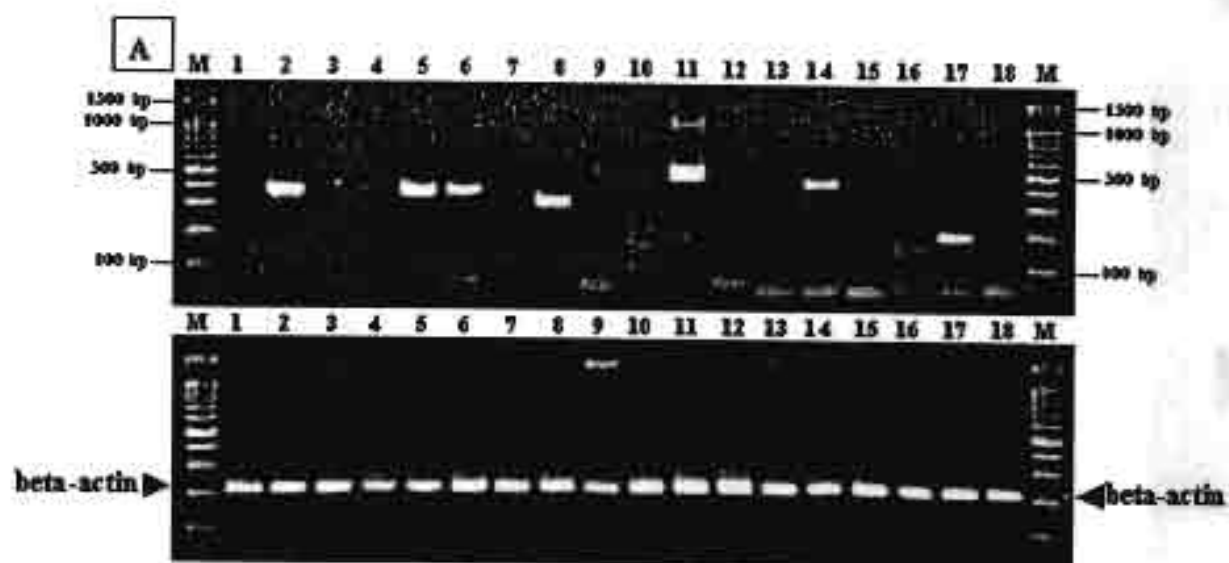
### 3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศที่พบใน cDNA libraries ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* มาตรวจสอบการแสดงออกโดยเทคนิค RT-PCR คือยีน Vitelline coat protein (VCP) ยีน Vitellogenin-1(VTG-1) ยีน Hydroxysteroid dehydrogenase -like protein (HSD) ยีน Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 (GIOT1) ยีน Axonemal p66.0 ยีน Tektin ยีน Small androgen receptor-interacting protein (SARIP) ยีน Sperm lysin (16 kDa acrosomal protein) และยีน Fertilization protein (18 kDa acrosomal protein) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 15 โดยได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน 3 เนื้อเยื่อ คือ อัณฑะ รังไข่ และ เม็ดเลือด ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

ตารางที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่เกี่ยวข้องกับเพศของหอยเป่าชื่อ *H. asinina*

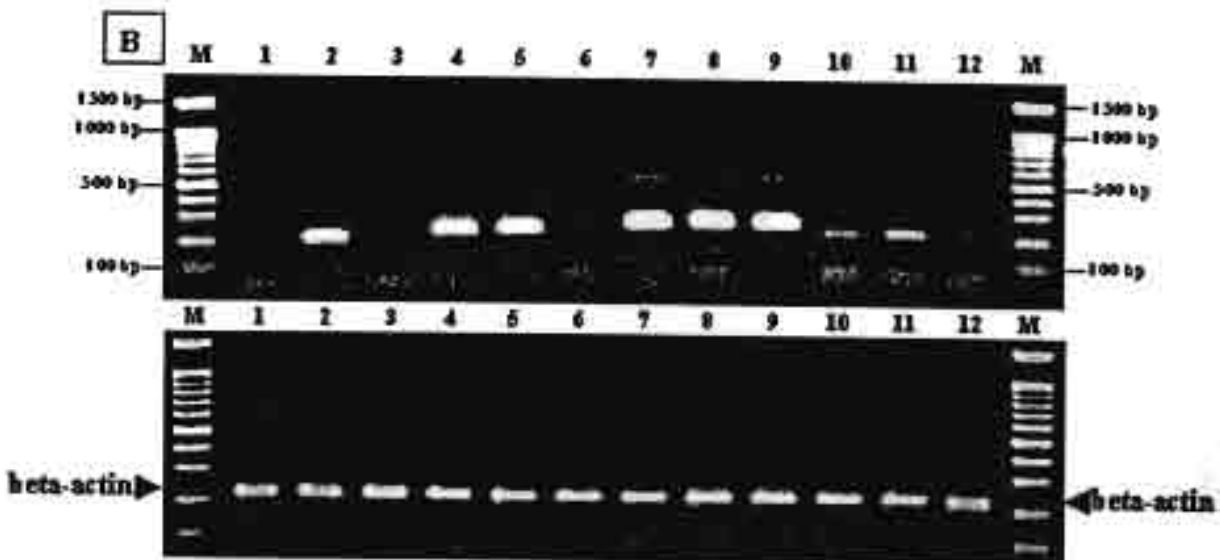
primer	sequence	Expected product
VCPg1	F: GGCTGCACCAGACCGATGAACGATACAC R: TGCTTCAACACCATAACCGTCTCCACAAC	346 bp
VCPg2	F: ACTGGGCTTTCTACCATCAACGTCCTGT R: CGACGACCCCTTGTTCTGGATAATCTCA	363 bp
VCPg3	F: ATACACAATCTCGTGCTCGTTCGGTTCA R: CACTATTCGCTCTCCGCAACCTGCTCTT	316 bp
VCPg7	F: TGCTCAGTGCTGGTGGTGGTCTGCTTGG R: TGGCTGGGCGGTGCCTTGTTACCTTCTA	467 bp
VCPHa49	F: ACCCCACAGGAGGAACAAACC R: CCGCAGCCAGCTCTAAGGATA	425 bp
VCPHa75	F: AGGATGTGGTGACGGTATTGTG R: CTTTATAGTGCGAGCGTTTGGT	189 bp
VTG	F: ACATCAGAACCGACGGCAAC R: TGAGGCAAGGTAGGCGAGG	202 bp
SARIP	F: GGCTTAGTGACTGAACGCCTCTA R: GCTGCTCTACTACGCACAACAC	246 bp
GIOT1	F: GACCACCCACGCACAGGAC R: TAGCAGCACTAATAAAGCCCCG	208 bp
HSD	F: GCCGTGGAAGAAGCAGTTGGA R: CAGGGGGTTGAGGTTGAGTGG	231 bp
Axonemal protein	F: GCACGACGAACTTCGCCCTG R: AACGCCCGCTTCGCTCCCA	327 bp
Tektin	F: TGTTGACAGGGATGGTGC GG R: CTCCTTGCCTACAGTTGAGATTG	282 bp
HaFP	F: CGACCCATAGCGGCGTAGTT R: AAGGTCCCAAAGAAAAGCCAGTA	248 bp
HaLysin	F: CGAGAAGGCAGACAGCCAGAC R: ATCCAGTGCTTGATGCTTGACG	262 bp

