



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การโคลนและการศึกษาโครงสร้างของนิวเคลียร์อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก
ชนิด U6 ในปลาหมึกลายเพื่อใช้สำหรับเทคนิคยีนคัดควาน

โดย

อาจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสาร

มิถุนายน 2551

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การโคลนและการศึกษาโครงสร้างของนิวเคลียร์อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก
ชนิด U6 ในปลาหมอสีเพื่อใช้สำหรับเทคนิคยีนนิ่งดาวน์

(Molecular Cloning and Characterization of U6 Small Nuclear RNA in
Zebrafish for Gene Knockdown Technique)

ผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสาร

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงยิ่งต่อสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และ
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.สกล พันธุ์ยิ้ม (มหาวิทยาลัยมหิดล)
นักวิจัยที่ปรึกษาที่ได้ให้โอกาสการทำงาน คำปรึกษา คำแนะนำ ในทุกด้าน ๆ ทำให้การวิจัยครั้งนี้
สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ Associate Professor Dr. Goro Yoshizaki (Tokyo University of
Marine Sciences and Technology) ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้การสนับสนุนในด้านต่าง ๆ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Dr. Toshio Takeuchi (Tokyo University of Marine Sciences
and Technology) ที่ได้ให้โอกาสและสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์
เมณะเศวต และ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิดวรกุล (ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านน้ำทะเล กุ้งทดลอง และคำแนะนำที่เป็น
ประโยชน์อย่างยิ่ง

ผู้วิจัยขอขอบคุณเพื่อนร่วมงาน ได้แก่ นายเสรี คอนเหนือ (หน่วยปฏิบัติการ
เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุ์และวิศวกรรมแห่งชาติ), นายสุนัย พลายมี (ฟาร์มประมง
ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี), คุณอมลวรรณ แสงอ่อน และ คุณศิริวรรณ เพชรสมบัติ (ศูนย์
เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทส.) และ นางสาวศิณภัทร กองร้อย (นักศึกษาปริญญา
เอก) ที่ได้ให้การช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาหมาลายโดยเทคนิคยีนน็อคดาวน์ได้มีมาอย่างต่อเนื่อง แต่ทว่าการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นเทคนิคยีนน็อคดาวน์ระยะสั้น ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาพัฒนาของมูลิจิโนมของปลาหมาลายแต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการนำยีนในส่วนโปรโมเตอร์ไปใช้ในการแสดงออกสำหรับ short hairpin RNA (shRNA) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการตัดต่อโปรโมเตอร์เพื่อนำไปใช้สำหรับการสร้างเวกเตอร์สำหรับยีนน็อคดาวน์ ผลการโคลนยีน U6 snRNA ในปลาหมาลายทำให้ได้ยีน U6 snRNA ที่แตกต่างกัน 3 ยีน ได้แก่ U6-1, U6-2 และ U6-3 ผลจากการสร้าง phylogenetic tree พบว่ายีน U6-1 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมมากกว่ายีน U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ยีน U6-2 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของ *Xenopus* และ ยีน U6-3 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของแมลงหัวมีมากกว่ายีน U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ผลการศึกษาโครงสร้างของโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ในปลาหมาลาย ได้จำแนก กลุ่มนิวคลีโอไทด์ TATA box และ proximal sequence element โดยการเทียบตำแหน่งกับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น พบกลุ่มเบส CCAAT ตรงบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณของ Distal sequence element ผลจากการวิเคราะห์ Blastn analysis กับจีโนมของปลาหมาลาย พบว่ายีน U6-1 มีการกระจายตัวอยู่ในโครโมโซมต่าง ๆ ของปลาหมาลายถึง 555 ชุด ในขณะที่ยีน U6-2 และ U6-3 พบเพียง 1 ชุดในจีโนมของปลาหมาลาย ผลจากการทำ RT-PCR แสดงให้เห็นว่ายีน U6 snRNA ทั้งสามมีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาหมาลาย เมื่อนำเอาโปรโมเตอร์ไปตัดต่อกับยีนที่สร้างเป็น shRNA พบว่าโปรโมเตอร์ทั้ง 3 ชนิดของยีน U6 snRNA สามารถสร้าง shRNA ได้เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา *in vitro* transcription โดยใช้สารสกัดจากเซลล์ของปลาหมาลาย ผลการทดสอบดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการใช้ในการตัดต่อยีนสำหรับยีนน็อคดาวน์ระยะยาวได้ในปลาหมาลาย เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของ shRNA ด้วยโปรโมเตอร์ U6 snRNA (ของปลาหมาลาย) ในสารสกัดจากเซลล์ของปลานิล ปลาไน และปลาดุก พบว่ามีการแสดงออกเมื่อใช้สารสกัดจากเซลล์ของปลานิลแต่ไม่มีการแสดงออกในสารสกัดจากเซลล์ของปลาดุกและปลาไน แสดงให้เห็นว่าการนำโปรโมเตอร์ U6 snRNA ของปลาหมาลายไปใช้กับปลาอื่น ๆ จะได้ผลหลากหลาย นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ Blastn analysis กับข้อมูลจีโนมของปลาหมาลาย ได้พบยีน U6 snRNA อีกหนึ่งชนิด (U6-4) แสดงให้เห็นว่าปลาหมาลายมียีน 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.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยอาจารย์รุ่นใหม่

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การโคลนและการศึกษาโครงสร้างของ นิวคลีียร์อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก
ชนิด U6 ในปลาหมากลาย เพื่อใช้สำหรับเทคนิคยีนนิ่งดาวน์

(ภาษาอังกฤษ) : Molecular cloning and characterization of U6 small nuclear RNA
in zebrafish for gene knockdown Technique

ชื่อหัวหน้าโครงการและนักวิจัยร่วมโครงการ พร้อมหน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสาร
หน่วยงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ที่อยู่ 111 ถ.มหาวิทยาลัย อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 044-22-4371, 044-22-4378
โทรสาร 044-22-4150
Email address surinton@sut.ac.th

สาขาที่ทำการวิจัย เทคโนโลยีทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ระยะเวลาดำเนินการ 24 เดือน

Deleted: งบประมาณทั้งโครงการ

360,000 บาท

๑
๑

ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทางชีวภาพโดยเฉพาะการทำห้องสมุดยีน (gene library) การแยกยีนและการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ทำให้ในปัจจุบันมีข้อมูลลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ อยู่ในธนาคารยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์ของจีโนมมนุษย์ หนู ปลาฟูก และปลาหมากลาย รวบรวมไว้ในธนาคารยีน ซึ่งสามารถเข้าไปศึกษาได้ทางอินเทอร์เน็ต (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีข้อมูลลำดับเบสของยีนต่าง ๆ แต่ข้อมูลลำดับเบสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถบอกหน้าที่ของยีน (gene function) ได้ จึงทำให้ยังไม่สามารถใช้ประโยชน์จากข้อมูลยีนต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาไว้ได้อย่างเต็มที่ การศึกษาวิจัยในปัจจุบัน

จึงมุ่งไปสู่การพัฒนาวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนที่ทราบลำดับเบสแล้ว วิธีที่จะใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่ได้ผลดีและใช้มาเป็นเวลานาน คือ การทำให้ยีนที่ต้องการศึกษาเกิดการกลายพันธุ์จนไม่สามารถจะทำงานได้เป็นปกติ ทำให้สิ่งมีชีวิตแสดงความผิดปกติออกมา และเราสามารถทราบหน้าที่ของยีนจากการเปรียบเทียบความผิดปกติที่เกิดขึ้น ถึงแม้เทคนิคดังกล่าวจะมีหลักการที่ง่าย แต่ในทางปฏิบัติเป็นการยากที่จะทำให้การกลายพันธุ์เกิดจำเพาะเจาะจงกับยีนที่เราต้องการศึกษา นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการน็อกเอาต์ (gene knockout) คือ เปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจงอาจจะโดยการแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าไปในยีนที่ต้องการศึกษาหรือการตัดชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการศึกษาออกบางส่วนก็ได้ และส่งผลทำให้ยีนนั้นไม่สามารถทำงานได้ถูกต้องต่อไป หรือการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนจนส่งผลให้ยีนไม่สามารถทำงานได้อีก นอกจากนี้ยังมีเทคโนโลยีอีกอันหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนได้ก็คือ เทคนิคการเพิ่มยีนหรือการถ่ายยีนที่ต้องการศึกษาเข้าไปในสิ่งมีชีวิต (transgenesis) เทคนิคต่าง ๆ เหล่านี้แม้จะสามารถใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนได้ แต่ก็ยุ่งยากในทางปฏิบัติ ยกตัวอย่างเช่น สำหรับเทคโนโลยียีนน็อกเอาต์ แม้ว่าจะมีการวิจัยพัฒนาเทคนิคยีนน็อกเอาต์ในสัตว์ต่าง ๆ แต่การนำไปใช้ยังจำกัดอยู่แต่ในหนูเท่านั้น สำหรับเทคโนโลยีการเพิ่มยีน การถ่ายยีนที่ต้องการศึกษาเข้าสู่ตัวอ่อนสัตว์นั้น ในทางปฏิบัติยีนที่ถ่ายเข้าสู่ตัวอ่อนสัตว์มักจะมีการเข้าไปรวมกับโครโมโซมหลังการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อน ทำให้เกิดสภาวะที่เซลล์ต่าง ๆ ในสัตว์ตัวเดียวกันมีพันธุกรรมไม่เหมือนกัน (mosaic) ทำให้ต้องเลี้ยงสัตว์อย่างน้อย 2-3 รุ่นจึงจะได้สัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างสมบูรณ์แบบ นอกจากนี้การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนจะได้ผลชัดเจนก็ต่อเมื่อ มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดของยีนที่เพิ่มเข้าไป

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคโนโลยียีนน็อกดาวน์ (gene knockdown) ซึ่งเป็นวิธีการที่รบกวนหรือขัดขวางการทำงานของยีน ซึ่งอธิบายได้ดังนี้ เทคนิคยีนน็อกดาวน์ (gene knockdown) คือ เทคนิคที่ใช้สารนิวคลีโอไทด์หรือสารนิวคลีโอไทด์ที่มีการดัดแปลงไปขัดขวางการทำงานของยีนเนื่องจากสารนิวคลีโอไทด์เหล่านี้จะมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสของยีนเป้าหมาย (target gene) เรียกว่า สารแอนไทเซนส์ (antisense molecules) จึงทำให้การขัดขวางการแสดงออกของยีนมีความจำเพาะสูงโดยจะจำเพาะต่อยีนที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น การขัดขวางการแสดงออกของยีนที่ทราบลำดับเบสอย่างจำเพาะเจาะจงนี้ ส่งผลให้ผู้ศึกษาสามารถทราบหน้าที่ของยีนโดยการเปรียบลักษณะที่ปรากฏเมื่อยีนถูกรบกวนการแสดงออก กับลักษณะที่ปรากฏเมื่อยีนมีการทำงานอย่างปกติ จึงได้มีการพิสูจน์อย่างกว้างขวางว่าสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนได้อย่างมีความจำเพาะสูง (Elbashir *et al.*, 2002) นอกจากนี้เทคโนโลยียีนน็อกดาวน์ยังเป็นเทคโนโลยีที่ใช้ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ไม่ต้องการเทคนิคหรือวิธีการที่ยุ่งยากมาร่วมด้วย จึงทำให้เทคโนโลยียีนน็อกดาวน์ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลา (Nasevicius *et al.*, 2000; Braat *et al.*, 2001;

Boonanuntanasarn *et al.*, 2002) และยีนนี้อีกความยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทดลองต่าง ๆ เช่น การนำไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้กับการรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น โรคโลหิตจาง (Lacerra *et al.*, 2000) พัฒนาเป็นยารักษาโรคเอดส์ (The vitravange group, 2002) และพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (Muller *et al.*, 1998) เป็นต้น

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการค้นพบสารต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่เป็นสารแอนไทเซนส์ที่เหมาะสมสำหรับสัตว์ เช่น antisense RNA, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีการดัดแปลง (modified oligonucleotides) อาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดเล็ก (small interfering RNA; siRNA) และ ไรโบไซม์ (ribozyme) แต่แอนไทเซนส์ทุกตัวมีผลอย่างเดียวกันคือ มีผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจงแต่มีผลต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตอย่างชั่วคราวเท่านั้น เพราะสารแอนไทเซนส์จะมีกรดอยู่ ในเซลล์ได้ช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น หลังจากนั้นก็จะถูกทำลายด้วยเอ็นไซม์นิวคลีเอส (nuclease) ต่าง ๆ ในเซลล์

จึงได้มีการแนวคิดที่จะพัฒนาการนำยีนของยีนอย่างถาวร โดยการถ่ายยีนของยีน (gene transfer) ที่สามารถสร้างแอนไทเซนส์ภายในเซลล์ ทำให้สามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนได้ในระยะยาว หรือสามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนอย่างถาวร ซึ่งก็คือการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมของสัตว์โดยการถ่ายยีนที่มีการแสดงออกของสารแอนไทเซนส์ภายในตัวสัตว์ (Vector based gene knockdown) ซึ่งยีนของยีนที่จะนำไปทำให้เกิดยีนนี้ออกความอย่างถาวรนั้น ประกอบด้วยส่วนของโปรโมเตอร์ ยีนและส่วนของยีนที่จะนำไปสร้างสารแอนไทเซนส์ โปรโมเตอร์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นโปรโมเตอร์ชนิดอาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส II (RNA polymerase II) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อเทคนิคยีนนี้ออกความ เนื่องจากโปรโมเตอร์ชนิดนี้ก็จะทำให้ส่วนของอาร์เอ็นเอมีส่วนที่เป็น untranslated region อยู่ทั้งสองปลายของสายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ได้จากการทรานสคริปชัน (transcription) ในขณะที่โปรโมเตอร์ ชนิด อาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส III (RNA polymerase III) จะมีความเหมาะสมมากกว่า เพราะเป็นโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อการสร้างอาร์เอ็นเอสายสั้น ๆ จึงมีการเติมเบสจำนวนน้อยเข้าไปในผลผลิตอาร์เอ็นเอที่ได้จากการทรานสคริปชัน ซึ่งเหมาะสมต่อสารแอนไทเซนส์ เพราะสารแอนไทเซนส์ส่วนใหญ่จะเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก และโปรโมเตอร์ชนิดอาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส III ยังมีอัตราการแสดงออกที่สูงหรือทำให้มีการผลิตสารแอนไทเซนส์ขนาดเล็กจำนวนมาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขัดขวางการทำงานของยีนในกระบวนการยีนนี้ออกความ

ปลาหมาลาย (zebrafish, *Danio rerio*) เป็นปลาที่นิยมใช้เป็นตัวแทนของสัตว์ทดลองอย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ เช่น ทางการแพทย์ การค้นคว้ายา การศึกษาทางด้านชีววิทยา และยังเป็นสัตว์ทดลองที่ดีในการค้นคว้าเทคนิคใหม่ ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอีกด้วย (Hertog, 2005; Bryson-Richardson *et al.*, 2007; Kari *et al.*, 2007) แม้ว่าการศึกษาลำดับเบสของยีนต่าง ๆ รวมทั้ง

ข้อมูลลำดับเบสของจีโนมปลาหมากลายจะได้รับการศึกษาอย่างมาก แต่ยังไม่มีการศึกษาการแยกโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อนีโอกดาวน์ ได้แก่ โปรโมเตอร์ของ U6 small nuclear RNA (U6 snRNA) มาใช้ในเทคนิคยีนนีโอกดาวน์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงจะทำการโคลน u6 snRNA promoter จากปลาหมากลาย เพื่อจะใช้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษายีนนีโอกดาวน์ระยะยาวในปลาหมากลาย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยียีนนีโอกดาวน์ระยะยาวในปลาหมากลาย ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่มีความนิยมสูงในการศึกษาหลายสาขาวิชาทั้งในด้านวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีรวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นต้น และจะนำเอาโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ที่โคลนได้ไปทดสอบการทำงานในปลาชนิดอื่น เพื่อเป็นแนวทางของการนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการแยกยีน U6 snRNA จากปลาหมากลาย และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน U6 snRNA
2. เพื่อการศึกษาเชิงเปรียบเทียบของโครงสร้างของยีน U6 snRNA ระหว่างปลาหมากลายและสัตว์อื่น ๆ ที่ได้มีข้อมูลศึกษาไว้แล้ว
3. เพื่อศึกษาคำแหน่งชุด และตำแหน่งยีนในของยีน U6 snRNA บนโครโมโซมของปลาหมากลาย
4. เพื่อศึกษาการทำงานของยีน U6 snRNA ที่มีอยู่ในจีโนมของปลาหมากลาย
5. เพื่อศึกษาการนำเอาส่วนของโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ไปใช้ในการแสดงออกอาร์เอ็นเอสายสั้น เพื่อการนำไปประยุกต์สำหรับเทคนิคยีนนีโอกดาวน์

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การแยกยีน U6 snRNA เส้นสมบูรณ์จากจีโนมของปลาหมากลาย โดยวิธี nested PCR โดยใช้ zebrafish genomic library เป็นยีนต้นแบบ
2. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน U6 snRNA และการวิเคราะห์โครงสร้างของยีน U6 snRNA โดยการเปรียบเทียบกับโครงสร้างทั่วไปของยีน U6 snRNA ที่ได้มีการรายงานไว้ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ
3. การสร้าง phylogenetic tree ของ coding region ของยีน U6 snRNA ระหว่างปลาหมากลายที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับข้อมูล coding region ของยีน U6 snRNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ โดยใช้ข้อมูลใน (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>)
4. การศึกษาการทำงานของยีน U6 snRNA ว่ายีนใดเป็น real gene หรือ pseudogene โดยวิธี reverse transcription PCR

5. การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน U6 snRNA บนโครโมโซมของปลาม้าลาย และจำนวนชุดของยีน U6 snRNA แต่ละชนิดบนโครโมโซมของปลาม้าลาย โดยใช้ข้อมูลจาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>
6. การศึกษาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับยีนนิ่งคาวาน์ โดยการโคลนส่วนของโปรโมเตอร์ เพื่อนำมาต่อกับส่วนของยีนที่สร้าง short hairpin RNA (shRNA) และทำการตรวจการใ้ใช้งานของรีคอมบีแนนท์เวกเตอร์ดังกล่าวในหลอดทดลอง โดยใช้สารสกัดของเอนไซม์ RNA polymerase III จากเซลล์ของปลาม้าลาย
7. การทดลองศึกษาการใช้รีคอมบีแนนท์เวกเตอร์ในข้อ 6 ต่อการทดสอบการแสดงออกในปลาข้ามชนิด โดยใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III จากเซลล์ของปลาที่มีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจ บางชนิด เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ปลาดุก (*Clarias gariepinus*) และปลานิล (*Oreochromis niloticus*)
8. การทดลองศึกษาการใช้รีคอมบีแนนท์เวกเตอร์ในข้อ 6 ต่อการทดสอบการแสดงออกในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ ได้แก่ กุ้งทะเล โดยใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III จากลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทกัณฑ์	ข
Abstract	ค
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	จ
สารบัญ	ญ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
 บทที่	
1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตการวิจัย	4
2 การตรวจเอกสาร	5
3 อุปกรณ์และวิธีการ	17
4 ผลการทดลอง	26
โครงสร้างของยีน U6 snRNA ในปลาหมึก	26
ยีน U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมึก	31
การประยุกต์ใช้โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA เพื่อการแสดงออก	33
short hairpin RNA (shRNA)	
5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	36
 บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	50
ประวัติผู้วิจัย	51
ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์จากการวิจัยในครั้งนี้	53

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษานี้	19
ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสของยีน U6 snRNA ในปลาหมึกลาย	28
ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสบริเวณ coding region ของยีน U6 snRNA ในปลาหมึกลายกับ coding region ของยีน U6 snRNA ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ	28
ตารางที่ 4.3 ตำแหน่งและจำนวนของ U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมึกลาย	32

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 4.1 ลำดับเบสของยีน U6 snRNA ของปลาหมึกลาย	27
ภาพที่ 4.2 แผนภาพ phylogenetic tree สร้างโดยวิธี neighbor-joining	29
ภาพที่ 4.3 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 ของอวัยวะต่าง ๆ	33
ภาพที่ 4.4 แผนภาพแสดงการตัดต่อยีน โปรโมเตอร์ของ U6-1, U6-2 และ U6-3 ต่อกับ shRNA	34
ภาพที่ 4.5 ผลของการวิเคราะห์การทำ <i>in vitro</i> transcription ด้วย northern blot analysis ในปลาหมึกลาย และปลานิล	34
ภาพที่ 4.6 ผลของการวิเคราะห์การทำ <i>in vitro</i> transcription ด้วย northern blot analysis ในกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>) และกุ้งกุลาดำ (<i>Penaeus monodon</i>)	35
ภาพที่ 5.1 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสเฉพาะส่วนของ PSE	37

บทที่ 1

บทนำ

ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทางชีวภาพโดยเฉพาะการทำห้องสมุดยีน (gene library) การแยกยีนและการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ทำให้ในปัจจุบันมีข้อมูลลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ อยู่ในธนาคารยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์ของจีโนมมนุษย์ หนู ปลาฟugu และปลาม้าลาย รวมรวมไว้ในธนาคารยีน ซึ่งสามารถเข้าไปศึกษาได้ทางอินเทอร์เน็ต (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีข้อมูลลำดับเบสของยีนต่าง ๆ แต่ข้อมูลลำดับเบสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถบอกหน้าที่ของยีน (gene function) ได้ จึงทำให้ยังไม่สามารถใช้ประโยชน์จากข้อมูลยีนต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาไว้ได้เต็มที่

การศึกษายีนในปัจจุบันจึงมุ่งไปสู่การพัฒนาวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนที่ทราบลำดับเบสแล้ว วิธีที่จะใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่ได้ผลดีและใช้มาเป็นเวลานาน คือ การทำให้ยีนที่ต้องการศึกษาเกิดการกลายพันธุ์จนไม่สามารถจะทำงานได้เป็นปกติ ทำให้สิ่งมีชีวิตแสดงความผิดปกติออกมา และเราสามารถทราบหน้าที่ของยีนจากการเปรียบเทียบความผิดปกติที่เกิดขึ้น ถึงแม้เทคนิคดังกล่าวจะมีหลักการที่ง่าย แต่ในทางปฏิบัติเป็นการยากที่จะทำให้การกลายพันธุ์เกิดจำเพาะเจาะจงกับยีนที่เราต้องการศึกษา นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการน็อกเอาต์ (gene knockout) คือ เปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจง อาจจะโดยการแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าไปในยีนที่ต้องการศึกษาหรือการตัดดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษาบางส่วนออกก็ได้ และส่งผลทำให้ยีนนั้นไม่สามารถทำงานได้ถูกต้องต่อไป (Lobe and Nagy, 1998; Moreadith and Radford, 1997) หรือการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนจนส่งผลให้ยีนไม่สามารถทำงานได้อีก นอกจากนี้ยังมีเทคโนโลยีอีกอันหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนได้ก็คือ เทคนิคการเพิ่มยีนหรือการถ่ายยีนที่ต้องการศึกษาเข้าไปในสิ่งมีชีวิต (transgenesis) เทคนิคต่าง ๆ เหล่านี้แม้จะสามารถใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนได้ แต่ก็ยังยากในทางปฏิบัติ ยกตัวอย่างเช่น สำหรับเทคโนโลยียีนน็อกเอาต์ แม้ว่าจะมีการวิจัยพัฒนาเทคนิคยีนน็อกเอาต์ในสัตว์ต่าง ๆ แต่การนำไปใช้ยังจำกัดอยู่แต่ในหนูเท่านั้น การนำไปใช้ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะปลา ยังอยู่ในระดับงานวิจัยเท่านั้น ซึ่งการนำมาใช้ต้องการเทคนิคอื่น ๆ และเครื่องมืออุปกรณ์สารเคมีที่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง สำหรับเทคโนโลยีการเพิ่มยีน การถ่ายยีนที่ต้องการศึกษาเข้าสู่ตัวอ่อนสัตว์นั้น ในทางปฏิบัติยีนที่ถ่ายเข้าสู่ตัวอ่อนสัตว์จะมีการเข้าไปรวมกับโครโมโซมหลังการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อน ทำให้เกิดสถานะที่เซลล์ต่าง ๆ ในสัตว์ตัวเดียวกันมีพันธุกรรมไม่เหมือนกัน (mosaic) ทำให้ต้องเลี้ยงสัตว์อย่างน้อย 2-3 รุ่นจึงจะได้สัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างสมบูรณ์แบบ (Stone and Vulchanova, 2003) นอกจากนี้การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนจะได้ผลชัดเจนก็ต่อเมื่อ มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดของยีนที่เพิ่มเข้าไป

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคโนโลยียีนนิ่งคดาวน์ (gene knockdown) ซึ่งเป็นวิธีการที่รบกวนหรือขัดขวางการทำงานของยีน ซึ่งอธิบายได้ดังนี้ เทคนิคยีนนิ่งคดาวน์ (gene knockdown) คือเทคนิคที่ใช้สารนิวคลีโอไทด์หรือสารนิวคลีโอไทด์ที่มีการดัดแปลงไปขัดขวางการทำงานของยีนเนื่องจากสารนิวคลีโอไทด์เหล่านี้จะมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสของยีนเป้าหมาย (target gene) เรียกว่า สารแอนไทเซนส์ (antisense molecules) จึงทำให้การขัดขวางการแสดงออกของยีนมีความจำเพาะสูงโดยจะจำเพาะต่อยีนเป้าหมายที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น การขัดขวางการแสดงออกของยีนที่ทราบลำดับเบสอย่างจำเพาะเจาะจงนี้ ส่งผลให้ผู้ศึกษาสามารถทราบหน้าที่ของยีนโดยการเปรียบลักษณะที่ปรากฏเมื่อยีนถูกรบกวนการแสดงออก กับลักษณะที่ปรากฏเมื่อยีนมีการทำงานอย่างปกติ และได้มีการพิสูจน์อย่างกว้างขวางว่าสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนได้อย่างมีความจำเพาะสูง (Elbashir *et al.*, 2002; Harboth *et al.*, 2001) นอกจากนี้เทคโนโลยียีนนิ่งคดาวน์ยังเป็นเทคโนโลยีที่ใช้ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ไม่ต้องการเทคนิคหรือวิธีการที่ยุ่งยากมาร่วมด้วย จึงทำให้เทคโนโลยียีนนิ่งคดาวน์ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลา (Nasevicius *et al.*, 2000; Braat *et al.*, 2001; Boonanuntanasarn *et al.*, 2002) และยีนนิ่งคดาวน์ยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทดลองต่าง ๆ เช่น การนำไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้กับการรักษาโรคที่เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น โรคโลหิตจาง (Lacerra *et al.*, 2000) พัฒนาเป็นยารักษาโรคเอดส์ (The vitravange group, 2002) และพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (Muller *et al.*, 1998) เป็นต้น

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการค้นพบสารต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่เป็นสารแอนไทเซนส์ที่เหมาะสมสำหรับสัตว์ เช่น antisense RNA, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีการดัดแปลง (modified oligonucleotides) อาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดเล็ก (small interfering RNA; siRNA) และ ไรโบไซม์ (ribozyme) แต่แอนไทเซนส์ทุกตัวมีผลอย่างเดียวกันคือ มีผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจงแต่มีผลต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตอย่างชั่วคราวเท่านั้น เพราะสารแอนไทเซนส์จะมีคงตัวอยู่ในเซลล์ได้ช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น หลังจากนั้นก็จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) ต่าง ๆ ในเซลล์

จึงได้มีแนวคิดที่จะพัฒนาการยีนนิ่งคดาวน์ของยีนอย่างถาวร โดยการถ่ายชุดของยีน (gene transfer) ที่สามารถสร้างแอนไทเซนส์ภายในเซลล์ ทำให้สามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนได้ในระยะยาว หรือสามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนอย่างถาวร ซึ่งก็คือการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของสัตว์โดยการถ่ายยีนที่มีการแสดงออกของสารแอนไทเซนส์ภายในตัวสัตว์ (Vector based gene knockdown) ซึ่งชุดของยีนที่จะนำไปทำให้เกิดยีนนิ่งคดาวน์อย่างถาวรนั้น ประกอบด้วยส่วนของโปรโมเตอร์ ยีนและส่วนของยีนที่จะนำไปสร้างสารแอนไทเซนส์ โปรโมเตอร์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นโปรโมเตอร์ชนิดอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส II (RNA polymerase II) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อเทคนิค

ยีนนี้อีกด้วย เนื่องจากโปรโมเตอร์ชนิดนี้มักจะทำให้ส่วนของอาร์เอ็นเอไม่มีส่วนที่เป็น untranslated region อยู่ทั้งปลาย 5' และปลาย 3' ของสายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ได้จากการทรานสคริปชัน (transcription) ในขณะที่โปรโมเตอร์ ชนิด อาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส III (RNA polymerase III) จะมีความเหมาะสมมากกว่า เพราะเป็นโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อการสร้างอาร์เอ็นเอสายสั้น ๆ จึงมีการเติมเบสจำนวนน้อยเข้าไปในผลผลิตอาร์เอ็นเอที่ได้จากการทรานสคริปชัน ซึ่งเหมาะสมต่อสารแอนไทเซนส์ เพราะสารแอนไทเซนส์ส่วนใหญ่จะเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กและมีโครงสร้างเฉพาะ (การเติมเบสจำนวนมากเข้าไปที่ปลายทั้งสองข้าง อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่สามารถทำงานได้) นอกจากนี้โปรโมเตอร์ชนิดอาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส III ยังมีอัตราการแสดงออกที่สูงหรือทำให้มีการผลิตสารแอนไทเซนส์ขนาดเล็กจำนวนมาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขัดขวางการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา

