



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การโคลนและการศึกษาโครงสร้างของนิวเคลียร์อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก
ชนิด U6 ในปลาหมึกลายเพื่อใช้สำหรับเทคนิคยีนคัดควาน

โดย

อาจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสาร

มิถุนายน 2551

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การโคลนและการศึกษาโครงสร้างของนิวเคลียร์อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก
ชนิด U6 ในปลาหมอไทยเพื่อใช้สำหรับเทคนิคยีนนิ่งดาวน์

(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
เมณะเสวต และ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรวิตรกุล (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 นางสาวศิญาภัทร กองร้อย (นักศึกษาปริญญา
เอก) ที่ได้ให้การช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาหมาลายโดยเทคนิคยีนน็อคดาวนได้มีมาอย่างต่อเนื่อง แต่ทว่าการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นเทคนิคยีนน็อคดาวนระยะสั้น ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาพัฒนาของมูลิจิโนมของปลาหมาลายแต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการนำยีนในส่วนโปรโมเตอร์ไปใช้ในการแสดงออกสำหรับ short hairpin RNA (shRNA) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการตัดต่อโปรโมเตอร์เพื่อนำไปใช้สำหรับการสร้างเวกเตอร์สำหรับยีนน็อคดาวน 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 ของสัตว์เลื้อยคลานมากกว่ายีน U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ยีน U6-2 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของ *Xenopus* และ ยีน U6-3 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของแมลงหวี่มากกว่ายีน 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 สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการใช้ในการตัดต่อยีนสำหรับยีนน็อคดาวนระยะยาวได้ในปลาหมาลาย 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 นิวเคลียร์อาร์เอ็นเอขนาดเล็ก
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

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 ทำให้เกิดสถานะที่เซลล์ต่าง 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) และยีนนี้มีความยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการทดลองต่าง 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) อาร์เอ็นเอสายขนาดเล็ก (small interfering RNA; siRNA) และ ไรโบไซม์ (ribozyme) แต่แอนไทเซนส์ทุกตัวมีผลอย่างเดียวกันคือ มีผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจงแต่มีผลต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตอย่างชั่วคราวเท่านั้น เพราะสารแอนไทเซนส์จะมีคงตัวอยู่ในเซลล์ได้ช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น หลังจากนั้นก็จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) ต่าง ๆ ในเซลล์

จึงได้มีการแนวคิดที่จะพัฒนาการนำยีนของยีนอย่างถาวร โดยการถ่ายยีนของยีน (gene transfer) ที่สามารถสร้างแอนไทเซนส์ภายในเซลล์ ทำให้สามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนได้ในระยะยาว หรือสามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนอย่างถาวร ซึ่งก็คือการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของสัตว์โดยการถ่ายยีนที่มีการแสดงออกของสารแอนไทเซนส์ภายในตัวสัตว์ (Vector based gene knockdown) ซึ่งยีนของยีนที่จะนำไปทำให้เกิดยีนนี้มีความอย่างถาวรนั้น ประกอบด้วยส่วนของโปรโมเตอร์ ยีนและส่วนของยีนที่จะนำไปสร้างสารแอนไทเซนส์ โปรโมเตอร์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นโปรโมเตอร์ชนิดอาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส II (RNA polymerase II) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อเทคนิคยีนนี้มีความ เนื่องจากโปรโมเตอร์ชนิดนี้มักจะทำให้ส่วนของอาร์เอ็นเอมีส่วนที่เป็น untranslated region อยู่ทั้งสองปลายของสายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ได้จากการทรานสคริปชัน (transcription) ในขณะที่โปรโมเตอร์ ชนิด อาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส III (RNA polymerase III) จะมีความเหมาะสมมากกว่า เพราะเป็นโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อการสร้างอาร์เอ็นเอสายสั้น ๆ จึงมีการเติมเบสจำนวนน้อยเข้าไปในผลผลิตอาร์เอ็นเอที่ได้จากการทรานสคริปชัน ซึ่งเหมาะสมต่อสารแอนไทเซนส์ เพราะสารแอนไทเซนส์ส่วนใหญ่จะเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก และ โปรโมเตอร์ชนิดอาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส III ยังมีอัตราการแสดงออกที่สูงหรือทำให้มีการผลิตสารแอนไทเซนส์ขนาดเล็กจำนวนมาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขัดขวางการทำงานของยีนในกระบวนการยีนนี้มีความ

