



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

Molecular Cloning of Myostatin (*MSTN*) and
Heat Shock Protein Cognate (*HSC70*) Genes from
Walking Catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี พุ่มพวง

สิงหาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

Molecular Cloning of Myostatin (*MSTN*) and
Heat Shock Protein Cognate (*HSC70*) Genes from
Walking Catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864)

รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี พุ่มพวง

คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การพัฒนารังไข่ของปลาตุกอยู่ในรอบปีจะมีช่วงเวลาที่ยังไข่ออกตัวเช่นเดียวกับในปลาตุกชนิดอื่นๆ ในการศึกษาที่ผู้วิจัยได้ตรวจสอบพัฒนาการรังไข่และการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการเจริญพันธุ์ (GSI) แต่ละเดือนของแม่ปลาตุกที่อยู่ในบ่อดินเป็นเวลา 1 ปี (เมษายน 2551 ถึงมีนาคม 2552) ในเดือนตุลาคม 2551 เมื่อปลามีอายุ 14 เดือน ได้สุ่มตัวอย่างปลาจากบ่อดินและนำมาเลี้ยงในตู้กระจกที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C และ 35°C นาน 6 สัปดาห์ และตรวจรังไข่ปลาทุก 2 สัปดาห์ พบว่าแม่ปลาที่เลี้ยงในบ่อดินมีค่า GSI สูงสุดในเดือนกรกฎาคม ($13.91 \pm 3.63\%$) ส่วนแม่ปลาที่เลี้ยงในตู้กระจกควบคุมอุณหภูมิปรากฏว่าพัฒนาการของไข่ระยะ 4 และ 5 เพิ่มขึ้นจาก 0.5% และ 4.7% ในสัปดาห์ที่ 2 เป็น 4.6% และ 19.7% ในสัปดาห์ที่ 6 และการตรวจแม่ปลาในบ่อดินในเวลาเดียวกันนั้นพบว่ารังไข่ยังอยู่ในระยะพักมีเฉพาะไข่ระยะ 2 และ 3 แม้ว่าในการทดลองไม่สามารถทำให้ไข่ปลาพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 6 ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายเนื่องจากปลาเกิดความเครียด แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอุณหภูมิเป็นวิธีการที่ง่ายในการกระตุ้นให้รังไข่ปลาตุกมีพัฒนาการนอกฤดูการเพาะพันธุ์

การโคลน cDNA ของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* พบว่าทั้งสองยีนมีจำนวนนิวคลีโอไทด์เท่ากัน (2,278 คู่เบส) ประกอบด้วย Open reading frame (ORF) จำนวน 1,950 คู่เบสซึ่งแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 649 หน่วย ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสองมีความเหมือนกัน 94% มีกรดอะมิโนต่างกัน 38 หน่วย และโปรตีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* มีความเหมือนกับปลากระดุกแฉ่งและสัตว์บกอื่นๆ ประมาณ 82-95% ภายใต้สภาวะปกติยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* มีการแสดงออกในระดับเท่าๆ กันในเนื้อเยื่อตับ เหงือก สมอและกล้ามเนื้อสันหลังของปลาตุก เมื่อปลาได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ยีนทั้งสองมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อและช่วงเวลาทดสอบ 48 ชั่วโมง โดยพบว่ายีน *HSC70-1* มีการแสดงออกในระดับต่ำในทุกเนื้อเยื่อ ขณะที่ยีน *HSC70-2* มีการแสดงออกสูงกว่าในตับและกล้ามเนื้อ ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *HSC70-2* อาจมีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของปลาตุก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (cDNA) ของยีน *MSTN* ในปลาตุกมีจำนวน 1,784 คู่เบส ประกอบด้วยปลาย 5' ที่ไม่ได้แปลรหัส 147 คู่เบส ส่วนของ Open reading frame (ORF) จำนวน 1,191 คู่เบสซึ่งแปลรหัสได้กรดอะมิโน 396 หน่วย ปลาย 3' ที่ไม่ได้แปลรหัส 446 คู่เบส และ poly(A) tail จำนวน 27 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *MSTN* ของปลาตุกมีความเหมือนกับปลากระดุกแฉ่งอื่นๆ เช่น ปลา channel catfish 94% ปลา common carp 78% ปลาเรนโบว์เทรา 75% และสัตว์บกชั้นสูง 60% ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MSTN* ในปลา มีความหลากหลายมากกว่าในสัตว์บกชั้นสูง และการแสดงออกของยีน *MSTN* ในสัตว์บกชั้นสูงจะพบเฉพาะในกล้ามเนื้อสันหลัง แต่ในปลาตุกยีน *MSTN* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นๆ ด้วย เช่น สมอ เหงือก กระเพาะอาหาร และหนังปลา ในระหว่างพัฒนาการของปลาตุกพบว่าในลูกปลาอายุ 1-3 สัปดาห์ยีน *MSTN* มีการแสดงออกมากที่สุด และที่อายุ 3 เดือน ยีนมีการแสดงออกต่ำสุดและการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงอายุ 3-6 เดือน

ABSTRACT

Reproductive cycle of female walking catfish, *Clarias macrocephalus* is normally interrupted by the presence of a resting phase as observed in other catfish species. Ovarian development and monthly change in GSI of females held under pond conditions was monitored over a 1-year period from April 2008 to March 2009. In October, fourteen-month old female fish were randomly collected from earthen pond and exposed to elevated temperatures at 30°C and 35°C under hatchery conditions for six weeks. Ovarian growth was determined at a 2-week interval. Significant variation of mean GSI values ($P<0.05$) was observed among months with the highest value ($13.91\pm3.63\%$) in July. Histological examination of ovaries revealed that in females held under 30°C and 35°C, the number of vitellogenic oocytes progressively increased from 0.5 and 4.7% at week 2 to 4.6 and 19.7% at week 6, whereas in the earthen pond, ovaries remained in resting stage. Although fully matured females could not be obtained, the present study suggested that temperature manipulation was probably the practical way to increase the number of maturing females outside the reproductive season for walking catfish.

Two different cDNAs encoding heat shock cognate protein 70 genes were isolated from liver of walking catfish. The length of complete cDNA sequences for walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* were identical (2,278 bp), with the open reading frame of 1,950 bp and a predicted 649 amino acid protein. Amino acid sequences of both proteins shared 94% similarity with 38 substitutions. The walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* proteins shared 82-95% identity of amino acids with other teleosts, chicken and human. Under normal conditions, *HSC70-1* and *HSC70-2* transcripts were expressed at similar levels in liver, gills, brain, and skeletal muscle of walking catfish. Bacterial infection by *Aeromonas hydrophila* differentially induced the expression of *HSC70s* in these tissues during 48 h. The *HSC70-1* was constitutively expressed at low levels in most tissues, whereas, the *HSC70-2* was up-regulated at moderate and high levels in liver and skeletal muscle respectively. The significant increase in the expression of *HSC70-2* in these tissues may relate with the role of *HSC70-2* in immune response of walking catfish.

The complete cDNA sequence of walking catfish myostatin (*MSTN*) (1,784 bp) contained 147 bases of 5'-untranslated region, an open reading frame of 1,191 bp encoding 396 amino acids, 446 bases of 3'-untranslated region, and a poly(A) tail of 27 nucleotides. The deduced amino acid sequence of walking catfish *MSTN* shared 94%, 78%, 75%, and 60% identity with *MSTNs* of channel catfish, common carp, rainbow trout and higher vertebrates, including avians and mammals, respectively. Results indicated that nucleotide and amino acid sequence of fish were more variable than those in higher vertebrates. Unlike terrestrial animals in which *MSTN* transcripts were expressed only in skeletal muscle, walking catfish *MSTN* mRNA was detected in other tissues, including brain, gills, stomach and skin. Temporal expression of *MSTN* was determined in whole fish during one to three weeks post hatch and from skeletal muscle from one to six months. The *MSTN* mRNA showed highest levels of expression at 3 weeks and the expression was lowest in 3-month old fish.

EXECUTIVE SUMMARY

การปรับปรุงพันธุ์สัตว์บกและสัตว์น้ำปัจจุบันได้มีบูรณาการความรู้เกี่ยวกับจีโนมมากขึ้น โดยเฉพาะการศึกษายีนควบคุมลักษณะสำคัญในการผลิตสัตว์ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ขบวนการเมตาบอลิซึม และระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ข้อมูลของยีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเป้าหมายจะนำไปใช้ร่วมกับการคัดเลือก (Selection) เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ โครงการวิจัยนี้เป็นงานทดลองต่อเนื่องจากโครงการ “การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด EST ใน ปลาดุกอูย” ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ระหว่างปี พ.ศ. 2547-50 ในงานวิจัยนั้นผู้วิจัยได้จำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนในรูป cDNA จากเนื้อเยื่อตับ รวม 303 ยีนและจากกล้ามเนื้อปลาดุกอูยจำนวน 234 ยีน ซึ่งนับเป็นอวัยวะที่สำคัญต่อระบบการทำงานของร่างกายหลายระบบ เช่น การรักษาสมดุลและระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนกล้ามเนื้อเป็นองค์ประกอบหลักในการเจริญเติบโตของปลา เป้าหมายของผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและนักปรับปรุงพันธุ์คือปลาที่โตดีและมีความทนทานโรค ปลาดุกอูยเป็นปลาน้ำจืดท้องถิ่นที่มีการเพาะเลี้ยงมายาวนานเป็นที่นิยมของผู้บริโภคเนื่องจากเนื้อนุ่มรสชาติดีและราคาขายปลีกค่อนข้างสูง แต่ปลาดุกอูยที่เลี้ยงในบ่อโตช้าและเป็นโรคง่าย การปรับปรุงพันธุ์ที่ผ่านมาเพื่อคัดเลือกปลาที่โตเร็วและทนทานโรคไม่ประสบความสำเร็จ เกษตรกรจึงเปลี่ยนไปเลี้ยงปลาดุกลูกผสมหรือ“บึกอูย”ที่เกิดจากการผสมข้ามปลาดุกอูยกับปลาดุกอัฟริกัน ปลาดุกลูกผสมโตเร็วและทนโรค แต่คุณภาพเนื้อด้อยกว่าปลาดุกอูย การเลี้ยงปลาดุกอูยเพื่อบริโภคในปัจจุบันมีปริมาณลดลงมากซึ่งเกษตรกรยังคงเลี้ยงเพื่อใช้เป็นแม่พันธุ์ผลิตลูกผสมเท่านั้น

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษายีน Heat shock cognate protein 70 (*HSC70*) ซึ่งเกี่ยวข้องับระบบสมดุลและภูมิคุ้มกันของปลาดุกอูย และยีน Myostatin (*MSTN*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ โดยผู้วิจัยได้โคลน cDNA ศึกษาโครงสร้างยีน วิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนจากลำดับกรดอะมิโน และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อปลาดุกอูย ผลการทดลองพบว่าปลาดุกอูยมียีน *HSC70* 2 รูปแบบคือ *HSC70-1* และ *HSC70-2* ซึ่งโปรตีนของยีนทั้งสองมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน 94% ยีน *HSC70* ทั้งสองแบบมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อปกติของปลาดุกอูย แต่ในสภาวะติดเชื้อแบคทีเรียยีนทั้งสองมีการแสดงออกแตกต่างกันในเนื้อเยื่อที่ทดสอบ ยีน *HSC70* ได้รับความสนใจและมีการศึกษาเพิ่มขึ้นในปลาหลายชนิด เนื่องจากผลการวิจัยแสดงว่าการแสดงออกของยีนมีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ เพื่อให้เข้าใจบทบาทของยีน *HSC70-1* และยีน *HSC70-2* ให้สมบูรณ์ขึ้น ควรมีการศึกษาการตอบสนองความเครียดลักษณะอื่น เช่น ความร้อน การปนเปื้อนโลหะหนัก หรือสภาวะออกซิเจนในน้ำต่ำ ส่วนยีน *MSTN* ซึ่งเกี่ยวข้องับพัฒนาการและการเจริญของกล้ามเนื้อปลาดุกอูยพบว่า มีการแสดงออกของยีน *MSTN* สูงสุดในลูกปลาวัยอ่อนระยะ 1-4 สัปดาห์หลังฟัก และการแสดงออกของยีน *MSTN* ต่ำสุดในปลาอายุ 3-6 เดือน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ปลาดุกอูยมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันมากที่สุด การโคลน cDNA ของยีน *MSTN* เป็นประโยชน์สำหรับการทำความเข้าใจโครงสร้างการทำงานและวิวัฒนาการของยีน *MSTN* และใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน *MSTN* (Functional analysis) โดยเทคนิค RNA interference (RNAi) ได้ต่อไป

บทนำ (INTRODUCTION)

ปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีราคาค่อนข้างสูง และเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากเนื้อนุ่มรสชาติดี มีสีเหลืองสวยงาม เมื่อปริมาณปลาดุกอูยในธรรมชาติลดลงได้มีการเพาะเลี้ยงปลาดุกอูยมายาวนานกว่า 50 ปี แต่ปลาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโตช้าและเป็นโรคร่ายเพราะมีความต้านทานโรคต่ำ ปัจจุบันการผลิตปลาดุกอูยเพื่อการบริโภคมีปริมาณลดลงอย่างมาก เกษตรกรส่วนใหญ่เปลี่ยนไปเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างแม่ปลาดุกอูยและพ่อปลาดุกยักษ์ (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) ปลาดุกลูกผสมโตเร็วและทนทานต่อโรคดีกว่าปลาดุกอูย ปัจจุบันผลผลิตประมาณ 90% ของปลาดุกในประเทศเป็นปลาดุกลูกผสม แต่อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่ต้องใช้ปลาดุกอูยสายพันธุ์แท้เพื่อเป็นแม่พันธุ์ในการผสมข้าม จึงมีเกษตรกรอีกจำนวนหนึ่งที่ยังคงเลี้ยงปลาดุกอูยไว้เพื่อใช้ผลิตปลาดุกบิ๊กอุยและเพื่อผลิตปลาดุกอูยจำหน่ายตามความต้องการของตลาด พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอูยที่ใช้อยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นหลัก ซึ่งเท่าที่ผ่านมามักพบปัญหาแม่พันธุ์ปลาดุกอูยโตช้า ความสมบูรณ์เพศลดลง และมักเป็นโรคร่ายในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ หรือในฤดูหนาวโดยเฉพาะในช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ ที่มีอุณหภูมิลดต่ำลงเฉลี่ย 5-10°C เกษตรกรส่วนใหญ่จึงหยุดเลี้ยงปลาในช่วงเวลาดังกล่าว เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาในระหว่างการผลิต ทำให้การผลิตลูกปลาทำได้ไม่ต่อเนื่อง

จากผลงานวิจัยในอดีตจะเห็นว่าถ้าสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงปลามีการเปลี่ยนแปลงจากสภาพที่เหมาะสมปลาจะเกิดความเครียด ซึ่งมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต การรักษาสมดุลของร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะส่งผลกระทบต่อการควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในปลา ทำให้ไม่มีการพัฒนาของไข่หรือรังไข่ หรือใช้เวลาในการพัฒนานานกว่าปกติ ส่งผลให้การขยายพันธุ์ต้องล่าช้าตลอดจนเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น แต่มีผลงานวิจัยในระยะต่อมาที่แสดงให้เห็นว่าการจัดการสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ เช่น เพิ่มอุณหภูมิน้ำ และ/หรือเพิ่มช่วงแสง สามารถกระตุ้นพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์และยืดระยะเวลาการเพาะพันธุ์ในรอบปีได้ สำหรับปลาน้ำจืดในเขตร้อนชื้น เช่น ปลาดุกอูย การเพิ่มอุณหภูมิน้ำในช่วงฤดูหนาวน่าจะเป็นทางหนึ่งที่สามารถกระตุ้นพัฒนาการของรังไข่และแก้ปัญหาการขาดแคลนลูกปลา

ในระหว่างการผลิตปลาดุกอูยตั้งแต่ระยะวัยอ่อนถึงระยะโตเต็มวัย เกษตรกรจะพบปัญหาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* คือโรคกักหุบวม หรือ โรคท้องบวม (Haemorrhagic septicemia) ซึ่งเป็นโรคสำคัญในปลาน้ำจืดหลายชนิดที่ทำความเสียหายแก่ผู้เลี้ยงปลาเป็นอย่างมาก วิธีการรักษาโรคนี้คือการใช้ยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยมากมายที่ระบุว่า การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาและมีการตกค้างของยาในบ่อที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียอื่นๆในบ่อเลี้ยงปลา ทำให้สมดุลของจุลินทรีย์ในบ่อเปลี่ยนไป การป้องกันและรักษาโรคด้วยวิธีอื่นนอกจากการใช้ยาปฏิชีวนะจึงเป็นที่ต้องการ เมื่อเร็วๆนี้มีผลงานวิจัยฉบับหนึ่งพบว่าการใช้ Recombinant heat shock protein (HSP) สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในปลา platyfish ความสำเร็จจากงานวิจัยนี้ทำให้การใช้โปรตีน HSP เป็นทางเลือกใหม่ในการป้องกันโรคสัตว์น้ำในอนาคต ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับการศึกษาโปรตีนที่สร้างโปรตีน HSP ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีความหลากหลายและมีการแบ่งกลุ่มย่อยตามน้ำหนักโมเลกุลและหน้าที่เฉพาะในการ

ควบคุมระบบสมดุลของร่างกาย ยีนที่สร้างโปรตีน HSP เป็นยีนที่มีการอนุรักษ์ในระดับสูง จะพบยีน HSP ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดตั้งแต่แบคทีเรีย สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ แมลง ปลา สัตว์ปีก จนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูงรวมทั้งมนุษย์ ในโครงการนี้ผู้วิจัยได้เลือกโคลนยีน HSC70 (Heat shock cognate protein 70) ในปลาตุกอยและศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในปลาตุกอยที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เพื่อเข้าใจโครงสร้างยีนและการทำหน้าที่ของโปรตีนในเนื้อเยื่อต่างๆของปลาตุกอย ซึ่งโปรตีน HSC70 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีน HSP70 ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ได้รับความสนใจและมีรายงานมากที่สุด

การปรับปรุงพันธุ์ปลาตุกอยให้โตเร็วเป็นเป้าหมายหลักของผู้เลี้ยงปลาตุกอย แต่เนื่องจากอัตราพันธุกรรม (Heritability) สำหรับการเจริญเติบโตมีค่าต่ำในปลาตุกอยสายพันธุ์ที่เลี้ยงในประเทศ ทำให้การคัดเลือกด้วยวิธีดูลักษณะตัวเอง (Individual selection) ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เกษตรกรจึงเปลี่ยนไปเลี้ยงปลาตุกกลุผสมแทนการเลี้ยงปลาตุกอดังที่กล่าวข้างต้น การปรับปรุงพันธุ์สัตว์บกและสัตว์น้ำในปัจจุบันส่วนหนึ่งมีเป้าหมายเพื่อศึกษายีนปริมาณที่มีผลมากต่อลักษณะปรากฏ (Major genes) หรือการศึกษายีนตัวแทน (Candidate genes) และนำข้อมูลยีนเหล่านี้มาใช้ร่วมกับการคัดเลือก (Selection) เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดพ่อแม่พันธุ์ การค้นพบ Growth Differentiation factor 8 (GDF-8) หรือที่รู้จักกันในชื่อยีน Myostatin (*MSTN*) ซึ่งเป็น Major gene ที่ควบคุมการเจริญของกล้ามเนื้อที่ยึดเกาะกับกระดูกในหนูโดย McPherron and Lee (1997) ได้นำไปสู่การศึกษาคุณลักษณะและการแสดงออกของยีน *MSTN* ในสิ่งมีชีวิตอื่นอีกเป็นจำนวนมาก ในหนูที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *MSTN* พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกล้ามเนื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ นอกจากนี้การเกิดลักษณะ Double muscle ในวัวพบว่าเชื่อมโยงกับการกลายของยีน *MSTN* งานวิจัยโดย Acosta และคณะ (2005) พบว่าการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน *MSTN* ด้วยเทคนิค RNAi ทำให้ปลา zebrafish มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 45% และเมื่อเร็วๆนี้ Lee และคณะ (2010) รายงานว่า *MSTN* prodomain ของปลา Japanese flounder สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *MSTN* ในปลาเรนโบว์เทราท์ทำให้น้ำหนักตัวปลาเพิ่มขึ้น 40%

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของรังไข่แม่ปลาตุกอยในโรงเรือน หลังฤดูการเพาะพันธุ์เทียบกับพัฒนาการของรังไข่แม่ปลาในบ่อดิน
2. ศึกษาคุณลักษณะ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และโครงสร้างยีน *HSC70* จากเนื้อเยื่อตับปลาตุกอย และศึกษาการแสดงออกของยีน *HSC70* ในปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila*
3. ศึกษาคุณลักษณะ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และโครงสร้างยีน *MSTN* จากกล้ามเนื้อปลาตุกอย และศึกษาการแสดงออกของยีน *MSTN* ระหว่างพัฒนาการระยะต่างๆ

งานวิจัยและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง (LITERATURE SURVEY AND RELATED THEORY)