จากผลการทดลองเมื่อใช้ไพรเมอร์ VCPg1 (รูปที่ 22 ช่องที่ 1-3) ไพรเมอร์ VCPg3 (รูปที่ 22 ช่องที่ 7-9) ไพรเมอร์ VCPg2 (รูปที่ 22 ช่องที่ 4-6) สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เฉพาะในรังไข่แต่ไม่พบในอัมชะ และในเม็ดเลือด ส่วนผลของไพรเมอร์ VCPg7 (รูปที่ 22 ช่องที่ 10-12) และ ไพรเมอร์ VCPHa49 (รูปที่ 22 ช่องที่ 13-15) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เฉพาะในรังไข่แต่ไม่พบในอัมชะ และในเม็ดเลือด ส่วนผลของไพรเมอร์ VCPHa75 (รูปที่ 10 แถวที่ 22-18) สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ในทั้งสามเนื้อเยื่อ และไพรเมอร์โดยในรังไข่พบแถบที่เอ็นขนาด 189 bp ตามขนาดที่คาดหวังไว้ ส่วนในอัมชะพบแถบที่เอ็นขนาดประมาณ 160 bp



รูป 22 ผลการตรวจการแสดงออกของยีน Vitelline coat protein homologue โดยใช้ไพรเมอร์ VCPg1 (ช่องที่ 1-3) ไพรเมอร์ VCPg2 (ช่องที่ 4-6) ไพรเมอร์ VCPg3 (ช่องที่ 7-9) ไพรเมอร์ VCPg7 (ช่องที่ 10-12) ไพรเมอร์ VCPHa49 (ช่องที่ 13-15) และไพรเมอร์ VCPHa75 (ช่องที่ 16-18) โดยใช้ mRNA จากอัมชะ (ช่องที่ 1, 4, 7, 10, 13, และ 16) รังไข่ (ช่องที่ 2, 5, 8, 11, 14, และ 17) และเม็ดเลือด (ช่องที่ 3, 6, 9, 12, 15, และ 18)

ผลของโปรเมอร์ VTG-1 ซึ่งออกแบบมาจาก vitellogenin-1 homologue พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เฉพาะในรังไข่ (รูปที่ 23 ช่องที่ 1-3) ส่วนโปรเมอร์ HSD ซึ่งออกแบบมาจาก ยีน Hydroxysteroid dehydrogenase -like protein homologue (HSD) (รูปที่ 23 ช่องที่ 4-6) และ GIOT1 ซึ่งออกแบบมาจาก ยีน Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 homologue (GIOT1) (รูปที่ 23 ช่องที่ 11-12) สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เฉพาะในรังไข่และอัมชะ โปรเมอร์ SARIP ซึ่งออกแบบมาจาก ยีน Small androgen receptor-interacting protein homologue (SARIP) สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ในทั้ง 3 เนื้อเยื่อ (รูปที่ 11 ช่องที่ 7-9)

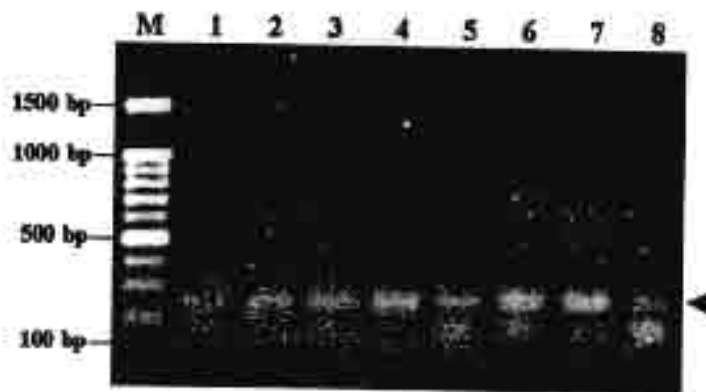


รูป 23 ผลการตรวจการแสดงออกของยีน vitellogenin-1 homologue (ช่องที่1-3) ยีน HSD homologue (ช่องที่4-6) ยีน SARIP homologue (แถวที่7-9) ยีน GIOT1 homologue (ช่องที่10-12) โดยใช้ mRNA จากอัมชะ (ช่องที่ 1, 4, 7 และ 10) รังไข่ (ช่องที่ 2, 5, 8 และ 11) และเม็คเลียด (ช่องที่ 3, 6, 9 และ 12)



### 3.3 การตรวจความจำเพาะต่อเพศใน genomic DNA

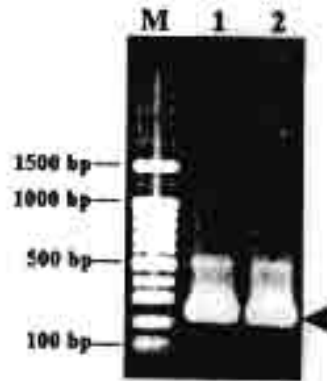
เมื่อนำไพรเมอร์ VCPg1 ไพรเมอร์ VCPg2 ไพรเมอร์ VCPg3 ไพรเมอร์ VCPg7 ไพรเมอร์ VCPHa49 ไพรเมอร์ VCPHa75 ไพรเมอร์ VTG-1 ไพรเมอร์ GIOT1 ไพรเมอร์ SRIP ไพรเมอร์ Tektin และ ไพรเมอร์ Axonemal protein มาตรวจความจำเพาะต่อเพศใน genomic DNA ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* เพศผู้ จำนวน 4 ตัวอย่าง และเพศเมีย จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ GIOT1 (รูปที่ 25) ไพรเมอร์ Tektin (รูปที่ 26) และ ไพรเมอร์ SARIP (รูปที่ 27) ให้ขนาดดีเอ็นเอตามที่คาดหวังไว้ทั้งในตัวผู้และตัวเมีย และ ไพรเมอร์ Axonemal protein (รูปที่ 28) ให้ขนาดดีเอ็นเอขนาดประมาณ 950 bp ทั้งในตัวผู้และตัวเมีย ส่วนไพรเมอร์อื่นที่เหลือไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งในเพศผู้ และเพศเมีย