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

ข้อมูลลำดับเบสของจีโนมปลาหมาลายจะได้รับการศึกษาอย่างมาก แต่ยังไม่มีการศึกษาการแยกโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อนีโอคาวาน์ ได้แก่ โปรโมเตอร์ของ U6 small nuclear RNA (U6 snRNA) มาใช้ในเทคนิคยีนนีโอคาวาน์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงจะทำการโคลน u6 snRNA promoter จากปลาหมาลาย เพื่อจะใช้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษายีนนีโอคาวาน์ระยะยาวในปลาหมาลาย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยียีนนีโอคาวาน์ระยะยาวในปลาหมาลาย ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่มีความนิยมสูงในการศึกษาหลายสาขาวิชาทั้งในด้านวิทยาศาสตร์บริสุทธิ์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีรวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นต้น และจะนำเอาโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ที่โคลนได้ไปทดสอบการทำงานในปลาชนิดอื่น เพื่อเป็นแนวทางของการนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการแยกยีน U6 snRNA จากปลาหมาลาย และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน U6 snRNA
2. เพื่อการศึกษาเชิงเปรียบเทียบของโครงสร้างของยีน U6 snRNA ระหว่างปลาหมาลายและสัตว์อื่น ๆ ที่ได้มีข้อมูลศึกษาไว้แล้ว
3. เพื่อศึกษาดำแหน่งชุด และตำแหน่งยีนในของยีน U6 snRNA บนโครโมโซมของปลาหมาลาย
4. เพื่อศึกษาการทำงานของยีน U6 snRNA ที่มีอยู่ในจีโนมของปลาหมาลาย
5. เพื่อศึกษาการนำเอาส่วนของโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ไปใช้ในการแสดงออกอาร์เอ็นเอสายสั้น เพื่อการนำไปประยุกต์สำหรับเทคนิคยีนนีโอคาวาน์

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การแยกยีน U6 snRNA เส้นสมบูรณ์จากจีโนมของปลาหมาลาย 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 ระหว่างปลาหมาลายที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับข้อมูล 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. การศึกษาเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับยีนนิ่งคาวาน์ โดยการโคลนส่วนของโปรโมเตอร์ เพื่อนำมาต่อกับส่วนของยีนที่สร้าง short hairpin RNA (shRNA) และทำการตรวจการใช้งานของรีคอมบีแนนท์เวกเตอร์ดังกล่าวในหลอดทดลอง 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
บทคัดย่อ	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 ในปลาม้าลาย	26
ยีน U6 snRNA ในจีโนมของปลาม้าลาย	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 ลำดับเบสของไพรเมอร์และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษา	19
ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสของยีน U6 snRNA ในปลาหมึก	28
ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบความตรงกันของลำดับเบสบริเวณ coding region ของยีน U6 snRNA ในปลาหมึกกับ coding region ของยีน U6 snRNA ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ	28
ตารางที่ 4.3 ตำแหน่งและจำนวนของ U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมึก	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

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

การศึกษาวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งไปสู่การพัฒนาวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนที่ทราบลำดับเบสแล้ว 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 โดยเฉพาะปลายังอยู่ในระดับงานวิจัยเท่านั้น ซึ่งการนำมาใช้ต้องการเทคนิคอื่น ๆ และเครื่องมืออุปกรณ์สารเคมีที่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง สำหรับเทคโนโลยีการเพิ่มยีน การถ่ายยีนที่ต้องการศึกษาเข้าสู่ตัวอ่อนสัตว์นั้น ในทางปฏิบัติยีนที่ถ่ายเข้าสู่ตัวอ่อนสัตว์มักจะมีการเข้าไปรวมกับโครโมโซมหลังการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อน 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 โดยการถ่ายซุดของยีน (gene transfer) ที่สามารถสร้างแอนไทเซนส์ภายในเซลล์ ทำให้สามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนได้ในระยะยาว หรือสามารถขัดขวางการแสดงออกของยีนอย่างถาวร ซึ่งก็คือการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของสัตว์โดยการถ่ายยีนที่มีการแสดงออกของสารแอนไทเซนส์ภายในตัวสัตว์ (Vector based gene knockdown) ซึ่งซุดของยีนที่จะนำไปทำให้เกิดยีนนิ่งคดาวน์อย่างถาวรนั้น ประกอบด้วยส่วนของโปรโมเตอร์ ยีนและส่วนของยีนที่จะนำไปสร้างสารแอนไทเซนส์ โปรโมเตอร์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นโปรโมเตอร์ชนิดอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส II (RNA polymerase II) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อเทคนิค

ยีนนี้อีกด้วย เนื่องจากโปรโมเตอร์ชนิดนี้มักจะทำให้ส่วนของอาร์เอ็นเอมีส่วนที่เป็น 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 ในการศึกษารุ่นนี้จึงจะทำการโคลน 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. เพื่อศึกษาดำแหน่งชุด และตำแหน่งยีนในของยีน U6 snRNA บนโครโมโซมของ ปลาม้าลาย
4. เพื่อศึกษาการทำงานของยีน U6 snRNA ที่มีอยู่ในจีโนมของปลาม้าลาย
5. เพื่อศึกษาการนำเอาส่วนของโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ไปใช้ในการแสดงออกอาร์เอ็นเอสายสั้น เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้ปลาม้าลายเป็นสัตว์ทดลอง โดยทำการเลี้ยงปลาเพื่อนำเอาชิ้นส่วนของครีปลาทำการสกัด genomic DNA และนำเอาอวัยวะภายในมาสกัด อาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และทำการเพาะพันธุ์ลูกปลาเพื่อนำเอาลูกปลามาทดสอบการแสดงออกของยีน นอกจากนี้การศึกษานี้ยังครอบคลุมไปถึงการเพาะพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด เช่น ปลาดุก ปลาไน และปลานิล เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนเมื่อใช้โปรโมเตอร์ที่ได้จากผลการศึกษานี้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