พัฒนาการของรังไข่ปลาดุกอูย

ปลาดุกอูยมีชื่อสามัญคือ Günther's walking catfish และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) พบแพร่กระจายทั่วไปเกือบทุกภูมิภาคของประเทศไทย และยังพบในประเทศใกล้เคียง เช่น พม่า กัมพูชา เวียดนาม ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย และบังกลาเทศ เป็นต้น ปลาดุกอูยเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเนื้ออร่อยรสชาติดี และขายได้ราคาสูงกว่าปลาดุกชนิดอื่นๆ การเพาะเลี้ยงปลาดุกอูยในประเทศไทยมีมากกว่า 50 ปี (Na-Nakorn *et al.* 1993) อย่างไรก็ตามการผลิตปลาดุกอูยมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากข้อจำกัดของปลาดุกอูยคือ เจริญเติบโตช้า และมีความต้านทานโรคต่ำ ในปัจจุบัน 90% ของเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาดุกในประเทศไทยเปลี่ยนมาเลี้ยงปลาดุกลูกผสม หรือปลาดุกบิ๊กอุยที่เกิดจากแม่ปลาดุกอูยกับพ่อปลาดุกยักษ์ (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) เพิ่มขึ้นเนื่องจากปลาดุกลูกผสมมีการเจริญเติบโตเร็ว และมีความทนทานต่อโรคมากกว่า (Nukwan *et al.*, 1991) ในปีพ.ศ. 2551 ผลผลิตปลาดุกลูกผสมมีปริมาณมากเป็นอันดับสองของการผลิตปลาน้ำจืดในประเทศรองจากปลานิล โดยมีผลผลิต 130,064 ตัน มูลค่ารวม 4,900 ล้านบาท (Department of Fisheries, 2009) การขยายการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมทำให้ความต้องการแม่ปลาดุกอูยเพิ่มขึ้น แต่ปัญหาที่เกษตรกรพบคือไม่สามารถเพาะลูกปลาได้ตลอดปีเนื่องจากการขาดแคลนแม่ปลาที่มีไข่แก่หลังฤดูเพาะพันธุ์

ปลาดุกอูยที่เลี้ยงในบ่อดินจะถึงวัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุ 1 ปี ฤดูการเพาะพันธุ์ในธรรมชาติจะเริ่มต้นในฤดูฝนราวเดือนพฤษภาคมต่อเนื่องถึงเดือนกันยายน (Jarimopas *et al.* 1995; Panprommin *et al.* 2008) ในโรงเพาะฟักการเพาะพันธุ์ปลาดุกอูยทำโดยการผสมเทียมฉีดฮอร์โมนเร่งให้ปลาดุกไข่ รังไข่ปลาดุกมีพัฒนาการแบบ Asynchronous ซึ่งประกอบด้วยไข่ (Oocytes) ที่มีขนาดต่างๆเนื่องจากการเจริญเติบโตของไข่ที่ไม่พร้อมกัน แบ่งได้คร่าวๆ 4 ขนาด คือไข่ที่มีขนาดเล็ก (Immature oocyte) ไข่กำลังเจริญเติบโต (Maturing oocyte) ไข่ขนาดใหญ่พร้อมที่จะผสมกับน้ำเชื้อ (Mature oocyte) และไข่ระยะที่สลายตัว (Atretic oocyte) ส่วนระบบสืบพันธุ์ของปลาดุกอูยในรอบปีแบ่งได้เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงก่อนการผสมพันธุ์วางไข่ ช่วงเวลาผสมพันธุ์วางไข่ และช่วงที่รังไข่หยุดพัฒนาการ (Richter *et al.* 1987) ซึ่งรังไข่ในแต่ละช่วงจะมีสัดส่วนของไข่ขนาดต่างๆที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งการฉีดฮอร์โมนผสมเทียมในช่วงที่รังไข่หยุดพัฒนาการหรือนอกฤดูผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ไม่ค่อยประสบความสำเร็จเนื่องจากรังไข่แม่ปลาดุกอูยมีไข่ขนาดเล็กจำนวนมาก (Tan-Fermin *et al.* 1997; Panprommin *et al.* 2008)

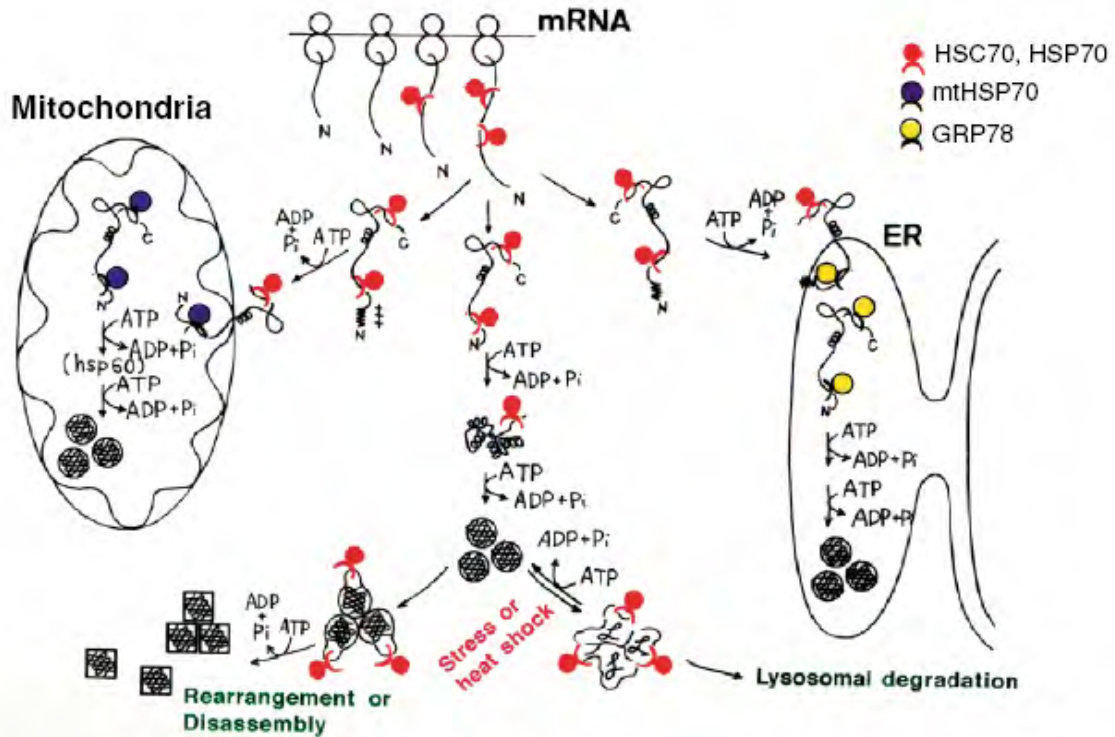
เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยภายนอกที่มีอิทธิพลต่อพัฒนาการระบบสืบพันธุ์ของปลา มีงานวิจัยที่แสดงว่าการเพิ่มอุณหภูมิในบ่อมีผลในการกระตุ้นให้รังไข่มีพัฒนาการที่ต่อเนื่อง และทำให้ช่วงเวลาที่สามารถเพาะพันธุ์ปลายาวนานขึ้น เช่น ปลาดุกอัฟริกัน *C. gariepinus* (Richter *et al.* 1987) ปลาช่อน *Channa punctatus* (Srivastava and Singh 1991) และปลา striped bass *Morone saxatilis* (Clark *et al.* 2005) อย่างไรก็ตามการจัดการสภาพแวดล้อมที่ต่างจากธรรมชาติอาจทำให้ปลาเกิดความเครียดและส่งผลกระทบต่อคุณภาพและพัฒนาการของรังไข่ เนื่องจากความเครียดทำให้ระดับฮอร์โมนของระบบสืบพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลง (Pankhurst and Van Der Kraak 1997) เช่น

การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินส์ในเลือดทำให้ระดับเทสโทสเตอโรนหรือเอสโตรเจนในระบบหมุนเวียนลดลง ซึ่งการลดลงของเอสโตรเจนในเลือดปลาพบว่าทำให้รังไข่แม่ปลาที่มีไข่ระยะที่สลายตัวมากขึ้น นอกจากนี้ความเครียดยังทำให้ไข่มีขนาดลดลงและน้ำเชื้อมีคุณภาพลดลง การเพิ่มระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลในเลือดเนื่องจากความเครียดพบว่ามีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของปลาเช่นกัน มีรายงานทดลองว่าแม่ปลาที่ได้รับการฉีดคอร์ติซอลจากภายนอกมีรังไข่ขนาดเล็กลง และเอสโตรเจนในเลือดลดลง ซึ่งระดับเอสโตรเจนที่ลดลงทำให้ตัวสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้น้อยลง แม่ปลาจึงมีไข่ขนาดเล็กกว่าปกติ

การศึกษา Heat shock proteins

ฮีตช็อกโปรตีน (HSP) เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระบบสมดุล (Homeostasis) ของเซลล์ และตอบสนองต่อความเครียดทุกรูปแบบ เช่น ความร้อน การปนเปื้อน โลหะหนัก และการได้รับเชื้อโรค (Iwama *et al.* 1998) ความเครียดเหล่านี้ทำให้เกิดการสะสมของโปรตีนที่ผิดปกติหรือโปรตีนที่ถูกทำลายภายในเซลล์ (Krone *et al.* 1997) ฮีตช็อกโปรตีนทำหน้าที่เป็น Molecular chaperone ช่วยโปรตีนตัวอื่นในการม้วนพับตัว (Protein folding) เพื่อให้มีรูปร่าง 3 มิติที่ทำหน้าที่ได้ มีการแบ่งกลุ่ม (Protein family) ของฮีตช็อกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ 1) HSP90 น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 85-90 kDa 2) HSP70 น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 68-73 kDa และ 3) ฮีตช็อกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 16-24 kDa (Iwama *et al.* 1998) ซึ่งโปรตีน HSC70 เป็นกลุ่มที่มีผู้รายงานและได้รับความสนใจมากที่สุด (Feder and Hofmann 1999) ในสภาวะปกติโปรตีน HSC70 จะไม่มีการแสดงออกแต่เมื่อเซลล์ได้รับความเครียดจะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน HSC70 ในเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามฮีตช็อกโปรตีนบางตัวที่จัดอยู่ในกลุ่ม HSP70 จะมีการแสดงออกในเซลล์ตลอดเวลา ซึ่งเรียกว่า Heat shock cognate protein 70 (HSC70) ซึ่งมีบทบาทหลักในการช่วยการพับม้วนของโปรตีนอื่นที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ รวมทั้งช่วยการเคลื่อนย้ายและทำลายโปรตีนอื่นๆ (Feder and Hofmann 1999) (ภาพที่ 1)

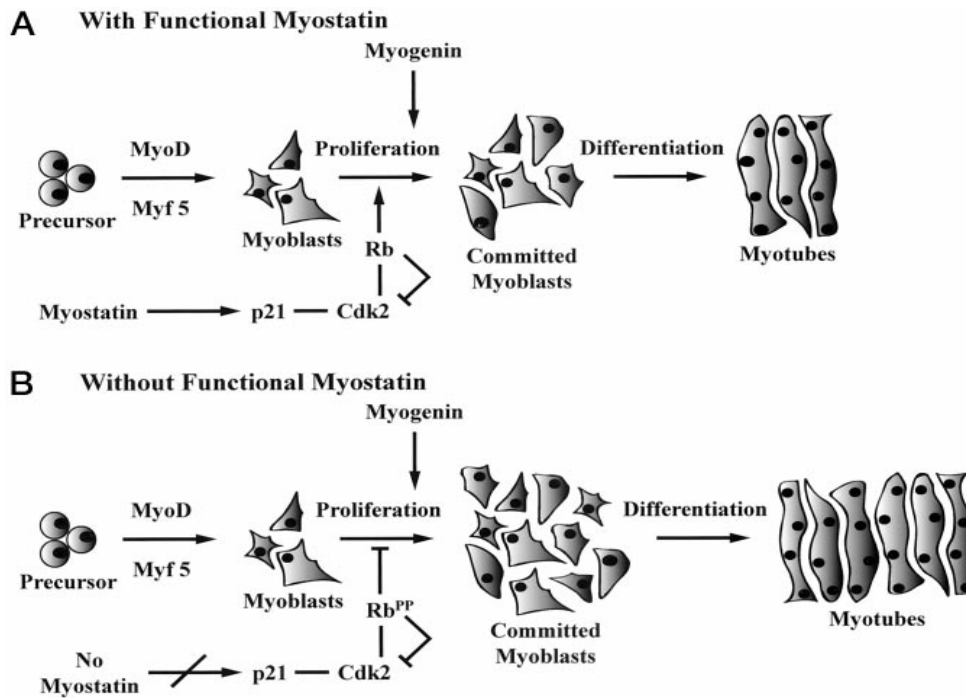
การศึกษาโปรตีน HSC70 ในปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีผลงานวิจัยที่แสดงว่าโปรตีน HSC70 อาจเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Basu *et al.* 2002; Robert 2003) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยหลายเรื่องมีผลการทดลองที่สอดคล้องกันว่าระดับของโปรตีน HSC70 ในเนื้อเยื่อตับของปลาและกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่สัตว์เหล่านี้ได้รับเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส (Leung and Hightower 1997; Deane *et al.* 2004; Chuang *et al.* 2007; Ming *et al.* 2010; Rungrussamee *et al.* 2010; Yue *et al.* 2011) และมีรายงานต่อว่าโปรตีน HSC70 ช่วยทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายโปรตีนของระบบภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองการติดเชื้อโรค จากความสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ได้มีการโคลนยีน HSC70 ในสัตว์น้ำหลายชนิด ได้แก่ ปลา zebrafish *Danio rerio* (Graser *et al.* 1996; Santacruz *et al.* 1997) ปลา common carp *Cyprinus carpio* (Ali *et al.* 2003) ปลา platyfish *Xiphophorus maculatus* (Yamashita *et al.* 2004) ปลา Wuchang bream *Megalobrama amblycephala* (Ming *et al.* 2010) ปลา grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Zhang *et al.* 2011) และปลา yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Yabu *et al.* 2010)



ภาพที่ 1 แบบจำลองการทำงานของฮีตช็อกโปรตีน HSP70 และ HSC70 หน้าที่สำคัญคือช่วยโปรตีนอื่นในการพับม้วน ช่วยย่อยโปรตีนที่เสียสภาพ ช่วยลำเลียงโปรตีนไปยังออร์แกเนลเป้าหมายภายในเซลล์ และลำเลียงโปรตีนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (ที่มา: Yamashita *et al.* 2010)

การค้นพบยีน Myostatin (MSTN)

ยีน *Myostatin (MSTN)* หรือ Growth-differentiation factor 8 (GDF-8) นี้จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน Transforming growth factor- β (TGF- β) ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาและการเจริญของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ในตัวอ่อนระยะ Somites ที่เริ่มสร้างกล้ามเนื้อจะมีการแบ่งเซลล์ของ Myoblasts ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นจำนวนมาก จากนั้น Myoblasts จะเปลี่ยนแปลงกลายเป็น Myotubes การทำงานของ Myostatin คือควบคุมไม่ให้การแบ่งเซลล์ Myoblasts มากจนเกินไป (Thomas *et al.* 2000) (ภาพที่ 2) จากการทดลองเพื่อศึกษากลไกการทำงานของ Myostatin โดยการฉีด Recombinant myostatin เข้าเซลล์กล้ามเนื้อของตัวอ่อนวัวอายุ 160 วัน พบว่าการแบ่งเซลล์ C_2C_{12} Myoblasts จะถูกยับยั้ง โดย Myostatin ส่วนเกินที่ฉีดเข้าเซลล์จะกระตุ้นให้มีการสร้าง P21 ซึ่งเป็น Cyclin-dependent kinase inhibitor ในขณะเดียวกันจะปลดปล่อย cdk2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อการเปลี่ยนระยะในวงจรเซลล์ (Cell cycle) จากระยะ G1/S เข้าสู่ระยะ G2/M ของเซลล์ C_2C_{12} Myoblasts (Thomas *et al.* 2000) แต่ถ้าการทำงานของ Myostatin ถูกยับยั้งจะทำให้เซลล์กล้ามเนื้อมีการเจริญอย่างไม่จำกัด ทั้งการเพิ่มจำนวนมัดกล้ามเนื้อ (Hypertrophy) และการเพิ่มขนาดมัดกล้ามเนื้อ (Hypertrophy)



ภาพที่ 2 แบบจำลองการทำงานของ Myostatin ระหว่างพัฒนาการของกล้ามเนื้อ ภาพ A มี Myostatin ควบคุมการแบ่งเซลล์ Myoblasts และภาพ B: ไม่มี Myostatin (ที่มา: Thomas *et al.* 2000)

McPherron and Lee (1997) เป็นผู้ค้นพบยีน MSTN ในหนู โดยผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค Gene-targeting ทำลายส่วนของยีน MSTN ที่สร้างโปรตีนด้าน C-terminal ทำให้หนูสายพันธุ์ที่ได้รับยีนที่เกิดการกลาย (Mutation) มีน้ำหนักตัวมากกว่าหนูปกติถึงสองเท่า โดยพบว่าหนูที่เกิดการกลายจะมีจำนวนและขนาดของมัดกล้ามเนื้อมากกว่าหนูปกติ ต่อมานักวิจัยค้นพบการกลายตามธรรมชาติของยีน MSTN ในสายพันธุ์โคเนื้อ (Belgian blue) ซึ่งทำให้มีกล้ามเนื้อขนาดใหญ่กว่าโคเนื้อปกติ 20% และเรียกลักษณะนี้ว่า Double muscle จากการวิเคราะห์โครงสร้างยีนที่เกิดการกลายพบว่านิวคลีโอไทด์ในส่วน Exon ที่ 3 ขาดหายไป 11 คู่เบส ทำให้เกิดการกลายที่เรียกว่า Frame-shift mutation ซึ่งมีรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (Stop codon) ปรากฏขึ้นล่วงหน้า สายโพลีเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจึงสั้นกว่าปกติ เพราะกรดอะมิโนด้าน C-terminal หายไป 102 หน่วย โปรตีน MSTN ที่ไม่สมบูรณ์จึงไม่สามารถทำงานได้ (Grobet *et al.* 1997; Kambadur *et al.* 1997; McPherron and Lee 1997)

จากการค้นพบยีน MSTN ในหนูและโคเนื้อ รวมทั้งบทบาทของโปรตีน MSTN ส่งผลให้มีการศึกษา ยีน MSTN ในสัตว์บกอีกหลายชนิดตามมา เช่น สุนัข (Shelton and Engvall 2007) สุนัข (Yu *et al.* 2007) ไก่ (Kim *et al.* 2007; Ye *et al.* 2007) และแกะ (Boman *et al.* 2009) เป็นต้น การศึกษา ยีน MSTN ในปลาได้รับความสนใจมากขึ้นเช่นเดียวกัน มีรายงานการโคลนนิ่งและศึกษาคุณลักษณะ รวมทั้งการแสดงออกของยีน MSTN ในระยะพัฒนาการจากตัวอ่อนเป็นระยะเต็มวัยในปลาหลายชนิด เช่น ปลา Gilthead seabream (Maccatrozzo *et al.* 2001) ปลาเรนโบว์เทรา (Ruscan *et al.* 2001) ปลา channel catfish (Kocabas *et al.* 2002) ปลา orange-spotted grouper (Ko *et al.* 2006) ปลา yellow catfish (Pan *et al.* 2007) ปลา Japanese sea perch

(Ye *et al.* 2007) และปลา Asian sea bass (De Santis and Jerry 2011) เป็นต้น งานวิจัยโดย Acosta และคณะ (2005) พบว่าด้วยเทคนิค RNAi (RNA interference) สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีน MSTN ในปลา zebrafish ทำให้ปลามีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 45% เมื่อเปรียบเทียบกับปลาปกติ และเมื่อเร็วๆนี้ Lee และคณะ (2010) ได้ศึกษาการแสดงออกของ MSTN-1 prodomain จากปลา Japanese flounder ใน *E. coli* และเมื่อนำ MSTN prodomain ไปฉีดให้ปลาเรนโบว์เทราพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน MSTN ทำให้ปลามีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นถึง 40%

ระเบียบวิธีวิจัย (MATERIALS AND METHODS)

ผลของการเพิ่มอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของรังไข่ปลาตุ๊กต

1. การเพาะพันธุ์ปลาตุ๊กต

1.1 การเลี้ยงปลาตุ๊กตในบ่อดิน

ปลาตุ๊กตที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง จังหวัดปทุมธานี ในเดือนสิงหาคม 2550 ได้มีการเพาะปลาตุ๊กตโดยวิธีฉีดฮอร์โมนผสมเทียมพ่อปลา 10 ตัว (น้ำหนักเฉลี่ย 202 ± 12 กรัม) และแม่ปลา 40 ตัว (น้ำหนักเฉลี่ย 210 ± 26 กรัม) อนุบาลลูกปลาที่ได้ในบ่อปูนขนาด 6 ตารางเมตร ($2 \times 3 \times 1$) ความหนาแน่น 3,000 ตัวต่อตารางเมตร เป็นเวลา 2 เดือน แล้วย้ายลูกปลาจำนวน 3,000 ตัวลงเลี้ยงในบ่อดินขนาด 800 ตารางเมตร ($20 \times 40 \times 1$) ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีโปรตีน 25% ปริมาณ 2% ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง เมื่อปลาอายุ 8 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างปลาตุ๊กตเพศเมีย จำนวน 15 ตัว ทุกเดือน เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยเริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน 2551 ถึงเดือนมีนาคม 2552 ตรวจวัดคุณภาพน้ำในบ่อดินในเวลาที่เก็บตัวอย่างปลาทุกเดือน และเก็บข้อมูลปริมาณฝนแต่ละเดือน ชั่งน้ำหนักตัวและวัดความยาวตัวอย่างปลา ผ่าตัดเก็บรังไข่ ชั่งน้ำหนักรังไข่และคำนวณค่าดัชนีการเจริญพันธุ์ (Gonadosomatic index: $GSI = \frac{\text{น้ำหนักรังไข่}}{\text{น้ำหนักตัว}} \times 100$)