ปลาหมากลาย (zebrafish, *Danio rerio*) เป็นปลาที่วงจรชีวิตสั้น (ประมาณ 3 เดือนก็เจริญเติบโตถึงระยะโตเต็มวัย) การพัฒนาการในระยะวัยอ่อนใช้เวลาสั้น (ประมาณ 1 สัปดาห์) การผสมพันธุ์เกิดภายนอก และให้ไข่หรือตัวอ่อนจำนวนมาก ไข่ปลาไม่เปลือกใสและโปร่งแสง ทำให้สามารถสังเกตการพัฒนาการของตัวอ่อนของไข่ปลาได้ง่าย จึงนิยมใช้เป็นตัวแทนของสัตว์ทดลองอย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ เช่น ทางการแพทย์ การค้นคว้ายา การศึกษาทางด้านชีววิทยา ทั้งนี้เนื่องจากปลาหมากลายมีการแสดงออกของยีนที่คล้ายคลึงการแสดงออกของยีนของมนุษย์ และยังเป็นสัตว์ทดลองที่ดีในการค้นคว้าเทคนิคใหม่ ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอีกด้วย (Postlewait et al., 2000; Hertog, 2005; Dahm and Geisler, 2006; Bryson-Richardson et al., 2007; Kari et al., 2007) แม้ว่าการศึกษาลำดับเบสของยีนต่าง ๆ รวมทั้ง ข้อมูลลำดับเบสของจีโนมปลาหมากลายจะได้รับการศึกษาอย่างมาก จึงมีข้อมูลทางด้านจีโนมที่สมบูรณ์ใน <http://zfin.org> แต่ยังไม่มีการศึกษาการแยกโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อยีนนี้อีกด้วย ได้แก่ โปรโมเตอร์ของ U6 small nuclear RNA (U6 snRNA) มาใช้ในเทคนิคยีนนี้อีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้จึงจะทำการโคลน u6 snRNA promoter จากปลาหมากลาย เพื่อจะใช้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษายีนนี้อีกด้วยระยะยาวในปลาหมากลาย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยียีนนี้อีกด้วยระยะยาวในปลาหมากลาย ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่มีความนิยมสูงในการศึกษาหลายสาขาวิชาทั้งในด้านวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีรวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทำการแยกยีน U6 snRNA จากปลาม้าลาย และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน U6 snRNA
2. เพื่อการศึกษาเชิงเปรียบเทียบของโครงสร้างของยีน U6 snRNA ระหว่างปลาม้าลาย และสัตว์อื่น ๆ ที่ได้มีข้อมูลศึกษาไว้แล้ว
3. เพื่อศึกษาดำเน่งชุด และตำแหน่งยีนในของยีน U6 snRNA บนโครโมโซมของ ปลาม้าลาย
4. เพื่อศึกษาการทำงานของยีน U6 snRNA ที่มีอยู่ในจีโนมของปลาม้าลาย
5. เพื่อศึกษาการนำเอาส่วนของโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ไปใช้ในการแสดงออกอาร์เอ็นเอสายสั้น เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้ปลาม้าลายเป็นสัตว์ทดลอง โดยทำการเลี้ยงปลาเพื่อนำเอาชิ้นส่วนของครีปปลามาทำการสกัด genomic DNA และนำเอาอวัยวะภายในมาสกัด อาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และทำการเพาะพันธุ์ลูกปลาเพื่อนำเอาลูกปลามาทดสอบการแสดงออกของยีน นอกจากนี้การศึกษากครั้งนี้ยังครอบคลุมไปถึงการเพาะพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด เช่น ปลาดุก ปลาไน และปลานิล เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนเมื่อใช้โปรโมเตอร์ที่ได้จากผลการศึกษากครั้งนี้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

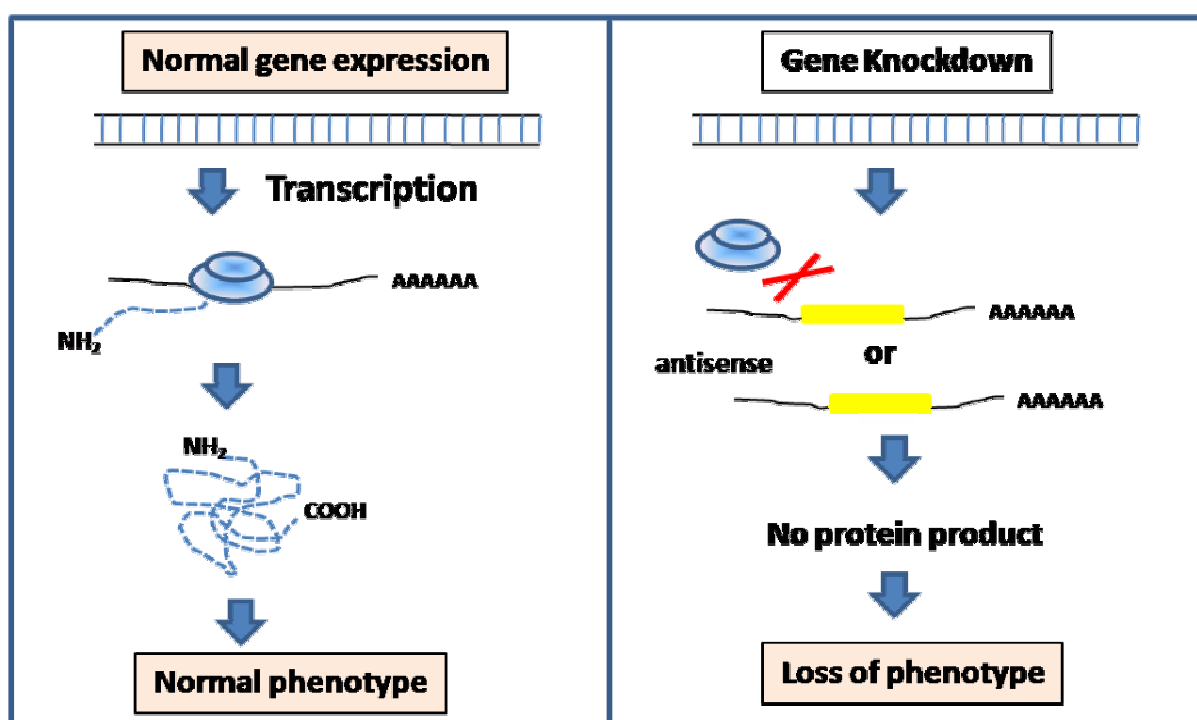
ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพ ทำให้มีการสะสมข้อมูลความรู้ทางด้านลำดับเบสของ ยีนต่าง ๆ ในปลาหลายชนิดอย่างมากมาย อย่างไรก็ตามข้อมูลทางด้านลำดับเบสเพียงอย่างเดียวยังไม่ เพียงพอที่จะทำให้ทราบบทบาทหน้าที่ของยีนได้อย่างสมบูรณ์ จึงไม่สามารถนำข้อมูลความรู้ ทางด้านยีนไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง ดังนั้นในปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์จึงได้พยายามพัฒนา เทคโนโลยีเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน เทคนิคในการศึกษาหน้าที่ของยีน อันหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในสัตว์น้ำ ก็คือ เทคนิคยีนน็อกดาวน์ (Gene knockdown)

ยีนน็อกดาวน์ (Gene knockdown)

ยีนน็อกดาวน์ คือ การขัดขวางกระบวนการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งได้แก่ การขัดขวางกระบวนการทรานสคริปชัน และ/หรือ การที่ mRNA ถูกทำลาย และ/หรือกระบวนการ ที่ขัดขวางการทรานสเลชัน (กระบวนการสร้างโปรตีน) ทำให้การผลิตโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีน ลดน้อยลง หรือถูกยับยั้งในช่วงเวลานั้นส่งผลต่อกระบวนการทางชีวภาพของเซลล์หรือสิ่งมีชีวิต เปลี่ยนไป จึงทำให้สามารถทราบหน้าที่ของยีนนั้น โดยการเปรียบเทียบลักษณะปรากฏที่เปลี่ยนไป เมื่อสิ่งมีชีวิตถูกน็อกดาวน์กับลักษณะปรากฏที่ปกติ (ภาพที่ 2.1) สารที่นำมาใช้ในกระบวนการ ยีนน็อกดาวน์ จะต้องมีความสมบัติที่สำคัญที่จะขัดขวางการทำงานของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งจะ เรียกสารที่นำมาขัดขวางการทำงานของยีนว่า สารแอนไทเซนส์ (antisense agents) สารแอนไทเซนส์ มีหลายชนิดแต่ทุกชนิดจะมีเบสที่เป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สม (complementary base) กับยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา สารแอนไทเซนส์ที่ได้ถูกนำมาศึกษาทางด้าน ยีนน็อกดาวน์ในปลามีหลายชนิด ได้แก่ แอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอ (antisense RNA) แอนไทเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (antisense oligonucleotides) เอสไออาร์เอ็นเอ (siRNA; small interfering RNA) และไรโบไซม์ (ribozyme) เป็นต้น

แอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอ (antisense RNA) คืออาร์เอ็นเอที่มีเบสคู่สมกับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน เป้าหมาย (McKee and McKee, 1999) แนวคิดในการนำแอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอมาใช้ในเทคนิค ยีนน็อกดาวน์เกิดจากการค้นพบว่าแอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอขัดขวางการแสดงออกของยีนที่ควบคุม การจำลองตัวเองของพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (Stougaard et al., 1981) และยัง พบยีนของแอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอจำนวนหนึ่งในจีโนมของสัตว์ จึงคาดว่าแอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอ อาจจะมียุทธศาสตร์ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สม (Adelman et al., 1987; Celano et al., 1992; Hatzaglou et al., 2002) อย่างไรก็ตามการอธิบายกลไกที่

แอนไทเซนซาร์เอ็นเอไปขัดขวางการทำงานของยีนยังไม่มี การพิสูจน์แน่ชัด ในระยะแรกได้มีการนำเอาแอนไทเซนซาร์เอ็นเอมาใช้ในเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์ในปลา เช่น ในปลาม้าลาย (Roth et al., 1999) และปลาเรนโบว์เทรา (Onchirhynchus mykiss) (Boonanuntanasarn, unpublished data) แต่พบว่าแอนไทเซนซาร์เอ็นเอมีผลต่อการขัดขวางการทำงานของยีนเป้าหมายในระยะเวลาดสั้น ๆ เท่านั้น อาจเนื่องจากว่าแอนไทเซนซาร์เอ็นเอถูกทำลายโดยนิวคลีเอส (nuclease) ต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ง่าย อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการทดลองการตัดต่อยีนแอนไทเซนซาร์เอ็นเอของยีน gonadotropin releasing hormone (GnRH) ในปลาเรนโบว์เทรา เพื่อทำการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของปลาเรนโบว์เทราเพื่อให้ได้ปลาเรนโบว์เทราที่เป็นหมัน โดยการถ่ายยีนแอนไทเซนซาร์ของ GnRH เข้าสู่ตัวอ่อนปลาเรนโบว์เทรา พบว่าปลาเรนโบว์เทราที่ได้รับการถ่ายยีนของแอนไทเซนซาร์เอ็นเอของ GnRH มีการแสดงออก หรือมีการผลิตแอนไทเซนซาร์เอ็นเอของ GnRH และมีผลทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอของ GnRH ซึ่งเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายลดลงได้ แต่ไม่มีผลเพียงพอที่จะทำให้ปลาเรนโบว์เทราเป็นหมันได้ (UZbekova et al., 2000)

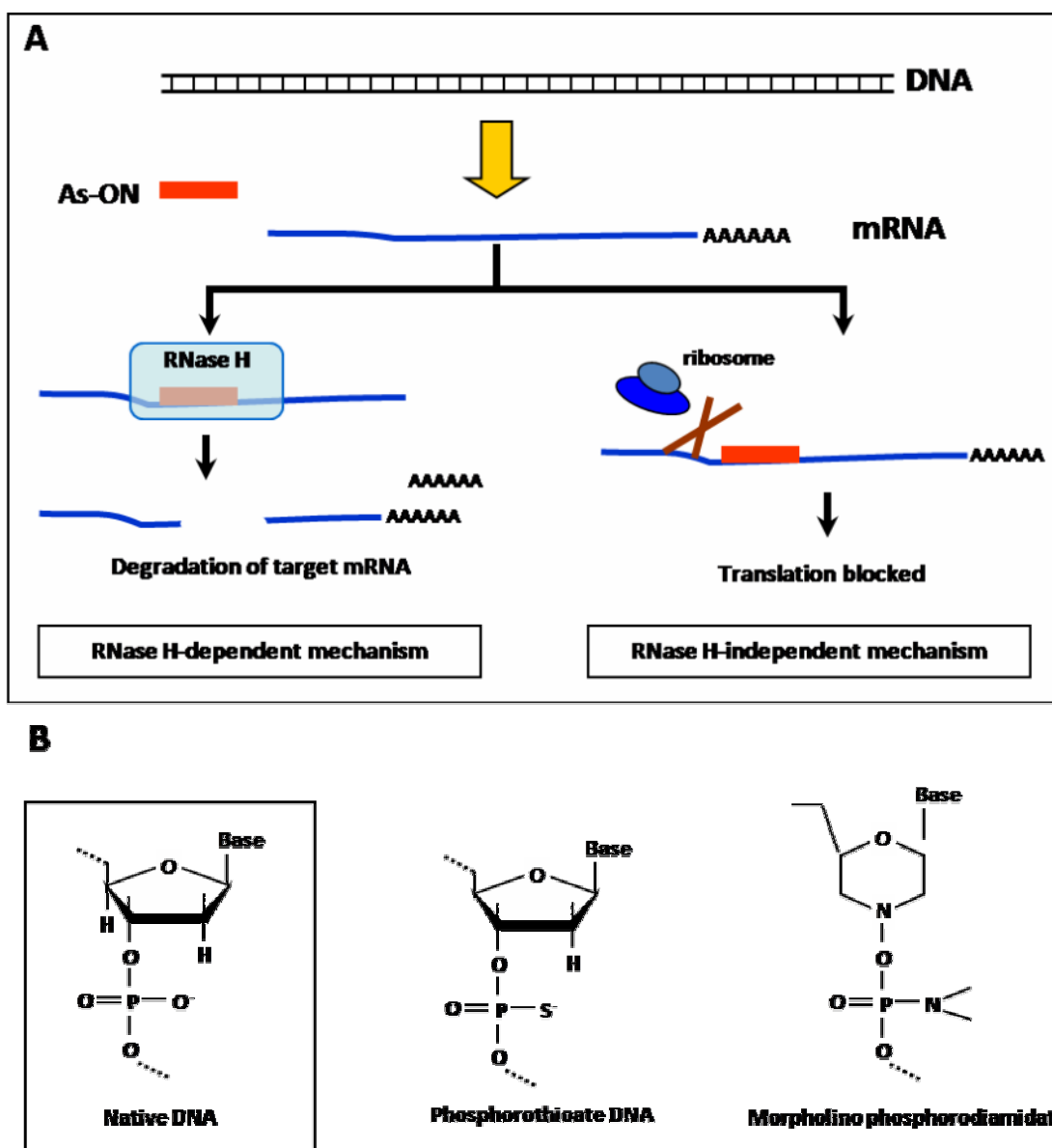


ภาพที่ 2.1 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยปกติ (normal gene expression) และกระบวนการยีนนิ่งคดาวน์ (Gene knockdown) กระบวนการยีนนิ่งคดาวน์ทำให้การแสดงออกของยีนถูกขัดขวาง ทำให้ได้โปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนลดลง ทำให้สิ่งมีชีวิตมีลักษณะปรากฏเปลี่ยนไปเนื่องจากยีนเป้าหมายที่ถูกยีนนิ่งคดาวน์

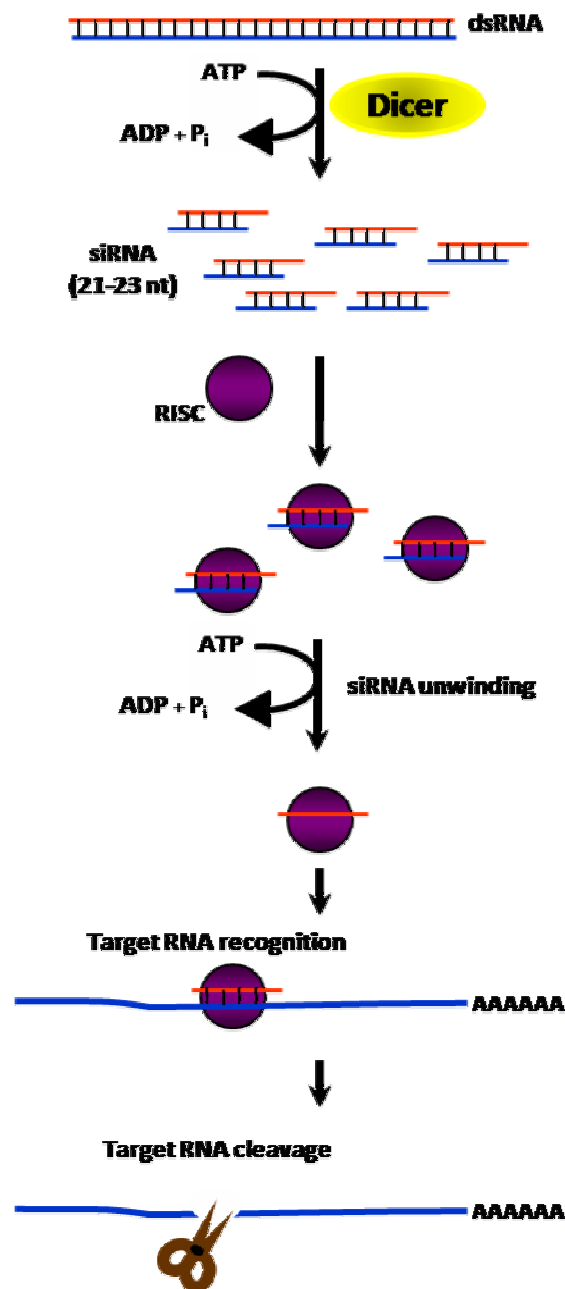
ต่อมาได้มีการนำเอาแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์มาใช้ในเทคนิคยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สิ่งมีชีวิต ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Paterson et al. (1977) จากนั้นจึงได้มีการทดลองนำเอาแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการขัดขวางการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์สิ่งมีชีวิต (Stephenson and Zamecnik, 1978; Zamecnik and Stephenson, 1978) มีการพัฒนาเทคนิคยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้แอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 15-25 นิวคลีโอไทด์ และได้มีการพัฒนาเป็นแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์แบบดัดแปลง (modified oligonucleotide) โดยการเปลี่ยนโครงสร้างแกนหลักของแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์แต่ยังคงส่วนประกอบของเบสกลุ่มไว้ เพื่อให้มีความคงตัวในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้นานขึ้น ได้แก่ phosphorothioate oligonucleotides (ภาพที่ 2.2) ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีระยะเวลาการทำงานยาวนาน แต่ก็จะเกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์สัตว์ จึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป็น morpholino phosphorodiamidates oligonucleotides (ภาพที่ 2.2) ซึ่งมีความเป็นพิษลดลง สามารถจับกับอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ดีขึ้น กลไกการทำงานของแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ในการขัดขวางการทำงานของยีนเป้าหมายมี 2 กลไก อธิบายดังภาพที่ 2.2 มีการนำแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีน ใช้เป็นยารักษาโรคไวรัส และใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการผิดปกติของยีน (Braat et al., 2001; Galderisi et al., 1999; Schmajuk et al., 1999; Lacerra et al., 2000; The vitravene group, 2002) ได้มีการนำเอาแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาหมอ ปลาเมดา และปลารวมหัว (Nasevicius and Ekker, 2000; Boonanuntanasarn et al., 2002; Boonanuntanasarn et al., 2004; Yasutake et al., 2004; Candel et al., 2004; Yamamoto and Suzuki, 2005) โดยจะเห็นได้ว่ามีผลงานวิจัยการใช้แอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของปลามากกว่า 300 ฉบับ

ถึงแม้ว่าแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์จะเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับเทคนิคยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ผลของการหยุดยั้งการแสดงออกของยีนเกิดเพียงระยะสั้น จึงจำกัดการใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในระหว่างการพัฒนาการของไข่ปลาหรือระยะตัวอ่อนของปลาเท่านั้น และการทำงานของแอนไทเซนซ์ morpholino phosphorodiamidates oligonucleotides ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างหลักจนทำให้ เอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอส (RNase H) ไม่สามารถจับได้ จึงทำให้ผลของการขัดขวางการแสดงออกของยีน เป็นแค่เพียงการป้องกันการดำเนินงานของไรโบโซมในการเข้าไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนเท่านั้น ทำให้การตรวจสอบการทำงานของยีนนี้ต้องอาศัยเทคนิคในการวัดปริมาณโปรตีน ซึ่งวิธีการวัดระดับโปรตีนหลายชนิดต้องการเทคนิคที่ซับซ้อน จึงได้มีการนำเอาเอสไออาร์เอ็นเอ (siRNA; small interfering RNA) มาทดลองใช้ในการขัดขวางการทำงานของยีนในปลารวมหัว (Boonanuntanasarn et al., 2003)

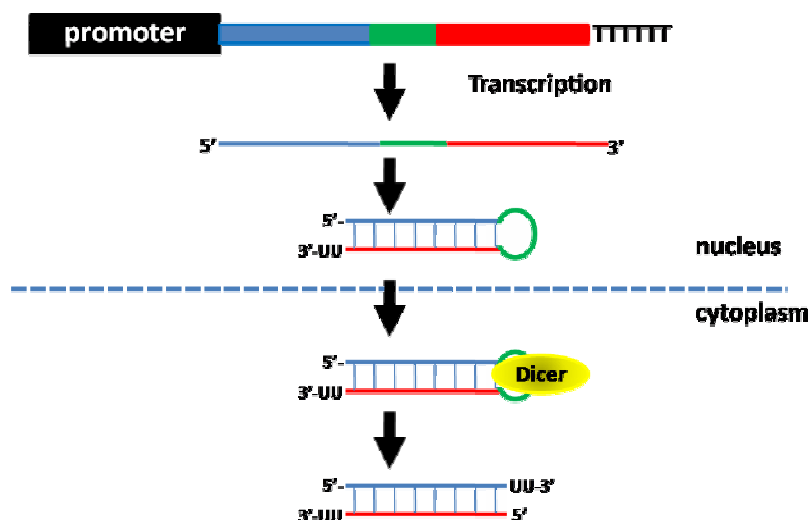
และปลาหมึกลาย (Dodd et al., 2004) กลไกการทำงานของเอสไออาร์เอ็นเอในการตัดเอ็มอาร์เอ็นเอ เป้าหมายอธิบายได้ดังภาพที่ 2.3 เนื่องจาก siRNA เป็น โมเลกุลของอาร์เอ็นเอที่ไม่ได้มีการดัดแปลง จึงสามารถที่จะนำไปประยุกต์กับเทคนิคการถ่ายยีน (Gene transfer) โดยการสร้างเป็นดีเอ็นเอสายสั้นที่ต่อเข้ากับ โปรโมเตอร์ที่เหมาะสม ซึ่งดีเอ็นเอสายสั้นนี้จะประกอบด้วยส่วนของ sense strand, loop และ antisense strand เมื่อดีเอ็นเอถูกทรานสคริบชัน จะได้อาร์เอ็นเอที่เรียกว่า short hairpin RNA (shRNA) ซึ่งเป็นเส้นอาร์เอ็นเอที่ม้วนมาจับกันด้วยเบสคู่สม แล้ว shRNA จะถูก dicer ภายในเซลล์ตัดส่วนของ loop ออกไป แล้วเปลี่ยนเป็น siRNA (ภาพที่ 2.4) เพื่อไปขัดขวางการแสดงออกของยีนดังภาพที่ 2.3 ต่อไป



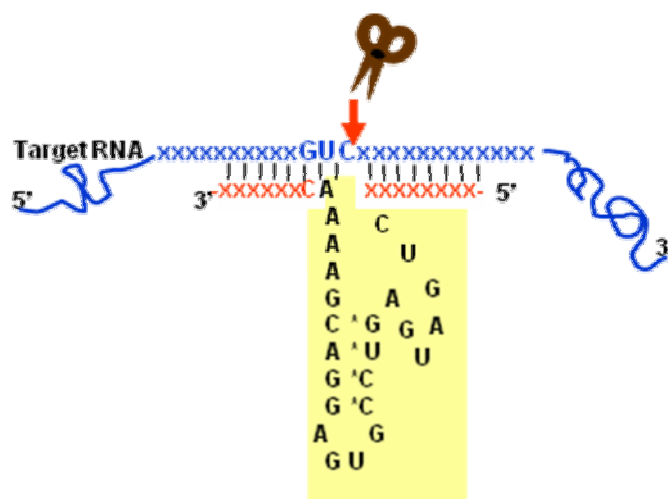
ภาพที่ 2.2 กลไกการขัดขวางการแสดงออกของยีนโดยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (A) และ โครงสร้างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีการดัดแปลง (B) กลไกยีนนี้คัดค้านแบ่งออกเป็น 2 กลไกหลัก คือ RNase H-dependent mechanism คือ การที่แอนไทเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์เข้าไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย แล้วทำให้เอ็นไซม์ RNase H ซึ่งจดจำโครงสร้างที่อาร์เอ็นเอจับกับดีเอ็นเอ แล้วทำการตัดสายเอ็มอาร์เอ็นเอ และอีกกลไกหนึ่งคือ RNase H-independent mechanism คือกระบวนการแอนไทเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์จับกับสายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ดี จนทำให้ไรโบโซมไม่สามารถเข้าไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเพื่อทำการสร้างโปรตีนของยีนเป้าหมายได้



ภาพที่ 2.3 อาร์เอ็นเอสายคู่ (doublestranded RNA; dsRNA) ขั้นตอนการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยที่ dsRNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ dicer เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดเล็ก (small interfering RNA; siRNA) ที่มีขนาดประมาณ 15-25 คู่เบส จากนั้น siRNA จะจับกับ RISC (RNA induced silencing complex) ซึ่งมีส่วนประกอบที่สามารถตัดสายเอ็มอาร์เอ็นเอได้ siRNA จับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายด้วยเบสคู่สม แล้วพา RISC เข้าไปตัดเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายให้ขาดออกจากกัน จากนั้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายจึงถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเออื่น ๆ ในเซลล์ต่อไป



ภาพที่ 2.4 การตัดต่อยีน shRNA เข้ากับโปรโมเตอร์ เพื่อการทรานสคริปเป็น shRNA และถูกเปลี่ยนเป็น siRNA โดยเอนไซม์ Dicer จากนั้น siRNA เข้าสู่กระบวนการยีนนิ่งคดาวน์ดังภาพที่ 2.3 ต่อไป



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของไรโบไซม์ (ribozyme) และยีนนิ่งคดาวน์โดยไรโบไซม์

นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิคอื่นนี้อีกด้วยโดยการใช้ไรโบไซม์ ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอที่มีฟอรัมรูปร่างพิเศษ ไรโบไซม์ที่นิยมสำหรับยีนนี้อีกตัวในปลา คือไรโบไซม์หัวฆ้อน (hammerhead ribozyme) (ภาพที่ 2.5) เมื่อเข้าไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีส่งผลให้ทำเส้นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายขาดออกจากกันได้ และการจัดขบวนการทำงานของยีนนั้นก็มีผลต่อการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย กลไกการทำงานแสดงโดยภาพที่ 2.5 จึงทำให้การตรวจสอบเทคนิคอื่นนี้อีกตัวสามารถใช้เทคนิคการวัดระดับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ (Tanner, 1999; Warashina et al., 2001; Boonanuntanasarn et al., 2005) และเทคนิคดังกล่าวนี้สามารถจะนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเทคนิคอื่นนี้อีกตัวระยะยาว หรือการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของยีนเป้าหมายให้มีการทำงานลดลง โดยการตัดต่อยีนของ shRNA และ/หรือ ไรโบไซม์ เข้ากับโปรโมเตอร์ที่เหมาะสม แล้วนำไปใช้ร่วมกับเทคนิคการถ่ายยีน (Gene transfer) (Xie et al., 1997) ดังนั้น ในปัจจุบันจึงเป็นที่สนใจกันอย่างมากในการศึกษาเพื่อการแยกและการโคลนโปรโมเตอร์ที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการพัฒนาเทคนิคอื่นนี้อีกตัว เนื่องจากโครงสร้างของ shRNA และ ribozyme เป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก และการทำงานของยีนนี้อีกตัวสำหรับยีนบางยีนต้องการระดับหรือปริมาณของ siRNA และ ribosome สูง เพื่อที่จะสามารถหยุดยั้งการทำงานของยีนได้และสามารถเห็นผลได้อย่างชัดเจน

RNA polymerase III promoter

ในเซลล์สิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต สามารถแบ่งกลุ่มอาร์เอ็นเอหลัก ๆ ออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ ribosomal (r)RNA ซึ่งมีอยู่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของอาร์เอ็นเอทั้งหมดภายในเซลล์ อีก 5 เปอร์เซ็นต์จะเป็น messenger (m)RNA และที่เหลืออีก 15 เปอร์เซ็นต์จะเป็นอาร์เอ็นเอจำพวก transfer (t)RNA การทรานสคริปชันของอาร์เอ็นเอเหล่านี้ถูกทำงานโดยเอ็นไซม์ต่างกัน คือ การทรานสคริปชันโดยเอ็นไซม์ RNA polymerase I (Pol I), RNA polymerase II (Pol II) และ RNA polymerase III (Pol III) ตามลำดับ (Wingender, 1993) โปรโมเตอร์ของยีนในกลุ่ม Pol II ทำหน้าที่ในการสร้าง mRNA และ กลุ่มอาร์เอ็นเอที่เรียกว่า small nuclear RNA (U-snRNAs) (ซึ่งทำหน้าที่ในกระบวนการ splicing) โดยปกติระดับการแสดงออกโดย Pol II จะแสดงออกในระดับที่ไม่สูงมาก และการแสดงออกของยีนบางชนิดอาจมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์หรืออวัยวะ อีกทั้งผลผลิตอาร์เอ็นเอที่ได้มักจะมีส่วนของอาร์เอ็นเอที่เพิ่มเติมทางด้านปลาย 5' (5'untranslated region และ cap structure) และ 3' (3'untranslated region และ poly A tail) (Ohkawa et al., 1993; Taira et al., 1991) การที่ผลผลิตที่ได้จากการทรานสคริปต์โดย Pol II มีสายนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติม ดังนั้นถ้าหากนำโปรโมเตอร์ของ Pol II มาใช้ในการสร้าง shRNA และ/หรือไรโบไซม์ อาร์เอ็นเอที่ถูกเพิ่มเติมอาจทำให้

รูปร่างการม้วนตัวของ shRNA และ/หรือ ไรโบไซม์เปลี่ยนไป ซึ่งโครงสร้างที่เปลี่ยนไปนั้นอาจทำให้ไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการตัดขวางการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้

การทรานสคริบของ Pol III ซึ่งโดยธรรมชาติทำหน้าที่ในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอขนาดเล็กจะมีการเติมนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' และ ปลาย 3' เข้ากับอาร์เอ็นเอผลผลิตเพียงเล็กน้อย ระดับการแสดงออกค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ Pol II (Bertrand et al., 1997) ส่วนใหญ่การแสดงออกจะไม่มี ความจำเพาะต่อเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ (Wingender, 1993) จึงน่าจะเป็นโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จะสร้างเป็น shRNA และ ไรโบไซม์