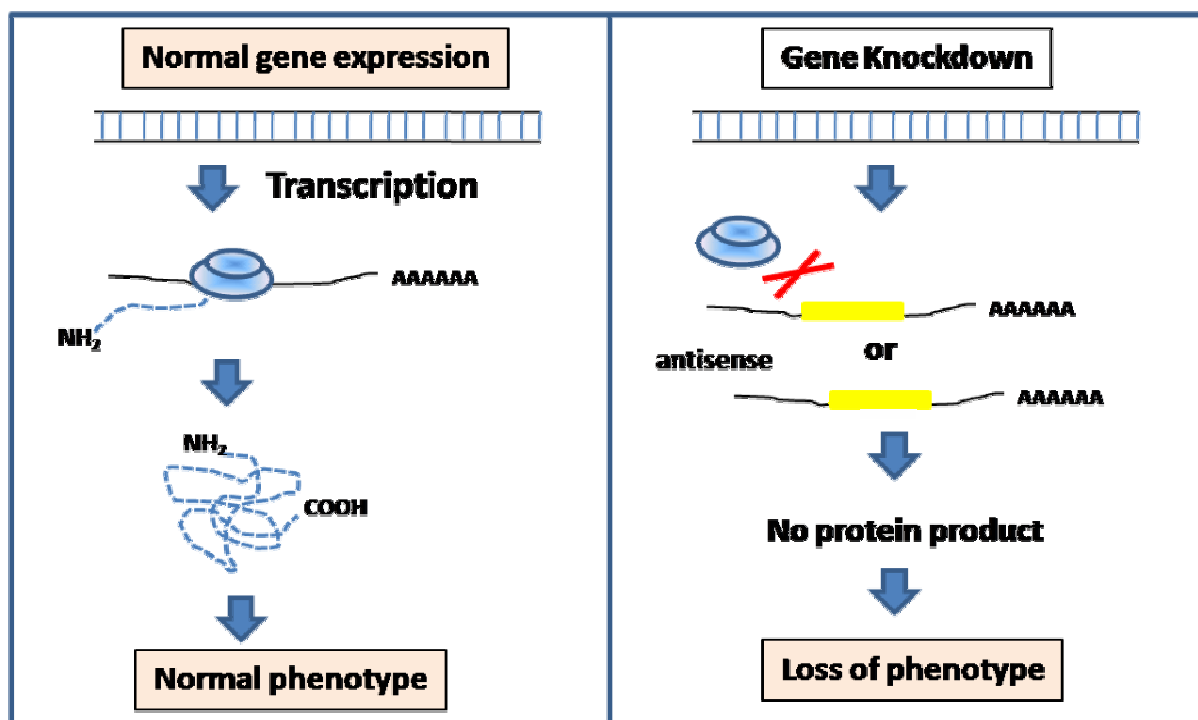
ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพ ทำให้มีการสะสมข้อมูลความรู้ทางด้านลำดับเบสของ ยีนต่าง ๆ ในปลาหลายชนิดอย่างมากมาย อย่างไรก็ตามข้อมูลทางด้านลำดับเบสเพียงอย่างเดียวยังไม่ เพียงพอที่จะทำให้ทราบบทบาทหน้าที่ของยีนได้อย่างสมบูรณ์ จึงไม่สามารถนำข้อมูลความรู้ ทางด้านยีนไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง ดังนั้นในปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์จึงได้พยายามพัฒนา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

ยีนน็อคดาวน์ (Gene knockdown)

ยีนน็อคดาวน์ คือ การขัดขวางกระบวนการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งได้แก่ การขัดขวางกระบวนการทรานสคริปชัน และ/หรือ การที่ mRNA ถูกทำลาย และ/หรือกระบวนการ ที่ขัดขวางการทรานสเลชัน (กระบวนการสร้างโปรตีน) ทำให้การผลิตโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีน ลดน้อยลง หรือถูกยับยั้งในช่วงเวลานั้นส่งผลต่อกระบวนการทางชีวภาพของเซลล์หรือสิ่งมีชีวิต เปลี่ยนไป จึงทำให้สามารถทราบหน้าที่ของยีนนั้น โดยการเปรียบเทียบลักษณะปรากฏที่เปลี่ยนไป เมื่อสิ่งมีชีวิตถูกยีนน็อคดาวน์กับลักษณะปรากฏที่ปกติ (ภาพที่ 2.1) สารที่นำมาใช้ในกระบวนการ ยีนน็อคดาวน์ จะต้องมีความสมบัติที่สำคัญที่จะขัดขวางการทำงานของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งจะ เรียกสารที่นำมาขัดขวางการทำงานของยีนว่า สารแอนไทเซนส์ (antisense agents) สารแอนไทเซนส์ มีหลายชนิดแต่ทุกชนิดจะมีเบสที่เป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สม (complementary base) กับยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา สารแอนไทเซนส์ที่ได้ถูกนำมาศึกษาทางด้าน ยีนน็อคดาวน์ในปลามีหลายชนิด 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 ยีนน็อคดาวน์เกิดจากการค้นพบว่าแอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอขัดขวางการแสดงออกของยีนที่ควบคุม การจำลองตัวเองของพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (Stougaard et al., 1981) และยัง พบยีนของแอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอจำนวนหนึ่งในจีโนมของสัตว์ จึงคาดว่าแอนไทเซนส์อาร์เอ็นเอ อาจจะมียุทธศาสตร์ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สม (Adelman et al., 1987; Celano et al., 1992; Hatzaglou et al., 2002) อย่างไรก็ตามการอธิบายกลไกที่