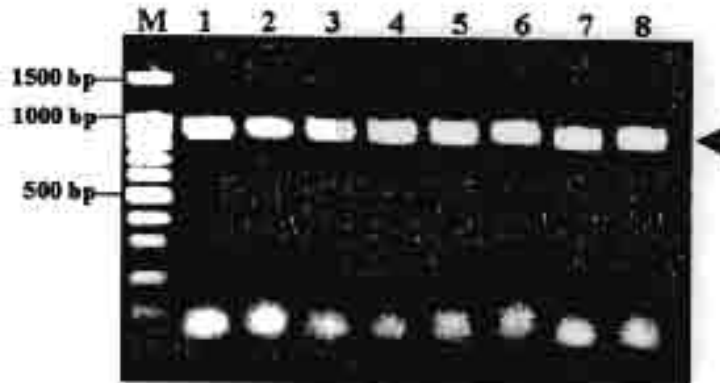
รูปที่ 25 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าชื่อเพศผู้ (ช่องที่ 1-4) และเพศเมีย (ช่องที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ GIOT1-F/R



รูปที่ 26 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าชื่อเพศผู้ (ช่องที่ 1-4) และเพศเมีย (ช่องที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ Tektin -F/R



รูปที่ 27 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าสีอเพศผู้ (ช่องที่ 1) และเพศเมีย (ช่องที่ 2) โดยใช้ไพรเมอร์ SARIP-F/R



รูปที่ 28 ผลเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าสีอเพศผู้ (ช่องที่ 1-4) และเพศเมีย (ช่องที่ 5-8) โดยใช้ไพรเมอร์ Axonemal protein F/R

## วิจารณ์

### 1. การค้นหาอินที่แสดงออกจำเพาะต่อเพศด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการค้นหาอิน DMRT1 ซึ่งเป็นอินที่เกี่ยวข้องกับเพศที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยการออกแบบ degenerated primer และนำมาทำ PCR โดยใช้ cDNA ของ testes พบแถบดีเอ็นเอขนาด 135 bp และนำแถบดีเอ็นเอชิ้นนั้นไปโคลน หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปเปรียบเทียบกับอินที่มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้ BLASTX program พบว่าเหมือนกับอิน DMRT1 ใน *Oryzias curvinotus* และเมื่อออกแบบไพรเมอร์จากโคลนที่ได้ มนเพิ่มจำนวนอินในดีเอ็นเอของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ผลคือพบแถบดีเอ็นเอทั้งในตัวผู้ และตัวเมีย ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังได้นำไพรเมอร์นี้และมาตรวจสอบการแสดงออกของอิน DMRT1 homologue ใน testes และ ovaries ในหอยเป่าฮือ *H. asinina* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 90 bp ใน testes แต่ไม่พบใน ovaries จากผลแสดงว่าอิน DMRT1 homologue อาจจะแสดงออกเฉพาะใน Testes เพราะอิน DMRT1 เป็นอินที่เกี่ยวข้องกับขบวนการพัฒนาของอวัยวะในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

### 2. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศด้วยเทคนิค AFLP

จากการใช้เทคนิค AFLP ค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อเพศในหอยเป่าฮือ *H. asinina* โดยใช้ AFLP primers ทั้งหมดจำนวน 224 คู่ของไพรเมอร์ จากผลการทดลอง พบ AFLP primers ที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ จำนวน 12 primers ซึ่งให้เครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศ จำนวน 14 ชิ้น ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศผู้จำนวน 7 ชิ้น และต่อเพศเมีย 7 ชิ้น และนำเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อเพศทั้งหมดจำนวนทั้งสิ้น 45 clones ไปโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าโคลนส่วนใหญ่ไม่เหมือนกับอินที่มีรายงานไว้ใน GenBank ยกเว้นโคลน 400 S/8F2 พบว่ามีความเหมือนกับ LTR retrotransposable element ใน *Oryzias latipes* โดยมีค่า E-value เท่ากับ 6e-22

และได้สุ่มคัดโคลนจาก AFLP markers มาออกแบบไพรเมอร์เพื่อพัฒนา SCAR markers ที่จำเพาะต่อเพศ จำนวน 6 คู่ ประกอบด้วย HaM1F/R และ HaM2F/R ซึ่งออกแบบมาจาก AFLP markers ที่พบเฉพาะในหอยเป่าฮือเพศผู้ และ HaF1F/R, HaF2F/R, HaF3F/R และ HaF4F/R ซึ่งออกแบบมาจาก AFLP markers ที่พบเฉพาะในหอยเป่าฮือเพศเมีย ผลจากการทำ PCR พบว่าไพรเมอร์ HaM1F/R ไพรเมอร์ HaM2F/R ไพรเมอร์ HaF2F/R และ ไพรเมอร์ HaF4F/R สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหอยเป่าฮือได้ในทั้งสองเพศ แสดงว่าไพรเมอร์ทั้งหมดนี้ไม่สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างเพศในหอยเป่าฮือได้ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจาก variation ที่เกิดขึ้นจากในหอยเป่าฮือเพศผู้หรือเพศเมียนั้นอาจมีความแตกต่างกันตรงจุดตัดของเอ็นไซม์ *EcoRI* และ/หรือ *MseI* ทำให้เมื่อออกแบบไพรเมอร์จึงสามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งสองเพศ ส่วนไพรเมอร์ HaF1F/R และไพรเมอร์

HaF3F/R ให้แถบดีเอ็นเอขนาดอื่นนอกเหนือจากแถบดีเอ็นเอที่คาดไว้ และพบในทั้งสองเพศ และจากการนำ PCR products ที่ได้จากไพรเมอร์ HaM1F/R ไพรเมอร์ HaM2F/R ไพรเมอร์ HaF2F/R และ ไพรเมอร์ HaF4F/R มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP พบว่าทั้งหอยเพศผู้ และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกัน

### 3. การค้นหาอินที่แสดงออกจำเพาะต่อเพศด้วยเทคนิค EST

จากการสร้าง cDNA libraries จำนวน 4 libraries เพื่อค้นหาอินที่เกี่ยวข้องกับเพศ ประกอบด้วย Normal cDNA libraries จำนวน 2 libraries คือ Normal cDNA library จากรังไข่ และ Normal cDNA library จากอัมชะ ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* และ Subtractive cDNA libraries จำนวน 2 libraries คือ Subtractive cDNA library จากรังไข่ และ Subtractive cDNA library จากอัมชะ โดยได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งหมด 588 โคลน ประกอบด้วย Normal cDNA library จากรังไข่ จำนวน 200 โคลน Normal cDNA library จากอัมชะ จำนวน 118 โคลน และ Subtractive cDNA library จากรังไข่ จำนวน 110 โคลน Subtractive cDNA library จากอัมชะ จำนวน 160 โคลน

เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับอินที่มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้ BLASTN และ BLASTX programs โดยจะต้องมีค่า E-value น้อยกว่า  $1 \times 10^{-4}$  พบว่าใน Normal cDNA library จากรังไข่ มีจำนวนอินที่ Homologue จำนวน 101 โคลน (50.5%) Unidentified function จำนวน 8 โคลน (4.0%) และ Unknown จำนวน 91 โคลน (45.5%) โดยพบอินที่มีการแสดงออกมากคือ อิน Vitelline coat protein มากถึงประมาณ 20 % (40 โคลน) โดยอินนี้ทำหน้าที่ห่อหุ้มรังไข่ และพบอินที่เกี่ยวข้องกับเพศเช่นอิน Vitelline envelope sperm lysin receptor ทำหน้าที่เป็น receptor ของ sperm lysin ในขบวนการ fertilization และอิน Hydroxysteroid dehydrogenase -like protein เป็น Steroid biosynthesis enzyme

ใน Normal cDNA library จากอัมชะ มีจำนวนอินที่ Homologue จำนวน 61 โคลน (51.7%) Unidentified function จำนวน 12 โคลน (10.2%) และ Unknown จำนวน 45 โคลน (38.1%) โดยพบอินที่มีการแสดงออกมากคือ อิน Sperm lysin (a 16-kDa acrosomal protein) ประมาณ 7.62 % (9 โคลน) ทำหน้าที่ในการจับกับ Vitelline envelope sperm lysin receptor เพื่อให้เกิดการ fertilization นอกจากนั้นพบอินที่เกี่ยวข้องกับเพศอื่น ๆ อีก เช่นอิน Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 (GIOT1) เป็นอินที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเกิด folliculogenesis และพบอินที่มีการแสดงออกเฉพาะใน pituitary, adrenal, testis และ ovary ในหนู rat (Mizutani et al, 2001) อิน Axonemal p66.0 เป็นโปรตีนโครงสร้างของ sperm tail และอิน Tektin เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ sperm flagella

ส่วน Subtractive cDNA library จากรังไข่ มีจำนวนยีนที่ Homologue จำนวน 65 โคลน (59.0%) Unidentified function จำนวน 6 โคลน (5.5%) และ Unknown จำนวน 39 โคลน (35.5%) พบยีนที่มีการแสดงออกมากคือยีน Vitelline coat protein ประมาณ 20.9 % (23 โคลน) และยีน Vitelline envelope sperm lysin receptor ประมาณ 13.64 % (15 โคลน) นอกจากนั้นยังพบยีน Vitellogenin-1 ซึ่งเป็นเกี่ยวข้องกับเพศ โดยเป็น precursor หลักของ egg-yolk protein และยีน ADAMTS-9 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9) โดยพบยีนนี้มีการแสดงออกมากใน รังไข่ของหนู mouse (Douglas B, 2002)

และใน Subtractive cDNA library จากอวัยวะ มีจำนวนยีนที่ Homologue จำนวน 52 โคลน (32.5%) Unidentified function จำนวน 4 โคลน (2.5%) และ Unknown จำนวน 104 โคลน (65.0%) พบยีนที่มีการแสดงออกมากคือ ยีน Sperm lysin (a 16-kDa acrosomal protein) ประมาณ 4.38 % (7 โคลน) และยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศ เช่น ยีน Fertilization protein (a 18-kDa acrosomal protein) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ fertilization และยีน Small androgen receptor-interacting protein เป็นโปรตีนที่จับกับ small androgen receptor

จากการตรวจการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเพศในอวัยวะ รังไข่ และเม็ดเลือด ผลจากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ VCPg1 VCPg3 VCPg7 และ VCPHa49 ที่ออกแบบมาจากยีน Vitelline coat protein (VCP) และไพรเมอร์ VTG ซึ่งออกแบบมาจากยีน vitellogenin-1 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะต่อรังไข่ของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ได้ นอกจากนั้นไพรเมอร์ VCPHa75 สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างเพศได้ โดยในรังไข่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 169 bp แต่ในอวัยวะจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 150 bp ในส่วนของไพรเมอร์ VCPg2 ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ทั้ง 3 เนื้อเยื่อ แต่มีระดับของการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน(รูปที่ 22 แถวที่ 4-6) ซึ่งอาจจะสามารถนำไพรเมอร์นี้มาตรวจระดับของการแสดงออกของยีน vitelline coat protein ได้ ว่ามีการแสดงออกของยีนนี้ในหอยเป่าชื่อระยะใด

ส่วนผลของไพรเมอร์ HSD ที่ออกแบบมาจากยีน hydroxysteroid dehydrogenase-like protein (HSD) และไพรเมอร์ GIOT1 ออกแบบมาจากยีน Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1(GIOT1) สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ในทั้งใน อวัยวะ และรังไข่ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในเม็ดเลือด ซึ่งทั้งสองยีนอาจจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ (อวัยวะ และรังไข่) ในหอยเป่าชื่อ เพราะยีน HSD เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Steroid hormone (Mitev et al, 2003) และยีน GIOT1 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ folliculogenesis (Mizutani et al, 2001) จากการใช้ไพรเมอร์ Axonemal protein , Tektin และ HaLysin มาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่าสามารถใช้สามไพรเมอร์นี้มาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่ออวัยวะของหอยเป่าชื่อได้ จากรายงานการศึกษายีน Tektin และ Axonemal p66 ใน อวัยวะของ

mouse (Iguchia et al , 1999) และ *Ciona intestinallis* (Padma et al, 2003) ตามลำดับ พบว่าอินนี้ เป็นโปรตีน โครงสร้างของ sperm ซึ่งมีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะ

ส่วนอื่น Sperm lysin และ Fertilization protein ซึ่งเป็นอินที่อยู่ในส่วนของ acrosome ของ หัว sperm ทั้งสองอินทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ fertilization ในหอยเป่าสี และเมื่อออกแบบ โปรเมอร์จากทั้งอินเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของอินพบว่า sperm lysin แสดงออกเฉพาะใน อวัยวะ แต่ในส่วนของอิน Fertilization protein พบว่ามีการแสดงออกในอวัยวะในปริมาณมากกว่า ในรังไข่ จากผลอาจแสดงว่าอิน Fertilization protein อาจจะมีการแสดงออกในรังไข่ในบางระยะได้ แต่แสดงออกในระดับต่ำกว่าอวัยวะมาก