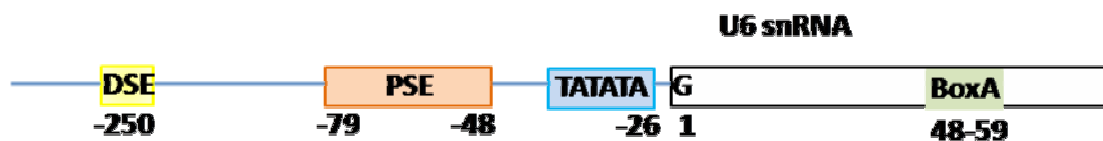
Pol III ทำหน้าที่ในการสร้างอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโปรตีน ได้แก่ tRNA, 5S RNA และ small nuclear RNA (snRNA) บางชนิดซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA splicing สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ Type I promoter ซึ่งจะอยู่ใน ribosomal 5 S gene, Type II promoter สร้าง tRNA และ adenovirus 2 VA I gene และ Type III promoter ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง U6 small nuclear RNA (U6 snRNA) โดยที่โปรโมเตอร์ชนิด Type I และ Type II จะจัดอยู่ในกลุ่ม intragenic control region (ICR) นั่นคือส่วนที่สำคัญต่อการควบคุมการทรานสคริบอยู่ภายใน coding region แต่ type III promoter จะมีลักษณะเป็น external promoter นั่นคือ ส่วนของโปรโมเตอร์จะอยู่ด้านนอกทางปลาย 5' เหมือนโครงสร้างของยีนในกลุ่ม Pol II (Wingender, 1993)

จากคุณสมบัติของโปรโมเตอร์ชนิด Pol III ดังที่ได้กล่าวมาทำให้มีการรายงานการนำเอาโปรโมเตอร์ของ Pol III ไปใช้สำหรับเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์ โดยได้มีการนำเอาโปรโมเตอร์ของ tRNA ไปเชื่อมต่อกับยีนของไรโบไซม์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการนำไปใช้ในการสร้างไรโบไซม์ด้านไวรัสโรคเอดส์ (Kuwabara et al., 1999; Warashina et al., 2001) และนำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีน *neuregulin-1* ในหนู (Zhao and Lemke, 1998) ในปลาเรนโบว์เทรา (Boonanuntanasarn et al., 2005) ต่อมาเมื่อได้มีการรายงานการทดลองถึงประสิทธิภาพในการใช้ siRNA ในเทคโนโลยียีนนิ่งคดาวน์ ทำให้มีการวิจัยพัฒนาโปรโมเตอร์ชนิด Pol III ที่อยู่ในกลุ่ม Type III promoter มาใช้สำหรับยีนนิ่งคดาวน์ ได้แก่ โปรโมเตอร์ของ U6 snRNA นำมาต่อเข้ากับยีน shRNA เพื่อใช้สำหรับการศึกษาหน้าที่ของยีน และการยีนนิ่งคดาวน์ยีนระยะยาว (Sui et al., 2002; Kwak et al., 2003)

U6 snRNA เป็นส่วนประกอบของ nuclear ribonucleoprotein ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ RNA splicing ได้มีการค้นพบ U small nuclear RNA ทั้งหมด 8 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA splicing โดยที่ยีน U small nuclear RNA อื่น ๆ มีการทรานสคริบโดย Pol II แต่ U6 snRNA มีการทรานสคริบโดย Pol III และมีลักษณะที่สำคัญ ๆ ดังต่อไปนี้

- 1) สามารถทดสอบการแสดงออกในหลอดทดลองโดยใช้ cytoplasmic extracts ที่มี Pol III และ transcription factors
- 2) α -amanitin เป็นสารตัวหนึ่งที่สามารถนำมาใช้จำแนกการทำงานของ RNA polymerase ชนิดต่าง ๆ ขึ้นในกลุ่ม Pol III จะถูกยับยั้งการทำงานในสภาวะที่มี α -amanitin สูง แต่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ α -amanitin ในระดับต่ำ
- 3) ยีน U6 snRNA ประกอบด้วยส่วนของ intragenic box A ที่ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่ 48-59 และนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่เป็น termination signal จะประกอบด้วยไธมิดีน (thymidine) 4-5 เบส เรียงต่อกัน

ได้มีรายงานการแยกยีนและการศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA ในคน หนู *Xenopus* (Krol et al., 1987; Das et al., 1988; Kunkel and Pederson, 1988) และ แมลงหวี่ (Das et al., 1987) โดยสามารถสรุปโครงสร้างที่สำคัญที่มีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน U6 snRNA (ภาพที่ 2.6) ซึ่งประกอบด้วย



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของยีน U6 snRNA

ตัวเลขข้างล่างแสดงตำแหน่งที่เทียบกับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นของกลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน U6 snRNA ได้แก่ DSE =

Distal sequence element, PSE = proximal sequence element, TATATA =

TATA box, G = start nucleotide, Box A = intragenic box A

TATA box, G = start nucleotide, Box A = intragenic box A

1. Distal sequence element (DSE)

กลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่จะพบที่ตำแหน่งประมาณ -250 ประกอบด้วยกลุ่มของลำดับเบสที่ทำหน้าที่เป็น enhancer ในการแสดงออกของยีน โดยในยีน U6 snRNA ในคน วัว หนู ไก่ *Xenopus* จะพบกลุ่มของลำดับเบสที่เรียกว่า Octamer motif (ATTTGCAT)

2. Proximal sequence element (PSE)

กลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีการทดลองพบว่ามีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน U6 snRNA จะอยู่ที่บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ -79 ถึง -48 ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ที่ถูกจำแนกว่า

เป็น PSE ใน U6 snRNA ของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกันมาก โดยทั่วไปจึงใช้การเทียบตำแหน่งในการจำแนกกลุ่มเบสของ PSE

3. TATA box

พบบริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ -31 ถึง -24 โดยในบริเวณนี้จะประกอบด้วย นิวคลีโอไทด์ชนิด thymidine และ adenosine จำนวนมาก

4. intragenic box A

กลุ่มของนิวคลีโอไทด์ (RRYNNRRYGG) (Wingender, 1993) ไม่ได้เป็นนิวคลีโอไทด์ที่จำเป็นต่อการทรานสคริปของยีน U6 snRNA

5. start nucleotide

การเริ่มต้นการทรานสคริปชันจะเกิดที่นิวคลีโอไทด์ G ที่อยู่ห่างจาก TATA-rich boxes ประมาณ 24-25 นิวคลีโอไทด์

6. termination nucleotides

ประกอบไปด้วย thymidine ประมาณ 4 -5 นิวคลีโอไทด์

ต่อมาได้มีการศึกษาแยกยีน U6 snRNA และการจำแนกกลุ่มของลำดับเบสที่มีบทบาทสำคัญที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ในไก่ (Kudo and Sutou, 2005; Wise et al., 2007) และในโค (Lambeth et al., 2005; Lambeth et al., 2006) รวมทั้งการนำไปใช้ในการสร้าง shRNA สำหรับเทคนิคยีนนิ่งอีกตัวอย่างหนึ่งที่ตามได้มีการรายงานไว้ว่า โพรโมเตอร์ U6 snRNA ทำงานได้จำเพาะต่อชนิดของสัตว์ (Das et al., 1987) สำหรับการศึกษา ยีน U6 snRNA ในปลา พบว่ามีรายงานการศึกษาในในกลุ่ม small nuclear RNA ในจีโนมของปลาฟูกู *Fugu rubripes* (Mysliniski et al., 2004)

ปลาม้าลาย (*Danio rerio*) จัดอยู่ใน Family Cyprinidae เป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเขตร้อน ขนาดความยาวเมื่อโตเต็มวัยมีขนาด 4-5 เซนติเมตร อาจมีความยาวถึง 6 เซนติเมตร อาจมีอายุยืนถึง 5 ปี สามารถวางไข่ได้เมื่อมีอายุถึง 2-3 เดือน ลำตัวมีลายแถบดำพาดตามยาวของลำตัวไปจนถึงหาง 7 แถบ ปลาเพศผู้จะมีลำตัวยาวเร็วกว่า รูปร่างเล็กกว่า และจะมีแถบสีทองระหว่างแถบดำของลำตัว ส่วนปลาเพศเมียจะมีลำตัวใหญ่กว่า คู่อ้วนกว่า ท้องจะอูมเป่ง จะมีแถบสีเงินระหว่างแถบดำของลำตัว การผสมพันธุ์วางไข่เกิดภายนอกของลำตัว (External fertilization) การผสมพันธุ์วางไข่ครั้งหนึ่งอาจได้ไข่มากถึง 100 ฟอง (อาจมากถึง 300-500 ฟอง) ไข่พัฒนาภายนอกตัวแม่ ไข่ปลามีลักษณะใส สามารถมองเห็นการพัฒนาการของตัวอ่อนได้อย่างชัดเจน จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านการพัฒนาการของตัวอ่อน นิยมใช้เป็นโมเดลศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โดยเฉพาะบทบาทหน้าที่ของยีนที่สำคัญต่อการพัฒนาการ ปลาม้าลายเป็นที่นิยมนำมาเป็นโมเดลศึกษาทางด้านบทบาทหน้าที่ของยีนของมนุษย์ เพราะคาดว่าน่าจะมีจำนวน

ยีนใกล้เคียงกับคน (Postlethwait et al., 2000; Dahm and Geisler, 2006) นอกจากนี้ปลาหมึกยังมีข้อมูลลำดับเบสของจีโนมที่เกือบสมบูรณ์ (<http://Zfin.org>) จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาหมึกอย่างต่อเนื่อง โดยการใช้ antisense RNA, modified oligonucleotides, double stranded RNA, siRNA, ribozymes (Roth et al., 1999; Stenkamp et al., 2000; Nasevicius and Ekker, 2000; Oates et al., 2000; Zhao et al., 2001; Xie et al., 1997; Dodd et al., 2004) อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลการศึกษาการใช้สารแอนไทเซนส์ต่าง ๆ จะมีการรายงานว่าสามารถนำมาใช้ในการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนได้เป็นอย่างดี แต่สารแอนไทเซนส์เหล่านี้ก็มีผลต่อยีนอื่นนอกคาวนในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น การศึกษาการโคลนและการแยกโปรโมเตอร์ ชนิด U6 snRNA สำหรับเทคนิคยีนนอกคาวนจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยียีนนอกคาวนระยะยาวในปลาหมึก เพื่อประโยชน์ในการใช้ปลาหมึกเป็นโมเดลศึกษาวิจัยทางการแพทย์ ด้านชีววิทยา และด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

บทที่ 3

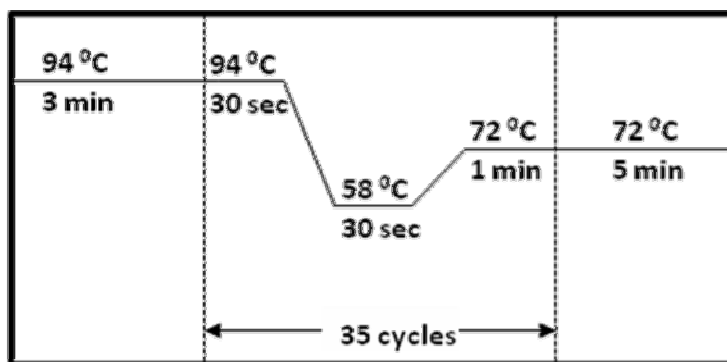
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกยีน U6 snRNA เส้นสมบูรณ์จากจีโนมของปลาหมอไทย โดยใช้ nested PCR โดยใช้ zebrafish genomic library เป็นยีนต้นแบบ

- 1.1 ทำการรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของส่วนของ coding region ยีน U6 snRNA ในสัตว์ที่ได้มีข้อมูลการศึกษาอยู่ใน (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) ได้แก่ human U6 snRNA (X07425), mouse U6 snRNA (X06980), xenopus U6 snRNA (M31678) และ *Drosophila* U6 snRNA (AH004871)
- 1.2 ทำการ alignment เพื่อหาส่วนที่มีความตรงกันของลำดับเบส เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน U6 snRNA (ภาคผนวก)
- 1.3 ทำการแยกยีน U6 snRNA ในส่วนของ 5'-flanking region จากจีโนมของปลาหมอไทยโดยการทำ nested PCR โดยใช้ zebrafish genomic library เป็นเทมเพลต และมีส่วนผสมของ PCR ในปริมาตรทั้งหมด 10 μ l ได้แก่

- each deoxynucleotide 200 μ M
- each primer 1 pmol
- EX Taq Polymerase 0.25 U
- 1X Ex Taq buffer (Takara Shuzo, Shiga, Japan)

สภาวะในการทำ PCR



ไพรเมอร์ (รายละเอียดลำดับเบสแสดงในตารางที่ 1)

- สำหรับ PCR ครั้งที่ 1 λ fix-F และ U6-r1
 สำหรับ PCR ครั้งที่ 2 λ fix-F และ U6-r2

1.4 นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gelpure DNA purification kit (GeneMate, Kaysville, UT, USA) และนำไปโคลนเข้าสู่ pGEM T-Easy plasmid (Promega, Madison, WI, USA) เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR

1.5 ทำการแยกยีน U6 snRNA ในส่วนของ coding region จนถึง termination sequences จากจีโนมของปลาหมอโดยการทำ nested PCR โดยใช้ zebrafish genomic library เป็นเทมเพลต มีส่วนผสมของ PCR และกระบวนการในการทำ PCR เช่นเดียวกับข้อ 1.3

ไพรเมอร์ (รายละเอียดลำดับเบสแสดงในตารางที่ 1)

สำหรับ PCR ครั้งที่ 1 U6-f1 และ λfix-R

สำหรับ PCR ครั้งที่ 2 U6-f2 และ λfix-R

และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR ที่ได้ เช่นเดียวกับรายละเอียดที่แสดงไว้ใน

ข้อ 1.4

2. การวิเคราะห์โครงสร้างของยีน U6 snRNA โดยการเปรียบเทียบกับโครงสร้างทั่วไปของยีน U6 snRNA ที่ได้มีการรายงานไว้ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ

ทำการศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA ที่ได้จากปลาหมอ โดยการศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีความสำคัญต่อยีน U6 snRNA ที่ได้มีการรายงานไว้ ได้แก่

- ส่วนของ proximal sequence element (PSE)
- ส่วนของ TATA box
- ส่วนของ distal sequence element (DSE)
- Initiation nucleotide
- Intragenic box A
- Termination sequences

3. การสร้าง phylogenetic tree ของ coding region ของยีน U6 snRNA ของปลาหมอ และยีน U6 snRNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

เนื่องจากการทดลองนี้พบว่า ในปลาหมอยังมี U6 snRNA 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ U6-1, U6-2 และ U6-3 จึงได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนทั้ง 3 ชนิดกับ U6 snRNA ของคน (X07425), mouse U6 snRNA (X06980), xenopus U6 snRNA (M31678) และ *Drosophila* U6 snRNA (AH004871) โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธีการ Neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987)

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษา

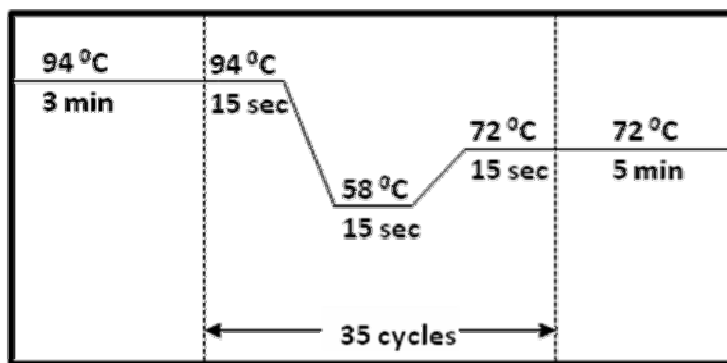
Primer	Sequence
λFix-F	5'-GAGCTCTAATACGACTCACTATAGG-3'
λFix-R	5'-GAGCTCAATTAACCCTCACTAAAG-3'
U6-r1	5'-TATGGAACGCTTCACGAAT-3'
U6-r2	5'-TGCGTGTCATCCTTGCGCAG-3'
U6-r3	5'-TGCGCAGGGGCCATGCT-3'
U6-f1	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACA-3'
U6-f2	5'-TGGAACGATACAGAGAAGAT-3'
cU6-1f	5'-GTGCTCGCTACGGTGGCACA-3'
cU6-2f	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACG-3'
cU6-3f	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACA-3'
cU6-1r	5'-AAAACAGCAATATGGAGCGC-3'
cU6-2r	5'-AAAATGAGGAACGCTTCACG-3'
cU6-3r	5'-AAAAGATGGAACGCTTCACG-3'
pU6-1f	5'-TCCATATTGCTGTTTTAGTGCGTGG-3'
pU6-2f	5'-TGGCTTCAAGTCTCTCAGCG-3'
pU6-3f	5'-TCCGAGAGTCTGTGAATGTT-3'
pU6-1r	5'-TCTAGACTCGAGGGATCCGTGGACAGGCTCAGGGC-3'
pU6-2r	5'-TCTAGACTCGAGGGATCCAGAGCTGGAGGGAGAGC-3'
pU6-3r	5'-TCTAGACTCGAGGGATCCGGAGCCTGGAGGACTGC-3'
slc-plus	5'-GATCCGGGCGACATCGGCGTCAGCTTCAAGAGAGCTGACGCCGA TGTCGCCCTTTTTT-3'
slc-minus	5'-CTAGAAAAAAGGGCGACATCGGCGTCAGCTCTCTTGAAGCTGACG CCGATGTCGCCCCG-3'
pGEM-f	5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'
pGEM-r	5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3'

4. การศึกษาการทำงานของยีน U6 snRNA ว่ายีนใดเป็น real gene หรือ pseudogene โดยวิธี reverse transcription PCR

จากการที่พบ U6 snRNA 3 ชนิดในจีโนมของปลาม้าลาย แต่ยังไม่ทราบว่า U6 snRNA แต่ละชนิดมีการแสดงออกหรือไม่ และมีการแสดงในอวัยวะที่แตกต่างกันหรือไม่ การทดลองนี้จึงทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิด ในอวัยวะต่าง ๆ และทำการตรวจสอบการแสดงออกโดยการทำ reverse transcription PCR ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- 4.1 นำปลาม้าลายที่ขนาดโตเต็มวัยหรืออายุประมาณ 3 เดือนมาเก็บตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ ตา สมอ เหงือก ตับ อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร อวัยวะ หรือ รังไข่
- 4.2 ทำการสกัด total RNA จากอวัยวะตัวอย่าง โดยใช้ TRIZOL Reagent (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิตและทำการขจัดดีเอ็นเอ โดยใช้เอ็นไซม์ DNase I (Promega)
- 4.3 ทำการสังเคราะห์ First-strand cDNA ด้วย First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech Ltd) โดยใช้ไพรเมอร์ hexadeoxynucleotides ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต
- 4.4 ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิดโดยการทำ PCR และใช้ first strand cDNA ของอวัยวะต่าง ๆ จากข้อ 4.3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ มีส่วนผสมของ PCR เช่นเดียวกับข้อ 1.3

สภาวะในการทำ PCR



ไพรเมอร์

- สำหรับ U6-1: cU6-1f และ cU6-1r
 สำหรับ U6-2: cU6-2f และ cU6-2r
 สำหรับ U6-3: cU6-3f และ cU6-3r

- 4.5 วิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้โดยการทำ Electrophoresis ด้วย 15 % nondenaturing polyacrylamide gel ย้อมสีด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide in 1 X TBE buffer และถ่ายภาพภายใต้แสง UV

5. การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน U6 snRNA บนโครโมโซมของปลาม้าลาย และจำนวนชุดของยีน U6 snRNA บนโครโมโซมของปลาม้าลาย

เนื่องจากการรายงานไว้ว่า โครงสร้างขนาดเล็กที่สุดของยีน U6 snRNA ที่สามารถแสดงออกได้ จะประกอบด้วยส่วนของ proximal sequence element (PSE), TATA box, coding sequence จนถึง termination sequence (Das et al. 1988; Goomer and Kunkel, 1992) ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ลำดับเบสของจีโนมของยีน U6 snRNA แต่ละชนิดที่ประกอบด้วยลำดับเบสที่ประกอบด้วย PSE จนถึง termination sequence (-79 ถึง 106 หรือ 112) เป็นอินพุต ในการทำ BLASTn search โดยใช้แหล่งข้อมูลของ zebrafish genome (<http://www.ncbi.nlm.gov/genome>)

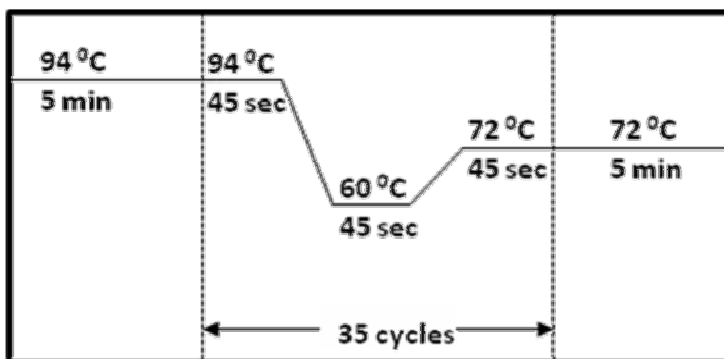
6. การศึกษาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับยีนน็อคดาวน์ โดยการโคลนส่วนของโปรโมเตอร์ เพื่อนำมาสร้าง expression vector โดยนำส่วนของโปรโมเตอร์ต่อกับส่วนของยีนที่สร้าง short hairpin RNA (shRNA) และทำการตรวจการใช้งานของรีคอมบีแนนท์เวกเตอร์ดังกล่าวในหลอดทดลอง โดยใช้สารสกัดของเอนไซม์ RNA polymerase III จากเซลล์ของปลาม้าลาย

6.1 การโคลนส่วนของโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA

6.1.1 ทำการสกัด genomic DNA ของปลาม้าลายจากส่วนของครีบล้างปลา โดยใช้ Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega)

6.1.2 ทำการโคลนส่วนของโปรโมเตอร์ของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 ด้วย nested PCR ซึ่งมีส่วนผสมของ PCR รายละเอียดเช่นเดียวกับข้อ 1.3 และใช้ genomic DNA ที่สกัดได้จากข้อ 6.1.1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

สภาวะในการทำ PCR



ไพรเมอร์

PCR ครั้งที่ 1 สำหรับ U6-1: pU6-1f และ U6-r3

สำหรับ U6-2: pU6-2f และ U6-r3

สำหรับ U6-3: pU6-3f และ U6-r3
 PCR ครั้งที่ 2 สำหรับ U6-1: pU6-1f และ pU6-1r
 สำหรับ U6-2: pU6-2f และ pU6-2r
 สำหรับ U6-3: pU6-3f และ pU6-3r

(ไพรเมอร์ pU6-1r, pU6-2r, pU6-3r ได้มีการออกแบบให้มีส่วนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Xba* I)

- 6.1.3 นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gelpure DNA purification kit (GeneMate) และนำไปโคลนเข้าสู่ pGEM T-Easy plasmid (Promega, Madison, WI, USA) เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR และคัดเลือกโคลนที่มีลำดับเบสถูกต้องมาใช้ในการทดลองต่อไป
- 6.1.4 นำโคลนที่มีลำดับเบสดีเอ็นเอถูกต้องไปตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Xba* I และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gelpure DNA purification kit (GeneMate)

6.2 การสร้าง expression vector และสร้างดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา *in vitro* transcription

ผู้วิจัยมีจุดมุ่งหมายสำหรับงานวิจัยในอนาคต ในการที่จะทำการน็อคดาวน์ลักษณะ golden phenotype ที่เป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีน *slc24a5-1* (GenBank accessions no. AY 538713) ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 385-405 ในการนี้จึงออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (slc-plus และ slc-minus) (ตารางที่ 3.1) สำหรับ short hairpin RNA (shRNA) ที่ตำแหน่งยีนดังกล่าวนี้ และมีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' เพื่อนำมาใช้ในการเชื่อมต่อกับพลาสมิดที่มีส่วนของโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ในข้อ 6.1.4

6.2.1 การทำ *in vitro* hybridization ตามวิธีของ Boonanuntanasarn (2005) โดยปฏิกิริยาการ annealing ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 15 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบ 20 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 15 µg slc-plus, และ 15 µg slc-minus

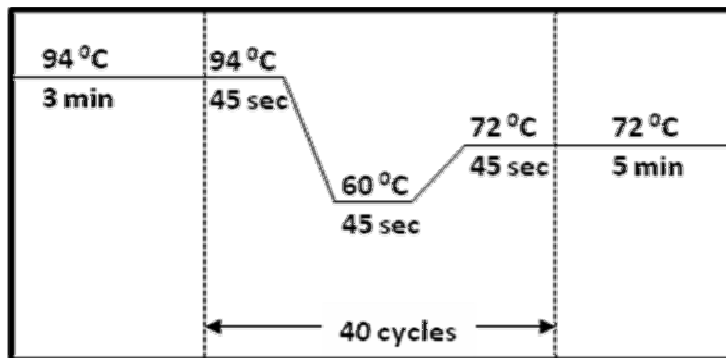
นำส่วนประกอบของปฏิกิริยา annealing ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

6.2.2 นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 6.2.1 มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดในข้อ 6.1.4 และทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับเบส นำข้อมูลวิเคราะห์ลำดับเบสมาใช้ในการเลือกใช้โคลนที่มีลำดับเบสที่ถูกต้อง

6.2.3 การผลิตดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา *in vitro* transcription ทำได้ด้วยการเพิ่มปริมาณยีนต้นแบบด้วยวิธี PCR ซึ่งมีส่วนประกอบของสารผสมดังรายละเอียดเช่นเดียวกับข้อ 1.3

และใช้พลาสติกที่มีส่วนของโปรโมเตอร์จาก U6-1, U6-2 หรือ U6-3 ที่ต่อกับ shRNA (ข้อ 6.2.2) เป็นคิเอ็นเอต้นแบบสำหรับ PCR

สภาวะในการทำ PCR



ไพรเมอร์ pGEM-f และ pGEM-r

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาสกัดให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

6.3 การผลิตสารสกัด RNA polymerase III จากปลาหมึก

การผลิตสารสกัด RNA polymerase III ทำตามวิธีของ Weil et al. (1979) โดยมีการดัดแปลงให้เหมาะสมดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

6.3.1 นำลูกปลาหมึกที่ระยะที่มีการใช้อาหารจากถุงไข่แดงหมด หรือระยะที่เริ่มว่ายน้ำขึ้นมา ทำให้สลบด้วยสารละลาย phenoxyethanol 300 ppm แล้วแช่ตัวอย่างลูกปลาในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง

6.3.2 นำลูกปลาที่สลบแล้วมาตัดเป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง แล้วล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS แช่เย็น 3 ครั้ง แล้วถ่ายเอาสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้งไป

6.3.3 เติมสารละลายเย็น hypotonic buffer (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol) ลงไปในเซลล์ตัวอย่าง ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรลูกปลา เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที แล้วบดด้วย homogenizer 5 ครั้ง

6.3.4 ทำการหยุดปฏิกิริยา hypotonic โดยการเติมสารละลายเย็น hypotonic stop solution (0.3 M HEPES-KOH, pH 7.9, 1.4 M KCl, and 0.03 M MgCl₂) ลงไปในตัวอย่างข้อ 6.3.3 ในปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน

6.3.5 นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 100 000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บสารละลายส่วนบนมาวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Total protein Kit, Micro

Lowry (Sigma, MO, USA) แล้วทำการเจือจางให้ได้ปริมาณโปรตีนความเข้มข้น 5 mg/ml จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

6.4 *in vitro* transcription

การตรวจสอบการใช้โปรโมเตอร์ของ U6 snRNA สำหรับการแสดงออกของ shRNA โดยปฏิกิริยาทรานสคริปชันในหลอดทดลอง ตามวิธีการของ Fan et al. (2005) โดยมีการดัดแปลงให้เหมาะสมดังนี้

6.4.1 เตรียมปฏิกิริยา ในปริมาตรรวม 300 μ l ซึ่งมีส่วนประกอบ 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, สารสกัด RNA polymerase III จากตัวอย่างปลา 900 μ g และ ดีเอ็นเอต้นแบบ(จากข้อ 6.2.3) 1.5 mg ปรับปริมาตรสารละลายรวมทั้งหมดให้ได้ 270 μ l โดยใช้น้ำสะอาดปราศจาก RNase ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดการสร้างโครงสร้าง preinitiation complex formation (PIC)

6.4.2 ทำการเริ่มปฏิกิริยาทรานสคริปชันโดยการเติม 250 μ M rNTP (ATP, UTP, CTP, GTP) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 1.5 ชั่วโมง

6.4.3 ทำการหยุดปฏิกิริยาทรานสคริปชันโดยการเติมสารละลาย stop solution (5% SDS, 100 mM EDTA, 1 M sodium acetate, pH 4.8) ลงไปในปฏิกิริยา ในปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรทั้งหมด

6.4.4 ทำการสกัดเอาดีเอ็นเอต้นแบบออก โดยใช้เอนไซม์ DNase (Promega) หลังจากนั้นทำการแยกสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์ด้วย phenol/Chloroform

6.4.5 ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอทานอล จากนั้นปั่นแยกตะกอน แล้วล้างตะกอนให้สะอาดละลายตะกอนใน loading buffer 5 μ l (95 % formamide, 18 mM EDTA, 0.025 % bromophenol blue, 0.025 % xylene cyanol, 0.025 % SDS)

6.4.6 การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยวิธี northern blot analysis

7. การทดลองศึกษาการใช้รีคอมบีแนนท์เวกเตอร์ในข้อ 6 ต่อการทดสอบการแสดงออกในปลาข้ามชนิด โดยใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III จากเซลล์ของปลาที่มีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจ บางชนิด เช่น ปลาไน ปลาดุก และปลานิล

7.1 ทำการผลิตสารสกัด RNA polymerase III จากปลาดุก (*Clarias gariepinus*) ปลาไน (*Cyprinus carpio*) หรือ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยใช้ลูกปลาที่ระยะการใช้อาหารจากถุงไข่แดงหมด หรือระยะที่เริ่มว่ายน้ำขึ้นมา สลับลูกปลาด้วยสารละลาย phenoxyethanol 300 ppm แล้วแช่ตัวอย่างลูกปลาในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่แช่อยู่ใน