แอนไทเซนซอร์เอ็นเอไปขัดขวางการทำงานของยีนยังไม่มี การพิสูจน์แน่ชัด ในระยะแรกได้มีการนำเอาแอนไทเซนซอร์เอ็นเอมาใช้ในเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์ในปลา เช่น ในปลาม้าลาย (Roth et al., 1999) และปลาเรนโบว์เทรา (Onchyrhynchus mykiss) (Boonanuntanasarn, unpublished data) แต่พบว่าแอนไทเซนซอร์เอ็นเอมีผลต่อการขัดขวางการทำงานของยีนเป้าหมายในระยะเวลาดสั้น ๆ เท่านั้น อาจเนื่องจากว่าแอนไทเซนซอร์เอ็นเอถูกทำลายโดยนิวคลีเอส (nuclease) ต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ง่าย อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการทดลองการตัดต่อยีนแอนไทเซนซอร์เอ็นเอของยีน gonadotropin releasing hormone (GnRH) ในปลาเรนโบว์เทรา เพื่อทำการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของปลาเรนโบว์เทราเพื่อให้ได้ปลาเรนโบว์เทราที่เป็นหมัน โดยการถ่ายยีนแอนไทเซนซอร์ของ GnRH เข้าสู่ตัวอ่อนปลาเรนโบว์เทรา พบว่าปลาเรนโบว์เทราที่ได้รับการถ่ายยีนของแอนไทเซนซอร์เอ็นเอของ GnRH มีการแสดงออก หรือมีการผลิตแอนไทเซนซอร์เอ็นเอของ GnRH และมีผลทำให้เอ็มอาร์เอ็นเอของ GnRH ซึ่งเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายลดลงได้ แต่ไม่มีผลเพียงพอที่จะทำให้ปลาเรนโบว์เทราเป็นหมันได้ (UZbekova et al., 2000)

