

		-240		-220
U6-1	GTGTGCAA	CCAA	TGCACTTCCAAAGCCCTTGC	TTTACATGGGACITTTGCCATA
U6-2	CCGAGACGC	CCAATCACT	CAAGCCGAGACCAGATAATT	TTGCATATGCTTTACAGTTT
U6-3	AGAACTCAT	CCAATCACA	CTAGCCTAAAACCAGCTTCC	TCTGCATATGCTTTACAGCT
U6-4	GAACTCAT	CCAATCACTCTA	AAGAAACGGCCTGTTCCTT	CGCATACGCTTACAGCTCCA
	-200	-180		-160
U6-1	GGCTATCC	TGACACTCTAAT	TTCCCCCTGTCCATAAACTT	GGTGAACCTACATCAATC
U6-2	GAAAATTAC	CACGGTAATCC	CTCACACAAACTCTGGATTT	GAGATCCTTCAGGTTTTATC
U6-3	CAAAAATAC	TACGGTAACCC	TCCACAAAACCTGCTGGTTTC	AAACTTTGAAGGTTTTAAGC
U6-4	AAACTCTAC	GGTAACCTTAC	ATAAACTGCTGGTTTTTCAAA	TTTTAAAGAAATTAAGGGTT
	-140	-120		-100
U6-1	AGTGTGCC	TAGCACTGACAG	GGCCAAAGCTCTGTAGTGCA	CGGCATACAAGTGGGAACAT
U6-2	AGTTTGCAG	GTTTATGTTCAC	CATGATATAGGGTTCAGACTT	GATCTAAGGGAGCTGAATAA
U6-3	ATTCGCAGG	TTTTCTCTGAA	GAGGTTTACTGTGATGTTTG	AGGTAAATGAGTTGAATAAG
U6-4	TACAGGTT	TACTACTACACA	GTGATTTACTGACACATGTA	AGTGTAAATGAGTTGAATAA
	-80	PSE	-60	-40
U6-1	GGCTCTCCAG	GTCCACCAC	CTTGGAGGAAACATTTGCTGGG	ACTCGAGGCGTACATATGCC
U6-2	GTGGTTTATG	TCAGTCACCAC	CTTCCAAAACATATACCCAGA	AGTCCCTGGTATATATAGCT
U6-3	TAGGTTTATCC	ACTTACCAC	ATGGCAGAAACATATACCCAGA	AGTCCCGGATATATATAGCA
U6-4	GTAAGTAAGCC	ATATACCAC	ACATGAAACACATATACCCAGA	AGTCACITGGTATATATAGCC
	-20	1	20	40
U6-1	CTGAGCC	TGACTGCTGATCT	GTGCTCGCTACGGTGGCACA	TATACTAAAATTTGGATTCGAT
U6-2	CTCCCTCCAG	CTCTTGGTTC	GTGCTTGTCTTCGGCAGCAG	TATACTAAAATTTGGAACGAT
U6-3	GTCTCCAGGCT	CTCTAGTTC	GTGCTTGTCTTCGGCAGCACA	TATACTAAAATTTGGAACGAT
U6-4	GTCTCCAGACT	CTCCAGCTC	GTGCTTGTCTTCGGCAGCACA	TATACTAAAATTTGGAACGAT
		60	80	100
U6-1	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGAAAGGATGACACG	CBAATCCGTGAAGCGCTCCA	
U6-2	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGCAAGGATGACACG	CBAATTCGTGAAGCGTTCCCT	
U6-3	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGCAAGGATGACACG	CBAATTCGTGAAGCGTTCCA	
U6-4	ACAGAGAGATTAGCATGGC	CCCTGCGCAAGGATGACACG	CBAATTCGTGAAGCGTTCCA	
U6-1	TATGTCTGTTTT	112		
U6-2	CA-----TTTTT	107		
U6-3	TC-----TTTT	106		
U6-4	TC-----TTTT	106		