น้ำแข็ง แล้วทำการสกัด RNA polymerase III ทำตามวิธีของ Weil et al. (1979) โดยมีการดัดแปลงให้เหมาะสมดังมีรายละเอียดเช่นเดียวกับข้อ 6.3

7.2 ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ shRNA โดยใช้ vector construct ในข้อ 6.2 ในสารสกัด RNA polymerase III ที่ได้จากปลาฉลาม ปลาไน หรือ ปลานิล โดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 6.4 แล้วทำการวิเคราะห์ผลผลิตอาร์เอ็นเอที่ได้โดยวิธี northern blot analysis

8. การทดลองศึกษาการใช้รีคอมบิแนนท์เวกเตอร์ในข้อ 6 ต่อการทดสอบการแสดงออกในสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III จากกุ้งวัยอ่อนที่ระยะ post larvae 10-15 ทำการสลับกุ้งโดยการแช่กุ้งในสารละลาย PBS ที่แช่ในน้ำแข็ง จนกุ้งสลบ แล้วหั่นตัวอย่างกุ้งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร แล้วสกัดสารตามรายละเอียดเช่นเดียวกับข้อ 6.3 จากนั้นทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ shRNA โดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 6.4 ด้วย vector construct (ข้อ 6.2) แล้วทำการวิเคราะห์ผลผลิตอาร์เอ็นเอที่ได้โดยวิธี northern blot analysis

9. Northern Blot analysis

9.1 เตรียมแผ่นเจล 15 % denaturing polyacrylamide gel ที่มี 8 M urea จากนั้นนำผลผลิต in vitro transcription ที่ได้มาแยกในแผ่นเจลที่เตรียมได้

9.2 ทำการย้อมอาร์เอ็นเอในแผ่นเจลด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide in 1 X TBE buffer แล้ววิเคราะห์ภาพอาร์เอ็นเอที่ได้โดยดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

9.3 นำแผ่นเจลที่มีอาร์เอ็นเอตัวอย่างไปถ่ายโอนอาร์เอ็นเอไปที่แผ่นเมมเบรน Hybond™-N⁺ membrane (Amersham) โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 80 โวลต์ 3 ชั่วโมง

9.4 หลังจากถ่ายโอนอาร์เอ็นเอไปที่แผ่นเมมเบรนแล้ว นำแผ่นเมมเบรนไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

9.5 นำแผ่นเมมเบรนมาไฮบริไดซ์กับ oligonucleotide probe

(5'AAGGGCGACATCGGCGTCAGC-3'Dig) ที่มีเบสคู่สมกับส่วนของแอนไทเซนซ์กับยีนเป้าหมาย โดยทำการไฮบริไดซ์ข้ามคืน ตามวิธีการที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต (Roche, Mannheim, Germany) จากนั้นนำไปวิเคราะห์แถบอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วย anti-digoxigenin-AP antibodies และทำให้เกิดแถบสีด้วย NBT/BCIP ตามวิธีการที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต (Roche)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

โครงสร้างของยีน U6 snRNA ในปลาหมึก

จากการโคลนยีนในบริเวณของโปรโมเตอร์และบางส่วนของ coding region ของยีน U6 snRNA จากจีโนมของปลาหมึก ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ genomic DNA library ของปลาหมึก เป็นยีนต้นแบบ ได้ผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 550 เบสเพอร์ จากนั้นทำการโคลนผลิตขึ้น ดังกล่าวนี้เข้าสู่ pGEM T easy vector แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามียีน U6 snRNA 3 ชนิดที่แตกต่างกัน จึงได้ตั้งชื่อว่า U6-1, U6-2, และ U6-3 และทำการโคลนยีนเส้นสมบูรณ์ของยีนแต่ละยีน ผลของลำดับเบสแสดงในภาพที่ 4.1

บริเวณ coding region

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน U6-1 มีส่วนของ coding sequences เท่ากับ 112 เบส และยีน U6-2 และ U6-3 มีส่วนของ coding sequences เท่ากับ 107 และ 106 เบส ตามลำดับ ซึ่งจากการเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบส พบว่าบริเวณ coding sequences ของยีนทั้ง 3 มีส่วนของลำดับเบสที่มีความตรงกันสูง (ตารางที่ 4.1) พบส่วนที่เรียกว่า intragenic “box A” ซึ่งมีส่วนประกอบของลำดับเบสที่ถูกจำแนกว่ามีความสำคัญในการทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ถูกทรานสคริบโดย RNA polymerase III และเป็นส่วนที่สำคัญต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่มีส่วนของโปรโมเตอร์อยู่ภายใน coding sequences อย่างไรก็ตาม intragenic “box A” ไม่ได้เป็นส่วนที่จำเป็นต่อการทรานสคริบของยีนในกลุ่ม RNA polymerase III ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์อยู่ข้างนอก coding sequences

พบกลุ่มของลำดับเบสที่ทำหน้าที่ในการเป็นสัญญาณให้หยุดทรานสคริบ ในยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ยีน คือ บริเวณที่ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบส thymidine ยาวประมาณ 4-5 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่า บริเวณที่เป็น termination sequences ของยีน U6-1 ประกอบด้วย thymidine 4 หรือ 5 นิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ยีน U6-2 มีบริเวณที่เป็น termination sequences เป็น thymidine 5 นิวคลีโอไทด์ แต่ U6-3 มีบริเวณที่เป็น termination sequences เป็น thymidine 4 นิวคลีโอไทด์

ลำดับเบสของบริเวณ coding sequences ของยีน U6 snRNA ของปลาหมึกทั้ง 3 ชนิด มีความคล้ายคลึงกันสูง (ตารางที่ 4.1) และมีความคล้ายคลึงกันกับ coding sequences ของยีน U6 snRNA ที่ได้จากสัตว์ชนิดอื่น ๆ สูงเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4.2)

		-240		-220
U6-1	GTGTGCTAA	CCAA	TGCACTTCCAAAGCCCTTGC	TTTACTGGGACTTTTGCCATA
U6-2	CCGAGACGC	CCAATCACT	CAAGCCGAGACCAGATAATT	TTGCATATGCTTTACAGTTT
U6-3	AGAACTCAT	CCAATCACA	CTAGCCTAAAACCAGCTTCC	TCTGCATATGCTTTACAGCT
U6-4	GAACTCAT	CCAATCACCTA	AAGAAACGGCCCTGTTTCCTT	CGCATACGCTTACAGCTCCA
	-200	-180		-160
U6-1	GGCTATCTGACACTCTAAT	TTCCCCCTGTCCATAAACTT	GGTGAOCTACTGCAATCAATC	
U6-2	GAAAATPACACGGTAAATCC	CTCACACAAACCTCGGATTT	GAGATCCTTCAGGTTTTATC	
U6-3	CAAAAATACTACGGTAAATCC	TCCACAAAACCTGCTGGTTTC	AAACTTTGAAGGTTTTAAGC	
U6-4	AAACTCTACGGTAAACCTAC	ATAAACCTGCTGGTTTTCAAA	TTTTAAAGAATTTAAGGGTT	
	-140	-120		-100
U6-1	AGTGTGCTTAGCACTGACAG	GGCCAAAGCTCTGTAGTGCA	CGGCATACAAGTGGGAACAT	
U6-2	AGTTTGCAGGTTTATGTTCAC	CATGATATAGGGTCAGACTT	GATCTAAGGGAGCTGAATAA	
U6-3	ATTCGCAGGTTTTCTCTGAA	GAGGTTTACTGTGATGTTTG	AGGTAAATGAGTTGAATAAG	
U6-4	TACAGGTTTACTACTACACA	GTAATTTACTGACACATGTA	AGTGTAAATGAGTTGAATAA	
	-80	PSE	-60	-40
U6-1	GCTCTCCAGGTCCCAACCAC	CTTGGAGGAAACAT	TGCTGGG	ACTCGAGGCGTACATATGCC
U6-2	GTTGGTTTATGTCACTTACCAC	CTTCCAAAACAT	TACCCAGA	AGTCCCTGGTATATATAGCT
U6-3	TAGGTTTATCCACTTACCAC	ATGGCAGAAACAT	TACCCAGA	AGTCCCGGTTATATATAGCA
U6-4	GTAAGTAAGCCATATACCAC	ACATGAACACAT	TACCCAGA	AGTCACTGGTATATATAGCC
	-20	1	20	40
U6-1	CTGAGCCTGACCTGCTGATCT	GTGCTCGCTACGGTGGCACA	TATACTAAAATTTGGATCGAT	
U6-2	CTCCCTCCAGCTCTTGGTTTC	GTGCTTGTCTTCGGCAGCAGC	TATACTAAAATTTGGAACGAT	
U6-3	GTCTTCCAGGCTTCTAGTTTC	GTGCTTGTCTTCGGCAGCACA	TATACTAAAATTTGGAACGAT	
U6-4	GTCTTCCAGACTTCCAGCTTC	GTGCTTGTCTTCGGCAGCACA	TATACTAAAATTTGGAACGAT	
		60	80	100
U6-1	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGAAAGGATGACACG	CAAAATCCGTGAAGCGTTCCA	
U6-2	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGCAAGGATGACACG	CAAAATCCGTGAAGCGTTCCCT	
U6-3	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGCAAGGATGACACG	CAAAATCCGTGAAGCGTTCCA	
U6-4	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGCAAGGATGACACG	CAAAATCCGTGAAGCGTTCCA	
U6-1	TATGTCTGTTTT	112		
U6-2	CA-----TTTTT	107		
U6-3	TC-----TTTT	106		
U6-4	TC-----TTTT	106		

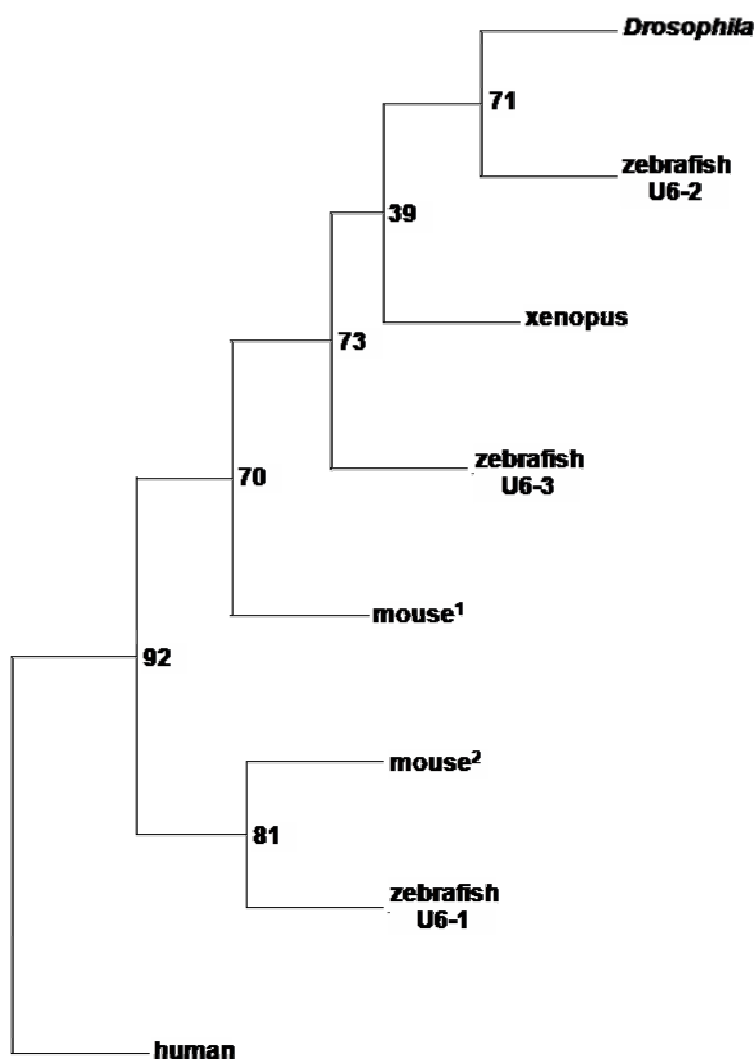
ภาพที่ 4.1 ลำดับเบสของยีน U6 snRNA ของปลาม้าลาย พบยีน U6 snRNA 4 ชนิด (U6-1, U6-2, U6-3 แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ U6-4 พบจาก zebrafish genomic database ในปลาม้าลาย การตั้งชื่อยีนในการศึกษาครั้งนี้เป็นการตั้งชื่อแบบกลุ่ม ลำดับเบสของยีน U6-4 ได้จาก zebrafish genomic database (NW001514080.1) กลุ่มของลำดับเบส CCAAT แสดงด้วยแถบสีเหลี่ยมสีดำ แถบสีเหลี่ยมสีขาว และสีเทาแสดงกลุ่มของลำดับเบส PSE และ TATA box ตามลำดับ นิวคลีโอไทด์เริ่มต้นในการทรานสคริปชัน แสดงด้วยนิวคลีโอไทด์ +1 แถบสีเหลี่ยม เส้นประแสดงส่วนที่ถูกจำแนกเป็น intragenic control region “boxA” ลำดับเบสที่เป็น termination sequences แสดงด้วยตัวหนังสือขีดเส้นใต้

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสของยีน U6 snRNA ในปลาหมอ

ชนิด U6 snRNA	coding region	PSE (-79 ถึง -1)	DSE (-250 ถึง -1)
U6-1 กับ U6-2	85.7 %	48.8 %	50.0 %
U6-1 กับ U6-3	86.6 %	54.2 %	51.7 %
U6-1 กับ U6-4	86.6 %	53.6 %	52.0 %
U6-2 กับ U6-3	96.3 %	81.3 %	73.6 %
U6-2 กับ U6-4	96.3 %	71.3 %	67.3 %
U6-3 กับ U6-4	100.0 %	74.7 %	76.1 %

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสของบริเวณ coding region ของยีน U6 snRNA ในปลาหมอเทียบกับ coding region ของยีน U6 snRNA ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ

Zebrafish	<i>Drosophila</i>	Xenopus	Mouse (X06980)	Mouse (M10329)	Human
U6-1	84.82 %	88.4 %	88.4 %	88.5 %	89.3 %
U6-2	95.3 %	97.2 %	95.3 %	95.4 %	96.3 %
U6-3	94.4 %	98.1 %	98.1 %	96.3 %	97.2 %



ภาพที่ 4.2 แผนภาพ phylogenetic tree สร้างโดยวิธี neighbor-joining (Saito and Nei, 1987) การสร้างแผนภาพใช้ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ coding region ของ U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิด (U6-1, U6-2, U6-3) และข้อมูลลำดับเบสบริเวณ coding region ของ U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ จากข้อมูลใน GenBank ได้แก่ มนุษย์ (X07425) หนู¹ (X06980) หนู² (M10329) *Xenopus* (M31687) *Drosophila* (AH004871)

หมายเหตุ ที่บริเวณ coding region ลำดับเบสของ U6-4 กับ U6-3 ตรงกัน

100 %

ผลจากการสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ coding sequences ของยีน U6 snRNA ของปลา ม้าลาย และจากสัตว์ชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ แสดงดังภาพที่ 4.2 ซึ่งจะเห็นได้ว่า U6-1 ของ ปลา ม้าลาย จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ U6 snRNA ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมนมากกว่า U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ U6-2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ U6 snRNA ของแมลงหวิ่มากกว่า U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ และ U6-3 จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ U6 snRNA ของกบ *Xenopus* มากกว่า

บริเวณโปรโมเตอร์

โปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิด มีลำดับเบสที่แตกต่างกันอย่างมาก (ภาพที่ 4.1) ใน การศึกษาครั้งนี้ ได้วิเคราะห์โครงสร้างของส่วนของโปรโมเตอร์เพื่อจำแนกองค์ประกอบของลำดับ เบสที่สำคัญต่อการแสดงออกของยีน U6 snRNA ในบริเวณของโปรโมเตอร์ 3 องค์ประกอบด้วยกัน ได้แก่

- Distal sequence element (DSE)
- proximal sequence element (PSE)
- TATA box

โดยองค์ประกอบของลำดับเบสที่ได้ถูกจำแนกเป็นส่วนหนึ่งของ DSE จะพบอยู่ในบริเวณโปร โมเตอร์ของ U6 snRNA ที่ตำแหน่งประมาณ -250 ถึง -240 ซึ่งจะมีส่วนประกอบของลำดับเบสที่มี บทบาทต่อการเร่งการแสดงออกของยีน (Wingender, 1993; Das et al., 1988) สำหรับยีน U6 snRNA ในปลา ม้าลาย พบว่าที่บริเวณโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ในตำแหน่งที่คาดว่าจะพบ DSE นั้น จะมีลำดับเบสของ “CCAAT” โดยใน U6-1 จะมี CCAAT ที่ตำแหน่ง -244 ถึง -240 และพบ CCAAT boxes ในโปรโมเตอร์ของ U6-2 และ U6-3 ที่ตำแหน่ง -249 ถึง -245 (ภาพที่ 4.1)

องค์ประกอบของลำดับเบสที่มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม U6 snRNA คือ PSE ซึ่งได้มีการศึกษาว่าเป็นส่วนที่มีความจำเป็นต่อการทรานสคริป U6 snRNA เนื่องจากลำดับเบส ของ PSE จะแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกัน ในการจำแนก PSE จึงใช้ตำแหน่งระยะห่างจาก ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น ที่ได้มีการรายงานในยีน U6 snRNA ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ คือประมาณ - 79 ถึง -48 นิวคลีโอไทด์เป็นการจำแนกองค์ประกอบของลำดับเบสของ PSE (ภาพที่ 4.1) พบว่า บริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณ PSE ของยีน U6 snRNA ของปลา ม้าลายทั้ง 3 ชนิด มีนิวคลีโอไทด์ แตกต่าง ๆ กัน อย่างไรก็ตามพบความตรงกันของลำดับเบสในบริเวณ PSE อยู่ 2 บริเวณคือ ACCAC (บริเวณ -65 ถึง -61) และ AACAT (บริเวณ -52 ถึง -48)

บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่จัดเป็น TATA box ของยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิด จะอยู่ที่บริเวณ เดียวกันคือ ที่ตำแหน่ง -31 ถึง -24 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเบสไทมีดีน (thymidine; T) และอะดีโนซีน

(adenosine; A) มาก ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่าง TATA box กับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นของ U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความคล้ายคลึงกัน

ยีน U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมอ

ในการศึกษาดำเนินการของยีน U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมอ ผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลของลำดับเบสที่ประกอบด้วย PSE, coding region จนถึง termination sequence เป็น input ในการวิเคราะห์ Blastn โดยใช้ฐานข้อมูลของจีโนมปลาหมอ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) ผลการศึกษาพบว่า ยีน U6-1 มีการเรียงตัวในจีโนมของปลาหมอมากถึง 555 ชุด โดยมีการเรียงตัวซ้ำกันแบบหัวต่อหาง ในตำแหน่งต่างๆ ของโครโมโซมต่าง ๆ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.3 ในขณะที่ยีน U6-2 และ U6-3 พบว่ามีอยู่ 1 ชุดในจีโนมของปลาหมอ

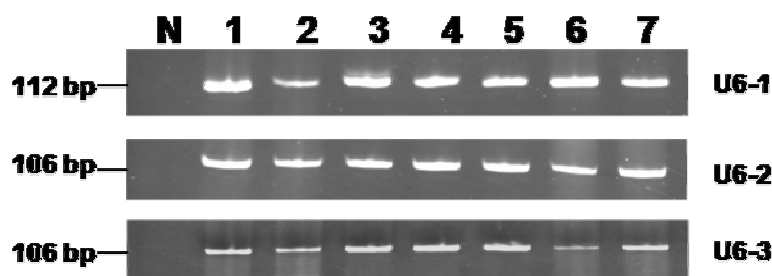
นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ Blastn โดยใช้ฐานข้อมูลของจีโนมปลาหมอ พบยีน U6 snRNA อีก 1 ชนิด จึงได้ตั้งชื่อเป็น U6-4 ดังนั้นจึงได้นำข้อมูลลำดับเบสของยีน U6-4 จากในฐานข้อมูลมาใช้ในการศึกษารั้งนี้ พบว่า ยีน U6-4 มีลำดับเบสที่ coding region ตรงกันกับ coding region ของ U6-3 ทั้งหมด นอกจากนี้ในบริเวณโปรโมเตอร์ของ U6-4 จะมีลำดับเบสที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการแสดงออกของยีนที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ได้แก่ DSE, PSE และ TATA-rich boxes (ภาพที่ 4.1) ดังนั้นผลการศึกษารั้งนี้จึงชี้ให้เห็นว่าปลาหมอมียีน U6 snRNA อยู่ 4 ชนิดในจีโนม

จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าปลาหมอมียีน U6 snRNA อยู่ 4 ชนิดที่แตกต่างกัน แต่ยังไม่สามารถทราบได้ว่ายีนชนิดใดมีการแสดงออก และชนิดใดบ้างที่ไม่มีการแสดงออก การศึกษารั้งนี้จึงใช้วิธี reverse transcription PCR โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ที่ให้ความจำเพาะต่อบริเวณ coding region ของยีน U6 snRNA ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด การศึกษารั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างอวัยวะต่าง ๆ ของปลาหมอ ได้แก่ สมอง ตา เหงือก ตับ ระบบย่อยอาหาร ไข่ และ อวัยวะ ภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่ายีน U6-1 และ U6-2 snRNA มีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษา และ ยีน U6-3 และ/หรือ U6-4 มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา

ตารางที่ 4.3 ตำแหน่งและจำนวนของ U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมอไทย

U6 Locus	Chromosome	Number of loci	Number of copies	strand
U6-1	1	1	2	Minus
	3	2	56	Plus
	4	2	121	Plus and
	5	2	60	Minus
	12	1	6	Plus and
	14	11	260	Minus
	18	1	3	Minus
	20	1	1	Plus and
	23	1	15	Minus
	Not placed	3	31	Plus and
				Minus
				Plus
				Plus
				Plus and
				Minus
U6-2	21	1	1	Minus
U6-3	11	1	1	Plus
U6-4	9	1	1	Minus

หมายเหตุ จำนวนชุดที่นับนั้นนับจากยีน U6 snRNA ที่มีส่วนของลำดับเบสของ PSE จนถึง termination sequences ที่สมบูรณ์เท่านั้น



ภาพที่ 4.3 ผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 ของอวัยวะต่าง ๆ

cDNAs สกัดจากอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ตับ (1), รั้งไข่ (2), ตา (3), สมอ (4), เหงือก (5), ระบบทางเดินอาหาร (6) และ อัณฑะ (7) N คือ negative control ใช้ น้ำกลั่นแทน cDNA

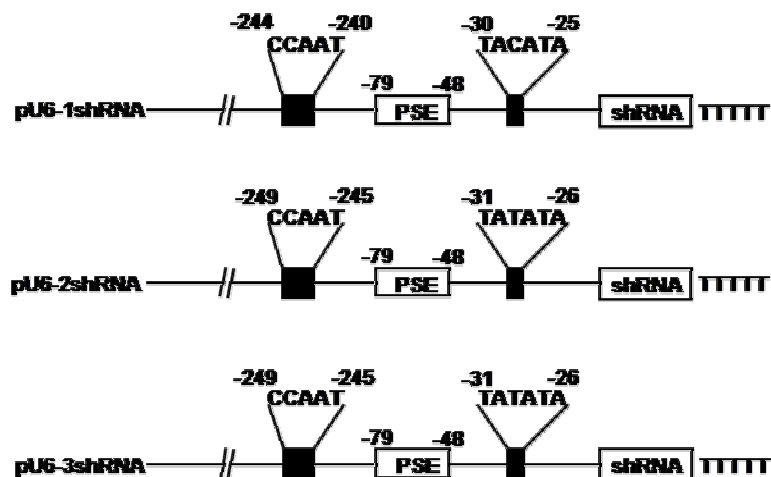
การประยุกต์ใช้โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA เพื่อการแสดงออก short hairpin RNA (shRNA)

วัตถุประสงค์หนึ่งที่สำคัญของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือเพื่อนำเอาโปรโมเตอร์ของปลาหมึกลายที่แยกได้ไปประยุกต์ใช้สำหรับเทคนิคยีนนิ่งควาน ผู้วิจัยจึงได้ทำการตัดต่อยีนโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ชนิดที่แยกได้ คือ โปรโมเตอร์ของ U6-1, U6-2 และ U6-3 เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะผลิตเป็น shRNA ภาพที่ 4.4 แสดงโครงสร้างของยีนที่ตัดต่อดังกล่าวเพื่อใช้เป็นยีนต้นแบบในการวิเคราะห์การทรานสคริปของ shRNA ด้วยเอนไซม์ RNA polymerase III ที่สกัดได้จากปลาหมึกลาย โดยวิธี *in vitro* transcription และวิเคราะห์ผลผลิต transcription โดยใช้ northern blot analysis ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่า โปรโมเตอร์จากยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิดของปลาหมึกลายสามารถผลิต shRNA ได้ และจะเห็นได้ว่า ผลผลิต transcription ของทุกโปรโมเตอร์จะมีแถบอาร์เอ็นเอ 2 แถบ ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า ผลผลิตทรานสคริปชันนี้ประกอบด้วย terminal sequences ที่มี thymidine 4 นิวคลีโอไทด์ หรือ 5 นิวคลีโอไทด์

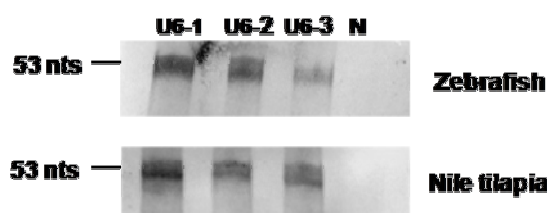
นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของโปรโมเตอร์ของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 กับการแสดงออกในปลาชนิดอื่น ๆ โดยการใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III ที่ได้จากปลาฉลาม ปลาไน และปลานิล พบว่าโปรโมเตอร์ของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 ของปลาหมึกลายสามารถทำงานได้เมื่อใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III ที่ได้จากปลานิล (ภาพที่ 4.5) แต่ไม่สามารถแสดงออกได้เมื่อใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III ที่ได้จากปลาฉลาม และปลาไน (ไม่ได้แสดงผล)

การศึกษาค้นคว้านี้ยังขยายขอบเขตในการทดสอบการประยุกต์ใช้โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิดของปลาหมึกลายในสัตว์น้ำเศรษฐกิจอื่น เช่น การใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA

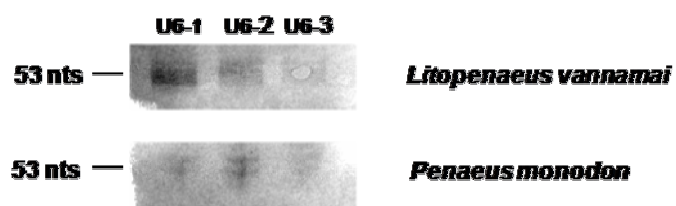
polymerase III จากกึ่งกลางดำ และกึ่งขาว พบว่ามีการทรานสคริปชันในปฏิกิริยาที่ใช้โปรโมเตอร์ U6-1 และ U6-2 อย่างไรก็ตามผลการทรานสคริปชันเกิดน้อยมาก



ภาพที่ 4.4 แผนภาพแสดงการตัดต่อยีนโปรโมเตอร์ของ U6-1, U6-2 และ U6-3 ต่อกับ shRNA ลำดับเบสของ PSE ดูได้ที่ ภาพที่ 4.1 และ ลำดับเบสของ shRNA ประกอบด้วย ส่วนของsense shRNA, 9-mer loop, shRNA antisense



ภาพที่ 4.5 ผลของการวิเคราะห์การทำ *in vitro* transcription ด้วย northern blot analysis ในปลาหมอและปลานิล U6-1, U6-2 และ U6-3 คือ เทมเพลตสำหรับ *in vitro* transcription ได้จากการตัดต่อยีนแล้วได้โครงสร้าง pU6-1shRNA, pU6-2shRNA และ pU6-3shRNA ตามลำดับ ดังแสดงแผนภาพในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.6 ผลของการวิเคราะห์การทำ *in vitro* transcription ด้วย northern blot analysis ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamai*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) U6-1, U6-2 และ U6-3 คือ เทมเพลตสำหรับ *in vitro* transcription ได้จากการตัดต่อยีน แล้วได้โครงสร้าง pU6-1shRNA, pU6-2shRNA และ pU6-3shRNA ตามลำดับ แสดง แผนภาพในภาพที่ 4.4

บทที่ 5

วิจารณ์ผล และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการแยกยีน U6 snRNA จากจีโนมของปลาม้าลายได้ 3 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยมีความแตกต่างกันที่ลำดับเบสทั้งที่บริเวณโปรโมเตอร์และบริเวณ coding region และได้ตั้งชื่อโดยการสุ่ม ดังนี้ U6-1, U6-2 และ U6-3 เนื่องจากยีน U6 snRNA ทั้งสามมีความแตกต่างกันของลำดับเบสอย่างมาก การจำแนกกลุ่มของลำดับเบส ที่เป็นกลุ่มของลำดับเบสที่มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน U6 snRNA ได้แก่ Distal sequence element (DSE), proximal sequenc element (PSE) และ TATA-rich boxes ที่ได้มีรายงานการศึกษา (Krol et al., 1987; Das et al., 1988; Kunkel and Pederson, 1988) จึงใช้การเทียบตำแหน่งกับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น

กลุ่มลำดับเบส DSE เป็นกลุ่มลำดับเบสที่จะพบอยู่ประมาณบริเวณ 258 ถึง 210 นิวคลีโอไทด์ก่อนถึงนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (Wingender, 1993) ทำหน้าที่เป็น enhancer หรือมีบทบาทในการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน U6 snRNA (Das et al., 1988) ในการศึกษาครั้งนี้พบกลุ่มลำดับเบส CCAAT ที่บริเวณตำแหน่ง -249 ถึง -240 เนื่องจากได้มีรายงานการศึกษาว่ากลุ่มเบส CCAAT box ทำหน้าที่เป็น enhancer ในยีนอื่น ๆ (Ach and Weiner, 1991; Park and Levine, 2000; Boularand et al., 1995; Eklund and Skalnik, 1995) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสรุปว่า CCAAT น่าจะมีบทบาทในการทำหน้าเป็น DSE ในยีน U6 snRNA ของปลาม้าลาย ผลการศึกษครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของยีน U6 snRNA ในคน หนู ไก่ และวัว ที่ได้รายงานว่าการกลุ่มเบสที่ทำหน้าที่เป็น DSE ในยีน U6 snRNA จะมีลำดับเบสเป็น ATTTGCAT หรือเรียกว่า octamer motif (Krol et al., 1987; Das et al., 1988; Kunkel and Pederson, 1988; Kudo and Sutou, 2005; Lambeth et al., 2005) ในขณะที่ในยีน U6 snRNA ของแมลงหวี่ไม่พบกลุ่มเบส octamer motif และไม่ได้มีรายงานการจำแนกว่ากลุ่มเบสใดทำหน้าที่เป็น DSE ในยีน U6 snRNA ของแมลงหวี่ (Das et al., 1987)