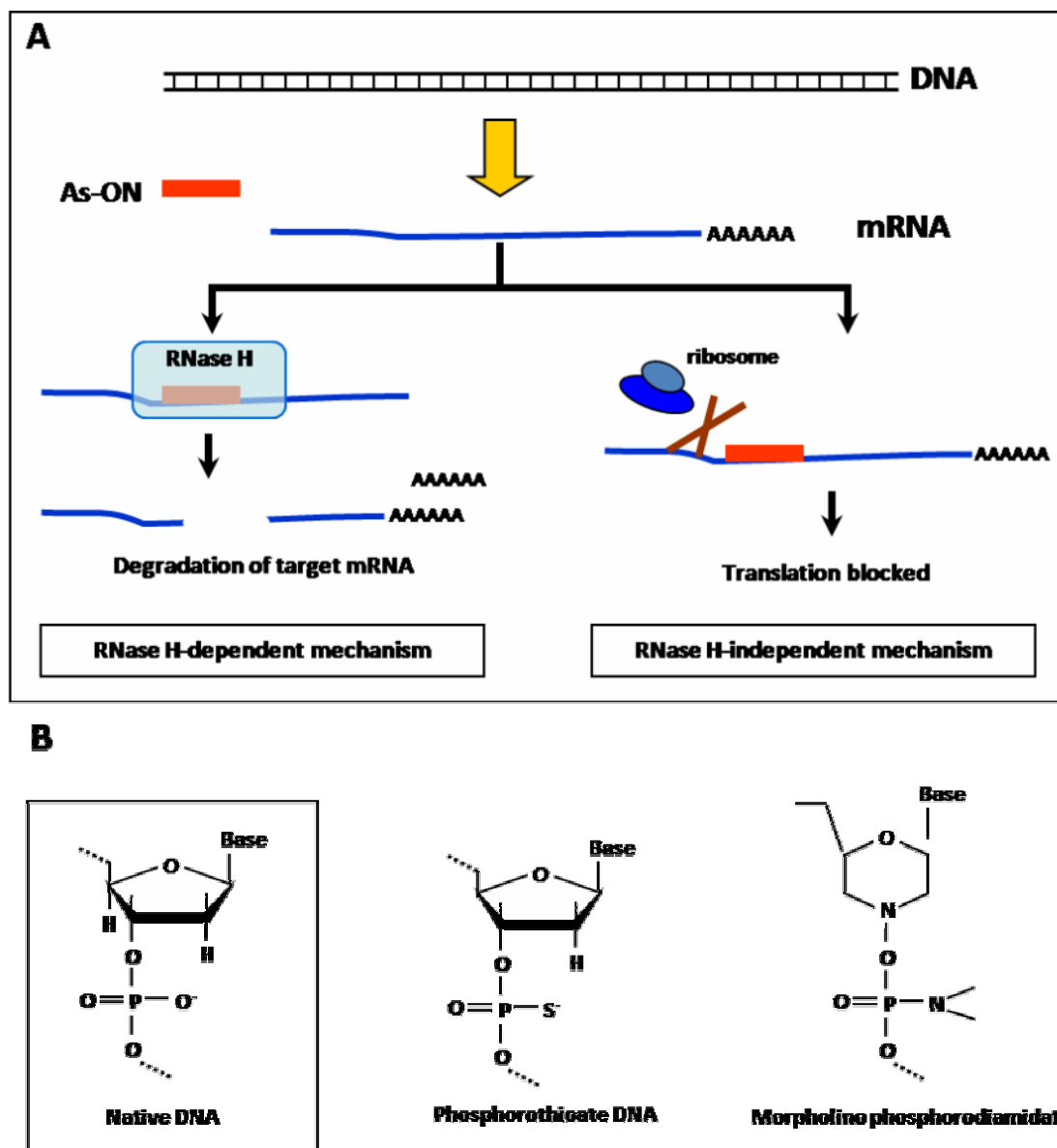


ภาพที่ 2.1 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยปกติ (normal gene expression) และกระบวนการยีนนิ่งคดาวน์ (Gene knockdown) กระบวนการยีนนิ่งคดาวน์ทำให้การแสดงออกของยีนถูกขัดขวาง ทำให้ได้โปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนลดลง ทำให้สิ่งมีชีวิตมีลักษณะปรากฏเปลี่ยนไปเนื่องจากยีนเป้าหมายที่ถูกยีนนิ่งคดาวน์

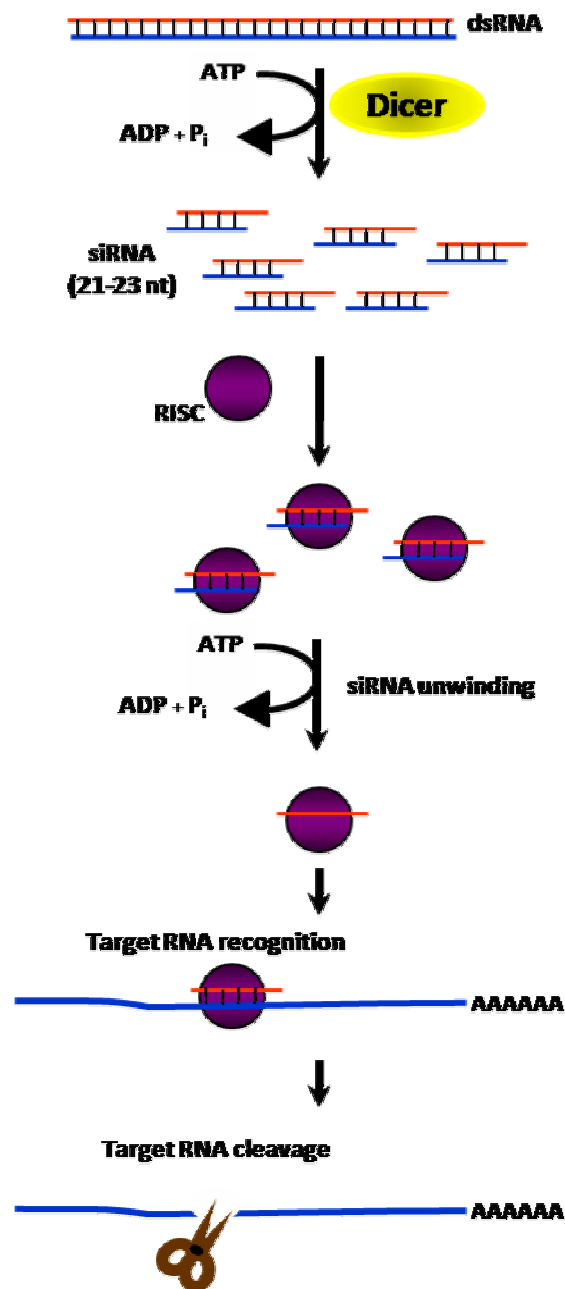
ต่อมาได้มีการนำเอาแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์มาใช้ในเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์ในปลา ผลของแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ต่อการขัดขวางการทำงานของยีนอย่างจำเพาะเจาะจงใน เซลล์สิ่งมีชีวิต ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Paterson et al. (1977) จากนั้นจึงได้มีการทดลองนำเอาแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการขัดขวางการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์สิ่งมีชีวิต (Stephenson and Zamecnik, 1978; Zamecnik and Stephenson, 1978) มีการพัฒนาเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์โดยแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์อย่างต่อเนื่อง เพราะเป็นเทคนิคที่ไม่ยุ่งยาก โดยใช้แอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 15-25 นิวคลีโอไทด์ และได้มีการพัฒนาเป็นแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์แบบดัดแปลง (modified oligonucleotide) โดยการเปลี่ยนโครงสร้างแกนหลักของแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์แต่ยังคงส่วนประกอบของเบสกลุ่มไว้ เพื่อให้มีความคงตัวในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้นานขึ้น ได้แก่ phosphorothioate oligonucleotides (ภาพที่ 2.2) ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีระยะเวลาการทำงานยาวนาน แต่มักจะเกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์สัตว์ จึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์เป็น morpholino phosphorodiamidates oligonucleotides (ภาพที่ 2.2) ซึ่งมีความเป็นพิษลดลง สามารถจับกับอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ดีขึ้น กลไกการทำงานของแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ในการขัดขวางการทำงานของยีนเป้าหมายมี 2 กลไก อธิบายดังภาพที่ 2.2 มีการนำแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีน ใช้เป็นยารักษาโรคไวรัส และ ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการผิดปกติของยีน (Braat et al., 2001; Galderisi et al., 1999; Schmajuk et al., 1999; Lacerra et al., 2000; The vitravene group, 2002) ได้มีการนำเอาแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาหลาย ปลาเมดาอะ และปลาเรนโบว์เทรา (Nasevicius and Ekker, 2000; Boonanuntanasarn et al., 2002; Boonanuntanasarn et al., 2004; Yasutake et al., 2004; Candel et al., 2004; Yamamoto and Suzuki, 2005) โดยจะเห็นได้ว่ามีผลงานวิจัยการใช้แอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ในการยีนนิ่งคดาวน์ปลามากกว่า 300 ฉบับ