1.2 การศึกษาพัฒนาการของรังไข่ปลาตุ๊กตในรอบปี

ผ่าตัดรังไข่ปลาตุ๊กตจากตัวอย่างแต่ละเดือน เก็บในสารละลาย Bouin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วยเอธานอล 79% ในเครื่อง Tissue Processor เพื่อตัดเนื้อเยื่อ และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Haematoxylin (สีน้ำเงิน) และ Eosin (สีแดง) ตรวจเนื้อเยื่อรังไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบ่งระยะพัฒนาการของไข่เป็น 6 ระยะตามวิธีของ Groman (1982) ดังนี้

ระยะที่ 1 ไข่มีสภาพเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissues) ที่ยังไม่พัฒนาบริเวณไฮโดพลาสซึมย้อมติดสี Eosin นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์

ระยะที่ 2 ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Primary oocytes) เป็นระยะเริ่มต้นการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ไข่ย้อมติดสี Haematoxylin นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์และมีการเชื่อมกันของโครมาติน

ระยะที่ 3 ไข่มีขนาดใหญ่มากขึ้น มีพัฒนาการของเยื่อหุ้ม (Follicular epithelium) และไฮโดพลาสซึมเพิ่มขนาดอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับไข่ระยะที่ 2

ระยะที่ 4 ไฮโดพลาสซึมย้อมติดสี Haematoxylin เริ่มปรากฏ Euvitel line nucleoli รอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส และนิวเคลียสย้อมติดสี Eosin แต่ยังไม่ปรากฏ Nucleolus ขบวนการ Vitellogenesis เกิดขึ้นในไข่ระยะนี้ มีการสร้าง Yolk-vesicles และ Yolk granules มี Fat vacuoles ปรากฏในไฮโดพลาสซึมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถแยกชั้น Zona radiate ออกจาก Follicular epithelium

ระยะที่ 5 Yolk vesicles ในไฮโดพลาสซึมมีขนาดใหญ่มากขึ้น ยกเว้นบริเวณที่ติดกับนิวเคลียส และ Euvitel line nucleoli ในนิวเคลียสมีจำนวนลดลง เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มเสื่อมในระยะนี้

ระยะที่ 6 ไข่มี Fat vacuoles และ Yolk granules จำนวนมาก และไซโทพลาสซึมปรากฏเป็นชั้นบางๆติดกับ Zona radiata
ระยะที่ 7 ไข่ระยะที่สลายตัว (Atresia)

2. การเลี้ยงปลาตกอยู่ในตู้กระจกที่เพิ่มอุณหภูมิเพื่อศึกษาพัฒนาการของรังไข่

ในเดือนตุลาคม 2551 เมื่อปลาที่เลี้ยงไว้ในบ่อดินมีอายุ 14 เดือน คัดปลาตกอยู่เพศเมียจำนวน 300 ตัว ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (น้ำหนักเฉลี่ย 108 ± 12.7 กรัม) แล้วนำมาพักไว้ในบ่อปูนขนาด 50 ตารางเมตร ($5 \times 10 \times 1$) เพื่อปรับสภาพและเตรียมความพร้อมก่อนการทดลอง 7 วัน จากนั้นสุ่มปลา 180 ตัวใส่ตู้กระจกความจุ 50 ลิตร ($90 \times 45 \times 45$ เซนติเมตร) จำนวน 15 ตู้ละ 12 ตัว แบ่งตู้ปลาเป็น 3 กลุ่ม (ชุดการทดลอง) แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 5 ซ้ำ(ตู้) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อุณหภูมิน้ำตามธรรมชาติ ($25-27^{\circ}\text{C}$) เป็นชุดควบคุม

ชุดการทดลองที่ 2 ควบคุมอุณหภูมิน้ำ 30°C โดยใช้ฮีตเตอร์

ชุดการทดลองที่ 3 ควบคุมอุณหภูมิน้ำ 35°C โดยใช้ฮีตเตอร์

สุ่มปลาจำนวน 15 ตัวต่อชุดการทดลอง หลังจากเลี้ยงปลาเป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ ผ่าตัดเก็บรังไข่ซึ่งน้ำหนักเพื่อคำนวณค่า GSI และศึกษาพัฒนาการของรังไข่ ตามวิธีการข้อ 1.2

3. การเก็บเลือดปลาเพื่อวิเคราะห์ระดับคอร์ติซอลและน้ำตาลกลูโคส

เก็บตัวอย่างเลือดปลาโดยใช้ไซริงขนาด 1-ml และเข็มขนาด 23-G และใส่ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Titriplex III, Merck, Darmstadt, Germany) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด นำเลือดใส่ในหลอดพลาสติกและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

วิเคราะห์ระดับคอร์ติซอลโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Cortisol Bridge kit (TKCO1, L&R enterpriser co. LTD, Thailand) วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป (no. 124 028, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

คำนวณค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับค่า GSI สัดส่วนพัฒนาการไข่ระยะต่างๆ ระดับน้ำตาลกลูโคสและคอร์ติซอลในเลือด ทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ในแต่ละเดือนสำหรับปลาตกอยู่ที่เลี้ยงในบ่อดิน และระหว่างกลุ่มทดลองในตู้กระจกที่เพิ่มอุณหภูมิ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 11.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ในแต่ละเดือน หรือชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's multiple range tests กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์หรีเกรสชันเพื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างค่า GSI ของปลาตกอยู่ในบ่อดินและปริมาณน้ำฝน และความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไข่ระยะที่ 6 กับค่า GSI ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 11.0 และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

การโคลนยีน Heat shock protein 70 (*HSC70*) และการแสดงออกของยีนในการตอบสนองการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

1. การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA สำหรับยีน *HSC70* โดยวิธี RACE

1.1 การออกแบบไพรเมอร์

เนื่องจากผู้วิจัยมีข้อมูลนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *HSC70* ทางปลายด้าน 3' (Expressed sequence tag ขนาด 371 คู่เบส Accession number EB360505) จากงานวิจัยของ Panprommin และคณะ (2007) การโคลน cDNA ของยีน *HSC70* ในการทดลองนี้จึงสังเคราะห์เฉพาะปลายด้าน 5' ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST ข้างต้น ดังแสดงในตารางที่ 1

1.2 การโคลน cDNA ปลายด้าน 5'

ผ่าตัดเก็บเนื้อเยื่อตับปลาดุกอายุ 1 ตัว (น้ำหนักตัว 152 กรัม) และสกัด Total RNA ด้วยสารละลาย TRIzol reagent แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป QuickPrepTM Micro mRNA Purification kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) จากนั้นนำ mRNA มาสังเคราะห์ First-strand cDNA ปลายด้าน 5' (มีชื่อการค้าว่า 5'-RACE-ready cDNA) โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป BD SmartTM RACE cDNA Amplification kit (BD Biosciences ClonTech, San Jose, CA, USA) ทำตามคู่มือผู้ผลิตดังนี้ ในปฏิกิริยาประกอบด้วย mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม สารละลาย BD Smart II A oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ 5'-CDS primer (5'-(T)₂₅VN-3', N = A, C, G or T; V = A, G or C) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่ง 5'-RACE-ready cDNA ใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ปลายด้าน 5' ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย (1) 5'-RACE-ready cDNA ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร (2) 10x BD Advantage 2 PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (3) dNTP Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (4) 50x BD Advantage 2 Polymerase Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (5) 10x Universal Primer Mix (UPM) ซึ่งประกอบด้วย ไพรเมอร์ยาว (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์) และไพรเมอร์สั้น (5'-CTAATACGACTCACTATA GGGC-3' ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ (6) ไพรเมอร์จำเพาะ (ตารางที่ 1) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 25 รอบ ภายใต้สภาวะดังนี้ 1) อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที 2) อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที 3) อุณหภูมิ 60°C นาน 30 วินาที และ 4) อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที แยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1%

ตารางที่ 1 รายชื่อไพรเมอร์จำเพาะ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และตำแหน่งของยีนในการโคลนยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ในปลาดุกอุย

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์*		วัตถุประสงค์
		<i>HSC70-1</i>	<i>HSC70-2</i>	
HSC70-1R1	CCAATGCCTGGTTTGCCTTGAA	2210-2231		5'RACE
HSC70-1R2	GTCTCTGCTGTTGACAAGAGC	1495-1515		5'RACE
HSC70-1R3	CCAGTATTGAGATCGACTCCC	872-892		5'RACE
HSC70-1R4	GCTCTGAGAGAAATGTCCTTATTTTCGA	602-629		5'RACE
HSC70-2R1	CCAATGCCTGGTTTGCCTTGAA		2210-2232	5'RACE
HSC70-2R2	GGAGTTCCTCAAATCGAAGTG		1441-1461	5'RACE
HSC70-2R3	CTACAGCAGGAGACACTCACC		695-715	5'RACE
HSC70-2R4	CTCAGCGTCAAGCCACAAAAGATGCTGG		491-518	5'RACE
HSC70F1	CAGATTGAGGTCACATTTGAC	2085-2106	1820-1841	Genomic cloning
HSC70R1	CCAATGCCTGGTTTGCCTTGAA	3088-3110	2822-2845	Genomic cloning
HSC70F2	GCTATTGCCTATGGGTTG	800-818	800-818	Genomic cloning
HSC70-1R2	GTCTCTGCTGTTGACAAGAGC	2119-2130		Genomic cloning
HSC70-2R2	GGAGTTCCTCAAATCGAAGTG		1843-1865	Genomic cloning
HSC70F3	CCAGCTGTTGGCATTGATCTG	46-67	46-67	Genomic cloning
HSC70-1R3	CCAGTATTGAGATCGACTCCC	1169-1190		Genomic cloning
HSC70-2R3	CTACAGCAGGAGACACTCACC		903-924	Genomic cloning
RTHSC70-1F	GCTATTGCCTATGGGTTGGAC			Semi-quantitative RT-PCR
RTHSC70-1R	GTCTCTGCTGTTGACAAGAGC			Semi-quantitative RT-PCR
RTHSP70-2F	GCTATTGCCTATGGGTTGGAC			Semi-quantitative RT-PCR
RTHSP70-2R	CAGAACTTCTGCAGGACTTC			Semi-quantitative RT-PCR
Ip β -actin-F**	AGAGAGAAATTGTCCGTGACATC			Semi-quantitative RT-PCR
Ip β -actin-R**	CTCCGATCCAGACAGATATTTG			Semi-quantitative RT-PCR

*ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากยีน *HSC70-1* (Accession number JX273642) และยีน *HSP70-2* (Accession number JX273643) ของปลาดุกอุย

**ไพรเมอร์ของยีน *β -actin* (Accession number AY555575)

1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดชิ้นส่วนเจลที่มีผลผลิตพีซีอาร์และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas, Germany) เนื่องจากดีเอ็นเอปรากฏบนเจล 2 แถบ ผู้วิจัยจึงโคลนดีเอ็นเอทั้งสองแถบแยกกัน เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 คัดเลือกโคลนผลบวกและสกัดพลาสมิดด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep kit แล้วส่งตัวอย่างพลาสมิดปริมาณ 3 ไมโครลิตร ไปยังห้องปฏิบัติการของเอกชน เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความเหมือนกันกับยีนในฐานข้อมูลและทำนายลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนของยีน *HSC70* ในปลาตุ๊กตากับกรดอะมิโนของยีน *HSC70* หรือ *HSC71* ในปลาและสัตว์ชนิดอื่นด้วยโปรแกรม Clustal W (Thompson *et al.* 1994) และสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *HSC70* ด้วยวิธี Neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) กำหนดค่าทำซ้ำ 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA v. 3.1 (Kumar *et al.* 2004)

2. การโคลนจีโนมมิกดีเอ็นเอ

2.1 การออกแบบไพรเมอร์

เนื่องจากการทดลองนี้ได้โคลน cDNA ของยีนสองยีนและตั้งชื่อว่า *HSC70-1* และ *HSC70-2* การโคลนจีโนมมิกดีเอ็นเอของทั้งสองยีน จึงใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ในการออกแบบไพรเมอร์ตามตารางที่ 1

2.2 การสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอ

นำเนื้อเยื่อตับปริมาณ 20-30 มิลลิกรัมมาสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Fermentas) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ บดเนื้อเยื่อตับให้ละเอียด แล้วใส่สารละลาย Lysis solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที นำมาใส่คลอโรฟอร์มปริมาณ 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นย้ายสารละลายส่วนใสมาเติม Precipitation solution ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอละลายด้วย NaCl (ความเข้มข้น 1.2 M) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำมาเติมเอธานอลปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธานอล 70% ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ไร้เชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.3 การโคลนจีโนมิคดีเอ็นเอ

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย (1) ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (2) 10x buffer ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร (3) dNTPs อย่างละ 1.5 ไมโครลิตร (4) สารละลาย $MgCl_2$ ปริมาณ 0.75 ไมโครลิตร (5) ไพรมเมอร์ส่วนหน้า และไพรมเมอร์ส่วนกลับอย่างละ 1 ไมโครลิตร และ (6) 1 U *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิจำนวน 26 รอบ ภายใต้สภาวะดังนี้ 1) อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที 2) อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 3) อุณหภูมิ 58°C นาน 30 วินาที และ 4) อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที นำผลผลิตพีซีอาร์มา ตรวจสอบบนอะกาโรสเจล 1.5 % โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับ GeneRuler™ Express DNA Ladder (Fermentas)

2.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas)

นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ตัดเจลตรงบริเวณที่มี แลบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ในหลอดพลาสติก แล้วใส่สารละลาย Binding buffer ใน อัตราส่วนเท่ากับน้ำหนักเจลที่ได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาเติมไอโซโพรพานอล ในปริมาณที่เท่ากัน กรองสารละลายผ่านคอลัมน์ และนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้างตะกอนใน คอลัมน์ด้วยสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง ตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ละลายดีเอ็นเอที่ได้โดย ใส่สารละลาย Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรงกลางคอลัมน์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ อุณหภูมิ -20°C

2.5 การสร้าง Competent cells

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar โดยนำมาบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นเลือกแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อในอาหาร LB broth ปริมาตร 3 มิลลิตร แล้วบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ได้โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิตร แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 3 นาที ใส่สารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 100 mM ไปบนตะกอนของแบคทีเรียปริมาตร 3,750 ไมโครลิตร ผสมสารที่ได้ให้เข้ากันแล้วนำไปแช่บนน้ำแข็งประมาณ 30 นาที แล้ว จึงนำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 นาที นำตะกอนที่ได้มาเติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 100 mM ที่มีกลีเซอรอล 15% ปริมาตร 2,250 ไมโครลิตร เก็บ Competent cells ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

2.6 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ (พลาสมิด)

เวกเตอร์ที่ใช้คือ pGEM®-T easy (Promega, USA) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ T7 และ SP6 ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *LacZ* และมีคุณสมบัติต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับเวกเตอร์ โดยเตรียมสารละลายใน Ligation reaction ซึ่งประกอบด้วย 2X Rapid ligation buffer และ pGEM®-T easy vector สารละลายดีเอ็นเอ และเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16 ชั่วโมง

2.7 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

นำ Ligation reaction ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาใส่ใน Competent cells ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้สารทั้งสองเข้ากันเบาๆ นำไปแช่ไว้บนน้ำแข็ง 20 นาที แล้วผ่านความร้อนอย่างรวดเร็วใน Water bath ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วจึงนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันทีอีก 2 นาที นำมาเติมอาหาร SOC medium ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที นำสารละลายที่ได้ 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C

2.8 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* สีขาวจาก LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ซึ่งแสดงว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการมาเลี้ยงต่อในอาหาร LB Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ผสมแอมพิซิลิน แล้วบ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วจึงนำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Re-suspension Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ Lysis Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเบาๆ ก่อนจะเติม Neutralization Solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำสารละลายส่วนใสมาใส่ในคอลัมน์ แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นนำคอลัมน์มาล้างด้วย Wash Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ก่อนจะล้างด้วย Wash Solution ซ้ำอีกครั้ง ละลายพลาสมิดที่อยู่ในคอลัมน์โดยใช้สารละลาย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วจึงนำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บพลาสมิดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.9 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดมาตรวจสอบหาชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการที่แทรกอยู่ใน pGEM®-T easy vector โดยเตรียม Reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย (1) 10x Fast Digest buffer (2) Fast Digest enzyme (*EcoRI*) (3) พลาสมิด และ (4) Nuclease-free water โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน

5 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำสารละลายที่ได้มาตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอที่โคลนได้บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่ได้กับ GeneRuler™ Express DNA Ladder (Fermentas)

2.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาคุณลักษณะของยีน

หลังจากตรวจสอบว่ามียีนที่ต้องการในพลาสมิด ส่งพลาสมิดไปห้องปฏิบัติการของบริษัทเอกชน เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ค้นหาส่วน Intron และ Exon ของยีน HSC70 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปจีโนมิกดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม (BLASTn) ผ่านเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nih.gov>

3. การแสดงออกของยีน HSC70 ในเนื้อเยื่อปลาตกอุกภายใต้สภาวะปกติด้วยวิธี RT-PCR

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสมอง หัวใจ ตับและกล้ามเนื้อสันหลังจากปลาตกอุกที่เลี้ยงในบ่อดินและสกัด Total RNA จากเนื้อเยื่อแต่ละชนิด แล้วนำ RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์ First-strand cDNA โดยใช้ iScript™ Select cDNA Synthesis kit (BIO-RAD) ไพรมเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน HSC70 ออกแบบจากลำดับ cDNA (ตารางที่ 1) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย (1) 1x Taq buffer (2) MgCl₂ ความเข้มข้น 0.75 mM (3) dNTPs แต่ละชนิดความเข้มข้น 0.2 mM (4) ไพรมเมอร์ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ (5) เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 U (Fermentas) และ (6) First-strand cDNA ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ 26 รอบ ดังนี้ 1) อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที 2) อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 3) อุณหภูมิ 58°C นาน 30 วินาที และ 4) อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที และรอบสุดท้ายตั้งอุณหภูมิ 72°C อีก 5 นาที และใช้การแสดงออกของยีน β -actin เป็นตัวควบคุมภายใน นำผลผลิตพีซีอาร์จากเนื้อเยื่อแต่ละชนิดประมาณ 10 ไมโครลิตร มาแยกขนาดบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% ในบัฟเฟอร์ (1xTBE) ผ่านกระแสไฟ 100 Volts และเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

4. การแสดงออกของยีน HSC70 ในการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย

4.1 การวางแผนการทดลอง

คัดเลือกปลาตกอุกอายุ 4 เดือน ที่ปราศจากโรคจำนวน 100 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 29.7 ± 6.4 กรัม จากบ่อดินของภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาพักในถังพลาสติกความจุ 250 ลิตร จำนวน 5 ถัง ถึงละ 20 ตัว เพื่อปรับสภาพก่อนการทดลองเป็นเวลา 7 วันให้อาหารสำเร็จรูป 5% ของน้ำหนักตัวสองครั้งเช้าและเย็น และสุมปลาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทางช่องท้องปลาแต่ละตัว

กลุ่มที่ 2 ฉีดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรทางช่องท้องปลาแต่ละตัว

4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค *Semi-quantitative RT-PCR*

เก็บเนื้อเยื่อสมอง หัวใจ ตับ และกล้ามเนื้อ จากปลาทั้ง 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อหรือน้ำเกลือ นำเนื้อเยื่อมาสกัด Total RNA ด้วยสารละลาย TRIzol reagent และสังเคราะห์ First-strand cDNA โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) นำ Total RNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาบ่มกับ Oligo (dT)₁₈ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที และผสม 5x Reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร กับ Ribonuclease inhibitor (RiboLock™) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dNTP Mix ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที แล้วเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C นาน 60 นาที ต่อด้วยอุณหภูมิ 70°C นาน 10 นาที