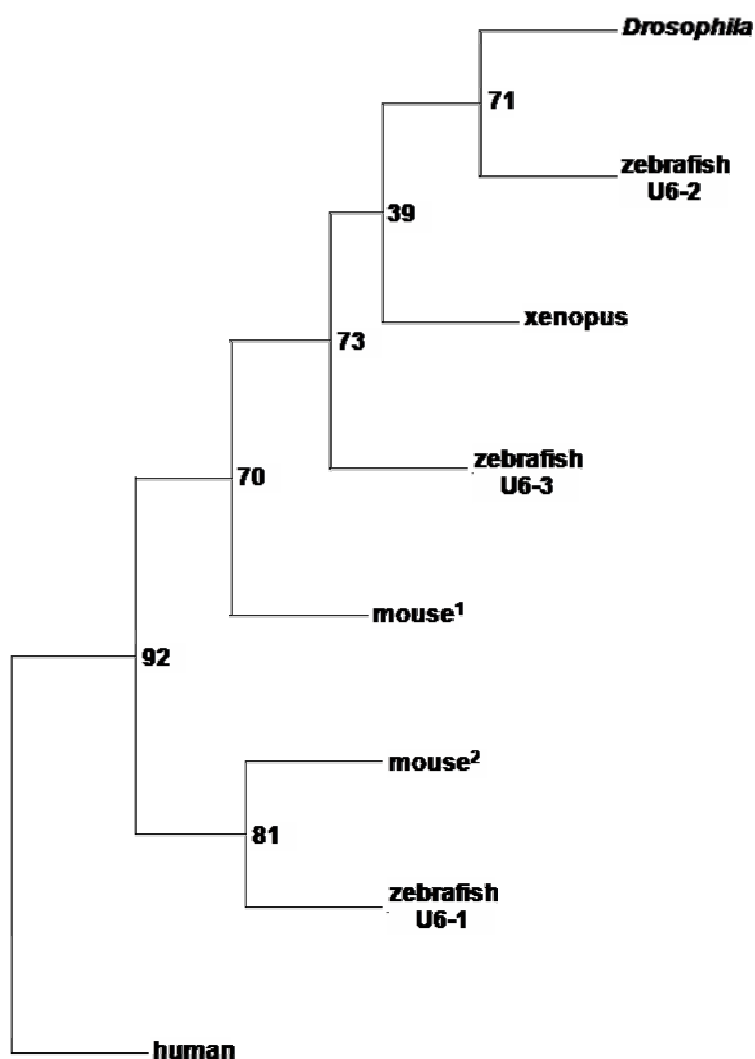
ภาพที่ 4.1 ลำดับเบสของยีน U6 snRNA ของปลาม้าลาย พบยีน U6 snRNA 4 ชนิด (U6-1, U6-2, U6-3 แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ U6-4 พบจาก zebrafish genomic database ในปลาม้าลาย การตั้งชื่อยีนในการศึกษาครั้งนี้เป็นการตั้งชื่อแบบสุ่ม ลำดับเบสของยีน U6-4 ได้จาก zebrafish genomic database (NW001514080.1) กลุ่มของลำดับเบส 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 ในปลาหมอชายน

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 ในปลาหมอชายนกับ 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 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากกว่า U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ U6-2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ U6 snRNA ของแมลงหมีมากกว่า 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 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเบสไทมิดีน (thymidine; T) และอะดีโนซีน

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

ยีน U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมอ

ในการศึกษาดำเนินงานของยีน 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

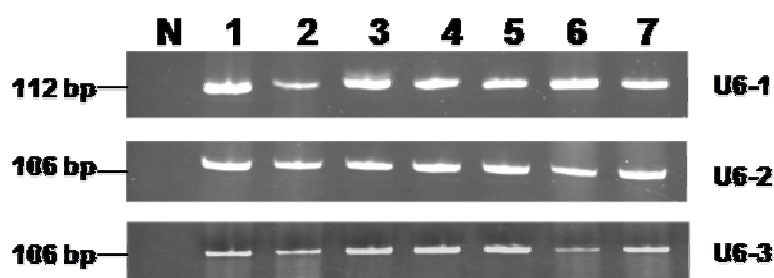
นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ Blastn โดยใช้ฐานข้อมูลของจีโนมปลาหมอ พบยีน U6 snRNA อีก 1 ชนิด จึงได้ตั้งชื่อเป็น U6-4 ดังนั้นจึงได้นำข้อมูลลำดับเบสของยีน U6-4 จากในฐานข้อมูลมาใช้ในการศึกษาค้นคว้า พบว่า ยีน U6-4 มีลำดับเบสที่ coding region ตรงกันกับ coding region ของ U6-3 ทั้งหมด นอกจากนี้ในบริเวณโปรโมเตอร์ของ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

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

ตารางที่ 4.3 ตำแหน่งและจำนวนของ U6 snRNA ในจีโนมของปลาหมอ

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

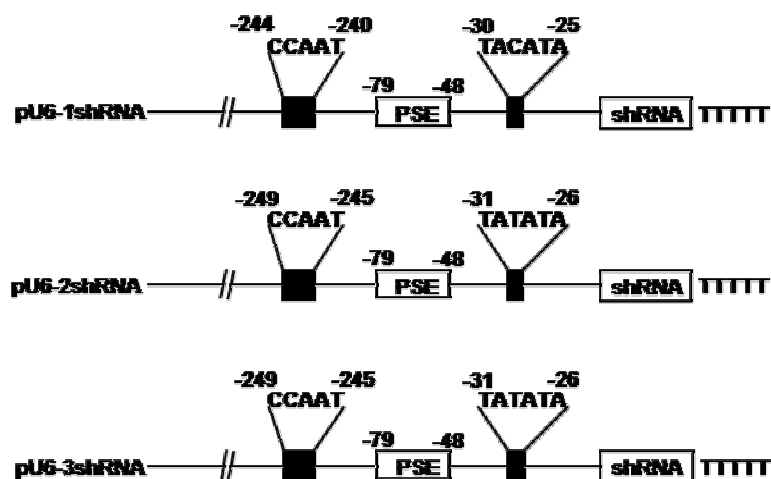
การประยุกต์ใช้โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA เพื่อการแสดงออก short hairpin RNA (shRNA)