นอกจากนั้นเราได้ใช้โปรเมอร์ VCPg1 โปรเมอร์ VCPg2 โปรเมอร์ VCPg3 โปรเมอร์ VCPg7 โปรเมอร์ VCPHa49 โปรเมอร์ VCPHa75 และโปรเมอร์ VTG มาตรวจความจำเพาะต่อเพศ ใน genomic DNA ของหอยเป่าสี *H. asinina* เพศผู้ และเพศเมีย พบว่าไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และโปรเมอร์ GIOT1 โปรเมอร์ Tektin และโปรเมอร์ SARIP สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามขนาด ที่คาดไว้ได้ทั้งใน ใน genomic DNA ของหอยทั้งสองเพศ ส่วนโปรเมอร์ Axonemal protein พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 950 bp ซึ่งใหญ่กว่าขนาดที่คาดไว้ประมาณ 623 bp จากผลแสดง ว่าส่วนนี้มี intron ประมาณ 623 bp ทั้งในเพศผู้ และเพศเมีย

## เอกสารอ้างอิง

- Baker, B.S. and Ridge, K.(1980). Sex and the single cell: On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophilla melanogaster*. *Genetics* 94: 383-423.
- Bell,L.P., Maine,E.M., Schedl, P., Cline, T.W.(1988). *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding protein. *Cell*. 55:1037-1046.
- Brunner, B., Hornung, U., Shan, Z., Nanda, L., Kondo, M., Zend-Ajusch, E., Haaf, T., Ropers, H.H., Shima, A., Schmid, M., Kalscheuer, V.M., and Scharl, M.,(2001). Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1. *Genomics* 77:8-17.
- Douglas B. Menke, David C. Page(2002) Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad , *Gene Expression Patterns* 2 359–367
- Hahn, K.O. (1989). *Handbook of culture of abalone and other marine gastropods*, USA. CRC Press, 348 pp.
- Hoelzel, A.R., and Green, A. (1992). Population – level variation by sequencing PCR – amplified DNA. In: Hoelzel, A.R. (ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Oxford: Oxford University Press, 159-187.
- Griffiths, R. and Orr, K.(1999). The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Molecular Ecology*. 8: 671-674.
- Griffiths, R., Orr, K.J., Adam, A. and Barber, I.(2000). DNA sex identification in the three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*. 57:1331-1334.
- Jarayabhand, P. and Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture*. 140: 159-168.
- Klinbunga, S., Penman, D.J., and McAndrew, B.J. (1996). An improved protocol for total DNA isolation and visualization of mtDNA RFLP(s) in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Thai J Aquat Sci*. 3:36-41.
- Mizutani, T., Yamada, K., Yazawa, T., Okada, T., Minegishi, T., and Miyamoto, K.(2001). Cloning and characterization of gonadotropin-Inducible ovarian transcription factors (GIOT1 and-2) that are novel members of the (Cys)<sub>2</sub>-(His)<sub>2</sub>-type zinc finger protein family. *Molecular Endocrinology* 15(10):1693–1705.

- Mitev, Y. A., Darwish, M., Wolf, S. S., Holsboer, F., Almeida, O. F. X. and Patchev, V. K. (2003). Gender differences in the regulation of 3-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and sensitivity to neurosteroid-mediated stress protection. *Neuroscience* 120 : 541–549
- Nanda, I., Zend-Ajuschi, E., Shan, Z., Grutzner, F., Schartl, M., Burt, D.W., Koehler, M., Fowler, V.M., Goodwin, G., Schneider, W.J., Mizuno, S., Dechant, G., Haaf, T., and Schmid, M., (2000). Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet* :89(1-2):67-78
- Iguchia, N., Tanakaa, H., Fujiib, T., Tamurab, K., Kanekoa, Y., Nojimab, H and Nishimunea, Y. (1999). Molecular cloning of haploid germ cell-specific tektin cDNA and analysis of the protein in mouse testis. *FEBS Letters* 456 : 315-321
- Padma P, Satouh Y, Wakabayashi K, Hozumi A, Ushimaru Y, Kamiya R and Inaba K.(2003). Identification of a novel leucine-rich repeat protein as a component of flagellar radial spoke in the Ascidian *Ciona intestinalis*. *Molecular Biology of the Cell*. 14, 774–785.
- Raymond, C.S., Parker, E.D., Kettlewell, J.R., Brown, L.G., Page, D.C., Kusz, K., Jaruzelska, J., Reinberg, Y., Flejter, W.L., Bardwell, V.J., Hirsch, B., and Zarkower, D. (1999). A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet*. 8(6):989-96
- Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifer, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J., and Zarkower, D. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 12; 391 (6668):691-5.
- Shan, M.M. and Hodgkin, J. (1988). mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male le-specific lineage in *C. elegans*. *Cell*. 54:1019-1031.
- Shepherd, S.A. and Hearn, W.S.(1983). Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) IV. Growth of *H. laevigata* and *H. ruber*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*.34: 461-475.
- Singhagraiwan, T., and Doi, M. (1993). *Seed production and culture of a tropical abalone, Haliotis asinina Linne*. Research Project of Fishery Resource Development in the Kingdom of Thailand. The Eastern Marine Fisheries Development Center (EMDEC), Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative, Thailand, 32 pp.
- Uki, N. (1989). Abalone seedling production and its theory (1). *International Journal of Aquaculture Fish Technology*.1:3-15.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

Williams, J. G.K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafolski, J.A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

## Output

### 1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Piti Amparyup, Sirawut Klimbunga, Rachanimuk Preechaphol, Anchalee Tassanakajon, Ikuo Hirono, Takashi Aoki, and Padermsak Jarayabhand (2003) Expressed Sequence Tag (EST) Analysis of Ovaries and Testes from the Tropical Abalone *Haliotis asinina*. *Marine Biotechnology* (submitted)

**Expressed Sequence Tag (EST) Analysis of Ovaries and Testes from  
the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*)**

Piti Amparyup<sup>1</sup>, Sirawut Klinbunga<sup>2</sup>, Rachanimuk Preechaphol<sup>1</sup>,

Anchalee Tassanakajon<sup>3</sup>, Ikuo Hirono<sup>4</sup>, Takashi Aoki<sup>4</sup>, and Padermsak Jarayabhand<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Program of Biotechnology, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, <sup>5</sup>Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>2</sup>Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

<sup>4</sup>Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Konan 4-5-7, Tokyo 108-8477, Japan

<sup>6</sup>Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

**Key words:** EST, subtraction, genetic markers, cDNA

\*To whom corresponding should be addressed

Corresponding address:

S. Klinbunga, Marine Biotechnology Research Unit, c/o Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Tel: +66-2-2185279

Fax: +66-2-2547680

e-mail: [sirawut@biotec.or.th](mailto:sirawut@biotec.or.th)

Running title: ESTs of abalone

## ABSTRACT

Normal and subtractive cDNA libraries were established from ovaries and testes of the tropical abalone (*Haliotis asinina*). A total of 588 randomly selected clones were unidirectional sequenced. Results indicated that 109 (54.5%) and 73 (61.9%) of normal cDNA libraries from *H. asinina* ovaries and testes significantly matched with known genes (E-value <  $10^{-4}$ ). Of these, vitelline coat proteins (VCP; 40 clones, 25.0%) were predominated in the former library but sperm lysin (9 clones, 7.6%) was the most abundant transcript in the latter library. For subtractive cDNA libraries, 71 clones (64.5%) and 54 clones (35.0%) of ovary (forward subtraction) and testes (reverse subtraction) libraries were known transcripts. Expression of sex-related genes was further examined using RT-PCR. Gender-specific expression was found from homologues of VCP1, VCP3, VCP7, VCP49 and VTG1 and axonemal p66.0, tektin A1 and sperm lysin in female and male *H. asinina*, respectively. Sex-specific isoforms (186 bp and 160 bp in female and male) of VCP75 were also identified.

## INTRODUCTION

Abalone are marine gastropods distributed worldwide along coastal waters of tropical and temperate areas (Geiger, 2000). At least 20 species of recognized species are commercially important (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). The demand of abalone consumption is consistently increased while the commercial catch of abalone has decreased from 18,000 metric tons to slightly greater than 10,000 metric tons within the last two decades (Gordon, 2000). Abalone aquaculture has been established in several countries and contributes approximately 75% of the world production annually (Gordon, 2000).

Based on chromosome numbers, abalone can be divided into 3 groups consisting of those having  $2N = 28$  (*H. tuberculata* and *H. lamellosa*) which inhabits the European-Mediterranean areas,  $2N = 36$  (*H. cracherodii*, *H. discus discus*, *H. discus hannai* and *H. madaka*) which inhabits the North Pacific region and  $2N = 32$  (*H. asinina*, *H. diversicolor*, *H. exigua*, *H. planata*, *H. ovina* and *H. varia*) which inhabits the Indo-Pacific region (Jarayabhand et al., 1998). Neither sex chromosome nor temperature sex determination (TSD) have been reported in abalone.

Three species of tropical abalone, *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* are locally found in coastal Thai waters (Jarayabhand and Paphavasit, 1996). Among these species, *H. asinina* is the most promising species for the aquaculture industry. Currently, artificially propagated breeding programs and culture techniques of *H. asinina* are well developed and indicated that the growth rate of females in this species is greater than that of males

for approximately 25% (P. Jarayabhand unpublished data). As a result, the basic information on sex-specific differentiation in *H. asinina* is necessary for development of monosex culture in this species.

The objective of this study was isolation and characterization of genes specifically expressed in ovaries and testes of *H. asinina*. Two normal cDNA libraries were established from mRNAs of ovaries and testes. In addition, subtractive cDNA libraries of ovaries and testes were also constructed. The cDNA clones were randomly selected and unidirectional sequenced. Candidate sex-specific/differential expression transcripts were further examined using RT-PCR.

## MATERIALS AND METHODS

### *Isolation of total RNA and mRNA of abalone*

Total RNA was extracted from different developmental stages of ovaries and testes of hatchry *H. asinina* established from the Samet Island sample (Gulf of Thailand) using TRI-REAGENT. Messenger (m) RNA was further purified using a QuickPrep *micro* mRNA Purification Kit (amersham pharmacia biotech).

### *Construction of normal and subtractive cDNA libraries*

Three micrograms of mRNA from ovaries and testes of *H. asinina* were subjected to complementary (c) DNA synthesis using a SuperScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning Kit (Invitrogen). Size-selected cDNAs (> 500 bp) were cloned into dephosphorelated *Not I/Sal I*-digested pSPORT 1 and transformed into *E. coli* JM109. Recombinant clones were selected by a *lacZ'* system following standard protocols (Maniatis *et al.* 1982).

Forward and reverse subtractions (Diatchenko *et al.*, 1996) between ovarian and testis cDNAs were carried out using a PCR Select cDNA Subtraction Kit (CLONTECH). The resulting products were ligated to pGEM-T Easy vector (Promega) and transformed to *E. coli* JM109. Recombinant clones were selected as above.

#### *Plasmid extraction and EST analysis*

Recombinant clones were randomly selected. Plasmid DNA was extracted using a NucleoSpin Plasmid Extraction Kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) and unidirectional sequenced using a Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP (amersham pharmacia biotech) on an automated DNA sequencer (LI-COR). Nucleotide sequences were compared with data in the GenBank using BLASTN and BLASTX (Altschul et al., 1990 available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Significant probabilities of matched nucleotides/proteins were considered when E-value was  $< 10^{-4}$ .

#### *Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

One microlitre of the 1<sup>st</sup> stranded cDNA synthesized from total RNA of ovaries, testes or hemocytes of *H. asinina* was used as the template for amplification of vitelline coat proteins (VCP) and other sex-related gene homologues. PCR was performed by predenaturation at 94° C for 3 minutes, followed by 35 cycles of a 94° C denaturation for 30 seconds, a 60° C annealing for 45 seconds and a 72° C extension for 45 seconds. The final extension was carried out at 72° C for 7 minutes. Five microlitres of each amplification product were electrophoretically analyzed through 1.5% agarose gel and visualized under a UV-transilluminator after ethidium bromide staining (Maniatis et al., 1982).

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 588 cDNAs from normal and subtractive libraries of ovaries (200 and 110 clones) and testes (118 and 160 clones) of *H. asinina* were unidirectional sequenced (Table 1). The percentage of recombinant clones of respective libraries was 65% and 80% for the normal (insert sizes > 500 bp) and 70% for subtractive (insert sizes > 200 bp) cDNA libraries.

Sex-related transcripts were predominated among known transcripts in all libraries but the most abundant transcript in ovaries and testes of *H. asinina* was VCP41 and sperm lysin ESTs, respectively (Table 2). The full length of sperm lysin cDNA was obtained and first isolated in *H. asinina* (Fig. 1). Abalone sperm lysin sequences are highly conserved between different *Haliotis* species (Lee and Vacquier, 1995).