ถึงแม้ว่าแอนไทเซนซ์โอลิโกนิวคลีโอไทด์จะเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับเทคนิคยีนนิ่งคดาวน์ แต่ว่าผลของการหยุดยั้งการแสดงออกของยีนเกิดเพียงระยะสั้น จึงจำกัดการใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในระหว่างการพัฒนาการของไข่ปลาหรือระยะตัวอ่อนของปลาเท่านั้น และ การทำงานของแอนไทเซนซ์ morpholino phosphorodiamidates oligonucleotides ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างหลักจนทำให้ เอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอส (RNase H) ไม่สามารถจดจำได้ จึงทำให้ผลของการขัดขวางการแสดงออกของยีน เป็นแค่เพียงการป้องกันการการทำงานของไรโบโซมในการเข้าไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนเท่านั้น ทำให้การตรวจสอบการทำงานของยีนนิ่งคดาวน์ต้องการเทคนิคในการวัดปริมาณโปรตีน ซึ่งวิธีการวัดระดับโปรตีนหลายชนิดต้องการเทคนิคที่ซับซ้อน จึงได้มีการนำเอาเอสไออาร์เอ็นเอ (siRNA; small interfering RNA) มาทดลองใช้ในการขัดขวางการทำงานของยีนในปลาเรนโบว์เทรา (Boonanuntanasarn et al., 2003)

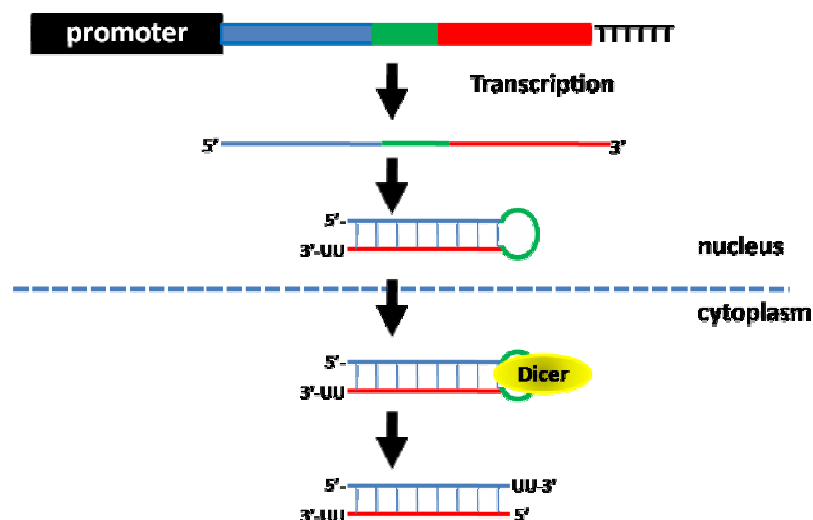
และปลาหมึกลาย (Dodd et al., 2004) กลไกการทำงานของเอสไออาร์เอ็นเอในการตัดเอ็มอาร์เอ็นเอ เป้าหมายอธิบายได้ดังภาพที่ 2.3 เนื่องจาก siRNA เป็น โมเลกุลของอาร์เอ็นเอที่ไม่ได้มีการดัดแปลง จึงสามารถที่จะนำไปประยุกต์กับเทคนิคการถ่ายยีน (Gene transfer) โดยการสร้างเป็นดีเอ็นเอสาย สั้นที่ต่อเข้ากับ โปร โมเตอร์ที่เหมาะสม ซึ่งดีเอ็นเอสายสั้นนี้จะประกอบด้วยส่วนของ sense strand, loop และ antisense strand เมื่อดีเอ็นเอถูกทรานสคริปชัน จะได้อาร์เอ็นเอที่เรียกว่า short hairpin RNA (shRNA) ซึ่งเป็นเส้นอาร์เอ็นเอที่ม้วนมาจับกันด้วยเบสคู่สม แล้ว shRNA จะถูก dicer ภายใน เซลล์ตัดส่วนของ loop ออกไป แล้วเปลี่ยนเป็น siRNA (ภาพที่ 2.4) เพื่อไปขัดขวางการแสดงออก ของยีนดังภาพที่ 2.3 ต่อไป