เนื่องจากลำดับเบสที่ได้มีการจำแนกว่าเป็น PSE ใน คน (Domitrovich and Kunkel, 2003), หนู (Oshima et al., 1981), วัว (Lambeth et al., 2005), *Xenopus* (Krol et al., 1987), และ แมลงหวี่ (Das et al., 1987) จะมีความตรงกันน้อย (ภาพที่ 5.1) ในการศึกษาครั้งนี้ จึงจำแนกกลุ่มของเบสที่ทำหน้าที่เป็น PSE โดยใช้การเทียบตำแหน่งของ PSE กับยีน U6 snRNA ทั้งหลายที่ได้มีการศึกษาเอาไว้ จะเห็นได้ว่า PSE ในยีน U6 snRNA ในสัตว์ชนิดเดียวกันจะมีความตรงกันของเบสบางตำแหน่ง (ภาพที่ 5.1) และ PSE ของยีน U6 snRNA ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีความคล้ายคลึงกันสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ PSE ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ (ภาพที่ 5.1)

Vertebrate consensus ¹			G _T T _C ACCGT _{TC} AG _{TC} (GT) RAAR ₍₀₋₃₎ TG	
Human²	U6-1	-66	C T T A C C G T A A C T T G A A A G T A	-47
	U6-2	-66	G T T A T C C T A A C C A A A A G A G T	-47
	U6-7	-66	G T T A C C G T A A G G A A A A C A A A T G	-45
	U6-8	-68	G T C A C C G T A A G T A G A A T A G G T G	-45
	U6-9	-66	G T C G G C C T A T G T G T A C A G A C	-47
Mouse³	U6	-72	A G G A A A C T C A C C C T A A C T G T A A G T	-49
Bovine⁴	U6	-67	G T C A C C A T A A C T G T T A A A G A G A T G	-44
Xenopus⁵	U6	-72	C T G T C A C T C T C C T A A G T T A C A G G	-49
Zebrafish	U6-1	-79	G C T T C C A G G T C C C A A C A C C T T G G A G G A A C A T	-48
	U6-2	-79	T G G T T A G T C A C T C A A C A C C T C C C A A A A A C A T	-48
	U6-3	-79	A G G T T A T C C A C T T A A C A C A T G G C A G A A A C A T	-48
	U6-4	-79	T A A C T A A G C C A T A T A A C A C A C A T G A A C A C A T	-48
Drosophila⁶	U6-1	-71	A T C C T T A T G A T T C C T A A G T A C A T A T T C T G	-43
	U6-2	-71	A T T C T T A T A A T T C T C A A C T G T C T C T T T C C	-43
	U6-3	-71	A C T T T T T A T A A T T C T C A A C T T C T T T T T C C	-43

ภาพที่ 5.1 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสเฉพาะส่วนของ PSE

ลำดับเบสของ PSE ในสัตว์ชนิดเดียวกันมีความตรงกันของลำดับเบสบางตำแหน่ง PSE ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีความคล้ายคลึงกันสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ PSE ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ

หมายเหตุ ¹Dahlberg and Lund (1988)

²Domitrovich and Kunkel (2003)

³Ohshima et al. (1981)

⁴Lambeth et al. (2005)

⁵Krol et al. (1987)

⁶Das et al. (1987)

ลำดับเบสที่สำคัญอีกอันหนึ่งที่พบในยีน U6 snRNA คือกลุ่มของลำดับเบสที่ไรมิดิน และอะดีโนซีนมาก หรือที่เรียกว่า TATA box จะพบ TATA box ในยีน U6 snRNA ทุกชนิดของปลา มีลาย และพบบริเวณตำแหน่ง (-30 ถึง -24) ซึ่งตำแหน่งของ TATA box จะสอดคล้องกับตำแหน่ง

ของ TATA box ของยีน U6 snRNA ที่พบในคน (Domitrovich and Kunkel, 2003), หนู (Oshima et al., 1981), วัว (Lambeth et al., 2005), ไก่ (Kudo and Sutou, 2005), *Xenopus* (Krol et al., 1987), และ แมลงหวี่ (Das et al., 1987) แต่นิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่าง TATA box กับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นมีความแตกต่างกันสูง จะเห็นได้ว่านิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่าง TATA box กับ นิวคลีโอไทด์เริ่มต้นของยีน U6 snRNA จะมีความแตกต่างกันสูงใน U6 snRNA ที่ต่างกัน หรือใน U6 snRNA ของสัตว์ต่างชนิดกัน แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ไม่มีความสำคัญ แต่ตำแหน่งหรือระยะห่างของบริเวณระหว่าง TATA box กับ นิวคลีโอไทด์เริ่มต้นมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน U6 snRNA ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในการโคลนเพื่อเป็นโปรโมเตอร์สำหรับ shRNA เพราะสามารถเปลี่ยนลำดับเบสบริเวณระหว่าง TATA box กับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นเป็นลำดับเบสของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ต้องการเพื่อการตัดต่อยีนได้

จากการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน U6 snRNA ในจีโนมของปลาม้าลาย จึงทำให้พบยีน U6 snRNA อีกชนิดหนึ่ง จึงตั้งชื่อว่าเป็น U6-4 ซึ่งมีลำดับเบสในส่วนของ coding region ตรงกัน 100 % กับ coding region ของยีน U6-3 แต่มีลำดับเบสที่บริเวณโปรโมเตอร์ต่างกัน จึงสรุปได้ว่าปลาม้าลายมียีน U6 snRNA ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด และเมื่อทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนในโครโมโซมต่าง ๆ ในจีโนมของปลาม้าลายพบว่า ยีน U6-1 มีการเรียงตัวมากถึง 555 ชุดในจีโนมของปลาม้าลาย ซึ่งจะอยู่ตามโครโมโซมต่าง ๆ จึงสามารถจัดยีน U6-1 ให้อยู่ในยีนชนิด multigene family ในรายงานการศึกษาอื่น ๆ (Hayashi, 1981; Domitrovich and Kunkel, 2003) ที่เกี่ยวข้องกับ U6 snRNA ก็มีการพบว่ายีน U6 snRNA เป็น multigene family และมีการเรียงตัวอยู่ในโครโมโซมต่าง ๆ ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าปลาม้าลายมียีน U6 snRNA แตกต่างกัน 4 ชนิด และมีอยู่ 1 ชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่มของ multigene family อีก 3 ชนิดเป็นยีนที่พบอยู่เพียงชุดเดียวในจีโนมของปลาม้าลาย

จากการที่พบว่าปลาม้าลายมียีน U6 snRNA ที่แตกต่างกันอยู่ 4 ชนิด จึงเป็นที่น่าสนใจว่ายีนทั้ง 4 ชนิดมีการแสดงออกหรือไม่ และมีการแสดงออกในอวัยวะใดบ้าง การศึกษาครั้งนี้จึงใช้วิธี reverse transcription PCR โดยทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน U6 snRNA ในอวัยวะต่าง ๆ เช่น สมอง ตา หัวใจ ตับ ระบบทางเดินอาหาร รังไข่ และ อัณฑะ ของปลาม้าลาย เนื่องจากองค์ประกอบของลำดับเบสของยีน U6-4 และ ยีน U6-3 มีความตรงกันทั้งหมด จึงไม่สามารถทราบได้ว่ายีนทั้ง 2 ชนิดแสดงออกได้หรือไม่ หรือเป็นการแสดงออกของยีนเพียงชนิดเดียว การศึกษาครั้งนี้พบว่า ยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิดมีการแสดงออกในปลาม้าลาย และพบการแสดงออกในทุกอวัยวะที่ทำการวิเคราะห์จึงอาจสรุปได้ว่ายีน U6 snRNA จัดอยู่ในประเภท house keeping gene

การศึกษานี้ได้ตรวจสอบการทำงานของโปรโมเตอร์ยีน U6 snRNA ในการทรานสคริป shRNA โดยการตัดต่อโปรโมเตอร์ของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 กับดีเอ็นเอที่สร้าง shRNA และทำการตรวจการทรานสคริปของโปรโมเตอร์ในหลอดทดลองโดยใช้สารสกัดของ RNA polymerase III

ที่ได้จากตัวอ่อนปลาหมึก พบว่าโปรโมเตอร์ทั้ง 3 ชนิดสามารถผลิต shRNA ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับข้อสรุปที่ได้กล่าวมาแล้วว่าขึ้นทั้ง 3 ชนิดทำหน้าที่เป็นยีนที่แท้จริงหรือมีการแสดงออก ในปลาหมึก จึงสรุปได้ว่าโปรโมเตอร์ที่ได้การศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการ เทคโนโลยียีนรีคอมบิแนนท์แบบระยะยาวในปลาหมึกต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาน้ำที่ ของยีน หรือการศึกษาทางด้านชีววิทยาด้านต่าง ๆ ที่ใช้ปลาหมึกเป็นสัตว์ทดลอง

ได้มีการรายงานผลการทดลองการทรานสคริปของโปรโมเตอร์ U6 snRNA ในสิ่งมีชีวิตต่าง ชนิดกัน ได้ผลที่แตกต่างกัน เช่น โปรโมเตอร์ U6 snRNA ที่ได้จากแมลงหวี่ ไม่สามารถทรานสคริป U6 snRNA ได้ในสารสกัด RNA polymerase III ที่ได้จากเซลล์ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม แต่ สามารถทรานสคริป U6 snRNA ได้ในสารสกัดเอ็นไซม์ที่ได้จากแมลงหวี่เท่านั้น (Das et al., 1987) ผลการทดลองนี้แตกต่างจากผลการทดลองที่ใช้โปรโมเตอร์ U6 snRNA ของหนู สามารถแสดงออก ได้ในตัวอ่อนของ *Xenopus* และการที่โปรโมเตอร์ U6 snRNA ของคนสามารถนำไปทดสอบการ แสดงออกของ shRNA ได้ในเซลล์ของไก่ (Kudo and Sutou, 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ การทดลอง การทรานสคริปของโปรโมเตอร์ U6-1, U6-2 และ U6-3 โดยใช้สารสกัด RNA polymerase III จาก ปลาไน ปลาดุก และปลานิล ผลจากการทำ northern blot analysis พบว่า โปรโมเตอร์ของ U6-1, U6-2 และ U6-3 ของปลาหมึก สามารถแสดงออกได้ในปลานิล แต่ไม่สามารถแสดงออกได้ในปลาไน และปลาดุก นอกจากนี้ยังพบว่าโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ของปลาหมึกสามารถทำงานได้สาร สกัด RNA polymerase III ที่ได้จากกิ้งก่าเลแม้ว่าจะได้ผลไม่ชัดเจนนักก็ตาม ผลการศึกษานี้เมื่อ เปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ได้มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ สามารถอภิปรายได้ว่า การที่โปรโมเตอร์ U6 snRNA จะสามารถทำงานได้ในสิ่งมีชีวิตข้ามชนิดกันได้หรือไม่ นั้น น่าจะเกิดเนื่องจากความ คล้ายคลึงกันของลำดับเบสในส่วนที่สำคัญของโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA โดยเฉพาะกลุ่มเบส DSE ที่เป็น octamer motif ที่พบในโปรโมเตอร์ U6 snRNA ของไก่ หนู คน และ *Xenopus* แต่ไม่ พบในโปรโมเตอร์ U6 snRNA ของแมลงหวี่ อย่างไรก็ตามจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาต่อไปเพื่อหา คำอธิบายการทำงานของโปรโมเตอร์ U6 snRNA ในปลาข้ามชนิดกันโดยการเปรียบเทียบลำดับนิ วคลีโอไทด์ในกลุ่มเบสที่มีบทบาทที่สำคัญในโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ในปลาชนิดต่าง ๆ ต่อไป

สรุปผลการศึกษา

1. ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถทำการแยกยีน U6 snRNA จาก genomic DNA library ของปลาม้าลายได้ 3 ชนิดที่แตกต่างกัน และได้ตั้งชื่อยีน U6 snRNA ที่ได้ในครั้งนี้ว่า U6-1, U6-2 และ U6-3 โดยยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันของลำดับเบสในส่วนของโปรโมเตอร์สูง จึงได้มีการจำแนกกลุ่มเบสที่มีบทบาทสำคัญในส่วนของโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ของปลาม้าลายโดยใช้วิธีการเทียบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์จากจุดเริ่มต้น ได้แก่ กลุ่มนิวคลีโอไทด์ Distal sequence element (DSE), Proximal sequence element (PSE) และ TATA box
2. แม้ว่ายีน U6 snRNA จะมีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณโปรโมเตอร์สูง แต่มีคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริเวณ coding region มาก
3. บริเวณ coding region ของยีน U6 snRNA ทั้ง 3 มีความคล้ายคลึงกันกับบริเวณ coding region ของยีน U6 snRNA ที่ได้จากสัตว์ชนิดอื่น ๆ สูงเช่นเดียวกัน
4. ผลจากการสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ลำดับเบสบริเวณ coding region ของยีน U6 snRNA ในการศึกษาครั้งนี้กับ U6 snRNA ในคน หนู Xenopus แมลงหวี่ พบว่า U6-1 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ U6 snRNA ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากกว่า U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ U6-2 มีสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ U6 snRNA ของแมลงหวี่มากกว่าสัตว์ชนิดอื่น ๆ และ U6-3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ U6 snRNA ของ Xenopus มากกว่า
5. การวิเคราะห์ Genome Blastn โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of PSE และ coding region พบว่า ยีน U6-1 มีการเรียงตัวกันแบบซ้ำกัน และมีมากถึง 555 ชุด อยู่ตามโครโมโซมต่าง ๆ ในขณะที่ U6-2 และ U6-3 พบอยู่ในจีโนมของปลาม้าลายเพียงอย่างละ 1 ชุด จึงสามารถจัดยีน U6-1 เป็นยีนจำพวก multigene family
6. ผลจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน U6 snRNA ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ สมอง ตา ตับ อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร เหงือก ไข่ และ อัณฑะ โดยวิธี Reverse transcription PCR พบว่า ยีน U6 snRNA สามารถแสดงในทุกอวัยวะที่ทำการทดสอบ แสดงว่า U6 snRNA จัดเป็นยีนในกลุ่ม house keeping gene

7. โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA สามารถนำมาใช้ในการแสดงออก short hairpin RNA ได้ใน สารสกัด RNA polymerase III ที่ได้จากตัวอ่อนปลาม้าลาย แสดงให้เห็นว่า โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเทคนิคอื่นนอก คาวนระยะยาว หรือเพื่อการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมของปลาม้าลายเพื่อการศึกษาการทำงานของ ยีนในปลาม้าลายต่อไปได้
8. โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ที่ได้จากปลาม้าลายน่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการ ปรับเปลี่ยนพันธุกรรมของปลานิลซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้
9. การวิเคราะห์ Genome Blastn โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of PSE และ coding region ทำให้พบยีน U6 snRNA อีก 1 ชนิดในจีโนมของปลาม้าลาย (U6-4) จึงสามารถสรุปได้ ว่าในจีโนมของปลาม้าลายมียีน U6 snRNA ทั้งหมด 4 ชนิดที่แตกต่างกัน

บรรณานุกรม

- Ach RA and Weiner AM. 1991. Cooperation between CCAAT and octamer motifs in the distal sequence element of the rat U3 small nucleolar RNA promoter. *Nucleic Acids Res.* 19:4209-4218
- Adelman JP, Bond CT, Douglass J and Herbert E. 1987. Two mammalian genes transcribed from opposite strands of the same DNA locus. *Science.* 235:1514-7
- Barabino SML, Spada F, Cotelli F and Boncinelli E. 1997. Inactivation of zebrafish homologue of *Chx10* by antisense oligonucleotides causes eye malformations similar to the ocular retardation phenotype. *Mech. Dev.* 63:133-143
- Bertrand E, Castanotto D, Zhou C, Carbonnelle C, Lee NS, Good P, Chatterjee S, Grange T, Pictet R, Kohn D, Engelke D and Rossi JJ. 1997. The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA* 3:75-88
- Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Morita T, and Takeuchi T. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Mar. Biotechnol.* 4: 256-266
- Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G and Takeuchi T. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem.Biophys. Res. Com.* 310: 1089-1095
- Boonanuntanasarn S, Takeuchi T and Yoshizaki G. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336:438-443
- Boularand S, Darmon MC, Ravassard P and Mallet J. 1995. Characterization of the human tryptophan hydroxylase gene promoter. Transcriptional regulation by cAMP requires a new motif distinct from the cAMP-responsive element. *J. Biol. Chem.* 270:3757-64
- Braat Ak, Water S, Korving J, and Zivkovic D. 2001. A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germ line. *Genesis* 30:183-185
- Brown DA, Kang S-H, Gryaznov SM, DeDionisio L, Heidenreich O, Sullivan S, Xu X, and Nerenberg MI. 1994. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J. Biol. Chem.* 269:26801-26805
- Bryson-Richardson RJ, Berger S, Schilling TF, Hall TE, Cole NJ, Gigson AJ, Sharpe J and Currie PD. 2007. FishNet: an online of zebrafish anatomy. *BMC Biol.* 5:34

- Candal E, Thermes V, Joly J-S, and Bourrat F. 2004. Medaka as a model system for the characterization of cell cycle regulators: a functional analysis of *Ol-Gadd45* during early embryogenesis. *Mech. Dev.* 121:945-958
- Caplen NJ, Fleenor J, Fire A and Morgan RA. 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 252:95-105
- Carbon P and Krol A. 1991. Transcription of the *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA^{(Ser)Sec} gene: a system that combines an internal B box and upstream elements also found in U6 snRNA genes. *EMBO J.* 10:599-606
- Celano P, Berchtold CM, Kizer DL, Weeraratna A, Nelkin BD, Baylin SB and Casero RA Jr. 1992. Characterization of an endogenous RNA transcript with homology to the antisense strand of the human c-myc gene. *J. Biol. Chem.* 267:15092-6
- Clemens MJ and Elia A. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* 9:503-524
- Dahlmberg JE, and Lund E. 1988. The genes and transcription of the major small nuclear RNAs. In *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles* Edited by: Birnstiel ML. Berlin Germany: Springer-Verlag. pp.38-70
- Dahm R and Geisler R. 2006. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar. Biotechnol.* 8:329-345
- Das G, Henning D and Reddy R. 1987. Structure, organization, and transcription of *Drosophila* U6 small nuclear RNA genes. *J. Biol Chem.* 262:1187-1193
- Das G, Henning D, Wright D and Reddy R. 1988. Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. *EMBO J.* 7:503-512
- Dodd A, Chambers SP and Love DR. 2004. Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS Lett.* 561:89-93
- Domitrovich AM and Kunkel GR. 2003. Multiple, dispersed human U6 small nuclear RNA genes with varied transcriptional efficiencies. *Nucleic Acids Res.* 31:2344-2352
- Draper BW, Morcos PA and Kimmel CB. 2001. Inhibition of zebrafish *fgf8* Pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30:154-156

- Eklund EA and Skalnik DG. 1995. Characterization of a gp91-phox promoter element that is required for interferon gamma-induced transcription. *J. Biol. Chem.* 270:8267-73
- Elbashir SM, Harborth J, Weber K, and Tuschl T. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213
- Fan X, Shi H and Lis JT. 2005. Distinct transcriptional responses of RNA polymerases I, II and III to aptamers that bind TBP. *Nucleic Acids Res.* 33:838-845
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
- Forster AC and Symons RH. 1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49:211-220
- Galderisi U, Cascino A and Giordano A. 1999. Antisense oligonucleotides as therapeutics agents. *J. cell. Physiol.* 181:251-257
- Goomer RS and Kunkel, G. 1992. The transcriptional start site for a human U6 small nuclear RNA gene is dictated by a compound promoter element consisting of the PSE and the TATA box. *Nucleic Acids Res.* 20:4903-4912
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T and Weber K. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114:4557-4565
- Haseloff J. and W.L. Gerlach. 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334:585-591
- Hatzoglou A, Deshayes F, Madry C, Laprée G, Castanas E and Tsapis A. 2002. Natural antisense RNA inhibits the expression of BCMA, a tumour necrosis factor receptor homologue. *BMC Mol. Biol.* 3:1-7
- Hayashi K. 1981. Organization of sequences related to U6 RNA in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 9:3379-3388
- Hertog JD. 2005. Chemical genetics: drug screens in zebrafish. *Biosci. Rep.* 25:289-297
- Kari G, Rodeck U and Dicker AP. 2007. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82:70-80

- Krol A, Carbon P, Ebel J-P and Appel B. 1987. *Xenopus tropicalis* U6 snRNA genes transcribed by Pol III contain the upstream promoter elements used by Pol II dependent U snRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 15:2463-2478
- Kudo T and Sutou S. 2005. Usage of putative chicken U6 promoters for vector-based RNA interference. *J. Reprod. Dev.* 51:411-417
- Kunkel GR and Pederson T. 1988. Upstream elements required for efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used. *Genes Dev.* 2:196-204
- Kunkel GR and Hixson JD. 1998. The distal elements, OCT and SPH, stimulate the formation of preinitiation complexes on a human U6 snRNA gene promoter *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 26:1536-1543
- Kurreck J. 2003. Antisense technologies: improvement through novel chemical modifications. *FEBS J.* 270:1628-1644
- Kuwabara T, Warashina M, Nakayama A, Ohkawa J and Taira K. 1999. tRNA^{Val}-heterodimeric maxizymes with high potential as gene inactivating agents: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 Tat mRNA in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1886-91
- Kwak Y-D, Koike H and Sugaya K. 2003. RNA interference with small hairpin RNAs transcribed from a human U6 promoter-driven DNA vector. *J. Pharmacol. Sci.* 93:214-217
- Lacerra G, Sierakowska H, Carestia C, Fucharoen S, Summerton J, Weller D and Kole R. 2000. Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9591-9596
- Lamason RL, Mohideen MPK, Mest JR, Wong AC, Norton, HL, Aros MC, Juryne MJ, Mao X, Humphreville VR, Humbert JE, Sinha S, Moore JL, Jagadeeswaran P, Zhao W, Ning G, Makalowska I, McKeigue PM, O'Donnell D, Kittles R, Parra EJ, Mangini NJ, Grunwald DJ, Shriver MD, Canfield VA and Cheng KC. 2005. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310:1782-1786
- Lambeth LS, Moore RJ, Muralitharan MS, Dalrymple RP, McWilliam S and Doran TJ. 2004. Characterisation and application of a bovine U6 promoter for expression of short hairpin RNAs. *BMC Biotechnol.* 5:9

- Lambeth LS, Wise TG, Moore RJ, Muralitharan MS and Doran TJ. 2006. Comparison of bovine RNA polymerase III promoters for short hairpin RNA expression. *Animal Genet.* 37:369-372
- Lobe CG and Nagy A. 1998. Conditional genome alteration in mice. *BioEssays* 20:200-208
- McKee T and McKee JR. 1999. Biochemistry: An introduction. McGraw-Hill, New York, USA., pp. 511
- Minshull J and Hunt T. 1986. The use of single-stranded DNA and RNase H to promote quantitative 'hybrid arrest of translation' of mRNA/DNA hybrids in reticulocyte lysate cell-free translations. *Nucleic Acids Res.* 14:6433-6451
- Moreadith RW and Radford NB. 1997. Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism. *J. Mol. Med.* 75:208-216
- Muller M, Dietel M, Turzynski A and Wiechen K. 1998. Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer* 77:567-571
- Myslinski E, Krol A and Carbon P. 2004. Characterization of snRNA and snRNA-type genes in the pufferfish *Fugu rubripes*. *Gene* 330:149-158
- Nasevicius A and Ekker SC. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* 26:216-220
- Oates AC, Bruce AEE, and Ho RK. 2000. Too much interference: injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Dev. Biol.* 224: 20-28
- Ohkawa J, Yuyama N, Takebe Y, Nishikawa S and Taira K. 1993. Importance of independence in ribozyme reactions: kinetic behavior of trimmed and of simply connected multiple ribozymes with potential activity against human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11302-6
- Ohshima Y, Okada N, Tani T, Itoh Y and Itoh M. 1981. Nucleotide sequences of mouse genomic loci including a gene or pseudogene for U6 (4.8S) nuclear RNA. *Nucleic Acids Res.* 9:5145-58
- Park JB and Levine M. 2000. Characterization of the promoter of the human ribonucleotide reductase R2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:651-657

- Paterson BM, Roberts BE, and Kuff EL. 1977. Structural gene identification and mapping by DNA●mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4370-4374
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan Y-L, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A and Talbot WS. 2000. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chrmosomes. *Genome Res.* 10:1890-1902
- Roth LW, Bormann P, Bonnet A and Reinhard E. 1999. beta-thymosin is required for axonal tract formation in developing zebrafish brain. *Development* 126:1365-74
- Saito N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425
- Schmajuk G, Sierakowska H and Kole R. 1999. Antisense oligonucleotides with different backbones. Modification of splicing pathways and efficacy of uptake. *J. Biol. Chem.* 274:21783-9
- Shen C, Buck AK, Liu X, Winkle M and Reske SN. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *Febs Lett.* 539:111-114
- Stein D, Foster E, Huang SB, Weller D and Summerton J. 1997. A specificity comparison of four antisense types: morpholino, 2'-O-methyl RNA, DNA, and phosphorothioate DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:151-157
- Stenkamp DL, Frey RA, Prabhudesai SN, and Raymond PA. 2000. Function for *Hedgehog* genes in zebrafish retinal development. *Dev. Biol.* 220:238-252
- Stephenson ML and Zamecnik PC. 1978. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:285-8
- Stone LS and Vulchanova L. 2003. The pain of antisense: in vivo application of antisense oligonucleotides for functional genomics in pain and analgesia. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:1081-1112
- Stougaard P, Molin S and Nordström K. 1981. RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6008-12
- Sui G, Soohoo C, Afar EB, Gay F, Shi U, Forrester WC and Shi Y. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-5520

- Summerton J. 1999. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* 1489:141-158
- Taira K, Nakagawa K, Nishikawa S and Furukawa K. 1991. Construction of a novel RNA-transcript-trimming plasmid which can be used both in vitro in place of run-off and (G)-free transcriptions and in vivo as multi-sequences transcription vectors. *Nucleic Acids Res.* 19:5125-30
- Tanner NK. 1999. Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:257-275
- The vitravene group. 2002. A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Am. J. Ophthalmol.* 133:467-474
- Tian B and Mathews MB. 2001. Functional characterization of and cooperation between the double-stranded RNA-binding motifs of the protein kinase PKR. *J. Biol. Chem.* 276:9936-9944
- Tijsterman M, Ketting RF and Plasterk RH. 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu. Rev. Genet.* 36:489-519
- Uzbekova S, Chyb J, Ferrière F, Bailhache T, Prunet P, Alestrom P and Breton B. 2000. Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *J. Mol. Endocrinol.* 25:337-50
- Wagner RW. 1994. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372:333-335
- Warashina M, Kuwabara T, Kato Y, Sano M, and Taira K. 2001. RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5572-5577
- Wargelius A, Ellingsen S, and Fjose A. 1999. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263:156-161
- Weil PA, Segall J, Harris B, Ng, S-Y and Roeder RG. 1979. Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J. Biol. Chem.* 254:6163-6173
- Westerfield M. 1993. "The Zebrafish Book. A Guide for the laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*).". Univ. of Oregon Press, Eugene, OR

- Wingender E. 1993. Gene regulation in eukaryotes. VCH. Weinheim. pp.1-58
- Wise TG, Schafer DJ, Lambeth LS, Tyack SG, Bruce MP, Moore RJ and Doran TJ. 2007. Characterization and comparison of chicken U6 promoters for the expression of short hairpin RNAs. *Animal Biotechnol.* 18: 153-162
- Xie Y., Chen X, and Wagner TE. 1997. A ribozyme-mediated, gene “knockdown” strategy for the identification of gene function in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13777-13781
- Yamamoto T and Suzuki N. 2005. Expression and function of cGMP-dependent protein kinase type I during medaka fish embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 280:16979-16986
- Yasutake J, Inohaya K and Kudo A. 2004. Twist functions in vertebral column formation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121:883-894
- Zamecnik PC and Stephenson ML. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:280-4
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA and Bartel DP. 2000. RNAi: Double-Stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33
- Zhao JJ, Lemke G. 1998. Selective disruption of neuregulin-1 function in vertebrate embryos using ribozyme-tRNA transgenes. *Development.* 125:1899-907
- Zhao Z, Cao Y, Li M, and Meng A. 2001. Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Dev. Biol.* 229:215-223

ภาคผนวก

การเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนของ coding sequences ของยีน U6 snRNA ของสัตว์ต่าง ๆ และตำแหน่งของไพรเมอร์ (ลำดับเบสแสดงในตารางที่ 3.1)

Drosophila	***** GTCCTTGCTTCGGCAGAACATATACTAAAATTGGAAACGATACAGAGAAAGATTAGCATGGC	60
Xenopus	GTCCTTGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAAACGATACAGAGAAAGATTAGCATGGC	60
Mouse	GTCCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAAACGATACAGAGAAAGATTAGCATGGC	60
Human	GTCCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAAACGATACAGAGAAAGATTAGCATGGC	60
	U6-r1 → U6-r2	
Drosophila	***** CCCTGCGCAAGGATGACACGCABAATTCGTGAAGCGTCCATATTTT	107
Xenopus	CCCTGCGCAAGGATGACACGCABAATTCGTGAAGCGTCCATATTTT	107
Mouse	CCCTGCGCAAGGATGACACGCABAATTCGTGAAGCGTCCATATTTT	106
Human	CCCTGCGCAAGGATGACACGCABAATTCGTGAAGCGTCCATATTTT	107
	← U6-r2 ← U6-r1	

ประวัติหัวหน้าโครงการ

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว สุรินทร์ บุญอนันตนาสาร
(ภาษาอังกฤษ) Ms Surintorn Boonanuntanasarn

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อ. เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 044-224371, 224378
โทรสาร 044-224150
Email : surinton@ccs.sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

ระดับ	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
การศึกษา			
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	วาริชศาสตร์	มหาวิทยาลัยบูรพา
ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก	Ph.D. Doctor of Philosophy	Aquatic Biosciences	Tokyo University of Fisheries

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ อนุพันธุศาสตร์ในสัตว์น้ำ
การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ผลงานตีพิมพ์

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Morita, T. and Takeuchi T. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Mar. Biotechnol.* 4: 256-266

- Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G. and Takeuchi T. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310: 1089-1095
- Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G., Iwai, K. and Takeuchi T. 2004. Molecular cloning, expression in albino mutants, and gene knockdown studies of two types of tyrosinase mRNA in rainbow trout embryos. *Pigment Cell Res.* 17: 413-421
- Boonanuntanasarn, S. Toshio Takeuchi, Goro Yoshizaki. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 336: 438-443
- Boonanuntanasarn, S. 2008. Gene Knockdown: a powerful tool for gene function study in fish. *Journal of The World Aquaculture Society.* 39:311-323.