Several other functionally important transcripts; ATP synthase, ATPase inhibitor, stress inducible chaperone GrpE-like 1, heat shock protein 40, TCTP homologues, small androgen receptor interacting protein (SARIP) and 18-KDa fertilization protein (FP) homologues were also isolated. Unknown ESTs was 40.5% and 38.1% in normal and 35.5% and 65.0% for subtractive libraries of ovaries and testes, respectively.

A large number of VCP ESTs found in this study could be gathered into 9 major groups and several other unique sequences. Primers were designed from different forms of VCP (groups 1, 2, 3, 7 and VCP49 and VCP75) and other sex-related transcripts (Table 3). RT-PCR was carried out to examine expression levels of interested genes in ovaries,

testes and hemocytes of *H. asinina*. SARIP, VCP2 and FP homologues were all expressed in ovaries, testes and hemocytes of *H. asinina* (Fig. 2).

Homologues of gonadotrophin inducible ovarian transcriptional factor 1 (GIOT1) and hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) were non-differentially expressed in both ovaries and testes. Although VCP75 was expressed in both ovaries and testes of *H. asinina*, a smaller size (160 bp) of the gene product was observed in testes suggesting sex-specific transcripts in this gene region. Expression of VCP1, VCP3, VCP7, VCP49 and VTG1 was only expressed in female *H. asinina*. Interestingly, VCP1 and VCP47 amplified products were found in both ovaries and hemocytes but not in testes when the annealing temperature was decreased to 55° C. These EST markers may be used to differentiate adult males and females of *H. asinina* without the requirement to sacrifice investigated specimens.

In contrast, axonemal p66.0 (a protein associated with axonemal structure of the sperm tail), tektin A1 (a class of proteins that form filamentous polymers in the walls of ciliary and flagellar microtubules) and sperm lysin (a species-specific protein creating a hole in the egg vitelline envelope of abalone) homologues were restrictively expressed in testes of *H. asinina*.

Gender-specific gene expression has been recently reported in a mosquito-borne filarial nematode (*Brugia malayi*) isolated by differential display (DD) PCR and *In silico* subtraction of EST cluster database and further confirmed by RT-PCR. Six of 12 (27%) and seven of 15 (47%) initially identified by DD-PCR and *In silico* subtraction revealed

gender-specific expression in that species (Michalksi and Weil, 1999). In the silkworm, sex-specific mRNA isoforms were found in double sex (*dsx*) gene where the male-specific cDNA lacked the sequence between 713 – 961 nucleotides of the female-specific cDNA (Ohbayashi et al., 2001).

Sex-specific markers should be developed from fixed polymorphism in genomic DNA of male and female *H. asinina* to avoid destruction of specimens. However, Sweijd et al. (1998) illustrated successful development of species-specific markers for differentiation of a commercially exploited abalone in South Africa, *H. midae* and a sympatrically congeneric species, *H. spadicea* using primers designed from genomic DNA of sperm lysin. Therefore, we did not attempt to develop sex-specific markers based on genomic DNA polymorphism of *H. asinina* sperm lysin.

Amplification of VCPI, 2, 3, 7, 49, 75 and VTG1 using genomic DNA of *H. asinina* as the template did not yield the amplification products whereas SARIP, GIOT1 and tektin gene segments showed identical sizes as that expected from cDNA sequences in both male and female *H. asinina*. Only, axonemal gene segments contains a relatively large intron (approximately 575 bp) but was still found in both sexes. Therefore, sex-specific markers of *H. asinina* were successfully developed at the cDNA level but not the genomic level. New primer pairs of cDNAs showing sex-specific expression in *H. asinina* should be designed and further characterized to identify the existence of single nucleotide polymorphism (SNP) between males and females of *H. asinina*.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by a Basic Research Grant for the Royal Golden Jubilee PhD Program, The Thailand Research Funds (TRF) awarded to PA.

## REFERECES

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J mol Biol* 215: 403-410.
- Diatchenko, L., Lau, Y., Campbell, A., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E., and Siebert, P. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 6025-6030.
- Geiger, D.L. (2000). Distribution and biogeography of the *Haliotidae* (Gastropoda: Vetigastropod) world-wide. *Bollettino Malacologico* 35:57-120.
- Gordon, H.R. (2000). World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future perspectives. 4<sup>th</sup> International Abalone Symposium, Cape Town, South Africa. University of Cape Town, 6-11<sup>th</sup> February 2000.
- Jarayabhand, P., and Paphavasit, N. (1996). A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140:159-168.
- Jarayabhand, P., Yom-La, R., and Popongviwat, A. (1998). Karyotypes of marine molluscs in the family Haliotidae found in Thailand. *J Shellfish Res* 17: 761-764.
- Lee, Y.H., and Vacquier, V.D. (1995). Evolution and systematics in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): inferences from DNA sequences of sperm lysin. *Mar Biol* 124:267-278.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Michalski, M.L., and Weil, G.J. (1999). Gender-specific gene expression in *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 104: 247-257.
- Ohbayashi, F., Suzuki, M.G., Mita, K., Okano, K., and Shimada, T. (2000). A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B* 128: 145-158.
- Sweijd, N.A., Bowie, R.C., Lopata, A.L., Marinaki, A.M., Harley, E.H., and Cook, P.A. (1998). A PCR technique for forensic, species level identification of abalone tissue. *J Shellfish Res* 17: 889-895.

**Table 1. Numbers and Functional Categories of ESTs from Normal and Subtractive cDNA Libraries of Abalone (*Haliotis asinina*)**

Category	No. of clone (%)			
	Ovary cDNA library	Testis cDNA library	Subtractive ovary cDNA library	Subtractive testis cDNA library
Sex-related genes	43 (21.5)	11 (9.3)	40 (36.4)	20 (12.5)
Stress response, detoxification and cell defense proteins	1 (0.5)	8 (6.8)	8 (7.3)	10 (6.25)
Protein synthesis and ribosomal proteins	31 (16.5)	16 (13.6)	5 (4.5)	10 (6.25)
Cell division and DNA replication	0 (0)	16 (13.6)	8 (7.3)	11 (6.9)
Metabolisms	9 (4.5)	10 (8.5)	11 (10.0)	11 (6.9)
Unidentified function	8 (4.0)	1 (0.85)	26 (23.6)	4 (2.5)
Unknown	91 (40.5)	45 (38.1)	39 (35.5)	104 (65.0)
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>118</b>	<b>110</b>	<b>160</b>

**Table 2. Sex-Related Transcripts Found in Normal and Subtractive cDNA Libraries of Ovaries and Testes of *H. asinina***