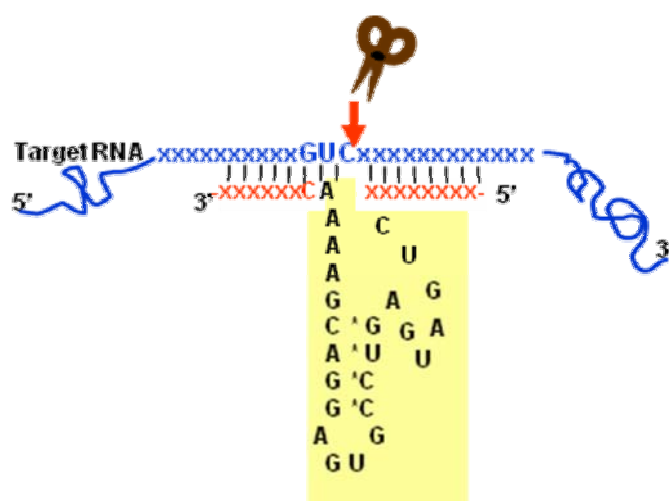
ภาพที่ 2.2 กลไกการขัดขวางการแสดงออกของยีนโดยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (A) และ โครงสร้างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีการดัดแปลง (B) กลไกยีนนี้คัดค้านแบ่งออกเป็น 2 กลไกหลัก คือ RNase H-dependent mechanism คือ การที่แอนไทเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์เข้าไปจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย แล้วทำให้เอ็นไซม์ RNase H ซึ่งจดจำโครงสร้างที่อาร์เอ็นเอจับกับดีเอ็นเอ 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 เข้าสู่กระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนตามภาพที่ 2.3 ต่อไป



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของไรโบไซม์ (ribozyme) และยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยไรโบไซม์

นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิคอื่นนี้อีกด้วยโดยการใช้ไรโบไซม์ ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอที่มีฟอรัมรูปร่างพิเศษ ไรโบไซม์ที่นิยมสำหรับยีนนี้อีกตัวในปลา คือ ไรโบไซม์หัวน้อน (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-snrRNAs) (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 โรโบไซม์เปลี่ยนไป ซึ่งโครงสร้างที่เปลี่ยนไปนั้นอาจทำให้ไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการจัดขบวนการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้

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

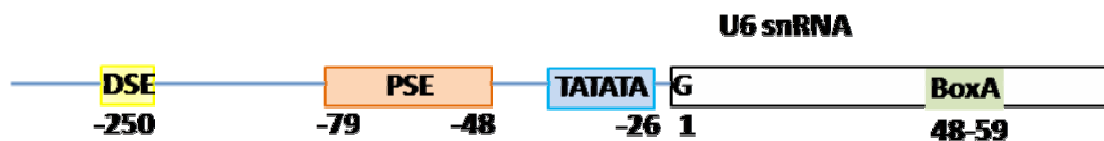
Pol III ทำหน้าที่ในการสร้างอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโปรตีน ได้แก่ tRNA, 5S RNA และ small nuclear RNA (snRNA) บางชนิดซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA splicing สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ Type I promoter ซึ่งจะอยู่ใน ribosomal 5 S gene, Type II promoter สร้าง tRNA และ adenovirus 2 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 ไปใช้สำหรับเทคนิคยีนน็อคดาวน์ โดยได้มีการนำเอาโปรโมเตอร์ของ tRNA ไปเชื่อมต่อกับยีนของโรโบไซม์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการนำไปใช้ในการสร้างโรโบไซม์ด้านไวรัสโรคเอดส์ (Kuwabara et al., 1999; Warashina et al., 2001) และนำไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีน *neuregulin-1* ในหนู (Zhao and Lemke, 1998) ในปลาเรนโบว์เทรา (Boonanuntanasarn et al., 2005) ต่อมาเมื่อได้มีการรายงานการทดลองถึงประสิทธิภาพในการใช้ siRNA ในเทคโนโลยียีนน็อคดาวน์ ทำให้มีการวิจัยพัฒนาโปรโมเตอร์ชนิด Pol III ที่อยู่ในกลุ่ม Type III promoter มาใช้สำหรับยีนน็อคดาวน์ ได้แก่ โปรโมเตอร์ของ U6 snRNA นำมาต่อเข้ากับยีน shRNA เพื่อใช้สำหรับการศึกษาหน้าที่ของยีน และการน็อคดาวน์ยีนระยะยาว (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