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย (1) First-strand cDNA template ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (2) dNTPs แต่ละชนิดความเข้มข้น 0.2 mM (3) บัฟเฟอร์ (1x Taq buffer) (4) Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 U (5) ไพรมเมอร์ส่วนหน้าและไพรมเมอร์ส่วนกลับอย่างละ 1 ไมโครโมลาร์ โดยเพิ่มปริมาณภายใต้สภาวะดังนี้ 1) อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที 2) อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 3) อุณหภูมิ 58°C นาน 30 วินาที และ 4) อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที จำนวน 26 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72°C อีก 5 นาที แยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% วัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอโดยเครื่อง FluorChem™ 8000 Advanced Fluorescence, Chemiluminescence and Visible Light Imaging (Alpha Innotech Corporation) ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์อ่านความเข้มแถบดีเอ็นเอเป็นค่า Pixel density values (Integrated Density Value หรือ IDV) นำค่า IDV ไปคำนวณอัตราส่วนการแสดงออกของยีนเป้าหมาย เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *β-actin* ซึ่งจะกำหนดค่า IDV เท่ากับ 100

4.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลการแสดงออกของยีน *HSP70* จะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างการแสดงออกของยีนแต่ละยีนระหว่างช่วงเวลาด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างการแสดงออกของยีนทั้งสองที่ช่วงเวลาเดียวกันด้วย *t*-test กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

การโคลนยีน Myostatin (*MSTN*) และการแสดงออกระหว่างการเจริญเติบโตของปลาดุกอุย

1. การโคลน cDNA ของยีน *MSTN*

1.1 การออกแบบไพรเมอร์

เนื่องจากยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน *MSTN* ในปลาดุกอุย จึงต้องออกแบบ Degenerate primers ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* ในปลาดุกอเมริกัน *Ictalurus punctatus* (AF 396747.1) ซึ่งเป็นปลาที่มีความใกล้เคียงทางวิวัฒนาการกับปลาดุกอุยมากที่สุด ใช้โปรแกรม BLASTn เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาชนิดอื่น ๆ ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ได้แก่ *I. furcatus* (AY540992.1) *Ameiurus catus* (AY540994.1) *Pseudobagrus fulvidraco* (DQ767966.1) *Megalobrama pellegrini* (GU553284.1) *Gobiocypris rarus* (FJ482232.1) *Labeo rohita* (GQ332409.1) *Procypris rabaudi* (GU553283.1) *Cyprinus carpio* (GQ214769.1) *Ctenopharyngodon idella* (EU555520.1) และ *Pimephales promelas* (EU714297.1) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดโดยใช้ โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) หลังจากนั้น ออกแบบไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) และทดสอบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.html>)

ตารางที่ 2 รายชื่อไพรเมอร์จำเพาะ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และตำแหน่งของยีนในการโคลนยีน *MSTN* ในปลาดุกอุย

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ตำแหน่งยีน*	วัตถุประสงค์
MSTN1_F	TGCAGATATCGCGACTCATGC	578-598	cDNA cloning
MSTN1_R	CTTGCCGTAGATGATCTGCTC	1132-1152	cDNA cloning
3'RACE_MSTN	CTGGTGAAGAGGGACTGCTCCATTCTTGG	1-17	cDNA cloning
5'RACE_MSTN	GCACATAGTCACACACTCGCCGAGCAGTAGT	411-431	cDNA cloning
MSTN2_F	ATCATGCATTTGGCGCAGGT	983-1012	5'RACE
MSTN2_R	GCCATGCTCATGACGGTCTC	794-823	3'RACE
RTMSTN_F	CAACGATCTGGCTATCACTTCTGC	765-789	Semi-quantitative RT-PCR
RTMSTN_R	CGAGCAGTAGTTAGCTTTGTAGCG	969-993	Semi-quantitative RT-PCR
Ipβ-actin-F**	AGAGAGAAATTGTCCGTGACATC		Semi-quantitative RT-PCR
Ipβ-actin-R**	CTCCGATCCAGACAGAGTATTTG		Semi-quantitative RT-PCR

*ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจากยีน *MSTN* (Accession number JX456396) ของปลาดุกอุย

**ไพรเมอร์ของยีน β-actin (Accession number AY555575)

1.2 การสกัด Total RNA และการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *MSTN*

สกัด Total RNA จากกล้ามเนื้อบริเวณลำตัวด้านบนของปลาดุกอุยโดยใช้ TRIzol reagent ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจสอบผลด้วยการแยก mRNA บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% จากนั้นสังเคราะห์ First strand cDNA โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป RevertAidTM cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ใช้ First-strand cDNA เป็น ต้นแบบ เพื่อเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดสภาวะการทำงาน 40 รอบ

ดังนี้ 1) อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที 2) อุณหภูมิ 58°C นาน 1 นาที 3) อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที และรอบสุดท้ายตั้งอุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที แยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% จากนั้นตัดเจลบริเวณแถบที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas) แล้วนำมาโคลนโดยเชื่อมต่อกับส่วนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector (Promega) แล้วย้ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10B โดยใช้วิธี Electroporation และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่านาน 90 นาที จากนั้นคัดเลือก Blue-white colony โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน สาร X-Gal และสาร IPTG แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Ampicillin แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน เพื่อใช้เป็น Master plate จากนั้นคัดเลือกโคลนของแบคทีเรียผลบวกโดยใช้เทคนิค Colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ M13 และ Degenerate primers ที่ออกแบบข้างต้น โดยกำหนดสภาวะการทำงาน 40 รอบ ดังนี้ 1) อุณหภูมิ 94°C นาน 45 วินาที 2) อุณหภูมิ 58°C นาน 45 วินาที และ 3) อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% คัดเลือกโคลนผลบวกที่ต้องการ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Ampicillin แบบเหลว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าตลอดเวลา นานประมาณ 12-16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัด พลาสมิดโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) จากนั้นส่งพลาสมิดไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัทไบโอดีไซน์ จำกัด โดยใช้ Universal primer T7

1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (696 คู่เบส) ของยีน *MSTN* ในปลาตุกอุยไปเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับปลาชนิดอื่น โดยใช้โปรแกรม BLASTN พบว่ามีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับยีน *MSTN* ในปลาตุกอเมริกัน (*I. punctatus*) โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 536 bits และ E-value เท่ากับ 0.0 ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* ในปลาตุกอุยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะอีกครั้งหนึ่ง เพื่อใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) เนื่องจาก cDNA ของยีน *MSTN* ในปลาตุกอเมริกัน (*I. punctatus*) ซึ่งใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง มีความยาวประมาณ 1,170 คู่เบส แบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นปลายทางด้าน 5' และส่วนที่ 3 เป็นปลายทางด้าน 3' ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลายทั้งสองด้านจะโคลนโดยเทคนิค RACE ส่วนที่ 2 ของยีนจะโคลนจากจีโนมดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (ตารางที่ 2)

1.4 การโคลนยีนด้วยเทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE)

สกัด Total RNA จากกล้ามเนื้อปลาตุกอุย อายุประมาณ 2 ปี จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้ TRIzol reagent แล้วตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโน

เมตร และตรวจสอบผลด้วยการแยก mRNA บน Formaldehyde agarose gel ความเข้มข้น 1% จากนั้นนำ Total RNA ที่ได้มาแยก mRNA ด้วย QuickPrep mRNA Purification Kit (GE Healthcare) แล้วสังเคราะห์ First-strand cDNA โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) โดยแยกสังเคราะห์ 2 หลอดทดลอง หลอดแรกสังเคราะห์ 5' RACE Ready cDNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ทางปลาย 5' และหลอดที่สองสังเคราะห์ 3' RACE Ready cDNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ทางปลาย 3' โดยกำหนดสภาวะการทำงานแบบ Touchdown ซึ่งมีสภาวะการทำงานดังนี้ 1) อุณหภูมิ 94°C 30 วินาที 2) อุณหภูมิ 72°C 3 นาที จำนวน 5 รอบ 3) อุณหภูมิ 94°C 30 วินาที 4) อุณหภูมิ 70°C 30 วินาที 5) อุณหภูมิ 72°C 3 นาที จำนวน 5 รอบ 6) อุณหภูมิ 94°C 30 วินาที 7) อุณหภูมิ 68°C 30 วินาที และ 8) อุณหภูมิ 72°C 3 นาที จำนวน 25 รอบ โดยในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีส่วนผสมของสารละลายในปฏิกิริยาดังนี้ (1) 5' RACE Ready cDNA หรือ 3' RACE Ready cDNA ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร (2) 10x LA PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร (3) dNTP Mix ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (4) LA Taq polymerase ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร (5) MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 mM ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร (6) Universal Primer Mix (UPM) 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3' ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร (7) ไพรเมอร์ทางด้านปลาย 5' ใช้เป็นไพรเมอร์ส่วนกลับ และไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' ใช้เป็นไพรเมอร์ส่วนหน้า (ตารางที่ 2) อย่างละ 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ 11 ไมโครลิตรเพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ไปแยกขนาดบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1%

จากนั้นตัดเจลบริเวณแถบที่ต้องการ นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJETTM Gel Extraction Kit (Fermentas) แล้วนำมาโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) แล้วย้ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยใช้วิธี Heat-shock แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่า นาน 90 นาที จากนั้นคัดเลือก Blue-white colony โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สาร X-Gal และสาร IPTG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Ampicillin agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน เพื่อใช้เป็น Master plate จากนั้นคัดเลือกโคลนผลบวกนำมาเกลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Ampicillin แบบเหลว ปริมาตร 3 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าตลอดเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน cDNA ที่ต้องการด้วยเทคนิค Restriction enzyme digestion โดยใช้เอนไซม์ *EcoRI* ตัด Recombinant DNA เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการโคลน ซึ่งส่วนผสมของสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย (1) พลาสมิด ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (2)

10xbuffer *Eco* RI ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (3) เอนไซม์ *Eco*RI ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ (4) น้ำปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร จนได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยแยกแแถบบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย 1xTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแแถบดีเอ็นเอด้วยการย้อม ด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปส่องภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation จากนั้นส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen, Inc.

การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ 2 จะโคลนจากจีโนมคิตีเอ็นเอที่สกัดจากครีบน้ำปลาดุกอยู่โดยวิธี Phenol/chloroform ดัดแปลงจากวิธีของ Taggart และคณะ (1992) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดสภาวะการทำงาน 30 รอบ ดังนี้ 1) อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 2) อุณหภูมิ 58°C นาน 30 วินาที 3) อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที และ 4) รอบสุดท้ายอุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ไปแยกขนาดบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas) แล้วนำมาโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector (Promega) แล้วย้ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยใช้วิธี Heat-shock แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่า นาน 90 นาที จากนั้นคัดเลือก Blue-white colony โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน สาร X-Gal และสาร IPTG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืนหลัง คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวเขียนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Ampicillin agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน เพื่อใช้เป็น Master plate จากนั้นคัดเลือกโคลนของแบคทีเรียผลบวกด้วยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน MSTN ในปลาดุกอยู่ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ กำหนดสภาวะการทำงาน 30 รอบ ดังนี้ 1) อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 2) อุณหภูมิ 56°C นาน 30 วินาที และ 3) อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% คัดเลือกโคลนผลบวกมาเกลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Ampicillin แบบเหลว ปริมาตร 5 มิลลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่าตลอดเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) จากนั้นส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท MacroGen Inc.

1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MSTN ในปลาดุกอยู่แล้ว นำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยในโปรแกรม BLASTn กำหนดให้มีความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และต้องมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (E-value) น้อยกว่า 10^{-4} ส่วนการเปรียบเทียบความ

คล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนใช้โปรแกรม BLASTx โดยบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันนั้นต้องมีจำนวนของกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 10 หน่วย มีความคล้ายคลึงกันไม่น้อยกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (E-value) น้อยกว่า 10^{-4}

ใช้โปรแกรม Genetyx version 7.0 ตัดส่วน 5'UTR และ 3'UTR ของ ยีน *MSTN* ออกก่อน แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนทั้งหมด มาหาค่าความเหมือน (Identity) และ ความคล้ายคลึง (Similarity) เปรียบเทียบกับยีน *MSTN* ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ด้วยโปรแกรม MatGAT2.01 จากนั้นหาตำแหน่ง Hydrophobic leader peptide และตัดส่วนนี้ออกโดยใช้โปรแกรม DAS Transmembrane prediction (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)

1.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *MSTN* ของปลาดุกอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม ClustalW จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.1 โดยกำหนดค่าการสุ่ม (Bootstrap) เท่ากับ 1,000 ครั้ง สิ่งมีชีวิต (หมายเลขอ้างอิงของลำดับกรดอะมิโน) ที่ใช้ในการเปรียบเทียบคือ ปลา White catfish *Ameiurus catus* (AY540994.1) ปลา Common carp *Cyprinus carpio* (GQ214769.1) ปลา Zebrafish *Danio rerio* *MSTN-1* (AF019626.1) และ *MSTN-2* (AY687474.1) ปลา Organe-spotted grouper *Epinephelus coioides* (AY856860.1) ปลา Blue catfish *Ictalurus furcatus* (AY540992.1) ปลา Channel catfish *Ictalurus punctatus* (AF396747.1) ปลา Wuchang bream *Megalobrama amblycephala* (JQ065336.1) ปลา White perch *Morone americana* (AF290911.1) ปลา White bass *Morone chrysops* (AF197194.1) ปลา Striped seabass *Morone saxatilis* (AF290910.1) ปลา Cutthroat trout *Oncorhynchus clarkii* *MSTN-2a* (JN990758.1) ปลา Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* *MSTN-1* (AF273035.1) และ *MSTN-2* (AF273036.1) ปลา Sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* *MSTN-2a* (JN990761.1) ปลา Yellow catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (DQ767966.1) ปลา Atlantic salmon *Salmo salar* *MSTN-1a* (AJ344158.3), *MSTN-1b* (AJ297267.3) และ *MSTN-2a* (JN990763.1) ปลา Brook trout *Salvelinus fontinalis* (AF247650.2) ปลา Gilthead seabream *Sparus aurata* (AF258448.1) ปลา Fugu rubripes *Takifugu rubripes* (AY445322.1) ปลา Grayling *Thymallus thymallus* *MSTN-2a* (JN990766.1) ปลา Tilapia *Tilapia mossambica* (AF197193.3) ปลา Shi-drum *Umbrina cirrosa* (AF316881.1) ห่าน *Anser anser* (AY448009.1) นกพิราบ Rock pigeon *Columba livia* (AF440863.1) นก Quail *Coturnix coturnix* (AF407340.1) ไก่ *Gallus gallus* (AY448007.1) ไก่วง *Meleagris gallopavo* (AF019625.1) โค Cattle *Bos taurus* (AF019620.1) สุนัข *Canis*

familiaris (AY367768.1) แพะ *Capra hircus* (GU377303.1) ม้า *Equus caballus* (AB033541.1) มนุษย์ *Homo sapiens* (AF019627.1) ลิง macaque *Macaca fascicularis* (AY055750.1) หนู *Mus musculus* (BC105674.1) ลิง Baboon *Papio hamadryas* (AF019619.1) หนู *Rat Rattus norvegicus* (AF019624.1) และหอย Japanese scallop *Chlamys farreri* (DQ988329.3) เป็น out-group

2. การแสดงออกของยีน Myostatin

2.1 การแสดงออกของยีน *MSTN* ในเนื้อเยื่อปลาตกูยโดยเทคนิค RT-PCR

ผ่าตัดเก็บเนื้อเยื่อสมอง หัวใจ ลำไส้ ไต ตับ กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อ ผิวหนัง และม้าม จากปลาตกูย อายุประมาณ 2 ปี (น้ำหนักตัว 183 กรัม) สกัด Total RNA โดยใช้ TRIzol reagent แล้วตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ โดยนำไปวัดค่า ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและตรวจสอบผลด้วยการแยก mRNA บน Formaldehyde agarose gel ความเข้มข้น 1% นำ Total RNA 1 ไมโครกรัมย่อยด้วย เอนไซม์ DNase I (Fermentas) แล้วสังเคราะห์ First-strand cDNA ด้วย ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป RevertAid™ M-MuL Reverse Transcriptase (Fermentas) ด้วย oligo(dT)₁₈ primers (Fermentas) ใช้ First-strand cDNA เป็นต้นแบบเพิ่มปริมาณ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดสภาวะการทำงาน 30 รอบ ดังนี้ 1) อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 2) อุณหภูมิ 58°C นาน 30 วินาที 3) อุณหภูมิ 72°C นาน 90 วินาที และ 4) รอบสุดท้ายตั้งอุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ ยีน *MSTN* (RT_ *MSTN*-F 5'-CAACGATCTGGCTATCACTTCTGC-3' และ RT_ *MSTN*-R 5'-CGAGCAGTAGTT AGCTTTGTAGCG-3') และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน β -actin (β -actin-F 5'-AGAGAGAAA TTGTCCGTGACATC-3' และ β -actin-R 5'-CTCCGATCCAGACAGAGTATTTG-3') เป็นตัวควบคุมภายใน นำ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปแยกขนาดบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% ใน 1xTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยการย้อม Ethidium bromide แล้วนำไปส่องภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation

2.2 การแสดงออกของยีน *MSTN* ระหว่างพัฒนาการระยะต่างๆ

ปลาตกูยที่ใช้ในการทดลองนี้ผลิตที่โรงเพาะฟัก ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เลี้ยงปลาที่ความหนาแน่น 60 ตัวต่อตารางเมตร ในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร เป็นระยะเวลา 6 เดือน ให้อาหารที่มีโปรตีน 32% วันละ 2 ครั้ง เก็บตัวอย่างปลาตกูยทั้งตัวที่ระยะ 1, 2 และ 3 สัปดาห์หลังจากการฟักเป็นตัวแล้ว ส่วนปลาตกูยอายุ 1-6 เดือน จะเก็บตัวอย่างเฉพาะเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ระยะละ 5 ตัว ตัวอย่างทั้งหมดเก็บใน TRIzol reagent เพื่อสกัด Total RNA นำ Total RNA 1 ไมโครกรัม ย่อยด้วย เอนไซม์ DNase I (Fermentas) แล้วสังเคราะห์ First-strand cDNA ด้วย ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป RevertAid™ M-MuL Reverse Transcriptase (Fermentas) และ oligo(dT)₁₈ primers (Fermentas) ใช้ First-strand cDNA เป็นต้นแบบเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดสภาวะการทำงาน

30 รอบ ดังนี้ 1) อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 2) 58°C นาน 30 วินาที 3) อุณหภูมิ 72°C 90 วินาที และ 4) รอบสุดท้ายตั้งอุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *MSTN* (RT_ *MSTN*-F 5'-CAACGATCTGGCTATCAC TTCTGC-3' และ RT_ *MSTN*-F 5'-CGAGCAGTAGTT AGCTTTGTAGCG-3') และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน β -actin (β -actin-F 5'-AGAGAGAAA TTGTCCGTGACATC-3' และ β -actin-R 5'-CTCCGATCCAGACAGAGTATTTG-3') เป็นตัวควบคุมภายใน นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปแยกขนาดบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% ใน 1xTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยการย้อม Ethidium bromide แล้วนำไปส่องภายใต้แสงยูวีและวัดระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง FluorchemTM 8000 Advanced Fluorescence และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์อ่านความเข้มเจลเป็นค่า Pixel density values (Integrated Density Value หรือ IDV) นำค่า IDV ไปคำนวณอัตราส่วนการแสดงออกของยีนเป้าหมาย เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin ซึ่งจะกำหนดค่า IDV เท่ากับ 100

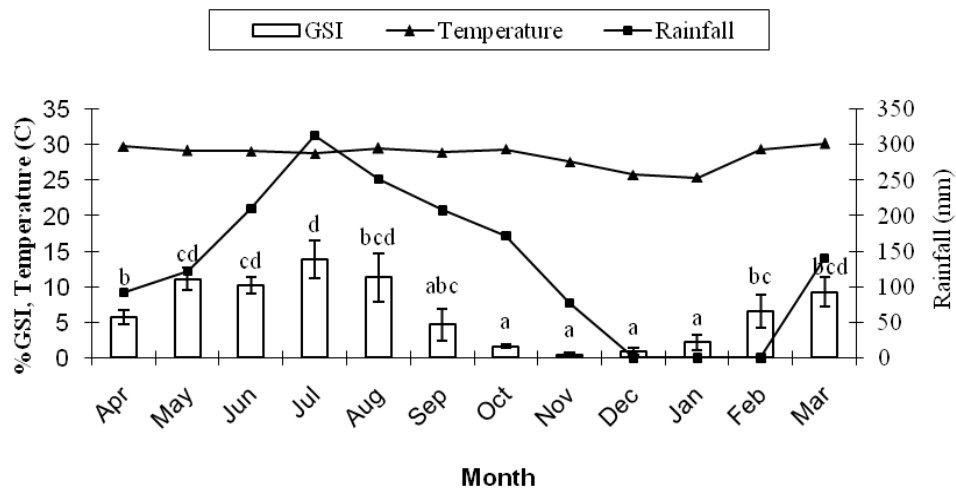
คำนวณค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการแสดงออกของยีน *MSTN* เปรียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทุกระยะพัฒนาการโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS, 2003) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการแสดงออกระหว่างช่วงพัฒนาการ ด้วยวิธี Duncan multiple range test กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P<0.05$

ผลลัพธ์ (RESULTS)