Transcript	Closest species	No. of clones
<i>Normal cDNA from ovaries</i>		
Vitelline coat protein (VCP) 41	<i>Tegula pfeifferi</i>	38
VCP42	<i>Tegula pfeifferi</i>	2
Vitelline envelope receptor for sperm lysin (VERL)	<i>Haliotis rufescens</i>	2
Hydroxysteroid dehydrogenase -like protein (HSD)	<i>Homo sapiens</i>	1
<i>Normal cDNA from testes</i>		
Sperm lysin	<i>Haliotis ovina</i>	9
Gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 (GIOT1)	<i>Rattus norvegicus</i>	1
Axonemal p66.0	<i>Ciona intestinalis</i>	1
Tektin A1	<i>Ciona intestinalis</i>	1
<i>Subtractive cDNA from ovaries</i>		
VCP41	<i>Tegula pfeifferi</i>	21
VCP42	<i>Tegula pfeifferi</i>	2
VERL	<i>Haliotis rufescens</i>	15
Vitellogenin-1 (VTG1)	<i>Plautia stali</i>	1
ADAMTS-9	<i>Homo sapiens</i>	1
<i>Subtractive cDNA from testes</i>		
Sperm lysin	<i>Haliotis ovina</i>	7
Fertilization protein (FP)	<i>Haliotis rufescens</i>	2
Small androgen receptor-interacting protein (SARIP)	<i>Rattus norvegicus</i>	1

**Table 3. Primers and Primer Sequences Used to Investigate Expression of Sex-Related Transcripts in Ovaries and Testes of *H. asinina***

Primer	Sequence	Accession no.	Expected product (bp)
VCP1	F: 5'-GGCTGCACCAGACCGATGAACGATACAC-3' R: 5'-TGCTTCAACACCATACCGTCTCCACAAC-3'	CF805554	346
VCP2	F: 5'-ACTGGGCTTTCTACCATCAACGTCCTGT-3' R: 5'-CGACGACCCCTTGTTCCTGGATAATCTCA-3'	CF805555	316
VCP3	F: 5'-ATACACAATCTCGTGCTCGTTCGGTTCA-3' R: 5'-CACTATTCGGTCTCCGCAACCTGCTCTT-3'	CF805556	467
VCP7	F: 5'-TGCTCAGTGCTGGTGGTCTGCTTGG-3' R: 5'-TGGCTGGCGGTGCCTTGTACCTTCTA-3'	CF805557	363
VCP49	F: 5'-ACCCACAGGAGGAACAAACC-3' R: 5'-CCGCAGCCAGCTCTAAGGATA-3'	CF805558	425
VCP75	F: 5'-AGGATGTGGTGACGGTATTGTG-3' R: 5'-CTTTATAGTGCAGCGTTTGGT-3'	CF805559	189
HSD	F: 5'-GCCGTGGAAGAAGCAGTTGGA-3' R: 5'-CAGGGGGTTGAGGTTGAGTGG-3'	CF805560	231
VTG1	F: 5'-ACATCAGAACCGACGGCAAC-3' R: 5'-TGAGGCAAGGTAGGCGAGG-3'	CF805561	202
Axonemal p66.0	F: 5'-GCACGACGAAACTTCGCCCTG-3' R: 5'-AACGCCCGCTTCGCTOCCCA-3'	CF805562	327
Tektin A1	F: 5'-TGTTGACAGGGATGGTGC GG-3' R: 5'-CTCCTTTGCCTACAGTTGAGATTG-3'	CF805563	282
Sperm lysin	F: 5'-CGAGAAGGCAGACAGCCAGAC-3' R: 5'-ATCCAGTGCTTGATGCTTGAACG-3'	CF805564	248
GIOT1	F: 5'-GACCACCCACGCACAGGAC-3' R: 5'-TAGCAGCACTAATAAAGCCCG-3'	CF805565	208
SARIP	F: 5'-GGCTTAGTGACTGAACGCCTCTA-3' R: 5'-GCTGCTCTACTAOCACAACAC-3'	CF805566	246
FP	F: 5'-CGACCCATAGCGCGTAGTT-3' R: 5'-AAGGTCCCAAAGAAAAGCCAGTA-3'	CF805567	262

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1** Multiple alignments of sperm lysin homologues of *H. asinina* (this study), *H. ovina* (L26276) and *H. varia* (L35181).

**Fig. 2.** RT-PCR of VCP1 (lanes 1 - 3, panel A), VCP2 (lanes 3 - 6, A), VCP3 (lanes 7 - 9, A), VCP7 (lanes 10 -12, A), VCP49 (lanes 13 - 15, A) and VCP75 (lanes 16 - 18, A), VTG1 (lanes 1 - 3, panel B), HSP (lanes 4 - 6, B), SARIP (lanes 7 - 9; B) and GIOT1 (lanes 10 - 12, B), axonemal p66.0 (lanes 1 - 3, panel C) and Tektin A1 (lanes 4 - 6; C), fertilization protein (lanes 1 - 3, panel D) and sperm lysin (lanes 4 - 6; D). Expression of each gene and  $\beta$ -actin (210 bp) was examined in testes, ovaries and hemocytes, respectively. Lanes M are a 100 bp DNA marker.

*H. ovina* MKLLVLCVLAMMVTVAVSRWAFIPPTRIIPRAHEVALKVQIIAGWNRKLANWLARHGSL  
*H. varia* MKLLVLCVLTMTVTVAMSRRWTFIPKRLPMAHEVALKVEIIAGFNKKLDIWLARHGSL  
*H. asinina* MKLLVLCVLTAMMVTMAMSRSWGFIIPRSLARPYEVAMKTOIIAGFDRKLVSWLARHGSL  
 \*\*\*\*\*:\* \* \*\*:\* \*\* \* \*\*\* :. .:\*\*\*:\*.\*\*\*\*\*:.\* \*\*\*\*\* \*

*H. ovina* SAIQKKTLYFVNRRYMQTHWPSYMI FVKKQIARLGRPGNTNDYSRLGAEIGRRI PMEVNY  
*H. varia* SPIQKKTLYFVNRRYMQTHWSNYMLWVKRRINSLGRPGTTADYRNLGAEIGRRVPLELTY  
*H. asinina* NAIQRKTLYFVNRRHMQTYWPSYTRYARRQTARLGRPATVNDYRRIGAEIGRRI PMELSY  
 ..\*\*:\*.....\*:\*:\*..\* :.::: \*\*\*\*\* \*\* .:\*\*\*\*\*:.\*:.\*

*H. ovina* SFLVRRNLIIPWRQYMANIMAKRVEDIPVQ--  
*H. varia* SFLVRRNLIIPWRQYMADLMARRVAIIPVARG  
*H. asinina* EVLVRRNMIPAWRQYMADLMAKRVEDIPVG--  
 ..\*\*\*\*\*:\* \*\*\*\*\*:\*:\*:\* \*\*\*\*\*