Characterization and organization of the U6 snRNA gene in zebrafish and application of their promoters to express short hairpin RNA

Surintorn Boonanuntanasarn^{1,*}, Sakol Panyim^{2,3}, and Goro Yoshizaki⁴

¹School of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Muang, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand

²Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

⁴Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato-Ku, Tokyo, 108-8477, Japan

* Corresponding author: e-mail: surinton@sut.ac.th

Fax: +66-44-22-4150

ABSTRACT

We have characterized three U6 snRNA genes in zebrafish and randomly designated them as U6-1, U6-2, and U6-3. 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 the *Drosophila* and *Xenopus* U6 snRNA genes. The upstream regulatory sequences were located based on their conserved position relative to the transcription start site. Furthermore, we speculate that the “CCAAT box” functions 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. Three U6 snRNA genes are functionally expressed in various tissues. All three putative promoters were able to transcribe short hairpin RNA (shRNA) in zebrafish cell extracts. Our findings demonstrate that these putative promoters have the potential to be used for vector-based RNA interference (RNAi) 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 carp, suggesting 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, demonstrating that there are four different types of zebrafish U6 snRNA genes.

Keywords:

U6 snRNA, U6 Promoter, zebrafish, short hairpin RNA

INTRODUCTION

Recently, the zebrafish (*Danio rerio*) has become the most popular vertebrate used as a genetic model for developmental biology studies, models of human disorders, and drug discovery research (Hertog, 2005; Bryson-Richardson *et al.*, 2007; Kari *et al.*, 2007). The short life cycle provides a number of embryological and experimental advantages. Moreover, zebrafish are easy to maintain and breed. The zebrafish is expected to have roughly the same number of genes in its genome as the human (Postlethwait *et al.*, 2000). It was found that the zebrafish genome contains about as many transcripts including expressed sequence tags (EST) and microarrays as the human genome assembly (Dahm and Geisler, 2006). In addition, the zebrafish genome is fully sequenced and mapped, and this information is available to the scientific community at (<http://zfin.org>). As a result, there has recently been more scientific focus on developing various genetic tools and methods that can rapidly elucidate gene function. Gene knockdown (GKD) technologies using antisense morpholino oligonucleotide (MO) and small interfering RNA (siRNA) have been widely used for gene function analysis in zebrafish (Nasevicius and Ekker, 2000; Dodd *et al.*, 2004). However, these techniques lead to transient loss-of-function phenotypes, which are only applicable for investigating gene function during embryogenesis. Additionally, the loss-of-function phenotype is not transmitted to subsequent generations. Thus, vector-based expression of short hairpin RNA (shRNA) that can provide constitutive, sustained GKD effects in zebrafish is needed to expand the knowledge of genes with redundant functions.

In order to mediate long-term gene silencing effects in zebrafish, a DNA-based construct that stably synthesizes shRNA from either the RNA polymerase II or III promoters is required. RNA polymerase III (Pol III) systems naturally promote

transcription more efficiently than do RNA polymerase II (Pol II) systems (Bertrand *et al.*, 1997). In addition, Pol III promoters offer several advantages over Pol II promoters. For instance, the compact sequence of the Pol III promoter is easier to manipulate molecularly. Their transcription is initiated and terminated at precise positions, resulting in addition of very little extra sequence when fused to other genes. The promoters of Pol III genes (i.e., tRNA, 5S RNA) usually contain an intragenic control region (Carbon and Krol, 1991). In contrast, U6 small nuclear RNA (U6 snRNA) genes are unique because the cis-elements necessary for transcription are present in the 5'-flanking regions. U6 snRNA is an abundant nuclear RNA involved in RNA processing (reviewed in Das *et al.*, 1987). Pol III-based shRNA expression constructs have recently become the method of choice to interfere with a gene of interest in mammalian cells. Stable expression using this shRNA approach has the potential to recapitulate traditional knockout phenotypes (Sui *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2003).

Although the zebrafish genomic information has been completed and zebrafish are widely used for genetic research, U6 snRNA genes have not yet been fully characterized. So far, characterization of U6 promoters has been conducted in various vertebrates (Krol *et al.*, 1987; Das *et al.*, 1988; Kunkel and Pederson, 1988; Kudo and Sutou, 2005; Lambeth *et al.*, 2005). In teleost fish, snRNA-type genes have been characterized in pufferfish, *Fugu rubripes* (Myslinski *et al.*, 2004). However, the U6 promoters have been reported to only drive species-specific transcription (Das *et al.*, 1987). In this study, we report the characterization of the U6 snRNA genes in zebrafish. Genomic organization and the expression of the U6 snRNA genes are documented. To provide sustained vector-based GKD approach, usage of putative the

U6 promoter for shRNA expression activity was also investigated in zebrafish and other teleost nuclear extracts.

RESULTS

DNA fragments approximately 550 base pairs (bp) (data not shown) in length containing the putative U6 promoter and a partial U6 snRNA coding region were amplified by nested PCR using zebrafish genomic DNA as the template. Sequencing these fragments revealed three different types of U6 snRNA genes. Three U6 snRNA genes were classified relying on the different contributions of sequences upstream and from within the RNA coding region. The three genes were randomly designated U6-1, U6-2, and U6-3 (Fig. 1). The complete sequences of the three U6 snRNA genes were also cloned.

Characterization of zebrafish U6 snRNA genes

The U6-1 gene consisted of 112 nucleotides of RNA coding sequence. The U6-2 and U6-3 genes contained 107 and 106 nucleotides of RNA coding sequences, respectively. All U6 snRNA genes have conserved sequence motifs homologous to an intragenic “box A,” which is characteristic of the RNA polymerase III (Pol III) genes (reviewed in Das *et al.*, 1987) (Fig. 1). The termination signals of the U6-1 gene consisted of four or five thymidines (Ts). The U6-2 gene contained five Ts, whereas the U6-3 contained four Ts. The coding sequences of U6-1 showed 85.7% and 86.6% homology to the coding regions of U6-2 and U6-3, respectively. The coding sequence of the U6-2 gene was 96.3% homologous to that of U6-3. The three zebrafish U6 snRNA genes had high identity with other known U6 snRNA genes (data not shown). Using the coding sequences of U6 snRNA as input, phylogenetic analysis indicated

that the U6-1 gene was closely related to the mammal U6 snRNA genes, while the U6-2 was more closely related to the *Drosophila* U6 snRNA gene than the other U6 snRNA genes. In addition, U6-3 has a close genetic relationship with the *Xenopus* U6 snRNA gene (Fig. 2).

Comparison of the putative promoter regions showed that the nucleotide sequences diverged significantly (Fig. 1). The nucleotide sequences of the 5'-flanking regions of all three U6 snRNA genes contained essential upstream elements such as "CCAAT boxes", the proximal sequence elements (PSE), and TATA box sequences. Compared to the location of the CCAAT in the U6-2 and U6-3 (-249 to -245) promoters, the CCAAT of the U6-1 promoter was located closer to the start site (-244 to -240). The predicted PSE consensus sequences, located from -79 to -48, showed two highly conserved regional ACCAC (-65 to -61) and AACAT (-52 to -48) sequences. The position of TATA boxes were conserved among the three U6 snRNA genes (-31 to -24), although the DNA sequences of the spacer were not.

Genomic organization and expression of U6 snRNA genes

In order to identify the location of each U6 snRNA gene on zebrafish chromosomes, a BLASTn analysis was performed against the zebrafish genomic database. The sequences of each of the U6 snRNA genes, which consisted of the PSE through the coding region and termination signal, were used as the input. Only perfect sequence identity between the input sequences and the genome database were identified. The result showed that the zebrafish genome contained 555 copies of the U6-1 gene, which were distributed across different loci on various chromosomes (Table 1). The U6-2 and the U6-3 genes were found to be single copy genes. To examine whether these three putative snRNA genes express detectable mRNAs, RT-

PCR was conducted with cDNA preparations from zebrafish organs including eyes, brain, gill, liver, digestive tract, ovary, and testis. All three U6 snRNA genes were expressed in all tissues examined (Fig. 3), demonstrating that these three U6 snRNA genes are constitutively expressed.

Another U6 snRNA gene was found when performing the genomic BLASTn search which was designated as U6-4. The coding sequence of U6-4 has totally identity to that of U6-3. However, the sequence of the upstream flanking region was 76 % homology to that of U6-3. The putative promoter region of U6-4 contains the core regulation elements which were identified in the upstream elements of the isolated U6 snRNA genes (Fig.1). The U6-4 was located as only one copy in chromosome 9 (Table 1).

Transcription of shRNA driven by U6 putative promoters

We conducted *in vitro* transcription experiments using zebrafish cell extracts to confirm the utility of the putative zebrafish U6 promoters for vector-based RNA interference. Three types of shRNA expression cassettes (pU6-1shRNA, pU6-2shRNA, and pU6-3shRNA) were constructed. Each expression cassette consisted of the putative U6 promoter, the shRNA sequences and the termination sequences (Fig. 4). All three U6 snRNA promoters were able to express the shRNA (Fig. 5) in cell extracts prepared from zebrafish embryos. Two transcript signals were observed from each putative promoter expression vector, which may be produced by variable termination sequences of 4Ts and 5Ts. In addition, *in vitro* transcription experiments were performed using cell extracts from other fish species, including catfish (*Clarias gariepinus*), common carp (*Cyprinus carpio*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fig. 5 shows the expression of the shRNA driven by all three of the U6 putative promoters in Nile tilapia cell extracts. None of the three putative U6

promoters were transcribed in cell extracts prepared from catfish or common carp (data not shown). The transcription experiments were also conducted using cell extracts from two shrimp species (*Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*). We found that the shRNA transcription products from the U6-1 and U6-2 putative promoters showed weak signals in shrimp cell extracts, whereas the U6-3 putative promoter transcribed no detectable signal (data not shown).

DISCUSSION

Three different U6 snRNA genes (U6-1, U6-2, and U6-3) were isolated and characterized from zebrafish, including some of the sequences of the putative promoters and the RNA coding regions. The DNA sequences corresponding to the 5'-flanking regions of all of the U6 snRNA genes were divergent, except for a few highly conserved upstream sequences. The core promoter elements that regulated the U6 snRNA genes were identified according to previous reports (Krol *et al.*, 1987; Das *et al.*, 1988; Kunkel and Pederson, 1988; Kudo and Sutou, 2005; Lambeth *et al.*, 2005). Based on their conserved position in all U6 genes, TATA boxes and the PSE were characterized. A distal sequence element (DSE), which is an octamer motif (ATTTGCAT), has been found in U6 snRNA genes of human, mouse, cattle, chicken and *Xenopus* (Krol *et al.*, 1987; Das *et al.*, 1988; Kunkel and Pederson, 1988; Kudo and Sutou, 2005; Lambeth *et al.*, 2005). However, this octamer motif was not present in the *Drosophila* U6 snRNA gene (Das *et al.*, 1987). In zebrafish, instead of the octamer motif, all three types of putative promoters have upstream sequences homologous to the "CCAAT box" motif, which acts as a functional enhancer in several gene promoters (Ach and Weiner, 1991; Park and Levine, 2000). The position of the "CCAAT box" (≈ -240) was conserved compared to the location of the octamer

motif that is generally positioned around -250 nucleotides relative to the transcription start site. Thus, the “CCAAT box” might be identified as the DSE in the zebrafish U6 snRNA genes. In summary, the 5’-flanking sequences of the U6 snRNA genes among zebrafish, *Xenopus*, chicken, mouse, human, and *Drosophila* are not significantly conserved, although the nucleotide sequences corresponding to the U6 snRNA coding region reveals a high degree of sequence conservation.

In general, the U6 gene sequences, including the upstream PSE and TATA boxes and the 3’ end T-rich terminator, were used to successfully synthesize U6 snRNA coding sequence (Das *et al.*, 1988; Goomer and Kunkel, 1992). Therefore, we used each of the 5’-flanking regions up to -79, together with the complete U6 snRNA coding region, as the input for the BLASTn analysis of the zebrafish genomic database. Whereas the U6-2 and U6-3 genes were each present as a single copy gene, multiple copies of the U6-1 gene were located at various loci distributed throughout the zebrafish genome. Similar findings of multigene families of the U6 snRNAs have been previously reported by Hiyashi (1981) and Domitrovich and Kunkel (2003).

Our sequencing data revealed that there are no additional types of U6 snRNA genes found in the products of nested PCR. However, the genomic BLASTn analysis showed another type of U6-4. The DNA sequences of U6-4 were taken from database. Comparison of the putative promoter regions showed that the 5’-flanking region of U6-4 contained essential upstream elements such as “CCAAT box”, PSE and TATA box sequences. In addition, the coding region of U6-4 has totally identity to that of U6-3. Taken together, these data suggest that there are four U6 snRNA genes in the zebrafish genome.

In order to determine whether these three types of U6 snRNA genes were real genes or pseudogenes, we performed RT-PCR analysis with cDNA isolated from

various zebrafish tissues. The results showed that all three U6 snRNA coding sequences were expressed at detectable levels. Furthermore, these three genes were expressed in all tissues, suggesting these genes can be labeled as “house-keeping genes”.

Previously, it was shown that U6 promoters that included the DSE could enhance transcription (Das *et al.*, 1988). In humans, the DSE of the U6 snRNA gene contributes to the formation of preinitiation complexes (PIC) (Kunkel and Hixson, 1998). In this study, therefore, each shRNA expression cassette (pU6-1shRNA, pU6-2shRNA, or pU6-3shRNA) was generated to contain a “CCAAT box” in the 5’-flanking sequences. All three putative U6 promoters initiated expression of the cloned shRNA in cell extracts prepared from zebrafish. As demonstrated in Fig. 5, *in vitro* transcription reactions produced two transcripts, which most likely are the products that comprise 4 Ts or 5 Ts, revealing that both 4Ts and 5Ts are effective termination signals. Similar efficient termination of a T cluster is demonstrated in other known U6 snRNA genes (Krol *et al.*, 1987; Das *et al.*, 1988; Kunkel and Pederson, 1988; Kudo and Sutou, 2005; Lambeth *et al.*, 2005).

We next sought to extend this finding to other fish species and shrimp cell extracts. The transcription efficiency from these putative U6 promoters in Nile tilapia cell extracts was similar to that from zebrafish cell extracts. However, these putative U6 promoters did not promote transcription in cell extracts prepared from catfish and common carp. The putative U6 promoters of the U6-1 and U6-2 genes promote very weak shRNA expression in shrimp cell extracts. Previous findings demonstrated variable transcription of the U6 snRNA genes across species. Das and colleagues (1987) reported that the *Drosophila* U6 snRNA genes could only be transcribed in *Drosophila* cell extracts and not in mammalian cell extracts, suggesting that the U6

snRNA genes promoted only species-specific transcription. Interestingly, the mouse U6 snRNA gene could be expressed in frog oocytes (Das *et al.*, 1988). Moreover, commercially available human U6 promoter efficiently transcribed shRNA in chicken cell lines (Kudo and Sutou, 2005). The octamer motif was identified as the DSE in the U6 snRNA genes of *Xenopus*, chicken, mouse, and human, while this octamer motif was not found in the *Drosophila* U6 snRNA genes. Transcription efficiency across species may partially be explained by the fact that the core elements of the U6 snRNA genes promoters are homologous or nearly homologous across species.

In conclusion, our findings demonstrate that there are four different types of U6 snRNA genes. They are ubiquitously expressed throughout a variety of zebrafish tissues. One of the zebrafish U6 snRNA genes is present in multiple copies dispersed throughout the zebrafish genome. These U6 promoters could promote shRNA expression, suggesting 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. Furthermore, these vector-based RNAi technologies might be applicable for some aquaculture-related species.

METHODS

Cloning of zebrafish U6 snRNA genes

The zebrafish U6 snRNA genes were cloned by nested PCR. Table 2 shows the sequence of the oligonucleotides used in this study. The putative promoter and partial U6 snRNA gene fragments were amplified using a zebrafish genomic DNA library as the template with λ fix-F as the forward primer and reverse primers U6-r1 and U6-r2 as the primary and nested primers, respectively. The first PCR was carried out in a total

volume of 10 μ l, consisting of 200 μ M of each deoxynucleotide, 1 pmol of each primer (λ fix-F and U6-r1), 1X EX Taq buffer and 0.25 U EX Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan). The PCR reaction was performed at 94°C for 3 min, then 35 reaction cycles were run, each consisting of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C and 1 min at 72°C. The final elongation step was conducted at 72°C for 5 min. The resulting PCR product was used as the template in a second PCR reaction with λ fix-F and U6-r2 as the primers. Another partial U6 snRNA gene fragment, including the termination signal, was amplified with U6-f1 and U6-f2 as the primary and nested forward primers and with the reverse primer λ fix-R. DNA fragments were isolated using the Gelpure DNA Purification Kit (GeneMate, Kaysville, UT, USA). The PCR-amplified DNA fragments were cloned into pGEM T-Easy plasmid (Promega, Madison, WI, USA). DNA purification was performed using the FlexiPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, Buckinghamshire, UK). All clones were sequenced using ALF express DNA Sequencer System with a Thermo Sequenase fluorescent labeled-primer cycle-sequencing kit and 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech Ltd). A phylogenetic tree of the U6 snRNA coding region was generated using the neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987). To locate the U6snRNA genes on the zebrafish chromosomes, the zebrafish genome resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) were used to perform a BLASTn search.

RT-PCR with zebrafish organs

To examine the expression of each U6-snRNA in various organs of the zebrafish, total RNA was isolated from tissue samples (brain, eyes, gill, liver, digestive tract, ovary and testis) using TRIZOL Reagent (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) according to

the manufacturer's protocol and was treated with DNase I during RNA purification. First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech Ltd) with random hexadeoxynucleotides. PCR was conducted using ExTaq[®] (Takara) in 10 µl of the reaction solution. The conditions for PCR cycles were as follows: initial denaturation of 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 58°C and 15 s at 72°C. The final elongation step was conducted at 72°C for 5 min. Three pairs of primers were designed to amplify the coding DNA of U6-1 (cU6-1f and cU6-1r), U6-2 (cU6-2f and cU6-2r) and U6-3 (cU6-3f and cU6-3r) (Table 2). The amplified products were separated by electrophoresis on a 15% nondenaturing polyacrylamide gel.

shRNA expression cassette construction

All U6 promoter-driven short-hairpin RNA (shRNA) vectors (pU6-shRNA) were constructed as follows. Plasmids containing the different types of the U6 putative promoters were cloned by nested PCR from zebrafish genomic DNA. Genomic DNA was extracted from the dorsal fin of zebrafish using Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed using ExTaq[®] (Takara) at 94°C for 5 min, then 35 reaction cycles of were run each consisting of 45 s at 94°C, 45 s at 60°C and 45 s at 72°C. The final elongation step was conducted at 72°C for 5 min. For the first PCR reaction, three pairs of primers were designed to clone the putative promoters of U6-1 (pU6-1f and U6-r3), U6-2 (pU6-2f and U6-r3) and U6-3 (pU6-3f and U6-r3). The resulting PCR products of the putative promoter of U6-1, U6-2 and U6-3 were used as the template in the second PCR reaction with the specific primers (pU6-1f and pU6-1r), (pU6-2f

and pU6-2r) and (pU6-3f and pU6-3r), respectively. Because *Bam*H I and *Xba* I restriction sites were used in all expression cassettes to insert the DNA fragment encoding the test transcript, each nested reverse primer (pU6-1r, pU6-2r or pU6-3r) (Table 2) in the second PCR reaction was designed to add the restriction enzyme *Bam*H I and *Xba* I sequences downstream of the U6 putative promoter. Each PCR product was cloned into pGEM T-Easy plasmid (Promega) and verified by DNA sequencing. The plasmid containing the putative promoter of U6-1, U6-2 or U6-3 was designated as pU6-1, pU6-2 or pU6-3, respectively. Each plasmid was digested with *Bam* HI and *Xba* I, so two complementary oligonucleotides could be inserted.

Because we want to target the zebrafish golden phenotype (Lamason *et al.*, 2005) in future studies, *slc24a5-1* (GenBank accessions no. AY 538713) (nucleotide 385-405) was used to generate two oligonucleotides (ONs): slc-plus and slc-minus (Table 2). The two ONs were 5'-phosphorylated and hybridized in annealing buffer as described previously (Boonanuntanasarn *et al.*, 2005). After annealing, the double-stranded DNA (dsDNA) fragment consisted of the 5'-*Bam*H I sticky end, the short hairpin RNA (shRNA) sense sequence, the 9-mer loop sequence, the shRNA antisense sequence, and the 5 attached thymidines at the 3' end, and the *Xba* I sticky end. The dsDNA was ligated into each of the *Bam* HI/*Xba* I digested pU6-1, pU6-2 and pU6-3 vectors to generate shRNA expression cassettes: pU6-1shRNA, pU6-2shRNA and pU6-3shRNA, respectively. All plasmid constructs were sequence-verified. The templates for *in vitro* transcription containing the shRNA driven by each U6 promoter (Fig. 4) were PCR-amplified with primers (pGEM-f and pGEM-r). Using pU6-1shRNA, pU6-2shRNA or pU6-3shRNA as a template, PCR was conducted using ExTaq® (Takara) at 94°C for 3 min, then 40 reaction cycles of were run each consisting of 45 s at 94°C, 45 s at 60°C and 45 s at 72°C. The final elongation step

was conducted at 72°C for 5 min. The amplified products were isolated using the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Preparation of fish cell extracts

In order to investigate the expression of the putative U6 snRNA promoter, fish cell extracts were prepared from zebrafish. We also tested the transcription activities of all of the zebrafish U6 putative promoters across species in cell extracts prepared from common carp (*Cyprinus carpio*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and catfish (*Clarias fariensis*) obtained from the Fisheries Farm, Suranaree University of Technology Farm (Nakhon Ratchasima, Thailand) and marine shrimps. In fish, cell extracts were prepared from fry during swim-up stages. Marine shrimp in post-larvae stages 10-15 were also used to prepare cell extract samples. First, fish or shrimp were anesthetized in 300 ppm of phenoxy ethanol. All cell extracts, which contained the enzyme RNA Pol III, were prepared following a modification of the procedure described by Weil and colleagues (1979). Briefly, the samples were cut into 5 mm-pieces in ice-cold PBS. After washing three times in PBS, the samples were incubated in twice the volume of ice-cold hypotonic solution (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol) for 10 min and homogenized for 5 strokes. One-tenth volume of hypotonic stop solution (0.3 M HEPES-KOH, pH 7.9, 1.4 M KCl, and 0.03 M MgCl₂) was added. The homogenate was centrifuged at 100,000 x g at 4°C for 1 h. The supernatant was used for protein determination using a Total Protein Kit, Micro Lowry (Sigma, MO, USA). Extracts with a protein concentration of 5 mg/ml were stored at -80°C until they were needed for *in vitro* transcription.

***in vitro* transcription and northern blot analysis**

Transcription reactions were carried out essentially according to Fan *et al.* (2005) with slight modifications. The 300- μ l reaction mixture contained 900 μ g protein of each fish embryo extract, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol and 1.5 mg of each template DNA. In order to allow for preinitiation complex formation (PIC), the transcription mixtures were incubated at 28⁰C for 30 min. Transcription reactions were initiated by adding 250 μ M of rNTP and allowed to proceed for 1.5 h at 28⁰C. The reactions were stopped by adding one-tenth volume of stop solution (5 % SDS, 100 mM EDTA, 1 M sodium acetate, pH 4.8). Subsequent to the transcription reaction, the mixtures were treated with DNaseI (RNase-free), extracted with phenol/chloroform and precipitated with ethanol. The precipitates were resuspended in loading buffer (95% formamide, 18 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol, 0.025% SDS), heat-denatured and loaded on a 15% denaturing polyacrylamide gel with 8 M urea. Following electrophoresis, the gels were electroblotted onto HybondTM-N⁺ membranes (Amersham). After baking at 80⁰C for 2 h, the membranes were hybridized overnight with the 3' dioxigenin (DIG)-labelled synthetic oligodeoxynucleotide (Sigma- Proligo, Singapore) complementary to the antisense shRNA strand. The membranes were then washed and incubated with anti-digoxigenin-AP antibodies (Roche, Mannheim, Germany). The signals were detected with NBT/BCIP kit (Roche) according to the manufacturer's protocol.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by a grant from the Thailand Research Funds (MRG 4880201). We thank Ms. Dollaya Maspatawee and Mr. Sunai Plaimmee for technical assistances.

LITERATURE CITED

- Ach RA, Weiner AM. 1991. Cooperation between CCAAT and octamer motifs in the distal sequence element of the rat U3 small nucleolar RNA promoter. *Nucleic Acids Res* 19:4209-4218.
- Bertrand E, Castanotto D, Zhou C, Carbonnelle C, Lee NS, Good P, Chatterjee S, Grange T, Pictet R, Kohn D, Engelke D, Rossi JJ. 1997. The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA* 3:75-88.
- Boonanuntanasarn S, Takeuchi T, Yoshizaki G. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 336:438-443.
- Bryson-Richardson RJ, Berger S, Schilling TF, Hall TE, Cole NJ, Gigson AJ, Sharpe J, Currie PD. 2007. FishNet: an online of zebrafish anatomy. *BMC Biol* 5:34.
- Carbon P, Krol A. 1991. Transcription of the *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA^{(Ser)Sec} gene: a system that combines an internal B box and upstream elements also found in U6 snRNA genes. *EMBO J* 10:599-606.
- Dahm R, Geisler R. 2006. Learning from small fry the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol* 8:329-345.
- Das G, Henning D, Reddy R. 1987. Structure, organization, and transcription of *Drosophila* U6 small nuclear RNA genes. *J Biol Chem* 262:1187-1193.
- Das G, Henning D, Wright D, Reddy R. 1988. Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. *EMBO J* 7:503-512.
- Dodd A, Chambers SP, Love DR. 2004. Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS Lett* 561:89-93.

- Domitrovich AM, Kunkel GR. 2003. Multiple, dispersed human U6 small nuclear RNA genes with varied transcriptional efficiencies. *Nucleic Acids Res* 31:2344-2352.
- Fan X, Shi H, Lis JT. 2005. Distinct transcriptional responses of RNA polymerases I, II and III to aptamers that bind TBP. *Nucleic Acids Res* 33:838-845.
- Goomer RS, Kunkel, G. 1992. The transcriptional start site for a human U6 small nuclear RNA gene is dictated by a compound promoter element consisting of the PSE and the TATA box. *Nucleic Acids Res* 20:4903-4912.
- Hayashi K. 1981. Organization of sequences related to U6 RNA in the human genome. *Nucleic Acids Res* 9:3379-3388.
- Hertog JD. 2005. Chemical genetics: drug screens in zebrafish. *Biosci Rep* 25:289-297.
- Kari G, Rodeck U, Dicker AP. 2007. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* 82:70-80.
- Krol A, Carbon P, Ebel J-P, Appel B. 1987. *Xenopus tropicalis* U6 snRNA genes transcribed by Pol III contain the upstream promoter elements used by Pol II dependent U snRNA genes. *Nucleic Acids Res* 15:2463-2478.
- Kudo T, Sutou S. 2005. Usage of putative chicken U6 promoters for vector-based RNA interference. *J Reprod Dev* 51:411-417.
- Kunkel GR, Pederson T. 1988. Upstream elements required for efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used. *Genes Dev* 2:196-204.
- Kunkel GR, Hixson JD. 1998. The distal elements, OCT and SPH, stimulate the formation of preinitiation complexes on a human U6 snRNA gene promoter in vitro. *Nucleic Acids Res* 26:1536-1543.

- Kwak Y-D, Koike H, Sugaya K. 2003. RNA interference with small hairpin RNAs transcribed from a human U6 promoter-driven DNA vector. *J Pharmacol Sci* 93:214-217.
- Lamason RL, Mohideen MPK, Mest JR, Wong AC, Norton, HL, Aros MC, Juryne MJ, Mao X, Humphreville VR, Humbert JE, Sinha S, Moore JL, Jagadeeswaran P, Zhao W, Ning G, Makalowska I, McKeigue PM, O'Donnell D, Kittles R, Parra EJ, Mangini NJ, Grunwald DJ, Shriver MD, Canfield VA, Cheng KC. 2005. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310:1782-1786.
- Lambeth LS, Moore RJ, Muralitharan M, Dalrymple RP, McWilliam S, Doran TJ. 2005. Characterisation and application of a bovine U6 promoter for expression of short hairpin RNAs. *BMC Biotechnol* 5:9.
- Myslinski E, Krol A, Carbon P. 2004. Characterization of snRNA and snRNA-type genes in the pufferfish *Fugu rubripes*. *Gene* 330:149-158.
- Nasevicius A, Ekker S. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genet* 26:216-220.
- Park JB, Levine M. 2000. Characterization of the promoter of the human ribonucleotide reductase R2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 267:651-657.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan Y-L, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS. 2000. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res* 10:1890-1902.
- Saito N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.

- Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5515-5520.
- Weil PA, Segall, J, Harris B, Ng, S-Y, Roeder RG. 1979. Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J Biol Chem* 254:6163-6173.

Table 1 Chromosomal locations of U6 snRNA loci

U6 Locus	Chromosome	Number of loci	Number of copies	strand
U6-1	1	1	2	Minus
	3	2	56	Plus
	4	2	121	Plus and
	5	2	60	Minus
	12	1	6	Plus and
	14	11	260	Minus
	18	1	3	Minus
	20	1	1	Plus and
	23	1	15	Minus
	Not placed	3	31	Plus and
				Minus
				Plus
				Plus
				Plus and
				Minus
U6-2	21	1	1	Minus
U6-3	11	1	1	Plus
U6-4	9	1	1	Minus

The four U6 loci are numbered randomly. “Number of Loci” refers to the number of U6 snRNA locations on each chromosome. “Number of copies” refers to the total copies of each U6 snRNA gene on each chromosome.