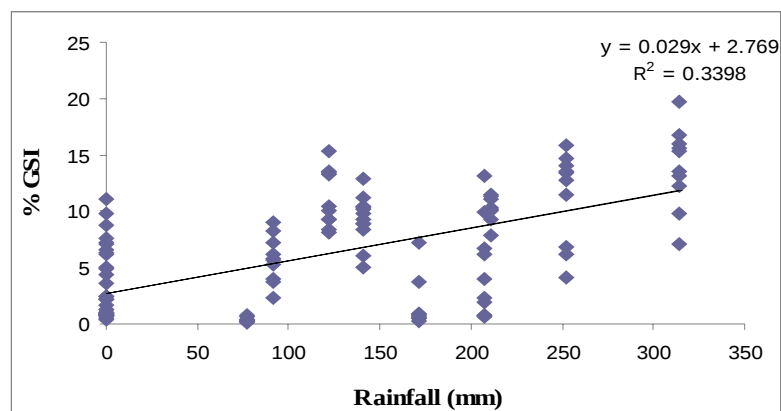
ผลของการเพิ่มอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของรังไข่ปลาตุ๊กตูลงหลังฤดูเพาะพันธุ์

1. พัฒนาการในรอบปีของรังไข่ปลาตุ๊กตูลงที่เลี้ยงในบ่อดิน

ระหว่างการเก็บตัวอย่างปลาตุ๊กตูลงที่เลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 1 ปี ได้บันทึกปริมาณน้ำฝน และอุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละเดือน (ภาพที่ 3) ปรากฏว่าอุณหภูมิในบ่อดินมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 25-30°C โดยอุณหภูมิในบ่อดินต่ำสุดในเดือนธันวาคมและมกราคม ปริมาณน้ำฝนมีค่า 0 มิลลิเมตร ตั้งแต่เดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์และมากที่สุด 313 มิลลิเมตร ในเดือนกรกฎาคม ส่วนค่า GSI ในรอบปีมีการเปลี่ยนแปลงและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างเดือนเมษายนถึงสิงหาคม ค่าเฉลี่ย GSI อยู่ระหว่าง $5.7\pm 2.0\%$ ถึง $11.3\pm 6.3\%$ โดยค่าเฉลี่ย GSI สูงสุดในเดือนกรกฎาคม ($13.9\pm 3.6\%$) ค่าเฉลี่ย GSI ลดลงตั้งแต่เดือนกันยายนถึงธันวาคม ($0.4\pm 0.2\%$ ถึง $0.9\pm 0.5\%$) และค่าเฉลี่ย GSI ค่อยๆเพิ่มขึ้นตั้งแต่เดือนมกราคมถึงมีนาคม ($2.2\pm 1.5\%$ ถึง $9.3\pm 2.1\%$) ผลการวิเคราะห์หรีเกอร์สชันพบว่าค่า GSI และปริมาณน้ำฝนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($r=0.656$, $P<0.01$) (ภาพที่ 4)

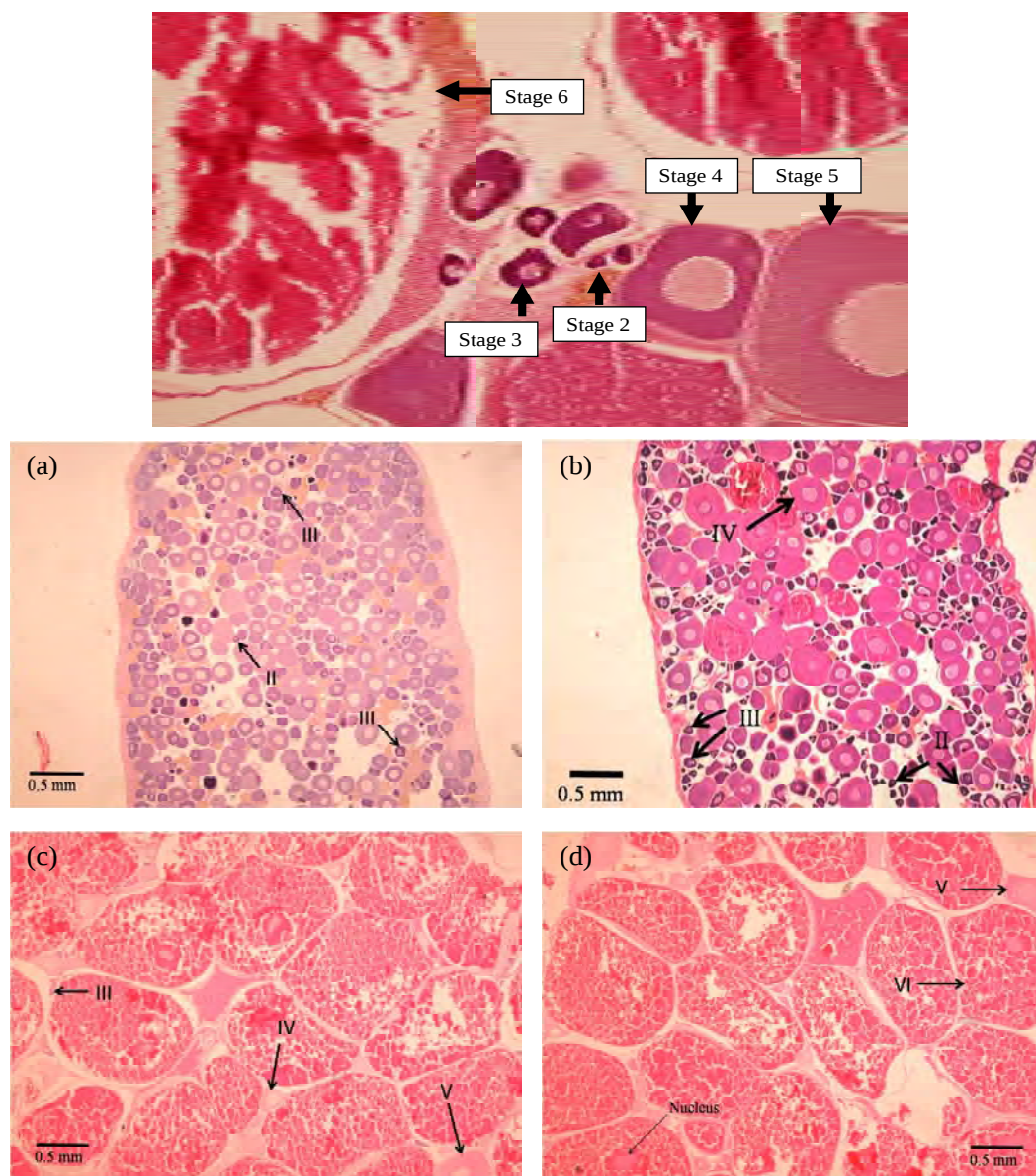


ภาพที่ 3 ค่า GSI ของแม่ปลาตุ๊กตูลง ปริมาณฝนและอุณหภูมิในบ่อดินในรอบปี

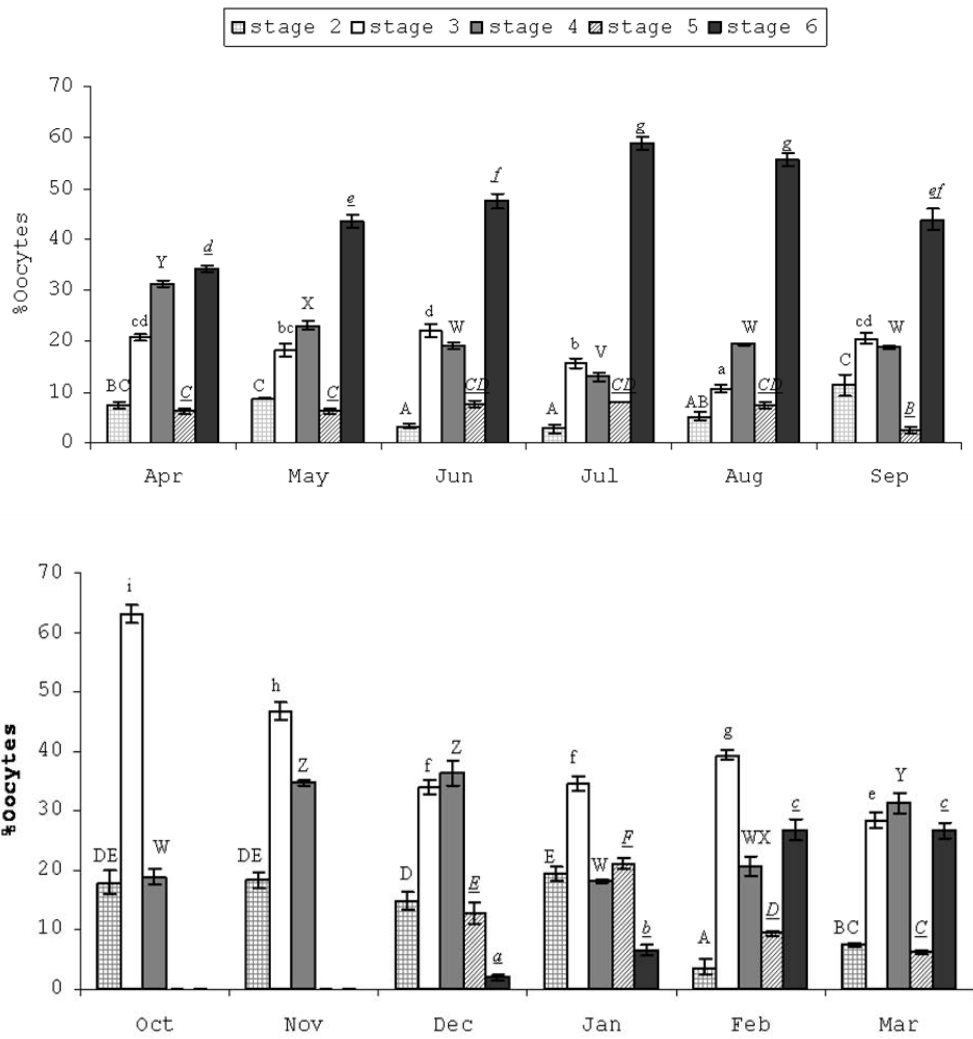


ภาพที่ 4 สหสัมพันธ์ระหว่างค่า GSI กับปริมาณฝน

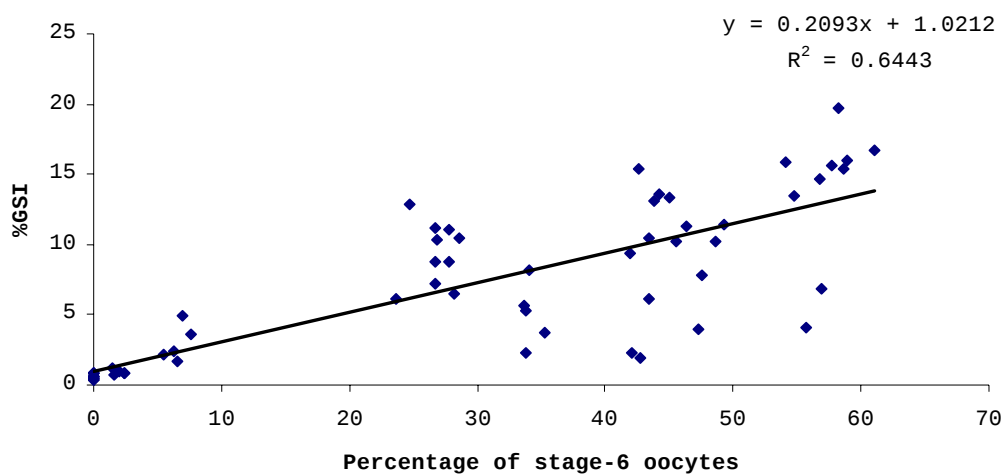
รังไข่ปลาตุกอยแต่ละเดือนมีพัฒนาการแตกต่างกัน สามารถแบ่งระยะไข่ในรังไข่ได้ 6 ระยะ (ภาพที่ 5) ไข่ระยะต่างๆมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางดังนี้ ไข่ระยะที่ 2 (0.046 มิลลิเมตร) ไข่ระยะที่ 3 (0.062 มิลลิเมตร) ไข่ระยะที่ 4 (0.185 มิลลิเมตร) ไข่ระยะที่ 5 (0.35 มิลลิเมตร) และไข่ระยะที่ 6 (1.0 มิลลิเมตร) ในฤดูเพาะพันธุ์ปลาตุกอยตั้งแต่เดือนเมษายนถึงกันยายน รังไข่จะมีสัดส่วนไข่ระยะที่ 6 มากที่สุด (34.1 ± 0.7 ถึง $59.0 \pm 1.3\%$) (ภาพที่ 6) หลังฤดูผสมพันธุ์ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน ไม่พบไข่ระยะที่ 5 และ 6 โดยพบว่ารังไข่จะมีสัดส่วนไข่ระยะที่ 3 มากที่สุด (46.8 ± 1.4 ถึง $63.1 \pm 1.5\%$) ในเดือนธันวาคมไข่มีพัฒนาการเข้าสู่ระยะที่ 5 ($12.8 \pm 1.6\%$) และระยะที่ 6 ($1.9 \pm 0.4\%$) และสัดส่วนไข่ระยะที่ 6 ค่อยๆเพิ่มมากขึ้นจนถึงเดือนมีนาคม ($26.7 \pm 1.4\%$) และตรวจพบไข่ทุกระยะในรังไข่ ผลการวิเคราะห์รีเกรสชันพบว่าค่า GSI และสัดส่วนไข่ระยะที่ 6 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($r=0.803$, $P<0.001$) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 5 พัฒนาการของรังไข่ระยะต่างๆในปลาตุกอยที่เลี้ยงในบ่อดิน



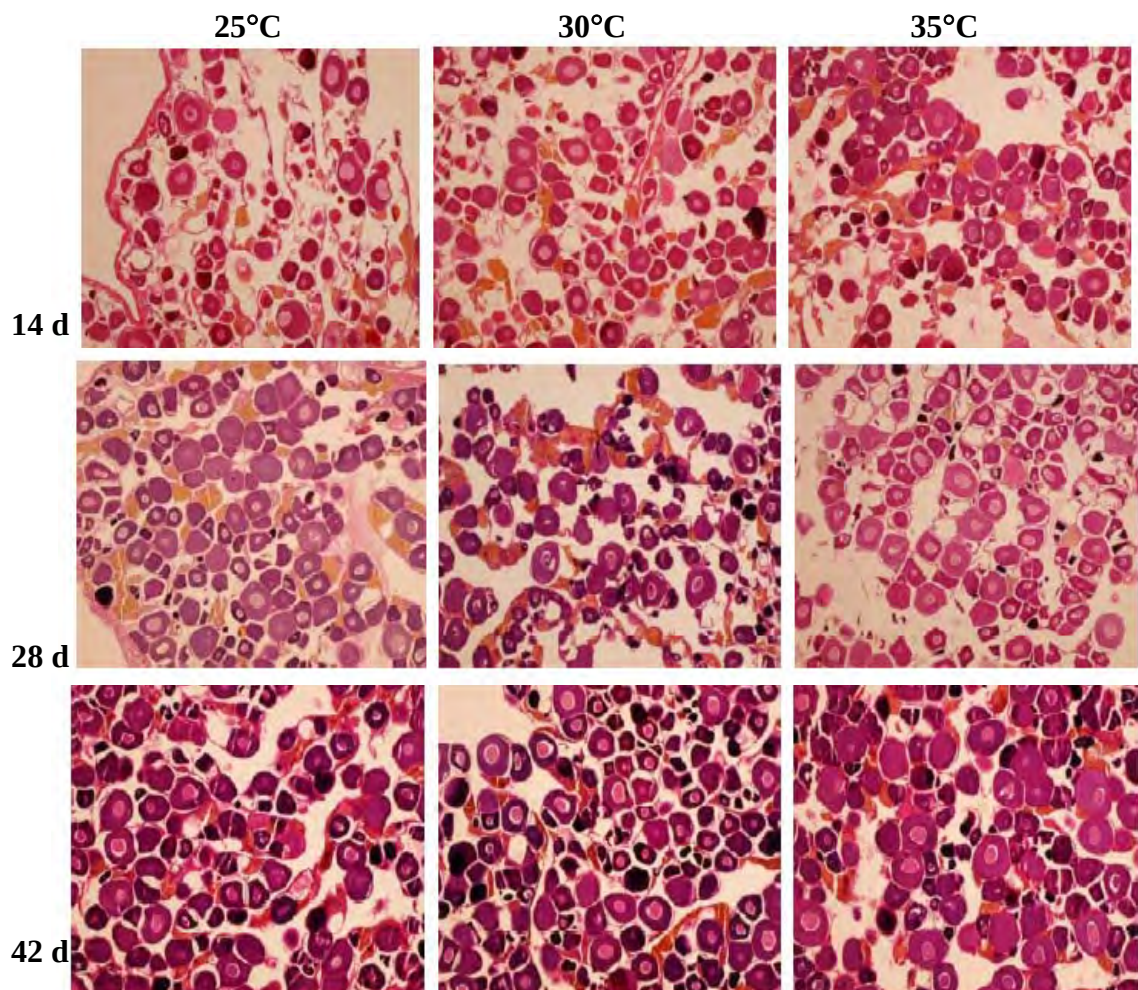
ภาพที่ 6 สัดส่วนของไข่ระยะต่างๆที่พบในรังไข่ปลาตุ๊กตากลูที่เลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 1 ปี



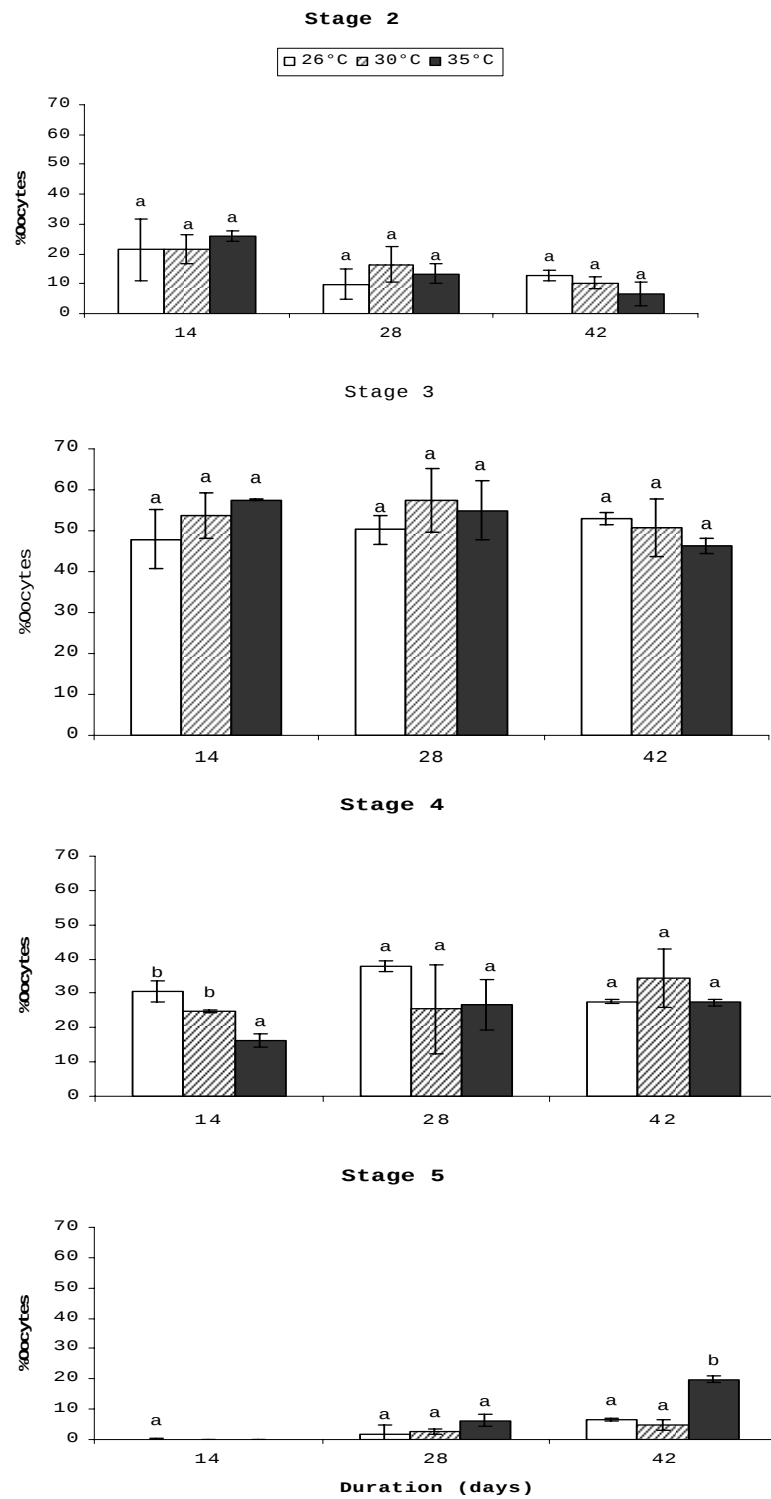
ภาพที่ 7 สหสัมพันธ์ระหว่างค่า GSI กับไข่ระยะที่ 6

