บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาม้าลายโดยเทคนิคยีนน็อคดาวน์ได้มีมาอย่างต่อเนื่อง แต่ทว่าการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นเทคนิคยีนน็อคดาวน์ระยะสั้น ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาพัฒนาของมูลจีโนมของปลาม้าลายแต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการนำยีนในส่วนโปรโมเตอร์ไปใช้ในการแสดงออกสำหรับ short hairpin RNA (shRNA) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการตัดต่อโปรโมเตอร์เพื่อนำไปใช้สำหรับการสร้างเวคเตอร์สำหรับยีนน็อคดาวน์ ผลการโคลนยีน U6 snRNA ในปลาม้าลายทำให้ได้ยีน U6 snRNA ที่แตกต่างกัน 3 ยีน ได้แก่ U6-1, U6-2 และ U6-3 ผลจากการสร้าง phylogenetic tree พบว่ายีน U6-1 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากว่ายีน U6 snRNAของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ยีน U6-2 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของ Xenopus และ ยีน U6-3 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของแมลงหวี่มากกว่ายีน U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ผลการศึกษาโครงสร้างของโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ในปลาม้าลาย ได้จำแนก กลุ่มนิวคลีโอไทด์ TATA box และ proximal sequence element โดยการเทียบตำแหน่งกับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น พบกลุ่มเบส CCAAT ตรงบริเวณที่คาดว่าจะเป็นบริเวณของ Distal sequence element ผลจากการวิเคราะห์ Blastn analysis กับจีโนมของปลาม้าลาย พบว่า ยีน U6-1 มีการกระจายตัวอยู่ในโครโมโซมต่าง ๆ ของปลาม้าลายถึง 555 ชุด ในขณะที่ยีน U6-2 และ U6-3 พบเพียง 1 ชุดในจีโนมของปลาม้าลาย ผลจากการทำ RT-PCR แสดงให้เห็นว่ายีน U6 snRNA ทั้งสามมีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาม้าลาย เมื่อนำเอาโปรโมเตอร์ไปตัดต่อกับยีนที่สร้างเป็น shRNA พบว่าโปรโมเตอร์ทั้ง 3 ชนิดของยีน U6 snRNA สามารถสร้าง shRNA ได้เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา *in vitro* transcription โดยใช้สารสกัดจากเซลล์ของปลาม้าลาย ผลการทดสอบดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการใช้ในการตัดต่อยีนสำหรับยีนน็อคดาวน์ระยะยาวได้ในปลาม้าลาย เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของ shRNA ด้วยโปรโมเตอร์ U6 snRNA (ของปลาม้าลาย) ในสารสกัดจากเซลล์ของปลานิล ปลาไน และปลาดุก พบว่ามีการแสดงออกเมื่อใช้สารสกัดจากเซลล์ของปลานิลแต่ไม่มีการแสดงออกในสารสกัดจากเซลล์ของปลาดุกและปลาไน แสดงให้เห็นว่าการนำโปรโมเตอร์ U6 snRNA ของปลาม้าลายไปใช้กับปลาอื่น ๆ จะได้ผลหลากหลาย นอกจากนี้จากการวิเคาะห์ Blastn analysis กับข้อมูลจีโนมของปงาม้าลาย ได้พบยีน U6 snRNA อีกหนึ่งชนิด (U6-4) แสดงให้เห็นว่าปลาม้าลายมียีน U6 snRNA ที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ชนิด

Abstract

Gene function studies via gene knockdown (GKD) in zebrafish have been intensively conducted; however, most techniques offer only transient interfering effects. Although zebrafish genomic information is available, the U6 snRNA genes and the use of their promoters for short hairpin RNA (shRNA) expression have not been fully characterized. In this study, the structure of the U6 snRNA genes and their genomic organization are elucidated. Additionally, transcription assays utilizing the U6 promoters were conducted to provide sustained vector-based RNA interference (RNAi). Three U6 snRNA genes were characterized and randomly designated as U6-1, U6-2, and U6-3. Phylogenetic tree analysis indicated that the U6-1 gene is closely related to the mammal U6 snRNA genes and that the U6-2 and U6-3 genes are more closely related to *Drosophila* and *Xenopus* U6 snRNA genes. According to the conserved position of the upstream regulatory elements, TATA box and the proximal sequence element were located. The “CCAAT box” is predicted to function as the distal sequence element in the zebrafish U6 snRNA genes. Genomic BLASTn analysis revealed that at least 555 copies of the U6-1 gene are dispersed throughout the zebrafish genome, whereas the U6-2 and U6-3 genes are each present as a single copy. RT-PCR demonstrated that these three U6 snRNA genes are functionally expressed in various tissues. All three putative promoters were able to transcribe shRNA in zebrafish, providing that they have potential to be used for vector-based RNAi in zebrafish. A putative U6 promoter would provide a powerful tool for long-term GKD in zebrafish. The zebrafish U6 promoter efficiently promoted shRNA *in vitro* expression in cell extracts isolated from Nile tilapia, but not from catfish or common

Comment:

carp, demonstrating that the zebrafish U6 promoters promoted variable transcription efficiency across species. Another U6 snRNA was found from the genomic BLASTn search and designated as U6-4, suggesting that there are four different types of zebrafish U6 snRNA genes.