Table 2 Primers and oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence
λFix-F	5'-GAGCTCTAATACGACTCACTATAGG-3'
λFix-R	5'-GAGCTCAATTAACCCTCACTAAAG-3'
U6-r1	5'-TATGGAACGCTTCACGAAT-3'
U6-r2	5'-TGCGTGTCATCCTTGCGCAG-3'
U6-r3	5'-TGCGCAGGGGCCATGCT-3'
U6-f1	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACA-3'
U6-f2	5'-TGGAACGATACAGAGAAGAT-3'
cU6-1f	5'-GTGCTCGCTACGGTGGCACA-3'
cU6-2f	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACG-3'
cU6-3f	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACA-3'
cU6-1r	5'-AAAACAGCAATATGGAGCGC-3'
cU6-2r	5'-AAAATGAGGAACGCTTCACG-3'
cU6-3r	5'-AAAAGATGGAACGCTTCACG-3'
pU6-1f	5'-TCCATATTGCTGTTTTAGTGCGTGG-3'
pU6-2f	5'-TGGCTTCAAGTCTCTCAGCG-3'
pU6-3f	5'-TCCGAGAGTCTGTGAATGTT-3'
pU6-1r	5'-TCTAGACTCGAGGGATCCGTGGACAGGCTCAGGGC-3'
pU6-2r	5'-TCTAGACTCGAGGGATCCAGAGCTGGAGGGAGAGC-3'
pU6-3r	5'-TCTAGACTCGAGGGATCCGGAGCCTGGAGGACTGC-3'
slc-plus	5'-GATCCGGGCGACATCGGCGTCAGCTTCAAGAGAGCTGACGCCGA TGTCGCCCTTTTTT-3'
slc-minus	5'-CTAGAAAAAAGGGCGACATCGGCGTCAGCTCTCTTGAAGCTGACG CCGATGTCGCCCCG-3'
pGEM-f	5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'
pGEM-r	5'-GGAAACAGCTATGACCATGA-3'

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Sequences of four zebrafish U6 snRNA genes.

The four U6 snRNA genes were numbered randomly. Note that the sequence of the U6-4 was taken from zebrafish genomic database (NW001514080.1). CCAAT boxes are indicated by a black box. The white and the gray boxes highlight the predicted PSE and TATA box elements, respectively. The start site of transcription, G, is shown as position +1. A dashed box indicates an intragenic control region “box A”.

Termination signals are underlined.

FIG. 2. Phylogenetic tree of the U6 snRNA coding sequences.

The tree was constructed based on the neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987) using the DNA sequences listed below. GenBank accession numbers for the U6 snRNA genes included in the analysis are human (X07425), mouse¹ (X06980), mouse² (M10329), *Xenopus* (M31687) and *Drosophila* (AH004871). Note that the coding sequence of U6-4 is 100 % homologous to that of U6-3.

FIG. 3. RT-PCR of the three U6 snRNA transcripts in various zebrafish tissues.

cDNAs were synthesized from total RNA extracted from various tissues including liver (1), ovary (2), eyes (3), brain (4), gill (5), digestive tracts (6) and testis (7).

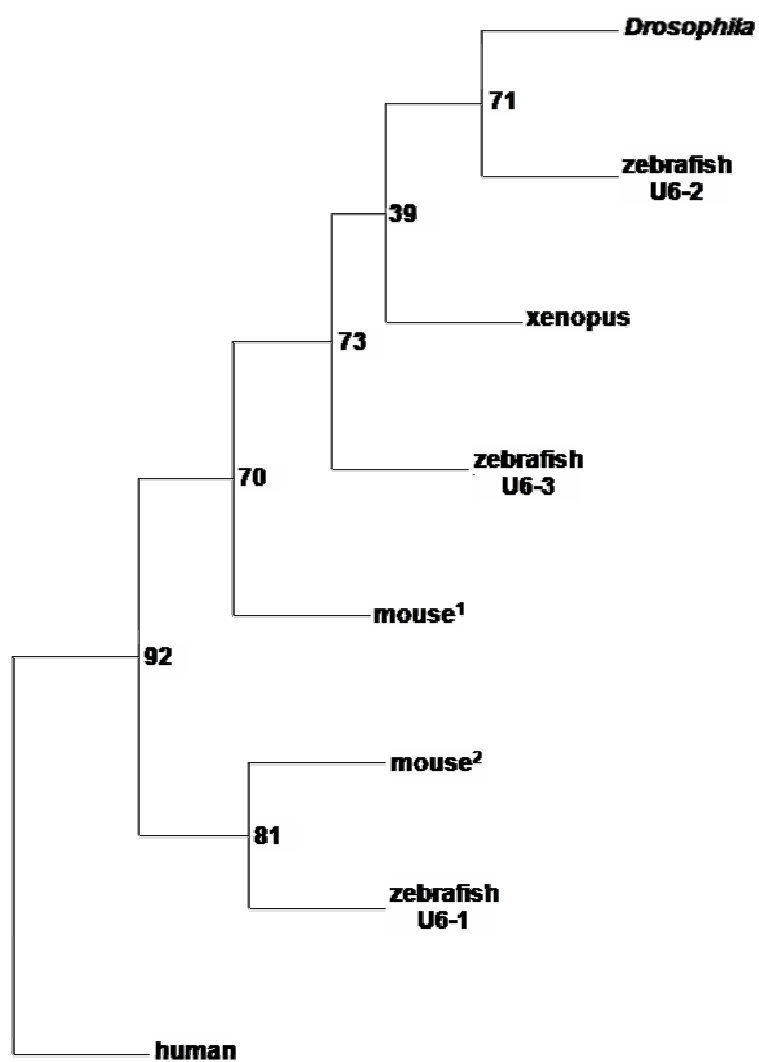
Distilled water was used as the template in the negative control (N). Note that all three of the U6 snRNAs are expressed in all tissues examined.

FIG. 4. Schematic illustrations of the putative zebrafish promoter-driven plasmid vector for shRNA. See Fig. 1 for the PSE sequences. The shRNA fragment consisted of shRNA sense, a 9-mer loop, shRNA antisense and termination sequences. These cassettes were PCR-amplified and used as the template for *in vitro* transcription.

FIG. 5. Northern blot analysis of each of the putative zebrafish promoter-driven shRNAs in cell extracts prepared from zebrafish and Nile tilapia. The structures of the shRNA expression cassettes are shown in Fig 4. U6-1, U6-2 and U6-3 denote the transcripts produced from the templates, which were PCR-amplified from pU6-1shRNA, pU6-2shRNA and pU6-3shRNA, respectively. Note that two bands were observed in each transcription assay, showing that the transcripts consisted of both 4 Ts and 5 Ts.

		-240		-220
U6-1	GTGTGTCAA	CCAA	TGCACCTTCCAAAGCCCTTGC	TTTACTGGGACTTTGCCATA
U6-2	CCGAGACGC	CCAA	TCACT CAAGCCGAGACCAGATAATT	TTTGCATATGCTTTACAGTTT
U6-3	AGAACTCAT	CCAA	TCACT CTAGCCTAAAACCAGCTTTC	TCTGCATATGCTTTACAGCT
U6-4	GAACTCAT	CCAA	TCACTCTA AAGAAACGGCCTGTTTCCTT	CGCATACGCTTTACAGCTCCA
	-200		-180	-160
U6-1	GGCTATCCTGACACTCTAAT		TTTCCCCCTGTCCATAAACTT	GGTGACCTACTGCATCAATC
U6-2	GAATAATTACCACGGTAATTC		CTCACACAAACTCTGGATT	GAGATCCCTTCAGGTTTATC
U6-3	CAAAAATACTACGGTAAAC		TCCACAAAACCTGCTGGTTTC	AAACTTTGAAGGTTTAAAGC
U6-4	AAACTCTACGGTAAACCTAC		ATAAACTGCTGGTTTTCAAA	TTTTAAAGAATTTAAGGGTT
	-140		-120	-100
U6-1	AGTGTGCTTAGCACTGACAG		GGCCAAAGCTCTGTAGTGCA	CGGCATACAAGTGGGAACAT
U6-2	AGTTTGCAGGTTTATGTCAC		CAATGATATAGGGTACAGACTT	GATCTAAGGGAGCTGAATAA
U6-3	ATTTCGCAGGTTTTCCTGAA		GAGGTTTACTGTATGTTTG	AGGTAAATGAGTTGAATAAG
U6-4	TACAGGTTTACTACTACACA		GTGATTTACTGACACATGTA	AGTGTAAATGAGTTGAATAA
	-80	PSE	-60	-40
U6-1	GGCTTTCAGGTTCC	ACCAC	CTTGGAGGAA	CAAT
U6-2	GTGGTTTATGTCAC	TACCAC	CTTCCCAAA	CAAT
U6-3	TAGGTTTATGTCAC	TACCAC	ATGGCAGAA	CAAT
U6-4	GTAAAGTAAGCCATAT	TACCAC	ACATGAAAC	CAAT
	-20		1	20
U6-1	CTGAGCCTGACTGCTGATCT		GTGCTCGCTACGGTGGCACA	TATACTAAAATTTGGATCGAT
U6-2	CTCCCTCCAGCTCTTGGTTC		GTGCTTGTCTTCGGCAGCACG	TATACTAAAATTTGGAACGAT
U6-3	GTCCCTCCAGGCTCCTAGTTC		GTGCTTGTCTTCGGCAGCACG	TATACTAAAATTTGGAACGAT
U6-4	GTCCCTCCAGACTCCCGACTTC		GTGCTTGTCTTCGGCAGCACG	TATACTAAAATTTGGAACGAT
		60	80	100
U6-1	ACAGAGAGGATTAGCATGGC		CCCTGCGCAAGGATGACACG	CAAATTCGTGAAGCGTTCCA
U6-2	ACAGAGAGGATTAGCATGGC		CCCTGCGCAAGGATGACACG	CAAATTCGTGAAGCGTTCCA
U6-3	ACAGAGAGGATTAGCATGGC		CCCTGCGCAAGGATGACACG	CAAATTCGTGAAGCGTTCCA
U6-4	ACAGAGAGGATTAGCATGGC		CCCTGCGCAAGGATGACACG	CAAATTCGTGAAGCGTTCCA
		112		
U6-1	TATGTCTGTTTT			
U6-2	CA-----TTTTT			
U6-3	TC-----TTTT			
U6-4	TC-----TTTT			

Fig 1.

**Fig 2.**

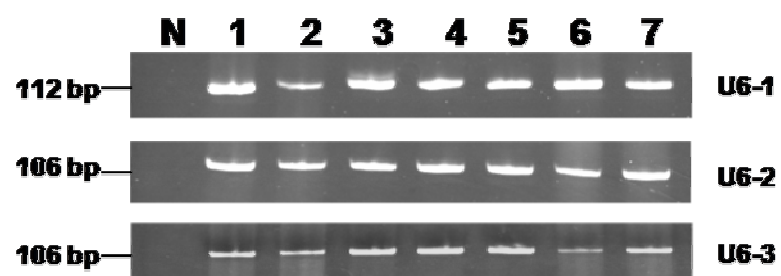
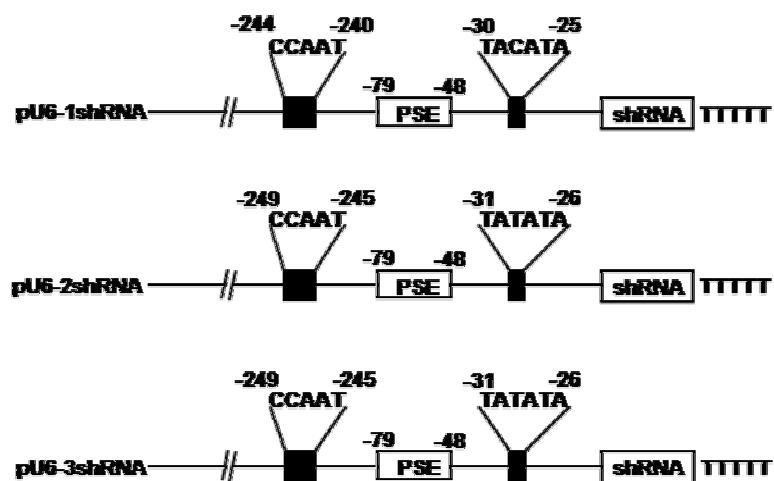


Fig 3.

**Fig 4.**

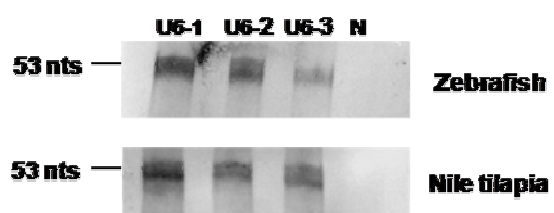


Fig 5.

Gene Knockdown: A Powerful Tool for Gene Function Study in Fish

SURINTORN BOONANUNTANASARN¹

School of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Muang, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Abstract

So far, there are a number of fish genome projects, including experimental and economically important fish that provide available DNA sequence information. However, the function of a gene cannot be deduced only by its DNA sequence. Therefore, a technique with which to investigate the function of the fish gene is needed. Gene knockdown (GKD), or antisense technology, is now being used as a powerful technique to study gene functions in living organisms. GKD effects result from the introduction of an antisense molecule into living cells. The antisense agents bind to target messenger RNA, thus inactivating the target gene expression. The appropriately spatial inhibitory effects on protein production from corresponding gene resulted in the phenotypic change. Therefore, the function of the gene can be understood. To date, there are a number of antisense molecules that can affect efficient GKD in fish. These include antisense oligonucleotides, small interfering RNA, and ribozyme. These antisense molecules cause specific gene inhibitor effects with different mechanisms. The various antisense mechanism types facilitate a number of GKD applications with various approaches in animals. In this review, we demonstrate the characteristics of each antisense molecule, its mechanism, and its application, especially for gene functional analysis in fish.

Recently, fish genome projects have been undertaken in experimental fish species, such as zebrafish, *Danio rerio*; medaka, *Oryzias latipes*; pufferfish, *Fugu rubripes* and *Tetraodon nigroviridis*; and stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. In addition, aquaculture-related genome projects have been available for economically important species (<http://www.animalgenome.org/aquaculture>). Moreover, expression sequence tags (ESTs) databases have been providing comprehensive gene information from small pieces of complementary DNA (cDNA) sequences. ESTs have been studied in a number of fish and shrimp, which are useful for gene identification, expression, and full-length cDNA isolation. However, the functions of many of these genes cannot be deduced from their DNA sequences. These isolated genes cannot be used for any application if their functions are unclear. To complete our knowledge of genes, the development of efficient methods to investigate the role of genes is needed. Gene sequences information together

with gene function studies would lead to a rapid advancement in biotechnological approaches for fish production.

Several efficient methods for the addition or inhibition of gene expression have been developed for studying gene functions. Production of transgenic fish offers a valuable means to study gene function because it permits the detection of phenotypes that have been altered by the addition of a function. The microinjected fish is typically mosaic and a so-called founder fish. Founder fish are bred individually to generate stable, independent lines of transgenic animals that generally exhibit variable expression characteristics. Thus, the transgenic approach is limited in that it is a rather time-consuming process to establish stable transgenics. Gene knockout is a technique for replacing wild-type alleles with mutant ones to produce heterozygous embryos with one to two mutant copies of a specific gene. Therefore, deleting gene products facilitates the comparison of phenotypes that have been changed by loss of function (Moreadith and Radford 1997; Lobe and Nagy 1998). However, creating generations of

¹ Corresponding author.

knockout animals that are necessary to study the role of such a gene *in vivo* is time-consuming, expensive, and labor intensive (reviewed in Stone and Vulchanova 2003). Gene knockdown (GKD) is an alternative technique that is now used for examining the function of a gene whose sequence is known. GKD or antisense technology is a technique to introduce an antisense agent that contains a complementary nucleotide (nt) sequence to target messenger RNA (mRNA) in living cells to inhibit target gene expression. Sequence alignment through nt base pairing of target mRNA antisense molecules leads to the specificity of inhibitory effects on gene expression. Consequently, the role of such a gene can be determined by phenotypic comparison. Therefore, GKD could mimic the loss of function of a gene whose sequence is known. Although GKD may have some limitations, it seems to be the most suitable technique for fish because it requires no specialized facilities and temporary effects can be determined within a generation. The purpose of this review was to demonstrate GKD technology by using various antisense molecules, such as antisense oligonucleotides (AS-ONs), small interfering RNA (siRNA), and ribozyme. Recent studies using antisense agents are revealing, especially for fish. While various GKD approaches were reported to be efficient in mammalian cells, some limited use in fish has also been revealed. We propose to demonstrate that GKD can be a powerful technique to study gene function in fish and other applications, that is, to alter genetic traits of fish (Xie et al. 1997; Nasevicius and Ekker 2000) and to prevent viral diseases (Xie et al. 2005).

Antisense Oligonucleotides

The concept of AS-ONs was first demonstrated by simply using single-stranded DNA to arrest translation *in vivo* (Paterson et al. 1977). Because then, the GKD technology using AS-ONs has been rapidly developed as a powerful research tool with great potential for the study of gene functions. AS-ONs typically consist of 15–25 nts, which are designed in a complementary (antisense) orientation to their

target (sense) mRNA (reviewed in Stone and Vulchanova 2003). Two major mechanisms contribute to their antisense effects when AS-ONs and target mRNA are hybridized in a strictly base pair (bp) specific. First, AS-ONs bind to the target mRNA and then are recognized by ribonuclease H (RNase H), thereby earning the name RNase-H-dependent antisense mechanism (Fig. 1A) (Galderisi et al. 1999a). RNase H is an enzyme that cleaves the RNA strand of a DNA–RNA duplex (Minshall and Hunt 1986). Second, AS-ONs that do not activate RNase H cleavage, but mediate gene silencing by only steric blockage of RNA (Fig. 1A) (Galderisi et al. 1999a; Summerton 1999). The mRNA–AS-ONs duplexes are thought to interfere with numerous RNA-processing steps. These are inhibition of 5'-capping, modulation of splicing, inhibition of 3'-polyadenylation, translational arrest, and disruption of critical RNA structure (Nasevicius and Ekker 2000; Karras et al. 2001; Vickers et al. 2001; Stone and Vulchanova 2003).

Native oligophosphodiester linkages have short half-lives in living cells because of the fact that cells contain a variety of exo- and endonucleases that can degrade native ONs (Wagner 1994). In zebrafish, the dechorinated eggs were incubated in native AS-ON with various concentrations from midblastula until 24-h postfertilization. Although these AS-ON treatments were dose-dependent, gene-interfering effects were limited before segmentation (Barabino et al. 1997). To date, many types of chemically modified AS-ONs have been produced to stabilize ONs against cellular nuclease, increase cellular uptake, enhance their target affinity to target mRNA, improve specific binding to target mRNA, and lower toxicity. In this review, we present only AS-ONs that have been widely reported for gene function analysis, especially in fish.

Phosphorothioate oligonucleotides (PS-ONs) are the main representatives of the first generation of AS-ONs that are best known and most widely used to date. The modification of ONs in which one of the nonbridging oxygen atoms in the phosphodiester bond is replaced by sulphur to phosphorothioate bonds (Fig. 1B). This modification leads to an increased PS-ONs

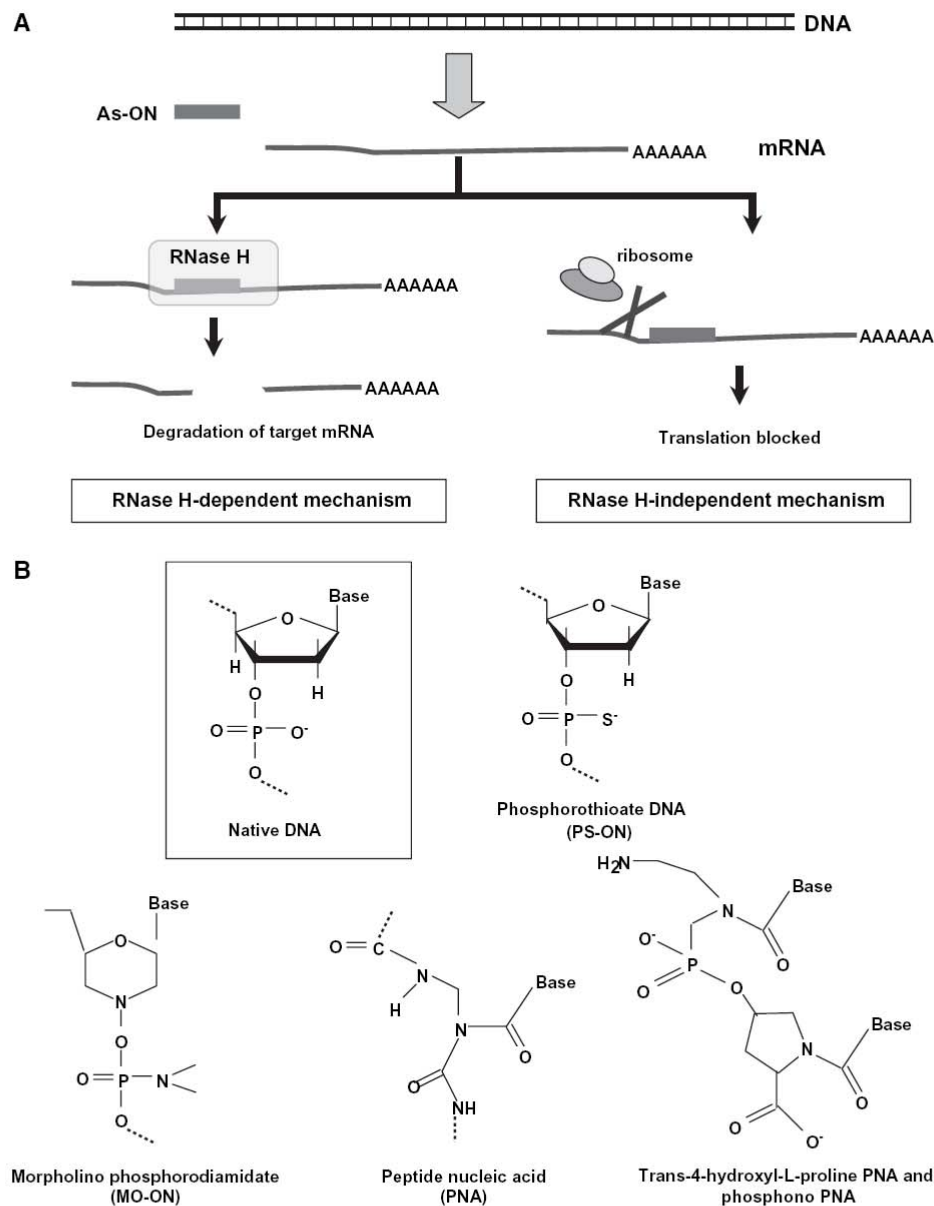


FIGURE 1. Two mechanisms contributing gene knockdown effects by antisense oligonucleotide (AS-ON) (A). AS-ON binds to target messenger RNA (mRNA) and induces the degradation of target mRNA by ribonuclease H (RNase H). This mechanism is called RNase-H-dependent mechanism. AS-ON hybridizes to the target mRNA and blocks the binding of ribosome to translate protein product. Because target mRNA is not degraded, this effect is called RNase-H-independent mechanism. Native oligonucleotide and various modified oligonucleotides that have been used in fish (B).

resistance to cellular nuclease while preserving RNase-H-dependent properties (Galderisi et al. 1999a; Kurreck 2003; Stone and Vulchanova 2003). The main advantage of using PS-ONs for GKD studies is that the confirmation of GKD effects can be performed by evaluation of the amount of mRNA (Muller et al. 1998; Galderisi et al. 1999b). Theoretically, antisense RNase H cleavage would be effective against target sequences elsewhere in the target RNA transcript. Therefore, any gene segment that can be accessed by AS-ONs would have the potential to be an antisense site. The choice of target sequences should be determined with the intention of avoiding the secondary structure of target mRNA, which is identified in advance by a computer-based model of the structure (Zuker and Stiegler 1981). Nevertheless, many target sequences of PS-ONs, if not most, were designed near a translational start site (Galderisi et al. 1999b; Whitehead et al. 2003). PS-ONs also have several disadvantages. For instance, the cellular toxicity of using PS-ONs was caused by that PS-ONs bind to cellular proteins (unrelated target gene) (Brown et al. 1994) and growth factors (Guvakova et al. 1995). Another weakness in using PS-ONs is that the modification of the backbone of PS-ONs results in the reduction of the binding affinity between PS-ONs and target RNA, in comparison to their corresponding phosphodiester ONs (Stein et al. 1997). PS-ON (18-mers) was used to demonstrate memory function in gold fish, *Carassius auratus*. PS-ON-injected gold fish showed antisense effects on ependymin gene expression (Schmidt et al. 1995). In zebrafish, PS-ONs were also used to demonstrate gene function analysis for two hedgehog (*hh*) genes, sonic hedgehog (*shh*), and tiggy-winkle hedgehog (*twhh*). Three regions on two target mRNAs were chosen, such as regions near the N-terminus, the autoproteolytic site, and the C-terminus of each *hh* proteins. PS-ONs (20-mers) were designed to contain 55–80% guanosine and cytosine residues (GC) and verified to not have significant homology with any other known gene sequence. The cocktail of six PS-ONs was coinjected with lipofectamine into the embryo's head to obtain maximal

GKD effects (Stenkamp et al. 2000). PS-ONs could be used for GKD research in fish if combined with an awareness of cellular toxicity and the need to carefully examine phenotype interpretation of gene function.

The second generation of AS-ONs has an alkyl modification at the 2' position of the ribose sugar. The 2'-O-methyl and 2'-O-methoxyethyl RNAs are the most common. The major improvement was to reduce cellular toxicity. Additionally, these AS-ONs were developed to increase stability and nuclease resistance (Kurreck 2003). There are not many instances of the use of these AS-ONs in fish.

The third generation of AS-ONs has been developed to improve antisense properties (i.e., target affinity, nuclease resistance, and low toxicity to living cells). These DNA or RNA analogues are modified with phosphate linkages or riboses, as well as nts with a completely different chemical moiety replacing the furanose ring (Kurreck 2003). One group, morpholino phosphoroamidate oligonucleotides (MO-ONs), is widely used for GKD in fish. Additionally, there have been few reports that have shown the GKD effects in fish using peptide nucleic acids (PNA).

MO-ON has the riboside moiety of each subunit converted to a morpholine ring (morpholine = C_4H_9NO). It uses a phosphorodiamidate intersubunit linkage instead of phosphodiester linkages (Fig. 1B). MO-ONs have shown high stability in living cells, excellent solubility in any transfection or microinjection solution, low cellular toxicity, and even resistance to repeated freezing and thawing. However, MO-ONs are an antisense type that acts only by a steric block mechanism or RNase-H-independent property (Summerton 1999). In other words, MO-ONs only block the translation process. They are presumed to act by preventing binding of ribosomes. Therefore, for the study of gene functions, MO-ONs should be designed to be closely complementary to the start codon (5' sequences at about the first 25 bases past the AUG translation start codon of an mRNA) (Summerton 1999). Gene-interfering effects using MO-ONs were first reported in zebrafish (Nasevicius and Ekker 2000). Because then, MO-ONs have been widely used for gene

function analysis in zebrafish in up to 300 publications. Significant GKD effects of MO-ONs were demonstrated during embryogenesis in transgenic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Boonanuntanasarn et al. 2002). MO-ONs were also used to determine the function of two isozymes of tyrosinase in rainbow trout embryos (Boonanuntanasarn et al. 2004). In addition, a few studies on gene function were undertaken in medaka using MO-ONs (Candal et al. 2004; Yasutake et al. 2004; Yamamoto and Suzuki 2005). Further, the potential of MO-ONs for use as chemotherapeutic agents to inhibit the infectious hematopoietic necrosis virus in fish cell lines has been demonstrated. The MO-ON was conjugated with a membrane-penetrating peptide to deliver MO-ON across cellular membranes. This peptide-conjugated MO-ON was shown to inhibit virus replication (Alonso et al. 2005). In summary, MO-ONs offer potential use as antisense agents not only in experimental vertebrate but also in aquaculture-related fish species.

The limitation of MO-ONs for gene function studies has also been discussed. Because MO-ON elicits its effects solely by blocking translation, it reduces expression of the target protein without affecting mRNA levels (Boonanuntanasarn et al. 2002). Therefore, its antisense action needs to be confirmed at the protein level, using such methods as Western blotting or immunostaining. The limitation of these protein assays is that antibody is not always available. A strategy that was proposed to overcome this limitation is to block pre-mRNA splicing with MO-ON. Binding of an antisense MO-ON to one poten-

tial intron/exon junction could remove the pre-mRNA splicing step (Fig. 2). Consequently, the splice blocking reduced the amount of functional mRNA. GKD effects would be confirmed by evaluation of the amount of functional mRNA (Draper et al. 2001).

PNA is also attractive for gene function study in fish. The phosphodiester linkage of PNA is replaced with a polyamide or peptide (Hyrup and Nielsen 1996) (Fig. 1B). The mechanisms in which PNA acts as GKD agents are similar to that by which MO-ON does. PNA reveals excellent mismatch discrimination, nuclease resistance, and protease resistance but low water solubility. The negatively charged PNA, which is composed of trans-4-hydroxyl-L-proline nucleic acid monomers and phosphono PNA, exhibits higher water solubility. The antisense effects of negatively charged PNA were shown to be better than those of MO-ON in zebrafish. This negatively charged PNA (18-mers) exhibited a potency comparable to MO-ON (25-mers). In addition, the negatively charged PNA showed a stronger hybridization and a greater specificity to target mRNAs than did MO-ONs (Urtishak et al. 2003; Wickstrom et al. 2004; Duffy et al. 2005).