2. พัฒนาการของรังไข่ปลาตุ๋กอุยที่เลี้ยงในตู้กระจกและเพิ่มอุณหภูมิน้ำ

ผลของการเพิ่มอุณหภูมิน้ำต่อพัฒนาการของรังไข่ปลาตุ๋กอุยที่เลี้ยงในตู้กระจกเป็นเวลา 6 สัปดาห์แสดงในภาพที่ 8 ในสัปดาห์ที่ 2 รังไข่ปลาทั้ง 3 กลุ่มมีไ้ระยะ 2 ถึงระยะที่ 4 ในสัดส่วนเท่าๆกัน แต่ในสัปดาห์ที่ 4 ปลาที่เลี้ยงในตู้กระจกที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 และ 35°C มีพัฒนาการของไข่เข้าสู่ระยะที่ 5 ในขณะที่รังไข่ของปลาชุดที่เลี้ยงในตู้กระจกที่อุณหภูมิปกติและรังไข่ปลาตุ๋กอุยในบ่อดินมีพัฒนาการอยู่เฉพาะระยะที่ 2 ถึงระยะที่ 4 เท่านั้น ในสัปดาห์ที่ 6 ความแตกต่างของพัฒนาการของรังไข่มีความชัดเจนมากขึ้น โดยปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C มีไ้ระยะที่ 5 ประมาณ $19.7 \pm 1.1\%$ (ภาพที่ 9) ในขณะที่ปลาอีกสองกลุ่มที่เลี้ยงในตู้กระจกมีสัดส่วนไ้ระยะที่ 5 เพียง 6.5 ± 0.6 ถึง $4.6 \pm 1.7\%$ และรังไข่ของปลาตุ๋กอุยที่เลี้ยงในบ่อดินไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากสัปดาห์ที่ 4 และตรวจพบเฉพาะไ้ระยะ 2 ถึงระยะที่ 4 เท่านั้น นอกจากนี้ค่าเฉลี่ย GSI ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ของปลาที่เลี้ยงในตู้กระจกและเพิ่มอุณหภูมิน้ำมีค่าสูงกว่า ($0.64-0.68\%$) ปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิปกติในบ่อดินและในตู้กระจก ($0.42-0.47\%$)



ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อรังไข่ระยะต่างๆในแม่ปลาตุ๋กอุยที่เลี้ยงภายใต้การควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 9 สัดส่วนของไข่ระยะต่างๆในแม่ปลาตุ๊กตอยู่ที่เลี้ยงภายใต้การควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 42 วัน

ผลการตรวจเลือดพบว่าปลาตกอยู่ที่เลี้ยงในตู้กระจกภายใต้อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จะมีระดับคอร์ติซอลสูงกว่าปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิปกติและที่ 30°C (ตารางที่ 3) ซึ่งระดับคอร์ติซอลในปลาสองกลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ปลาตกอยู่ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C วัดระดับคอร์ติซอลได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (313.6 ± 30.5 นาโนกรัมต่อมิลลิตร) และระดับคอร์ติซอลลดลงเล็กน้อยเมื่อวัดในสัปดาห์ที่ 6 (251.5 ± 18.6 นาโนกรัมต่อมิลลิตร) ผลการตรวจระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดพบว่ามีความสูงสุด (123.4 ± 12.7 มิลลิโมลต่อลิตร) ในกลุ่มปลาที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 35°C ในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง แต่ค่าระดับน้ำตาลกลูโคสในทุกชุดการทดลองและทุกช่วงเวลาที่วัดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E ของระดับคอร์ติซอลและน้ำตาลกลูโคสในแม่ปลาตกอยู่ที่เลี้ยงในตู้กระจกที่ควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ เป็นเวลา 42 วัน

วัน-อุณหภูมิ	คอร์ติซอล (ng/ml)	กลูโคส (mmol/l)
14 วัน		
25°C	157.46 ± 9.53	79.57 ± 5.01
30°C	121.43 ± 3.14	81.86 ± 11.12
35°C	$299.67 \pm 29.30^*$	101.25 ± 8.17
28 วัน		
25°C	199.72 ± 10.75	61.72 ± 5.46
30°C	133.69 ± 17.18	79.13 ± 3.98
35°C	$313.61 \pm 30.5^*$	92.67 ± 3.83
42 วัน		
25°C	104.93 ± 8.01	73.84 ± 10.53
30°C	133.16 ± 5.18	71.92 ± 7.19
35°C	$251.54 \pm 18.62^*$	123.41 ± 12.70

*แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญภายในสัปดาห์ ($P < 0.05$)

การโคลนยีน Heat shock protein 70 (HSC70) และการแสดงออกของยีนในการตอบสนอง การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

1. การโคลน cDNA ของยีน HSC70

ผลการโคลน cDNA ปรากฏว่าทั้งสองยีนมีจำนวนนิวคลีโอไทด์เท่ากัน (2,278 คู่เบส) ประกอบด้วย Open reading frame (ORF) จำนวน 1,950 คู่เบสซึ่งแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 649 หน่วย และ cDNA ของทั้งสองยีนประกอบบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้แปลรหัสที่ปลายด้าน 5' (5' Untranslated region, UTR) จำนวน 33 คู่เบส และปลายด้าน 3' (3' UTR) จำนวน 295 คู่เบส นอกจากนี้ปลายด้าน 3' จะปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ TAA ซึ่งเป็นรหัสสิ้นสุดการสังเคราะห์โปรตีน และลำดับ AATAAA ซึ่งเป็น Polyadenylation signal ปรากฏที่ตำแหน่งเบส 19 นิวคลีโอไทด์ก่อนถึงบริเวณปลาย poly(A) (ภาพที่ 10 และ 11) น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน HSC70-1 และ HSC70-2 เท่ากับ 71.24 และ 71.27 กิโลดาลตันตามลำดับ ผลการค้นหาคำความเหมือนของโปรตีนทั้งสองชนิดด้วยโปรแกรม BLAST สามารถระบุได้ว่าทั้งสองโปรตีนคือ HSC70

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าประกอบด้วยลำดับที่เป็น Signature sequence ของโปรตีน HSC70 ปรากฏอยู่ 3 ลำดับคือ ลำดับ IDLGTTYS ที่บริเวณ N-terminus ถัดมาเป็นลำดับ IFDLGGGTFDVSIL และ IVLVGGSTRIPKIQK ปรากฏที่ช่วงกลางของโมเลกุลโปรตีน และที่บริเวณ C-terminus ปรากฏลำดับ EEVD (ภาพที่ 8 และ 9) เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนของทั้งสองโปรตีนพบว่า บริเวณ C-terminus ของ HSC70-1 จะปรากฏ Tetra-peptide motif (GGMP) 1 ซ้ำ ในขณะที่ C-terminus ของ HSC70-2 จะปรากฏ Tetra-peptide motif (GGMP) 2 ซ้ำ เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ปรากฏว่าทั้งสองโปรตีนมีกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 94% และมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 38 หน่วย (ภาพที่ 12)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HSC70-1 และ HSC70-2 ของปลาตกอุกกับโปรตีน HSC70 และ HSC71 ในสัตว์ชั้นสูงและปลาชนิดอื่นพบว่า บริเวณ Signature sequence และ EEVD เป็นส่วนที่มีการอนุรักษ์สูงสุด จำนวนกรดอะมิโนของโปรตีนในปลา มีค่าตั้งแต่ 612 ถึง 650 หน่วย โดยจำนวนกรดอะมิโนของโปรตีน HSC70 ในปลาตกอุก และปลาตกอุกอเมริกันมีจำนวนเท่ากันคือ 649 หน่วย ในขณะที่จำนวนกรดอะมิโนของโปรตีน HSC70 ในกบและมนุษย์มีจำนวน 646 หน่วย (ภาพที่ 13 และตารางที่ 4) โดยภาพรวมความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนสำหรับ HSC70-1 และ HSC70-2 ในปลาตกอุก กับปลาชนิดอื่นและสัตว์ชั้นสูงมีค่าระหว่าง 82-95% (ตารางที่ 5) ผู้วิจัยได้ส่งลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HSC70-1 และ โปรตีน HSC70-2 ในปลาตกอุก เพื่อเผยแพร่ในฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank และได้รับ Accession number เพื่อใช้อ้างอิงดังนี้ JX112294 สำหรับโปรตีน HSC70-1 และ JX112295 สำหรับ HSC70-2


```

AACTTTCTAAAGTGCTCGAAGAAATTTTGTAAACCATGTCTAAGGGACCAGCTGTTGGCATT      60
                                     M S K G P A V G [E]
GATCTGGGGACCACATACTCTGTGTTGGAGTCTTCCAGCATGGCAAAGTGGAAATCATT      120
D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I
GCTAATGACCAAGGAACAGGACCACACCAAGCTACGTGGCCCTTCACTGATAGCGAAAGG      180
A N D Q G N R T T P S Y V A F T D S E R
TTGATTGGTGATGCAGCCAGAACCAGGTGGCCATGAACCCCAACACAAATCITTGAT      240
L I G D A A K N Q V A M N P T N T I F D
GCCAAACGTCTGATTGGCAGAAAGTTTGAAGACTCCGTGGTTGAGTCTGACATGAAACAT      300
A K R L I G R R F E D S V V Q S D M K H
TGGCCGTTTCAAGGTTCAGTGATGGTGGACGTCCCAAAGTGGAGTTGAATATAAAGCA      360
W P F F K V I S D G G R P K V E V E Y K A
GAGACTAAGAACTTCTACCCCTGAGGAAATCTCCTCCATGGTGGTGAAGATGAAGGAA      420
E T K N F Y P E E I S M V L V K M K E
ATTGCTGAAGCCTATCTTGGAAAGACCGTCCCAATGCTGTGATCACAGTACCAGCTTAC      480
I A E A Y L G K T V T N A V I T V P A Y
TTCAATGACTCTCAGCGTCAAGCCACAAAAGATGCTGGCACCATCTCTGGTTTAAATGTC      540
F N D S Q R Q A T K D A G T I S G L N V
CTGCGAATTATTAAATGAGCTACTGCTGCTGCTATTGCTATGGGTTGGACAAAGGGAAG      600
L R I I N E P T A A A I A Y G L D K G K
AAAACAGAGCGCAACTCCTTATTTTCGATCTGGCGGTGGTACTTTTGAATGTGTCATC      660
K T E R K A L L I F D L G G G T F D V S I
CTGACCATTGATGATGGCATCTTTGAAGTGAAAGCTACAGCAGGAGACACTCACCTGGGT      720
E T I D D F D Y P E E V K A T A G D T H L G
GGAGAAGACTTTGACAACCGTATGGTCACCCACTTTGTGGAGGAATTTAAGAGGAAGCAC      780
G E D F D N R M V T H F V E E F K R K H
AAGAAAGACATCAGCCAGAACCAAGCGAGCCCTGAGGAGGCTGCGTACAGCCTGTGAGAGA      840
K K D I S Q N K R A L R R L R T A C E R
GCCAAGAGAACCTGTCTCCAGTTCTCAAGCCAGCATTTGAAATGATTCCCTGTATGAG      900
A K R T L S S S S Q A S I E I D S L Y E
GGCACCGACTTTTACACCTCCATCACCAGAGCAGCGCTTTGAGGAGCTGTGTTTACAGCCTG      960
G T D F Y T S I T R A R F E E L C S D L
TTCAGAGGAACACTAGATCCGGTGGAGAAAGCCCTAAGAGATGCCAAAATGGACAAATCC      1020
F R G T L D P V E K A L R D A K M D K S
CAGATCCATGAAATTTGCTCTGGTTGGAGGTTCTACAAGAATCCCAAGATCCAGAACTT      1080
Q I H E I V L V G G S T R I P K I Q K L
CTGCAGACTTCTTTAATGGACGTGAACCTGAACAAAAGCATCAACCCAGATGAGGCGATT      1140
L Q D F F N G R E L N K S I N P D E A V
GCTTATGGTGCTGCATTCAGGCTGCCATCCTTTCTGGTGACACTTCTGGAACGTTCCAG      1200
A Y G A A F Q A A I L S G D T S G N V Q
GACTTGTCTGCTGCTGGATGTGGCTCCACTGTCCCTGGGCATTGAGACAGCAGGAGGAGTC      1260
D L L L L D V A P L S L G I E T A G G V
ATGACCCCACTCATCAACGCAACACCACTATTCCCAACCAACAGACACAAACCTTTAGC      1320
M T P L K R N L T I P T K Q T Q T F S
ACCTACGCAGACAATCTGCCCGGGTCTCTGATCCAGGTGTATGAAGGTGAAAGAGCCATG      1380
T Y A D N L P G V L I Q V Y E G E R A M
ACCAAAGACAACAACCTGCTCGGGAAGTTTGATCTGACAGGCATCCCACCTGCACCTCGG      1440
T K D N N L L G K F D L T G I P P A P R
GGAGTTTCTCAAAGTGAAGTGACCTTTGACATCGATGCCAACGGCATTCTGAACGTCTAT      1500
G V P Q I E V T F D I D A N G I L N V Y
GAAGGTGACAAGAGCACTGGCAAAGAGAATAAGATCACCATCACTAATGACAAAGGTAAT      1560
E G D K S T G K E N K I T I T N D K G N
TTGAGTAAGGAGGACATTGAGCGCATGGTGCAGGAAGCTGAGAAATACAAAGCTGAGGAT      1620
L S K I E R M V Q E A E K Y K A E D
GATGTGCAGCGTGATAAGGTGTCTGCCAAGAATGGTCTGGAGTCTTATGCTTTCAACATG      1680
D V Q R D K V S A K N G L E S Y A F N M
AAGTCCACTGTAGAGGATGAGAAGCTAAAGGATAAAATCAGTGATGAGGATAAGCAGAAG      1740
K S T V E D E K L K D K I S D E D K Q K
ATTCTTGACAAGTGCAATGAAGTAATCAGCTGGCTTGACAAGAACCAGACCGCCGAGAAG      1800
I L D K C N E V I S W L D K N Q T A E K
GAAGAGTATGAGCATCAACATAAGGAGCTGGAGAAGGTCTGTAAACCAATCATCACCAAA      1860
E E Y E H Q H K E L E K V C N P I I T K
CTGTACCAGAGTGCTGGTGGTATGCCAGGTGGTATGCCTGATGGGATGCCTGGTGGTTTC      1920
L Y Q S A G G M P G G M P D G M P G G F
CCAGGAGCCGGAGCTGCTCCCGGTGGCGGATCTTCTGGTCCCACCATCGAGGAGGTTGAT      1980
P G A T A A P G G S S G P T I E E V D
TAAGCCATTCTAAACCTGCTCTACCTCTCCAATGCTTTTACTGCCCTTTGTAGCAAAATCC      2040
*
TGAGACCCTATTAAATGTGTTGGGGCTTTAGATTTTTTCTGCTGCAGAGTGAATGCTTATT      2100
TATAAATAAAAAAGGGGGGAGATTAAGGGGATCACTTCATCAGGGAACAGTTTTTATT      2160
TATACTTGAATGTTGCACAACTTCTCAATTATAGATGTTAAGCCTTTTGCCAATGCCTGG      2220
TTTGCTTGAAGTAAATCTGAATAAAGTGAACTTTTTCCCCCTCAAAAAAAAAAAAAA      2278

```

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน HSC70-2 สำหรับปลาดุกอุย ลำดับ Signature sequence ของโปรตีน HSC70 แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม คือ ลำดับกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้คือ Signal sequence และ EEVD คือ Consensus sequence ตัวเลขด้านขวาคือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ลำดับ AATAAA คือ Polyadenylation signal

CmHSC70-1	MSKGPAVGIDLGTTYS	CVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDSERL	50
CmHSC70-2	MSKGPAVGIDLGTTYS	CVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDSERL	50

CmHSC70-1	IGDAAKNQVAMNPTNTIFDAKRLIGRRFEDSVVQSDMKHWPFKVISDGGR		100
CmHSC70-2	IGDAAKNQVAMNPTNTIFDAKRLIGRRFEDSVVQSDMKHWPFKVISDGGR		100

CmHSC70-1	PKVEVEYKAETKNFYPEEISSMVLVKMKEIAEAYLGKTVTNAVITVPAYF		150
CmHSC70-2	PKVEVEYKAETKNFYPEEISSMVLVKMKEIAEAYLGKTVTNAVITVPAYF		150

CmHSC70-1	NDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSEENVL	IFDL	200
CmHSC70-2	NDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKGKKTERKLL	IFDL	200
***** :*:*****			
CmHSC70-1	GGGTFDVSIL	TIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAEFKRKYK	250
CmHSC70-2	GGGTFDVSIL	TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVTHFVEEFKRKHK	250
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*			
CmHSC70-1	KDISDNKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRA		300
CmHSC70-2	KDISQNKRALRLRTACERAKRTLSSSSQASIEIDSLYEGTDFYTSITRA		300
::*****:*****:*****:*****			
CmHSC70-1	RFEELNADLFRGTLDPVEKSLRDAKLDKSQIHD	IVLVGGSTRIPKIQKLL	350
CmHSC70-2	RFEELCSDLFRGTLDPVEKALRDAKMDKSQIHE	IVLVGGSTRIPKIQKLL	350
*****:*****:*****:*****:*****:*****			
CmHSC70-1	QDFFNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLS		400
CmHSC70-2	QDFFNGRELNKSINPDEAVAYGAAFQAAILSGDTSGNVQDLLLLDVAPLS		400
*****:*****:*****:*****:*****:*****			
CmHSC70-1	LGIETAGGVMTALIKRNTSIPTKQTQTFTTYSQNPVGLIQVYEGERAMT		450
CmHSC70-2	LGIETAGGVMTPLIKRNTTIPTKQTQTFTSTYADNLPVGLIQVYEGERAMT		450
*****:*****:*****:*****:*****:*****			
CmHSC70-1	KDNLLGKGFELTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSAVDKSTGKENK		500
CmHSC70-2	KDNLLGKFDLTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVYEGDKSTGKENK		500
*****:*****:*****:*****:*****:*****			
CmHSC70-1	ITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDDVQRDKVSAKNGLESYAFNMK		550
CmHSC70-2	ITITNDKGNLSKEDIERMVQEAKEYKAEDDVQRDKVSAKNGLESYAFNMK		550
*****:*****:*****:*****:*****:*****			
CmHSC70-1	STVEDEKLKDKISDEDKQTILDKCNEVISWLDKNQTAEKEEYEHQHKELE		600
CmHSC70-2	STVEDEKLKDKISDEDKQILDKCNEVISWLDKNQTAEKEEYEHQHKELE		600
*****:*****:*****:*****:*****:*****			
CmHSC70-1	KVCNPIITKLYQSAGDMPGGMPDGMPPGGFPGAGAAPGGGSSGPTI	EEVD	649
CmHSC70-2	KVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPDGMPPGGFPGAGAAPGGGSSGPTI	EEVD	649
*****:*****:*****:*****:*****:*****			