1. Distal sequence element (DSE)

กลุ่มของนิวคลีโอไทด์ที่จะพบที่ตำแหน่งประมาณ -250 ประกอบด้วยกลุ่มของลำดับเบสที่ทำหน้าที่เป็น enhancer ในการแสดงออกของยีน โดยในยีน U6 snRNA ในคน หนู *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 สำหรับเทคนิคยีนนิ่งอีกดาวน์ อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานไว้ว่า โปรโมเตอร์ U6 snRNA ทำงานได้จำเพาะต่อชนิดของสัตว์ (Das et al., 1987) สำหรับการศึกษา ยีน U6 snRNA ในปลา พบว่ามีรายงานการศึกษา ยีนในกลุ่ม 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) นอกจากนี้ปลาม้าลายยังมีข้อมูลลำดับเบสของจีโนมที่เกือบสมบูรณ์ (<http://Zfin.org>) จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาม้าลาย อย่างต่อเนื่อง 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 สำหรับเทคนิคยีนนอกคาวนจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยียีนนอกคาวนระยะยาวในปลาม้าลาย เพื่อประโยชน์ในการใช้ปลาม้าลายเป็น โมเดลศึกษาวิจัยทางการแพทย์ ด้านชีววิทยา และด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

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

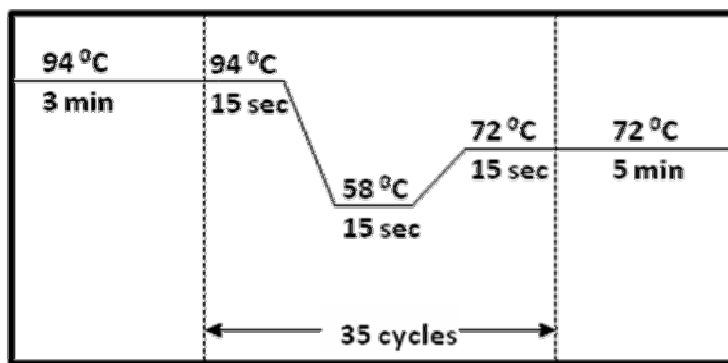
Primer	Sequence
λFix-F	5'-GAGCTCTAATACGACTCACTATAGG-3'
λFix-R	5'-GAGCTCAATTAACCCTCACTAAAG-3'
U6-r1	5'-TATGGAACGCTTCACGAAT-3'
U6-r2	5'-TGCGTGTCATCCTTGCGCAG-3'
U6-r3	5'-TGCGCAGGGGCCATGCT-3'
U6-f1	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACA-3'
U6-f2	5'-TGGAACGATACAGAGAAGAT-3'
cU6-1f	5'-GTGCTCGCTACGGTGGCACA-3'
cU6-2f	5'-GTGCTTGCTTCGGCAGCACG-3'
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 อัณฑะ 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

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

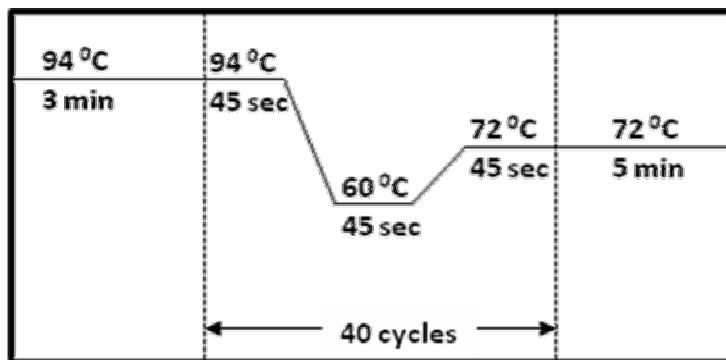
นำส่วนประกอบของปฏิกิริยา annealing ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

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

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

สถานะในการทำ PCR



ไพรเมอร์ pGEM-f และ pGEM-r

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

6.3 การผลิตสารสกัด RNA polymerase III จากปลาม้าลาย

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

6.3.1 นำลูกปลาม้าลายที่ระยะที่มีการใช้อาหารจากถุงไข่แดงหมด 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 โดยใช้ น้ำสะอาดปราศจาก 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 phenoxylethanol 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. การทดลองศึกษาการใช้รีคอมบีแนนท์เวกเตอร์ในข้อ 6 ต่อการทดสอบการแสดงออกในสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III จากกุ้งวัยอ่อนที่ระยะ post larvae 10-15 ทำการสลับกุ้งโดยการแช่กุ้งในสารละลาย PBS ที่แช่ในน้ำแข็ง จนกุ้งสลบ แล้วหั่นตัวอย่างกุ้งเป็นชิ้นเล็กๆ 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 ในปลาม้าลาย

จากการโคลนยีนในบริเวณของโปรโมเตอร์และบางส่วนของ coding region ของยีน U6 snRNA จากจีโนมของปลาม้าลาย ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ genomic DNA library ของปลาม้าลาย เป็นยีนต้นแบบ ได้ผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 550 เบสเพอร์ จากนั้นทำการโคลนผลิตขึ้น ดังกล่าวนี้นำเข้าสู่ 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” ซึ่งมีส่วนประกอบของลำดับเบสที่ถูกจำแนกว่ามีความสำคัญในการทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ถูกทรานสคริปต์โดย RNA polymerase III และเป็นส่วนที่สำคัญต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่มีส่วนของโปรโมเตอร์อยู่ภายใน coding sequences อย่างไรก็ตาม intragenic “box A” ไม่ได้เป็นส่วนที่จำเป็นต่อการทรานสคริปต์ของยีนในกลุ่ม RNA polymerase III ที่มีส่วนของโปรโมเตอร์อยู่ข้างนอก coding sequences

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