Small Interfering RNA

RNA interference (RNAi) describes a mechanism initiated by double-stranded RNA (dsRNA) that mediates the degradation of homologous mRNA. It is first observed in the nematode, *Caenorhabditis elegans*, that dsRNA was more effective at producing interference than individual antisense RNA strands (Fire et al. 1998). Later, dsRNA-mediated gene silencing was

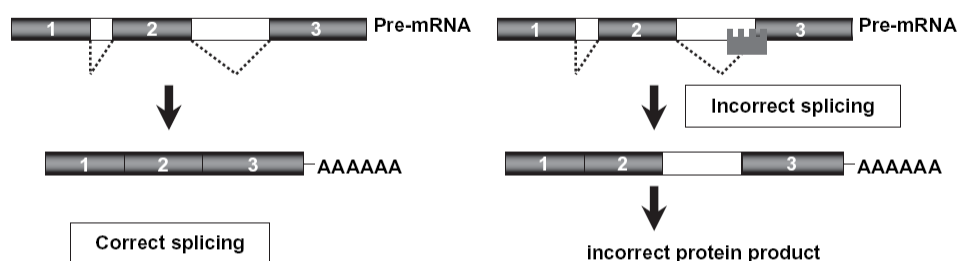


FIGURE 2. Binding of antisense oligonucleotide at the splicing site leads to an incorrect splicing process and results in an incorrect translation product of the particular gene.

intensively studied for its gene-interfering mechanism in many organisms and zebrafish (Wargelius et al. 1999). Functional genomic studies by long dsRNA can be undertaken in invertebrates. However, long dsRNA has been reported to cause nonspecific inhibition of gene expression in mammalian cells (Caplen et al. 2000). The mechanism of nonspecific inhibitory effects was explained as part of an antiviral response as many viruses generate dsRNA intermediates during their replication. These nonspecific effects have been attributed to the activation of dsRNA-dependent protein kinase R (PKR) and 2'-5' oligoadenylate synthetase by dsRNAs longer than 30 bp (Fig. 3). Activated PKR inhibits general translation by phosphorylation of the translation factor eukaryotic initiation factor 2 α (IF2 α), leading to a generalized suppression of protein synthesis. Another dsRNA-response pathway involves the process in which 2'-5'-oligoadenylate synthetase causes a nonspecific reduction of mRNA (Minks et al. 1980; Clemens and Elia 1997; Tian and Mathews 2001). As a result, the activation of either, or both, of these pathways results in a nonspecific downregulation in gene expression. Recently, identification and characterization of PKR-like eukaryotic IF2 α and IF2 α have been investigated in their immunity responses to virus from zebrafish and rainbow trout, demonstrating that the immunity role of fish is conserved between vertebrates (Garner et al. 2003; Rothenburg et al. 2005). Thus, long dsRNA would not be able to cause specific GKD in fish. Indeed, the nonspecific inhibition of gene expression by long dsRNA in zebrafish was also reported (Oates et al. 2000; Zhao et al. 2001).

It has been revealed that the RNAi mechanism in vertebrates is related to the mobilization of transposon and a general defense against virus infection (Tijsterman et al. 2002). The dsRNA-mediated specific gene degradation is explained in two main steps (Fig. 3). First, long dsRNAs are recognized by an adenosine triphosphate (ATP)-dependent ribonuclease from the RNase III family, Dicer. Dicer cleaves the dsRNA into siRNAs of 19–25 nt containing 5'-phosphate and 3'-hydroxyl termini and 3' overhangs of 2–3 nt. Second, these siRNAs are

unwound in an ATP-dependent process and incorporated into a multicomponent nuclease complex, identified in *Drosophila* as the RNA-induced silencing complex (RISC). The siRNAs then guide RISC in the sequence-specific degradation of mRNA in the middle of the target region. The cleaved target RNA may be further degraded by a cellular exonuclease activity. Consequently, translation of the target gene is prevented. Thus, siRNA-mediated gene silencing is so-called posttranscriptional gene silencing (Yang et al. 2000; Zamore et al. 2000). This siRNA–RISC-mediated cleavage of target mRNA is sequence specific. Therefore, it is interesting to investigate the potential uses of siRNA in various strategies. Chemically synthesized duplexes of 21–23 siRNAs were used to examine their specific gene-interfering effects in *Drosophila*, *Cae. elegans*, and mammalian cell lines (Elbashir et al. 2001). siRNAs could bypass the nonspecific effects induced by long dsRNAs and enter the second steps of the RNAi mechanism. In agricultural biotechnology, the use of siRNA for GKD studies in chicken, pig, and cattle has been demonstrated (Karlas et al. 2004; Dai et al. 2005; Paradis et al. 2005).

In fish, the siRNA-mediated gene-inactivating technique was first demonstrated in rainbow trout embryos. Using transgenic fish carrying the green fluorescent protein (GFP) reporter gene, siRNA was able to interfere with transient and stable transgene expression during trout embryonic development. siRNA could also inhibit the expression of maternally inherited mRNA. In addition to transgenic fish, the silencing effect of siRNA was observed in endogenous tyrosinase gene expression (Boonanuntanasarn et al. 2003). In zebrafish, siRNA was shown to target the dystrophin gene, indicating that siRNA had the potential to assist in the investigation of the roles of multiple protein products expressed by a single gene. The results of siRNA-injected zebrafish embryos were similar to the use of MO-ON-targeting pre-mRNA (Dodd et al. 2004). siRNA was shown to have a potent antiviral purpose in a fish cell line, fathead minnow (FHM) cells (muscle cells of FHM). siRNA effectively inhibited the replication of an iridovirus (tiger frog virus) that causes severe disease in fish (Xie et al.

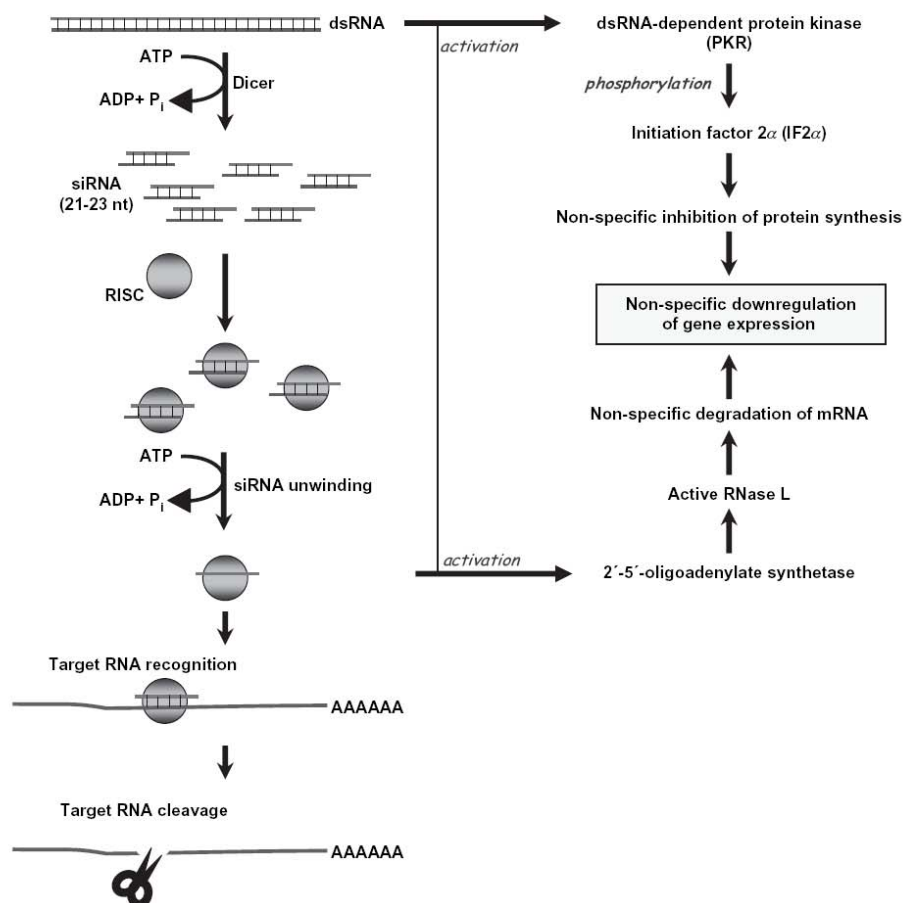


FIGURE 3. Mechanism of RNA interference. The dicer cleaves the double-stranded RNA (dsRNA) substrate into a number of small pieces of RNA, called small interfering RNA (siRNA). RISC denotes RNA-induced silencing complexes. siRNA is recognized and unwound by RISC. Thereafter, siRNA guides RISC in the sequence-specific degradation of the target mRNA. Long dsRNA causes nonspecific inhibition of gene expression by activation of the two pathways. dsRNA activates protein kinase R (PKR) and 2'-5'-oligoadenylate synthetase. A general suppression of protein synthesis is caused by PKR-inhibited phosphorylation of the translation initiation factor 2α (IF2α). Nonspecific mRNA degradation resulted from activation of RNase L by 2'-5'-oligoadenylate synthetase.

2005). The efficient GKD effects of using chemically synthesized siRNAs were reported in fish up to 30 publications. The effects in fish of GKD from siRNA prepared by other sources have also been examined. siRNAs were recently prepared by *in vitro* digestion of long dsRNA using *Escherichia coli* RNase III, which is called esiRNA. esiRNA was able to efficiently interfere with gene expression in mouse embryos (Calegari et al. 2002). However, this approach

was not found in zebrafish. esiRNA alleviated nonspecific defects and toxicity to zebrafish embryos. The explanation for these nonspecific effects was that these esiRNAs contained siRNA sequences that might be homologous with other gene expression (Liu et al. 2005). In addition, *in vitro* transcription of two strands of RNA by commercial RNA polymerase enzymes have been investigated to determine whether this can be an efficient technique. siRNA synthesized by

in vitro transcription with SP6 RNA polymerase was able to produce specific siRNA interference effects in zebrafish (Liu et al. 2005) and in fish cell lines (Xie et al. 2005).

Although it was demonstrated that MO-ON is an excellent GKD agent in many fish species, a siRNA-mediated GKD technique may have some advantages. First, GKD effects can be achieved by using siRNA against a wide range of target mRNA strands, whereas MO-ONs should empirically target the region around the initiation codon. The use of MO-ONs is therefore limited to instances in which the location of the initiation codon of a gene has still not been determined. Recently, a number of genes from aquaculture-related species have been explored by ESTs analysis. ESTs provide information of the DNA sequence of small pieces of cDNA (usually 200–500 nt) that are expressed in target tissue under induced conditions. In cases in which there are many potential genes that are probably involved in any particular role, siRNA would be useful for preliminary screening of gene functions if the characterization of those cDNA is not yet complete. Second, the confirmation of MO-ONs-mediated GKD requires the protein level to be analyzed. This is complicated in some cases depending on the method to measure the protein. In contrast, siRNA-mediated gene inactivation causes a reduction of the level of target mRNA. The confirmation of the GKD effects by siRNA can be evaluated by measuring the target mRNA level, which is simpler.

In *Cae. elegans*, RNAi-mediated effects are stable and passed on to the progenies because the nematode contains RNA-dependent RNA polymerases that amplify siRNAs (Fire et al. 1998). In contrast, siRNA-mediated gene-inactivating effects in mammalian cells are transient. The effects of siRNA in mammalian embryos (including those of fish) are dependent on the amount of siRNAs delivered. These become progressively diluted as cells divide and are digested by cellular nuclease. As a result, a transgene vector for stable expression of siRNAs in vertebrate embryos would be applied for a long-term GKD technology in aquaculture-related species in combination with a transgene-

sis technique. In zebrafish, the transgene vector that contain express small hairpin RNAs (shRNAs) driven by the mouse U6 promoter was also observed to cause silencing effects in fish cell lines. However, the effects were less effective than those from the use of chemically synthesized siRNAs (Xie et al. 2005). Therefore, to improve stable GKD in fish, an expression vector that contains promoter, which can express the large amount of shRNA for fish cell, is needed.

Ribozymes

Naturally existing ribozyme has been found in plants, bacteria, and vertebrates (reviewed in Tanner 1999). Ribozyme (R_z) or catalytic RNA is an RNA molecule that specifically possesses catalytic RNA cleavage activity (McKee and McKee 1999). Catalytic RNAs are categorized into two types according to their size and reaction mechanisms. First, there are three types of large R_z consisting of RNase P and group I and group II introns. These molecules range in size from a few hundred nts to around 3000 nts. The catalytic reactions generate products with 3'-hydroxyls and 5'-phosphate groups. To date, the RNase P gene has been identified and has proved to be actively transcribed in zebrafish embryos (Eder et al. 1996). Nevertheless, there is no evidence in studies to demonstrate gene-targeting study by RNase P. Second, the small R_z s include the hammerhead, the hairpin, hepatitis delta, and Varkud Satellite (VS) RNA. These R_z s range in size from about 35 nts to around 155 nts. The cleavage reactions possess 5'-hydroxyls and a 2',3'-cyclic phosphate groups (Forster and Symons 1987; Tanner 1999). Among them, the hammerhead R_z is the most extensively used for GKD in fish, although it has not been found to be naturally existing in fish.

The hammerhead R_z is the smallest of the naturally occurring R_z s that have been identified to date. Hammerhead R_z consists of at least three components of RNA helices. A model of the minimum structural requirements for R_z -catalyzed RNA cleavage is shown in Fig. 4. The cleavage reactions presumably result from hybridization of two substrate recognition

arms (catalytic arms) to target RNA substrate governed by complementary bases. This brings the reactive group (the conserved secondary structure maintained in R_z forms between two catalytic arms) close to the substrate RNA and then mediates specific cleavage of the target RNA at a conserved GUC target. In general, cleavage occurs after an NUH triplet, where N is any nt, and H is A, U, or C. The rate of cleavage is highest if the triplet is GUC, but other triplets will work nearly as well. Normally, the hybridizing arms of 6–8 bps are considered optimal (Haseloff and Gerlach 1988). Therefore, R_z is theoretically able to target any RNA molecule by altering the sequences of the hybridizing arms and retaining the conserved reactive sequences.

Although the principle of R_z -mediated gene inactivating is simple, actual inactivation *in vivo* can be more complex. Because animal cells contain a variety of proteins, as well as intracellular mRNA, which usually form secondary structures, R_z might not be able to access it to cleave the target mRNA. The identification of potential cleavage sites on the target RNA is a key step toward achieving the most effective GKD. Several attempts have been made to achieve the gene silencing by R_z . For instance, R_z -access-

sible site selection is traditionally based on the prediction of the secondary structure of the target mRNA generated by a computer model (Zuker and Stiegler 1981). Nevertheless, the predicted structure of target mRNA is often inaccurate because of the interaction of mRNA with other cellular proteins. Xie et al. (1997) achieved three potential target sites on the target *no tail (ntl)* gene from zebrafish by computer software analysis. The three R_z s were designed to target against regions surrounding the GUC. However, only one R_z could show effective GKD in zebrafish embryos. Recently, a constitutive transport element (CTE), which is a retroviral nt, has been reported to facilitate the nucleocytoplasmic transport of mRNA. In addition, the CTE was capable of binding to RNA helicase A (Tang et al. 1997). The interaction of RNA helicase with CTE is attributed to the unwinding of the secondary structure of target mRNA (Warashina et al. 2001). The chimeric R_z comprising the hammerhead R_z and CTE was demonstrated to enhance the efficiency of GKD in trout embryos (Boonanutanasarn et al. 2005). However, similar levels of GKD activity by hairpin R_z , with or without CTE, were demonstrated in the inhibition effects on Chronic Hepatitis C virus replicon RNA expression in human hepatoma cell line (Jarczak et al. 2005).

The efficacy of R_z -mediated gene silencing also depends on the amount of stable R_z present in the same subcellular compartment. The R_z structure was incapable of export between the nucleus and the cytoplasm (Eckner et al. 1991). Maximum GKD effects will be achieved if R_z presents in both nucleus and cytoplasm. In addition, the cytoplasmic compartmentalization of R_z and target RNA was shown to be significant for R_z activity for viral therapy (Bertrand et al. 1997). To develop long-term GKD for R_z , it is necessary to have an expression vector that includes elements that express at high level of stable structure of small RNA molecules and that contributes to ("facilitates") the transportation of R_z between nucleus and cytoplasm. In general, the transcript resulting from RNA polymerase II promoter is capped and contains polyadenylated RNAs at the 3' end. These

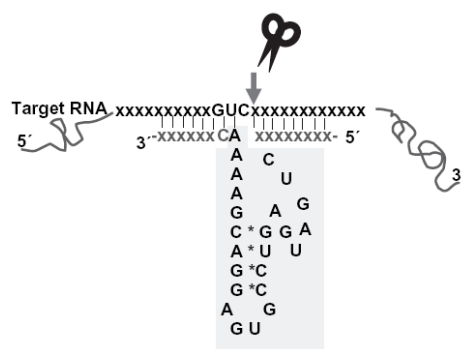


FIGURE 4. Model of minimal structure of hammerhead ribozyme (R_z). Three structures of R_z consist of conserved GUC sequence in the RNA substrate, conserved sequences maintained in the R_z (grey box), and substrate recognition arms or catalytic arms (grey characters). The site of cleavage occurs immediately adjacent to the GUC-conserved sequences.

RNA polymerase II promoted transcripts are able to transport R_z into the cytoplasm. However, it expresses at low levels. In contrast, the RNA polymerase III system (i.e., transfer RNA [tRNA], U6 RNA, and adenovirus) naturally directs small RNA molecules at high level of expression. Thus, the RNA polymerase III system is more attractive to direct high-level expression of R_z in animal models. However, these promoter transcripts are limited mostly to the nucleus (Bertrand et al. 1997). In zebrafish, the GKD effects were carried out to target *ntl* mRNA in both the nucleus and the cytoplasm by using a dual promoter system to control R_z expression. This dual promoter system contains a strong T7 promoter that drives the cytoplasmic R_z expression and a human adenovirus type 2-associated VA_I (VA) gene promoter, which is an RNA polymerase III promoter that drives the nuclear R_z expression. This T7 cytoplasmic expression relies on the codelivery of vector DNA containing T7 RNA polymerase gene driven by the T7 promoter (pT7T7) and T7 RNA polymerase enzyme (Chen et al. 1994). This dual promoter system showed pronounced gene-silencing effects. However, no interfering effect was observed when fish were coinjected without the pT7T7 and T7 RNA polymerase, although there was expression of VA gene promoter. This suggests that most R_z -mediated gene-silencing effects occur in the cytoplasm (Xie et al. 1997). In an attempt to develop a suitable RNA pol III system, human tRNA^{Val}, which is an internal promoter and express small RNA molecules at a constitutive levels, were used. The human tRNA^{Val} was fused at the 5' end of chimeric R_z that contains hammerhead R_z and CTE. The chimeric R_z -CTE construct driven by human tRNA^{Val} promoter showed GKD efficiency in trout embryos (Boonanuntanasarn et al. 2005). The tRNA^{Val} promoter will transcribe the chimeric R_z at constitutive levels. The CTE facilitates the shuttles of chimeric R_z between the nucleus and the cytoplasm and probably attributed the accessibility of R_z to target mRNA in cytoplasm. This chimeric R_z expression strategy seemed to fulfill all criteria that are necessary for R_z -mediated GKD.

Conclusions

As a result of the discovery of antisense effects using diverse antisense agents, many applications of GKD have been rapidly developed in a variety of fish cell lines, experimental fish, and aquaculture-related fish. For obvious purpose, GKD has potential for studying gene function of many known genes. Further, GKD technology constitutes an important application to the biotechnological tools available for fish production. For example, sterile fish may be produced by interfering with a key gene for germ cell development. GKD of myostatin gene expression could be applicable for generation of increased muscle mass of fish. Viral GKD provides effective therapy for a number of viral diseases not only in commercially valuable fish but also in shrimp.

Acknowledgments

The author thanks Goro Yoshizaki and Toshio Takeuchi for helpful support and advice. Financial support of the author's work by The Thailand Research Fund (MRG4880201) is gratefully acknowledged.

Literature Cited

- Alonso, A., D. A. Stein, E. Thomann, H. M. Moulton, J. C. Leong, P. Iversen, and D. V. Mourich. 2005. Inhibition of infectious haematopoietic necrosis virus in cell cultures with peptide-conjugated morpholino oligomers. *Journal of Fish Disease* 28:399–410.
- Barabino, S. M. L., F. Spada, F. Cotelli, and E. Boncinelli. 1997. Inactivation of zebrafish homologue of *Chx10* by antisense oligonucleotides causes eye malformations similar to the ocular retardation phenotype. *Mechanisms of Development* 63:133–143.
- Bertrand, E., D. Castanotto, C. Zhou, C. Carbonnelle, N. S. Lee, P. Good, S. Chatterjee, T. Grange, R. Pictet, D. Kohn, D. Engelke, and J. J. Rossi. 1997. The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA* 3:75–88.
- Boonanuntanasarn, S., G. Yoshizaki, Y. Takeuchi, T. Morita, and T. Takeuchi. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Marine Biotechnology* 4:256–266.
- Boonanuntanasarn, S., G. Yoshizaki, and T. Takeuchi. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310:1089–1095.
- Boonanuntanasarn, S., G. Yoshizaki, K. Iwai, and T. Takeuchi. 2004. Molecular cloning, gene expression

- in albino mutants and gene knockdown studies of tyrosinase mRNA in rainbow trout. *Pigment Cell Research* 17:413–421.
- Boonanuntanasarn, S., T. Takeuchi, and G. Yoshizaki.** 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336:438–443.
- Brown, D. A., S. -H. Kang, S. M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, and M. I. Nerenberg.** 1994. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *Journal of Biological Chemistry* 269:26801–26805.
- Calegari, F., W. Haubensack, D. Yang, W. B. Huttner, and F. Buchholz.** 2002. Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:14236–14240.
- Candal, E., V. Thermes, J.-S. Joly, and F. Bourrat.** 2004. Medaka as a model system for the characterization of cell cycle regulators: a functional analysis of *Ol-Gadd45 γ* during early embryogenesis. *Mechanisms of Development* 121:945–958.
- Caplen, N. J., J. Fleenor, A. Fire, and R. A. Morgan.** 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 252:95–105.
- Chen, X., Y. Li, K. Xiong, and T. E. Wagner.** 1994. A self-initiating eukaryotic transient gene expression system based on cotransfection of bacteriophage T7 RNA polymerase and DNA vectors containing a T7 autogene. *Nucleic Acids Research* 22:2114–2120.
- Clemens, M. J. and A. Elia.** 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 9:503–524.
- Dai, F., F. Yusuf, G. H. Farjah, and B. Brand-Saberi.** 2005. RNAi-induced targeted silencing of developmental control genes during chicken embryogenesis. *Developmental Biology* 285:80–90.
- Dodd, A., S. P. Chambers, and D. R. Love.** 2004. Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS Letters* 561:89–93.
- Draper, B. W., P. A. Morcos, and C. B. Kimmel.** 2001. Inhibition of zebrafish *fg8* pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30:154–156.
- Duffy, K. T., M. F. McAleer, W. R. Davidson, L. Kari, C. Kari, C.-G. Liu, S. A. Farber, K. C. Cheng, J. R. Mest, E. Wickstrom, A. P. Dicker, and U. Rodeck.** 2005. Coordinate control of cell cycle regulatory genes in zebrafish development tested by cyclin D1 knockdown with morpholino phosphorodiamidates and hydroxypropyl-phosphono peptide. *Nucleic Acids Research* 33:4914–4921.
- Eckner, T., W. Ellmeier, and M. L. Birnstiel.** 1991. Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. *The EMBO Journal* 10: 3513–3522.
- Eder, P. S., A. Srinivasan, M. C. Fishman, and S. Altman.** 1996. The RNA subunit of ribonuclease P from the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Biological Chemistry* 271:21031–21036.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl.** 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal* 20:6877–6888.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Forster, A. C. and R. H. Symons.** 1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49:211–220.
- Galderisi, U., A. Cascino, and A. Giordano.** 1999a. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *Journal of cellular physiology* 181:251–257.
- Galderisi, U., G. Di Bernardo, M. A. B. Melone, G. Galano, A. Cascino, A. Giordano, and M. Cipollaro.** 1999b. Antisense inhibitory effect: a comparison between 3'-partial and full phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Journal of Cellular Biochemistry* 74: 31–37.
- Garner, J. N., B. Joshi, and R. Jagus.** 2003. Characterization of rainbow trout and zebrafish eukaryotic initiation factor 2 α and its response to endoplasmic reticulum stress and IPNV infection. *Developmental and Comparative Immunology* 27:217–231.
- Guvakova, M. A., L. A. Yakubov, I. Vlodavsky, J. L. Tonkinson, and C. A. Stein.** 1995. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 270: 2620–2627.
- Haseloff, J. and W. L. Gerlach.** 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334:585–591.
- Hyrup, B. and P. E. Nielsen.** 1996. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorganic and Medical Chemistry* 4:5–23.
- Jarczak, D., M. Korf, C. Beger, M. P. Manns, and M. Kruger.** 2005. Hairpin ribozymes in combination with siRNAs against highly conserved hepatitis C virus sequence inhibit RNA replication and protein translation from hepatitis C virus subgenomic replicons. *FEBS Journal* 272:5910–5922.
- Karlas, A., R. Kurth, and J. Denner.** 2004. Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology* 325:18–23.
- Karras, J. G., M. A. Maier, T. Lu, A. Watt, and M. Manoharan.** 2001. Peptide nucleic acids are potent modulators of endogenous pre-mRNA splicing of the

- murine interleukin-5 receptor- α chain. *Biochemistry* 40:7853–7859.
- Kurreck, J.** 2003. Antisense technologies: improvement through novel chemical modifications. *FEBS Journal* 270:1628–1644.
- Liu, W. -Y., Y. Wang, Y. -H. Sun, Y. Wang, Y. -P. Wang, S. -P. Chen, and Z. -Y. Zhu.** 2005. Efficient RNA interference in zebrafish embryos using siRNA synthesized with SP6 RNA polymerase. *Development Growth and Differentiation* 47:323–331.
- Lobe, C. G. and A. Nagy.** 1998. Conditional genome alteration in mice. *BioEssays* 20:200–208.
- McKee, T. and J. R. McKee.** 1999. *Biochemistry: an introduction*. McGraw-Hill, New York, New York, USA.
- Minks, M. A., D. K. West, S. Benveniste, J. J. Greene, P. O. P. Ts'o, and C. Baglioni.** 1980. Activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa Cells by 2'-O-Methylated Poly (Inosinic Acid)-Poly(Cytidylic Acid). *Journal of Biological Chemistry* 255:6403–6407.
- Minshall, J. and T. Hunt.** 1986. The use of single-stranded DNA and RNase H to promote quantitative 'hybrid arrest of translation' of mRNA/DNA hybrids in reticulocyte lysate cell-free translations. *Nucleic Acids Research* 14:6433–6451.
- Moreadith, R. W. and N. B. Radford.** 1997. Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism. *Journal of Molecular Medicine* 75: 208–216.
- Muller, M., M. Dietel, A. Turzynski, and K. Wiechen.** 1998. Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer* 77:567–571.
- Nasevicius, A. and S. Ekker.** 2000. Effective targeted gene 'Knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics* 26: 216–220.
- Oates, A. C., A. E. E. Bruce, and R. K. Ho.** 2000. Too much interference: injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Developmental Biology* 224:20–28.
- Paradis, F., C. Vigneault, C. Robert, and M. A. Sirard.** 2005. RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 70:111–121.
- Paterson, B. M., B. E. Roberts, and E. L. Kuff.** 1977. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:4370–4374.
- Rothenburg, S., N. Deigendesch, K. Dittmar, F. Koch-Nolte, F. Haag, K. Lowenhaupt, and A. Rich.** 2005. A PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1602–1607.
- Schmidt, R., W. Brysch, S. Rother, and K.-H. Schlingensiepen.** 1995. Inhibition of memory consolidation after active avoidance conditioning by antisense intervention with ependymin gene expression. *Journal of Neurochemistry* 65:1465–1471.
- Stein, D., E. Foster, S. B. Huang, D. Weller, and J. Summerton.** 1997. A specificity comparison of four antisense types: morpholino, 2'-O-methyl RNA, DNA, and phosphorothioate DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Development* 7:151–157.
- Stenkamp, D. L., R. A. Frey, S. N. Prabhudesai, and P. A. Raymond.** 2000. Function for *Hedgehog* genes in zebrafish retinal development. *Developmental Biology* 220:238–252.
- Stone, L. S. and L. Vulchanova.** 2003. The pain of antisense: in vivo application of antisense oligonucleotides for functional genomics in pain and analgesia. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:1081–1112.
- Summerton, J.** 1999. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489:141–158.
- Tang, H., G. M. Gaietta, W. H. Fischer, M. H. Ellisman, and F. Wong-Staal.** 1997. A cellular cofactor for the constitutive transport element of type D retrovirus. *Science* 276:1412–1415.
- Tanner, N. K.** 1999. Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiology Reviews* 23:257–275.
- Tian, B. and M. B. Mathews.** 2001. Functional characterization of and cooperation between the double-stranded RNA-binding motifs of the protein kinase PKR. *Journal of Biological Chemistry* 276:9936–9944.
- Tijsterman, M., R. F. Ketting, and R. H. Plasterk.** 2002. The genetics of RNA silencing. *Annual Review of Genetics* 36:489–519.
- Urtishak, K. A., M. Choob, X. Tian, N. Sternheim, W. S. Talbot, E. Wickstrom, and S. A. Farber.** 2003. Targeted gene knockdown in zebrafish using negatively charged peptide nucleic acid mimics. *Developmental Dynamics* 228:405–413.
- Vickers, T. A., J. R. Wyatt, T. Burckin, C. F. Bennett, and S. M. Freier.** 2001. Fully modified 2'MOE oligonucleotides redirect polyadenylation. *Nucleic Acids Research* 29:1293–1299.
- Wagner, R. W.** 1994. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372:333–335.
- Warashina, M., T. Kuwabara, Y. Kato, M. Sano, and K. Taira.** 2001. RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:5572–5577.
- Wargelius, A., S. Ellingsen, and A. Fjose.** 1999. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 263:156–161.
- Whitehead, B. F., R. Schofield, K. M. Rogers, K. Gustafsson, and J. W. Fabre.** 2003. Modulation of

- adenovirus infection *in vitro* by antisense oligodeoxynucleotides. *Respirology* 8:310–315.
- Wickstrom, E., M. Choob, K. A. Urtishak, X. Tian, N. Sternheim, S. Talbot, J. Archdeacon, V. A. Efimov, and S. A. Farber.** 2004. Sequence specificity of alternating hydroxypropyl/phosphono peptide nucleic acids against zebrafish embryo mRNAs. *Journal of Drug Targeting* 12:363–372.
- Xie, Y., X. Chen, and T. E. Wagner.** 1997. A ribozyme-mediated, gene “knockdown” strategy for the identification of gene function in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13777–13781.
- Xie, J., L. Lu, M. Deng, S. Weng, J. Zhu, Y. Wu, L. Gan, S.-M. Chan, and J. He.** 2005. Inhibition of reporter gene and Iridovirus-tiger frog virus in fish cell by RNA interference. *Virology* 338:43–52.
- Yamamoto, T. and N. Suzuki.** 2005. Expression and function of cGMP-dependent protein kinase type I during medaka fish embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 280:16979–16986.
- Yang, D., H. Lu, and J. W. Erickson.** 2000. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Current Biology* 10:1191–1200.
- Yasutake, J., K. Inohaya, and A. Kudo.** 2004. Twist functions in vertebral column formation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121:883–894.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp, and D. P. Bartel.** 2000. RNAi: Double-Stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25–33.
- Zhao, Z., Y. Cao, M. Li, and A. Meng.** 2001. Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Developmental Biology* 229:215–223.
- Zuker, M. and P. Stiegler.** 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research* 9:133–148.