ภาพที่ 12 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน HSC70-1 และ HSC70-2 ในปลาตุ๊กตา โดย เครื่องหมาย (*) แสดงกรดอะมิโนที่เหมือนกัน เครื่องหมาย (:) แสดงกรดอะมิโนที่มีความสัมพันธ์กันระดับสูง และเครื่องหมาย (.) แสดงกรดอะมิโนที่มีสัมพันธ์กัน ตัวเลขด้านขวาแสดงตำแหน่งกรดอะมิโน Signature sequence ของโปรตีน HSC70 แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

```

HSP70_Salmo          MSSAKGPSIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 60
HSP70_Acanthopagrus  MAPAKGVAIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNH 60
HSP70_Megalobrama    MSSAKGVAIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 60
HSP70_Carassius       MSSAKGVAIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 60
HSP70_Fundulus        MSSAKGISIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 60
HSP70_Paralichthys    MSSAKGISIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 60
HSC70-1_Clarias       -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70-2_Clarias       -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC71_Ictalurus       -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Fundulus        -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Acanthopagrus  -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC71_Paralichthys    -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Pimephales      -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Megalobrama    -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Danio           -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Cyprinus        -----AVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 53
HSC70_Carassius       -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Gallus          -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Homo            -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Xenopus         -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSP70_Xenopus         -MS-KGPAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSC70_Salmo           -MSGKTAVGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 58
HSP70_Gallus          -MSGKGPAIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 59
HSP70_Homo            MATAKGIAIGIDLGTTCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ 60
                        : :*****:*****:

HSP70_Salmo          VAMNPNNTVFDKRLIGRKFNDDVQVQADMKHWPFKVSDGGKPKVQVDYKGENKSFNPEE 120
HSP70_Acanthopagrus  LALNPSNTVFDKRLIGRKMDQVQVQADMKHWPFKVSDGGKPKIQVEYKGEDKTFYPPEE 120
HSP70_Megalobrama    VAMNPNNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWSFKVSDGGKPKVQVEYKGENKTFNPEE 120
HSP70_Carassius       VAMNPNNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWSFKVSDGGKPKVQVEYKGENKTFYPPEE 120
HSP70_Fundulus        VAMNPTNTIFDAKRLIGRKFDVQVQADMKLWPFKVINDDNGKPKVQVEYKGETKAFYFPEE 120
HSP70_Paralichthys    VAMNPTNTIFDAKRLIGRKFNDSIVQSDMKLWPFKVISDNGKPKVQVEYKGETKAFYFPEE 120
HSC70-1_Clarias       VAMNPTNTIFDAKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFKVISDGGKPKVEVEYKAETKNFYFPEE 118
HSC70-2_Clarias       VAMNPTNTIFDAKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFKVISDGGKPKVEVEYKAETKNFYFPEE 118
HSC71_Ictalurus       VAMNPTNTIFDAKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFKVISDGGKPKVEVEYKGEAKNFYFPEE 118
HSC70_Fundulus        VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGESKSFYFPEE 118
HSC70_Acanthopagrus  VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGESKSFYFPEE 118
HSC71_Paralichthys    VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGESKSFYFPEE 118
HSC70_Pimephales      VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFTVINDDTRPKVQVEYKGETKAFYFPEE 118
HSC70_Megalobrama    VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGETKSFYFPEE 118
HSC70_Danio           VPLNPNNTVFDKRLIGAKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGESKSFYFPEE 118
HSC70_Cyprinus        VVMNPTDTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGETKSFYFPEE 113
HSC70_Carassius       VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGETKSFYFPEE 118
HSC70_Gallus          VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFTVINDDAGRPKQVEYKGETKSFYFPEE 118
HSC70_Homo            VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFMVNDAGRPKQVEYKGETKSFYFPEE 118
HSC70_Xenopus         VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKAETKSFYFPEE 118
HSP70_Xenopus         VAMNPTNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFTVINDDAGRPKQVEYKAETKSFYFPEE 118
HSC70_Salmo           VAMNPNCTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFNINDSTRPKVQVEYKGETKSFYFPEE 118
HSP70_Gallus          VAMNPTNTIFDAKRLIGRKFDVQVQADMKHWPFRVNDGGKPKVQVEYKGETKSFYFPEE 119
HSP70_Homo            VAMNPNQNTVFDKRLIGRKFDVQVQADMKLWPFQVINEGGKPKVQVEYKGENKAFYFPEE 120
                        : :* :***** : :* ** ** * * : : :* . . . * * * *

HSP70_Salmo          ISSMVLVKMKEIAEAYLGQKVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA 180
HSP70_Acanthopagrus  ISSMVLVKMKEIAEAYLGQKVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA 180
HSP70_Megalobrama    ISSMVLVKMKEIAEAYLGQKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA 180
HSP70_Carassius       ISSMVLVKMKEIAEAYLGQKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA 180
HSP70_Fundulus        ISSMVLVKMKEIAEAYLGQKVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVISGLNVLRINEPTA 180
HSP70_Paralichthys    ISSMVLVKMKEIAEAYLGQKVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVISGLNLRINEPTA 180
HSC70-1_Clarias       ISSMVLVKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70-2_Clarias       ISSMVLVKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC71_Ictalurus       ISSMVLVKMKEIAEAYLGKVINNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Fundulus        ISSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Acanthopagrus  VSSVLTVMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC71_Paralichthys    ISSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Pimephales      ISSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Megalobrama    ISSMVLTKMKEIAEAYLGKTVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Danio           ISSMVLTKMKEIAEAYLGKTVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVLGAGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Cyprinus        ISSMVLTKMKEIAEAYLGKTVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 173
HSC70_Carassius       ISSMVLTKMKEIAEAYLGKTVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Gallus          ISSMVLTKMKEIAEAYLGKTVNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Homo            VSSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Xenopus         ISSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSP70_Xenopus         VSSMVLTKMKEIAEAYLGKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSC70_Salmo           ISSMVLVKMKEIAEAYLGKTVSNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 178
HSP70_Gallus          ISSMVLTKMKEIAEAYLGKQVQNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRINEPTA 179
HSP70_Homo            ISSMVLTKLKETAELGHPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRINEPTA 180
                        : ** * * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

ภาพที่ 13 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ในปลาตุ๊กตากับปลาและสัตว์ชนิดอื่น โดยเครื่องหมาย (*) แสดงกรดอะมิโนที่เหมือนกัน เครื่องหมาย (:) แสดงกรดอะมิโนที่มีสัมพันธกัน ระดับสูงและเครื่องหมาย (.) แสดงกรดอะมิโนที่มีสัมพันธกัน ตัวเลขด้านขวาแสดงตำแหน่งกรดอะมิโน

HSP70_Salmo	GRELNKSINPDEAVAYGAATQAAAILSGDKSENVDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TALIK	417
HSP70_Acanthopagrus	GRELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILSGDTSGNVDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TSLIK	417
HSP70_Megalobrama	GRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILMGDTSGNVDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TALIK	417
HSP70_Carassius	GRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILMGDTSGNVDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TALIK	417
HSP70_Fundulus	GRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILMGDTSENVQDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TPLIK	417
HSP70_Paralichthys	GRELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILMGDTSENVQDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TPLIK	417
HSC70-1_Clarias	GKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70-2_Clarias	GRELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDTSGNVDLLLLDVAPLSLGIETAGGVM TPLIK	415
HSC71_Ictalurus	GKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAESSLGDKSENVDLVLDDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Fundulus	GKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSP70_Acanthopagrus	GKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC71_Paralichthys	GKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Pimephales	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TILIK	415
HSC70_Megalobrama	GKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Danio	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLYLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Cyprinus	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	410
HSC70_Carassius	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Gallus	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Homo	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Xenopus	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSP70_Xenopus	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSC70_Salmo	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILSGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TVLIK	415
HSP70_Gallus	GKELNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILMGDKSENVDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM TALIK	418
HSP70_Homo	GRDLNKSINPDEAVAYGAAPQAAAILMGDKSEKVDLLLLDVAPLSLGLTAGGVM TALIK	417
*:*****.* **.*:****:****: * **:* **** *		
HSP70_Salmo	RNTIIPSKQTQFTTYSNDQPGVMIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELSGIPPA PRGVPQIE	477
HSP70_Acanthopagrus	RNTIIPKQTQVFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	477
HSP70_Megalobrama	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	477
HSP70_Carassius	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	477
HSP70_Fundulus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	477
HSP70_Paralichthys	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	477
HSC70-1_Clarias	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70-2_Clarias	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC71_Ictalurus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Fundulus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSP70_Acanthopagrus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTRDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC71_Paralichthys	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTRDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Pimephales	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Megalobrama	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Danio	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Cyprinus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGDVPLTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	470
HSC70_Carassius	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Gallus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Homo	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Xenopus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSP70_Xenopus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSC70_Salmo	RNTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	475
HSP70_Gallus	RNTIIPKQTQFTTYSNDQSSVLVQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPA PRGVPQIE	478
HSP70_Homo	RNSTIIPKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELTGIPPA PRGVPQIE	477
::*** **:* **.*:****:****: **:* **** *		
HSP70_Salmo	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDADKYKAEDDQREK	537
HSP70_Acanthopagrus	VTFDVDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEEIERMVQDADRYKAEDDLQREK	537
HSP70_Megalobrama	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDADRYKAEDDLQREK	537
HSP70_Carassius	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDADRYKAEDDLQREK	537
HSP70_Fundulus	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKDEIEKMQDADRYKAEDDQREK	537
HSP70_Paralichthys	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKQIEQMVQDAEYKADDELKRD	537
HSC70-1_Clarias	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70-2_Clarias	VTFDIDANGILNVYEGDKSTGKENKITIINDKGNLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC71_Ictalurus	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Fundulus	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSP70_Acanthopagrus	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKIQITNDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC71_Paralichthys	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Pimephales	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Megalobrama	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Danio	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Cyprinus	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	530
HSC70_Carassius	VTFDIDANGIMNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Gallus	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Homo	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Xenopus	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSP70_Xenopus	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSC70_Salmo	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKEDIERMVQDAEYKADDDVQRDK	535
HSP70_Gallus	VTFDIDANGILNVSADVDKSTGKENKITIINDKGRLSKDDIDRMVQDAEYKADDEANRDR	538
HSP70_Homo	VTFDIDANGILNVTADKSTGKVNKITIINDKGRLSKEEIERMVLDAEYKADDEVQREK	537
****:****:*** ***** ** *****:****:****: **:* **.*:****:****:***		

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนกรดอะมิโนของยีน HSC70-1 และ HSC70-2 ในปลาตุ๊กอยู่กับปลากระดุก
แข็งและสัตว์ชนิดอื่น

สิ่งมีชีวิต	ORF (คู่เบส)	จำนวนกรดอะมิโน
<i>Clarias macrocephalus</i> HSC70-1	1950	649
<i>Clarias macrocephalus</i> HSC70-2	1950	649
<i>Ictalurus punctatus</i> HSC71	1950	649
<i>Fundulus heteroclitus</i> HSC70	1839	612
<i>Acanthopagrus schlegelii</i> HSC70	1953	650
<i>Paralichthys olivaceus</i> HSC71	1839	612
<i>Pimephales promelas</i> HSC70	1953	650
<i>Megalobrama amblycephala</i> HSC70	1950	649
<i>Danio rerio</i> HSC70	1950	649
<i>Cyprinus carpio</i> HSC70-2	1935	644
<i>Carassius auratus gibelio</i> HSC70	1950	649
<i>Xenopus laevis</i> HSC70	1953	650