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

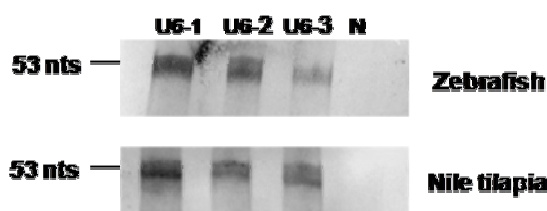
นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของโปรโมเตอร์ของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 กับการแสดงออกในปลาชนิดอื่น ๆ โดยการใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III ที่ได้จากปลาฉลาม ปลาไน และปลานิล พบว่าโปรโมเตอร์ของยีน U6-1, U6-2 และ U6-3 ของปลาหมากลายสามารถทำงานได้เมื่อใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA polymerase III ที่ได้จากปลานิล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

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ยังขยายขอบเขตในการทดสอบการประยุกต์ใช้โปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ทั้ง 3 ชนิดของปลาหมากลายในสัตว์น้ำเศรษฐกิจอื่น เช่น การใช้สารสกัดเอนไซม์ RNA

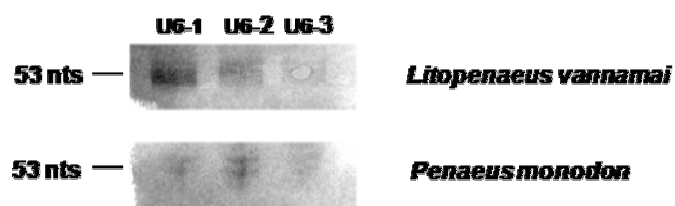
polymerase III จากกึ่งกลางดำ และกึ่งขาว พบว่ามีการทรานสคริปชันในปฏิกิริยาที่ใช้โปรโมเตอร์ U6-1 และ U6-2 อย่างไรก็ตามผลการทรานสคริปชันเกิดน้อยมาก



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 ได้จากการตัดต่อเรียบร้อยแล้วได้โครงสร้าง 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)

เนื่องจากลำดับเบสที่ได้มีการจำแนกออกเป็น 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)

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 เหงือก ตับ ระบบทางเดินอาหาร รังไข่ และ อัณฑะ ของปลาม้าลาย เนื่องจากองค์ประกอบของลำดับเบสของยีน U6-4 และ ยีน U6-3 มีความตรงกันทั้งหมด จึงไม่สามารถทราบได้ว่ายีนทั้ง 2 ชนิดแสดงออกได้หรือไม่ หรือเป็นการแสดงออกของยีนเพียงชนิดเดียว การศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน 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

ที่ได้จากตัวอ่อนปลาหมาลาย พบว่าโปรโมเตอร์ทั้ง 3 ชนิดสามารถผลิต shRNA ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับข้อสรุปที่ได้กล่าวมาแล้วว่ายีนทั้ง 3 ชนิดทำหน้าที่เป็นยีนที่แท้จริงหรือมีการแสดงออก ในปลาหมาลาย จึงสรุปได้ว่าโปรโมเตอร์ที่ได้รับการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการ เทคโนโลยียีนน็อคควันแบบระยะยาวในปลาหมาลายต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษายีนหน้าที่ ของยีน หรือการศึกษาทางด้านชีววิทยาด้านต่าง ๆ ที่ใช้ปลาหมาลายเป็นสัตว์ทดลอง

ได้มีการรายงานผลการทดลองการทรานสคริปของโปรโมเตอร์ U6 snRNA ในสิ่งมีชีวิตต่าง ชนิดกัน ได้ผลที่แตกต่างกัน เช่น โปรโมเตอร์ U6 snRNA ที่ได้จากแมลงหวี่ ไม่สามารถทรานสคริป U6 snRNA ได้ในสารสกัด RNA polymerase III ที่ได้จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 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 ของปลาหมาลาย สามารถแสดงออกได้ในปลานิล แต่ไม่สามารถแสดงออกได้ในปลาไน และปลาดุก นอกจากนี้ยังพบว่าโปรโมเตอร์ของ U6 snRNA ของปลาหมาลายสามารถทำงานได้สาร สกัด RNA polymerase III ที่ได้จากกึ่งทะเลแม้ว่าจะได้ผลไม่ชัดเจนนักก็ตาม ผลการศึกษานี้เมื่อ เปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ได้มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ สามารถอธิบายได้ว่า 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 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเทคนิคยีนนิ่ง คาวนัระยะยาว 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 geneinactivating 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, Jurynece 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	***** GTCCTTGCTTCGGCAGAACATATACTAAAAATTGGAAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGC	60
Xenopus	GTCCTTGCTTCGGCAGCACATATACTAAAAATTGGAAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGC	60
Mouse	GTCCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAAATTGGAAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGC	60
Human	GTCCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAAATTGGAAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGC	60
	U6-r1 U6-r2	
Drosophila	***** CCCTGCGCAAGGATGACACGCAAAATTCGTGAAGCGTTCACATTTTT	107
Xenopus	CCCTGCGCAAGGATGACACGCAAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTTT	107
Mouse	CCCTGCGCAAGGATGACACGCAAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTTT	106
Human	CCCTGCGCAAGGATGACACGCAAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTTT	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