<i>Gallus gallus</i> HSC70	1941	646
<i>Homo sapiens</i> HSC70	1941	646

ตารางที่ 5 ค่าความเหมือน (Identity) และความคล้ายคลึงกัน (Similarity) ของกรดอะมิโนของยีน HSC70-1 และ
HSC70-2 ในปลาตุ๊กอยู่กับปลากระดุกแข็งและสัตว์ชนิดอื่น

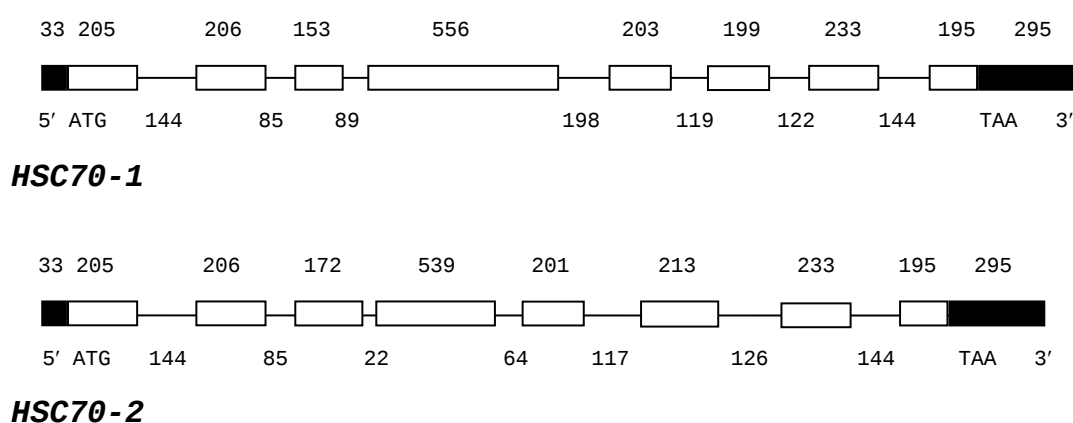
สิ่งมีชีวิต	HSC70-1		HSC70-2		หมายเลข อ้างอิง
	Identity	Similarity	Identity	Similarity	
<i>Ictalurus punctatus</i> HSC71	94	96	90	94	P47773
<i>Fundulus heteroclitus</i> HSC70	95	91	90	89	DQ202278
<i>Salmo salar</i> HSC70	95	91	90	89	BT059361
<i>Acanthopagrus schlegelii</i> HSC70	94	83	89	80	AAX07833
<i>Paralichthys olivaceus</i> HSC71	95	91	90	89	AB006814
<i>Pimephales promelas</i> HSC70	93	95	89	93	AAS46619
<i>Megalobrama amblycephala</i> HSC70	95	91	91	89	EU623471
<i>Danio rerio</i> HSC70	91	94	87	91	CAA72216
<i>Cyprinus carpio</i> HSC70-2	93	95	90	89	AAP51388
<i>Carassius auratus gibelio</i> HSC70	94	97	91	95	AAO43731
<i>Gallus gallus</i> HSC70	90	93	87	91	NP_990334
<i>Homo sapiens</i> HSC70	91	94	87	91	NP_006588
<i>Xenopus laevis</i> HSC70	93	96	89	93	AAH41201

2. โครงสร้างยีน HSC70

ในการโคลนจีโนมิคดีเอ็นเอของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST (EB360505) ในปลาตุกอย สำหรับยีน *HSC70-1* เริ่มการโคลนด้วยไพรเมอร์คู่แรก (HSC70F1-R1) ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,048 คู่เบส ไพรเมอร์คู่ที่สอง (HSC70F2-HSC70-1R2) ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,351 คู่เบส และไพรเมอร์คู่ที่สาม (HSC70F3-HSC70-1R3) ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,165 คู่เบส จีโนมิคดีเอ็นเอของยีน *HSC70-1* มีลำดับนิวคลีโอไทด์รวม 3,179 คู่เบส ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสโปรตีน (Exons) จำนวน 8 ชิ้น ขนาดต่างกัันๆ (205, 206, 153, 556, 203, 199, 233, และ 195 คู่เบส) และส่วนที่ไม่ได้สร้างโปรตีน (Introns) จำนวน 7 ชิ้น ขนาดต่างกัันๆ (144, 85, 89, 203, 199, 233, และ 195 คู่เบส) (ภาพที่ 14) ซึ่งหมายเลขอ้างอิงของจีโนมิคดีเอ็นเอสำหรับยีน *HSC70-1* ของปลาตุกอยในฐานข้อมูล GenBank คือ JX273642

การโคลนยีน *HSC70-2* ใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ คู่ที่หนึ่ง (HSC70F1-R1) คู่ที่สอง (HSC70F2-HSC70-2R2) และคู่ที่สาม (HSC70F3-HSC70-2R3) ได้ขึ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้นขนาดต่างกััน (921, 1,094 และ 1,110 คู่เบส) ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมของยีน *HSC70-2* เท่ากับ 2,980 คู่เบส ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสโปรตีน (Exons) จำนวน 8 ชิ้น ขนาดต่างกัันๆ (205, 206, 172, 539, 201, 213, 219 และ 195 คู่เบส) และส่วนที่ไม่ได้สร้างโปรตีน (Introns) จำนวน 7 ชิ้น ขนาดต่างกัันๆ (144, 85, 22, 64, 117, 126 และ 144 คู่เบส) (ภาพที่ 14) ซึ่งหมายเลขอ้างอิงของจีโนมิคดีเอ็นเอสำหรับยีน *HSC70-2* ของปลาตุกอยในฐานข้อมูล GenBank คือ JX273643

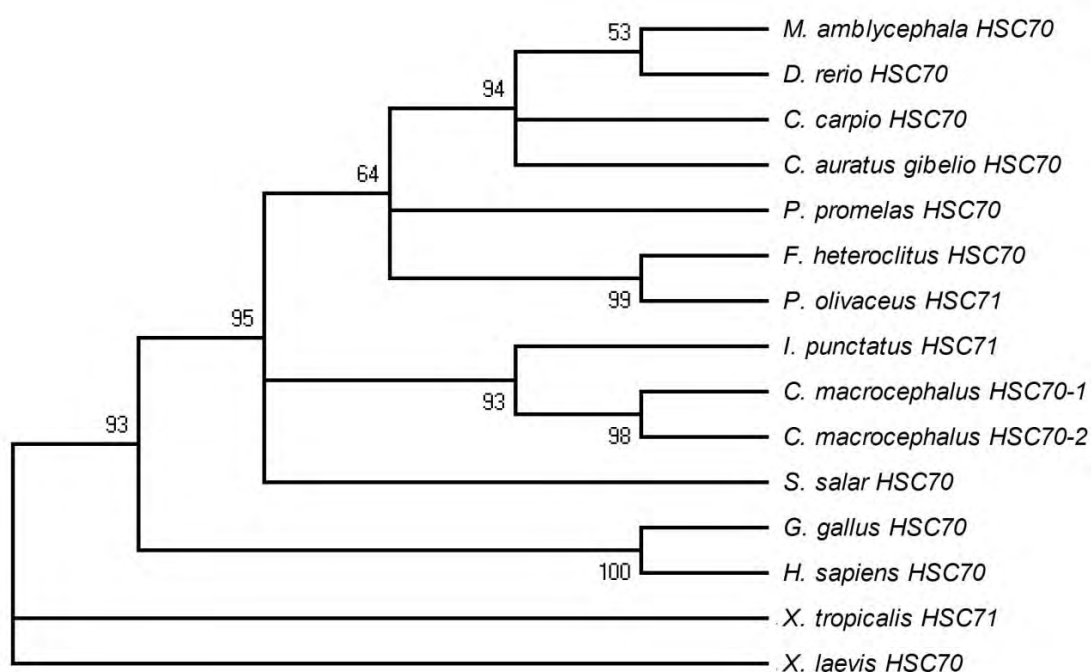
เมื่อเปรียบเทียบจีโนมิคดีเอ็นเอทั้งสองยีนพบว่า Exon ชิ้นที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 ของยีนทั้งสองมีขนาดต่างกััน และ Intron ชิ้นที่ 3, 4, 5 และ 6 ของยีนทั้งสองมีขนาดต่างกััน



ภาพที่ 14 โครงสร้างของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ในปลาตุกอย กล่องสีขาวคือ Exon กล่องสีดำคือ 5'UTR และ 3'UTR เส้นเชื่อมกล่องสีขาวคือ Intron ตัวเลขคือขนาดของ Exon และ Intron

3. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

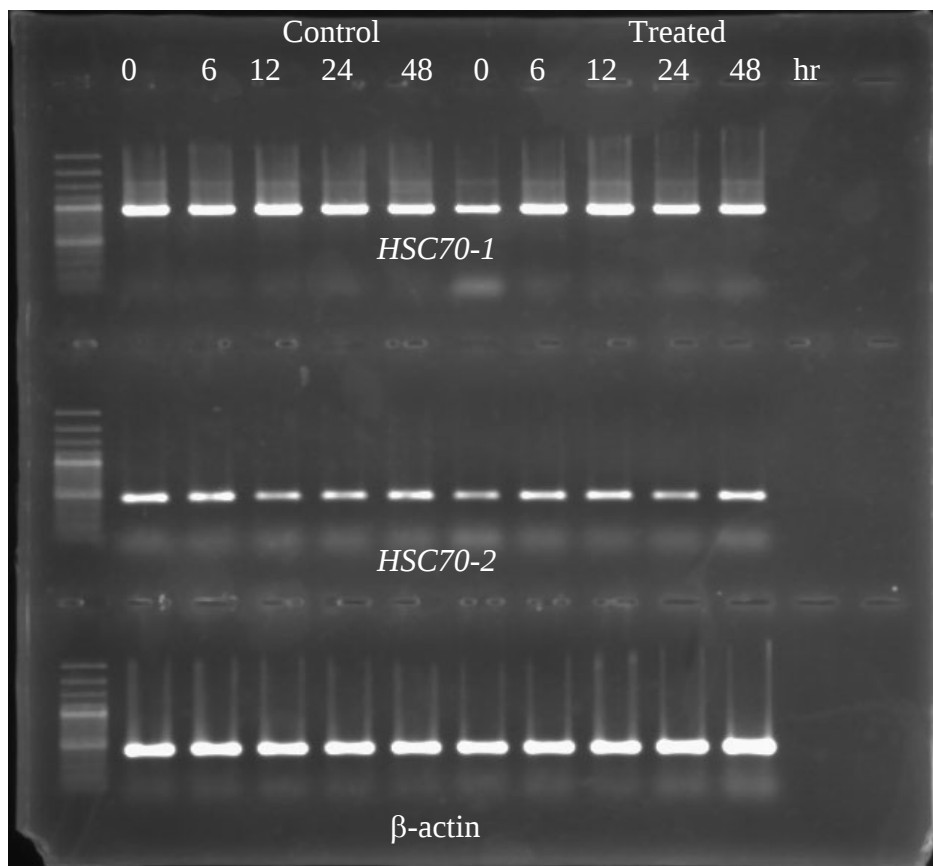
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ของปลาดุกอุย โดยวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของทั้งสองยีนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *HSC70* และ/หรือ *HSC71* ในปลากระดูกแข็งและสัตว์ชนิดอื่นๆ 15 ชนิด สามารถแยกกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ 2 กลุ่มอย่างชัดเจน กลุ่มแรกประกอบด้วยปลากระดูกแข็งกลุ่มที่สองประกอบด้วยสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง คือ กบ ไก่ และมนุษย์ (ภาพที่ 15) ในกลุ่มปลากระดูกแข็ง ปลาดุกอุยรวมอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับปลาดุกอเมริกัน ซึ่งปลาทั้งสองชนิดเป็นสมาชิก Order Siluriformes กลุ่มย่อยปลากระดูกแข็งกลุ่มที่สองประกอบด้วยปลาที่เป็นสมาชิก Family Cyprinidae ได้แก่ปลา common carp ปลา Wuchang bream ปลา zebrafish ปลา fathead minnow และปลา Japanese flounder



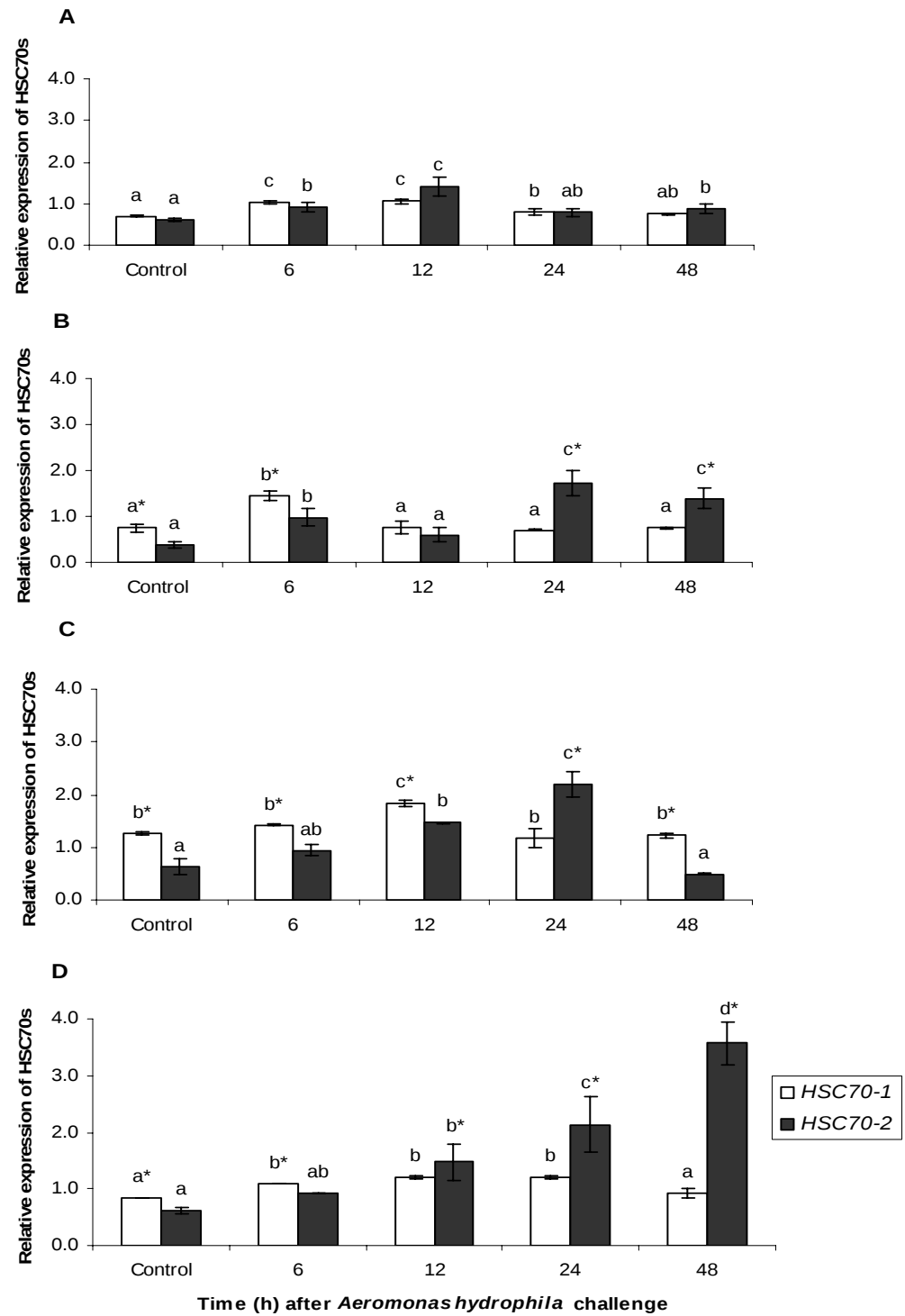
ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ในปลาดุกอุยกับปลากระดูกแข็งและสัตว์ชนิดอื่น ตัวเลขคือค่าการสุ่ม (%)

4. การแสดงออกของยีน HSC70 ในการตอบสนองการฉีดเชื้อแบคทีเรีย

ภายใต้สภาวะปกติยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* มีการแสดงออกในระดับเท่าๆกัน ในเนื้อเยื่อตับ เหยือก สมอและกล้ามเนื้อสันหลังของปลาตุ๊กตุ๋น เมื่อปลาได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อและช่วงเวลาทดสอบ ในเนื้อเยื่อสมอปลาที่ฉีดเชื้อพบว่าระดับ mRNA ของยีนทั้งสองมีปริมาณไม่แตกต่างกับปลาชุดควบคุม ยกเว้นที่ 12 ชั่วโมง ปริมาณ mRNA ของยีน *HSC70-1* สูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 0.5-1 เท่า และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 16) ในเหยือกของปลาที่ฉีดเชื้อพบว่าปริมาณ mRNA ของ ยีน *HSC70-1* เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระยะเวลา 48 ชั่วโมงและไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ขณะที่ mRNA ของยีน *HSC70-2* มีระดับสูงขึ้นที่ 24 ชั่วโมงและคงที่ถึง 48 ชั่วโมง การวิเคราะห์เนื้อเยื่อตับพบว่าระดับ mRNA ทั้งสองยีนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทุกช่วงเวลา ระดับการแสดงออกของยีน *HSC70-1* เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 12 ชั่วโมงและไม่เปลี่ยนแปลงถึง 48 ชั่วโมง ในขณะที่ระดับ mRNA ของยีน *HSC70-2* เพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมงและลดระดับอย่างชัดเจนที่ 48 ชั่วโมง การวิเคราะห์กล้ามเนื้อสันหลังพบว่าระดับ mRNA ของยีน *HSC70-2* ค่อยๆเพิ่มขึ้นจากเวลา 6 ชั่วโมงและสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปรากฏว่าระดับการแสดงออกของ *HSC70-2* ในปลาที่ฉีดเชื้อสูงกว่าปลาชุดควบคุมถึง 3 เท่า และพบว่า mRNA ของยีน *HSC70-1* มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอด 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 16 ปริมาณ mRNA ของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ในเนื้อเยื่อสมอปลาตุ๊กตุ๋นที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุม ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 17 การแสดงออกของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ในเนื้อเยื่อปลาตกูยที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุม ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง
A = สมอง B= เหงือก C = ตับ D = กล้ามเนื้อสันหลัง

การโคลนยีน *MSTN* ในปลาตุ๊กต๋อ

1. การโคลน *cDNA*

จากการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *MSTN* ในปลาตุ๊กต๋อโดยใช้เทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) เริ่มต้นจากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *cDNA* แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* ในปลาตุ๊กต๋อ จึงจำเป็นต้องออกแบบ Degenerate primers คือ *MSTN1_F* และ *MSTN1_R* (ตารางที่ 6) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *MSTN* ก่อน เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 575 คู่เบส จึงออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *MSTN* คือไพรเมอร์ *3'RACE_MSTN* และ *5'RACE_MSTN* ตามลำดับ (ตารางที่ 6) การโคลนยีนทางด้านปลาย 5' ได้ส่วนของยีนจำนวน 821 คู่เบส และการโคลนยีนทางด้านปลาย 3' ได้ส่วนของยีนจำนวน 845 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' มาเชื่อมต่อกันได้ความยาวรวม 852 คู่เบส ซึ่งจากการศึกษาข้อมูลยีน *MSTN* ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ *cDNA* มีความยาวประมาณ 1,100 คู่เบส และจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BlastN ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ขาดหายไปประมาณ 300 คู่เบส จึงออกแบบไพรเมอร์ *MSTN2_F* และ *MSTN2_R* (ตารางที่ 6) เพื่อโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไปนี้ ผลการโคลนได้ส่วนของยีนจำนวน 434 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 ส่วนมาเชื่อมต่อกันจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *MSTN* ของปลาตุ๊กต๋อ ที่มีความยาวทั้งหมด 1,784 คู่เบส ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) มีความยาวเท่ากับ 1,191 คู่เบสซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เท่ากับ 396 หน่วย และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (Untranslated region) ทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' มีความยาวเท่ากับ 147 และ 446 คู่เบส ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Start codon (ATG) อยู่ตำแหน่งที่ 147 และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น (TGA) อยู่ตำแหน่งที่ 1,338 (ภาพที่ 18)

เมื่อพิจารณาลำดับของกรดอะมิโนพบกรดอะมิโน Cysteine ที่ตรงกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จำนวน 9 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น Signal sequence ของยีน *MSTN* หลังบริเวณ Proteolytic processing (RXXR) (ภาพที่ 19) และพบตำแหน่งของ N-glycosylation sites (NXS หรือ NXT) 2 ตำแหน่ง ซึ่งตำแหน่ง N-linked เป็นการเติม Dolichol Phosphate ลงไปที่ Amide group ที่ Side chain ของ Asparagine บน ER membrane ซึ่ง N-linked นี้ เป็น Cotranslational Process ซึ่งจะช่วยในกระบวนการของม้วนพับของโปรตีน (Protein folding) ช่วยให้โปรตีนจับกับตัวรับที่จำเพาะได้

10 ACATGGGATCAACGCAGAGTACATGGGGATGCCGTCTGCCGCTACCTGTCCGGTGTGCATGGCGCACGGTGTATTGTTACTGCTGCCAC 90
 91 ACAGAGACGCACCAAGTTCTCCGCACTCACTCACGCGCCGCTCTGACCGCGCTCATCATGCATTGGCGCAGGTTCTCATCCCGCTGGGT 180
 1 M H L A Q V L I P L G 11
 181 TTCGTGGTGGCTTTCGGCCCGATGGCGCACACTGACACCGGAGCACCGGAGCACCAGCAGCAGCAGCAACACCCGCAACACCCGCAACAG 270
 12 F V V A F G P M A H T D T G A P E H Q Q Q Q H P Q H P Q Q 41
 271 CAGCAACCCACCGCCGTGACCGAGGAGGCGCAGTGTTCGCCGCCAGCGTGTGCGCGTTCCGCCAGCACAGCAAGCAGCTCCGTCTGCAG 360
 42 Q Q P T A V T E E A Q C S A A S V C A F R Q H S K Q L R L Q 71
 361 GCCATCAAGTCTCAGATCTGAGCAAGCTGCGCCTGAAGCACGCGCCCAACGTGAGCCGAGACGTGGTCAAGCAGCTGCTGCCGAAAGCG 450
 72 A I K S Q I L S K L R L K H A P N V S R D V V K Q L L P K A 101
 451 CCGCCCGTGACGACGTGCTGACCAAGTACGACGTGCTCGGGGACGACGGCAAGCCGGGACCGCGCTCCCGGACGACGAGGAGGACGAA 540
 102 P P V Q Q L L D Q Y D V L G D D G K P G T A L P D D E E D E 131
 541 GAGGAGCGCGCCACCGAGACCGTCAAGCATGAGCATGGCGGCGGACGCCAACCACCGACGTTCAAGTAGACCAAAACCGAAGTGTGTTTT 630
 132 E E R A T T E T V M S M A A E P N P D V Q V D Q K P K C C F 161
 631 TTCTCCTTCAGCCCAAAGATCCAAGCGAGCCGATTGTAAGGGCACAGCTTTGGGTGCACTTGCGCCAACGGACGAAGCAACACATTG 720
 162 F S F S P K I Q A S R I V R A Q L W V H L R P T D E A T T L 191
 721 TTCTTGAGATATCACGACTCATGCCATCAAAGATGGTAGAAGGCATGTAAGAATACGTTGCTGAAAATCGACGTGGAGGCCGGTGTG 810
 192 F L Q I S R L M P I K D G R R H V R I R S L K I D V E A G V 221
 811 AGGTCGTGGCAGAGCATCGATGTCAAGCAGGTGCTTGGGTGTGGCTGAGGCAACCGGAAACCAACTGGGGGATCGAGATCAATGCGTTC 900
 222 R S W Q S I D V K Q V L A V W L R Q P E T N W G I E I N A F 251
 901 GATTCCAAAAGCAACGATCTGGCTATCACTTCTGCAGAGCCTGGTGAAGAGGGACTGCTTCCATTCTTGGAGGTCAAAATTTCCGAAGTG 990
 252 D S K S N D L A I T S A E P G E E G L L P F L E V K I S E V 281
 991 CCCAAGCGAACCCGGAGAGAATCGGGACTGGACTGTGACGAGAATTCGTCCGAGTCCCGCTGCTGCCGCTACCCCTTACGGTGGACTTT 1080
 282 P K R T R R E S G L D C D E N S S E S R C C R Y P L T V D F 311
 1081 GAAGACTTCGGCTGGGATTGGATTATTGCCCCGAAACGCTACAAAGCTAACTACTGCTCGGGCGAGTGTGACTATGTGCATTTGCAGAAG 1170
 312 E D F G W D W I I A P K R Y K A N Y C S G E C D Y V H L Q K 341
 1171 TATCCGCACACGCACTTGGTAAACAAAGCCAACCCGCGTGACTGCGGTCCTGCTGCACGCCACCAAGATGTCTCCCATCAACATG 1260
 342 Y P H T H L V N K A N P R G T A G P C C T P T K M S P I N M 371
 1261 CTCTACTTCAACGAAAAGAGCAGATCATCTACGGCAAGATCCCTTCCATGGTGGTGGATCGCTGTGGCTGTTGTGATCGATGTGCCCA 1350
 372 L Y F N G K E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S * 397
 1351 TGCAGGGACTTGTGCCGTTCTGTTTCCAAACATTTCCCTCTGGACTTCTTTACGACACCTTACAACATTATCCATGCTAACACTGTGCA 1440
 1441 ATATGCAATAGAACCAGAATCGCAGCAAGCAAGGAACCATCCACAGAGCACCGCTTACTTTCACTGACTTTTTATTGCTTTACGCTTTAT 1530
 1531 CTGCATCTTGGGGTCAGAGGTCTCATGGACGTACTGAAGGAATGTAATGCCGGTCCAACCTGGAGGAATGGACGAAAAATAATCTATAC 1620
 1621 AGTTCACGTAGTACCAAAAAACACACGTTTTGTTCAAACCTGCTCGACAATATCCATTAGTCATGTTCTCACTCCAAACAGCTGTTGA 1710
 1710 GAGTCAAGTATCCAAGAGCAACAGAGAGGGACTCAAGGACACTTTTGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1784

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *MTSN* ในปลาตุ๊กตาสี ATG คือ Start codon และ TGA คือ Stop codon C คือกรดอะมิโน Cysteine ที่ตรงกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ 9 ตำแหน่ง ลำดับกรดอะมิโน NSS ในกรอบสี่เหลี่ยมเส้นประคือ N-glycosylation sites (NXS หรือ NXT) และลำดับกรดอะมิโน RXXR ในกรอบสี่เหลี่ยมคือ Proteolytic processing sites ตัวเลขทางซ้ายและขวาคือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

ภาพที่ 19 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *MSTN* ของปลาตุ๊กตากับปลาและสัตว์อื่น
เครื่องหมาย (*) แสดงกรดอะมิโนที่เหมือนกัน และเครื่องหมาย (.) แสดงกรดอะมิโนที่มีความสัมพันธ์กัน
ตัวเลขด้านขวาแสดงตำแหน่งกรดอะมิโน

เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *MSTN* ของปลาดุกอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (ตารางที่ 17) พบว่าค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* อยู่ระหว่าง 47.7–90.3% โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* ของปลาดุกอยู่ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับ *Ameiurus catus* มากที่สุดถึง 90.3 % รองลงมาคือ *Ictalurus furcatus* เท่ากับ 89.2% และ *Pseudobagrus fulvidraco* เท่ากับ 88.6% และค่าความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน *MSTN* อยู่ระหว่าง 27.4–94.5% โดยลำดับกรดอะมิโนของยีน *MSTN* ของปลาดุกอยู่ มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันกับปลา white catfish (*A. Catus*) มากที่สุดถึง 94.5% รองลงมาคือ ปลา channel catfish (*I. Punctatus*) เท่ากับ 93.7% และ ปลา yellow catfish (*P. Fulvidraco*) เท่ากับ 93.2 % ซึ่งปลาทั้งสี่ชนิดนี้เป็นสมาชิก Order Siluriformes

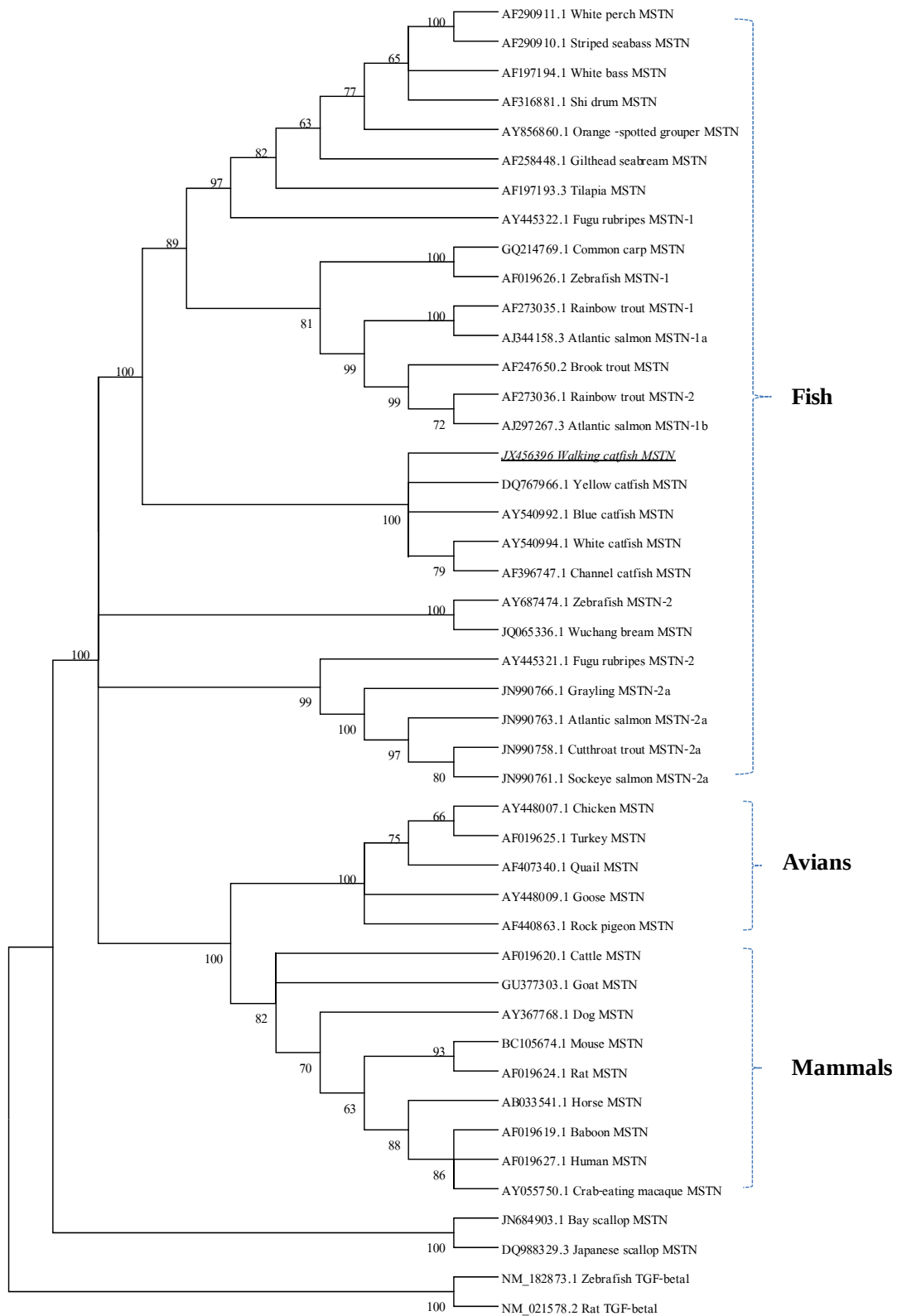
ตารางที่ 17 เปรียบเทียบค่าความเหมือน (Identity) และความคล้ายคลึงกัน (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *MSTN* ของปลาดุกอยู่กับปลากระดุกเข็งและสัตว์ชนิดอื่น

ชื่อวิทยาศาสตร์	Accession Number	ความเหมือน (%)		ความคล้ายคลึงของ
		ลำดับนิวคลีโอไทด์	กรดอะมิโน	กรดอะมิโน (%)
ปลากระดุกเข็ง				
<i>Ameiurus catus</i>	AY540994.1	90.3	94.5	96.2
<i>Ictalurus furcatus</i>	AY540992.1	89.2	92.5	95.5
<i>Ictalurus punctatus</i>	AF396747.1	81.8	93.7	95.7
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	DQ767966.1	88.6	93.2	96.2
<i>Cyprinus carpio</i>	GQ214769.1	73.5	78.3	85.6
<i>Danio rerio MSTN-1</i>	AF019626.1	72.0	77.3	83.6
<i>Danio rerio MSTN-2</i>	AY687474.1	63.3	59.8	73.2
<i>Epinephelus coioides</i>	AY856860.1	71.9	74.1	83.6
<i>Megalobrama amblycephala</i>	JQ065336.1	62.8	60.1	74.0
<i>Morone americana</i>	AF290911.1	72.0	73.1	83.8
<i>Morone chrysops</i>	AF197194.1	71.8	71.9	83.1
<i>Morone saxatilis</i>	AF290910.1	71.9	73.1	83.8
<i>Oncorhynchus clarkii (MSTN-2a)</i>	JN990758.1	60.7	59.8	73.0
<i>Oncorhynchus mykiss (MSTN-1)</i>	AF273035.1	71.1	75.8	81.8
<i>Oncorhynchus mykiss (MSTN-2)</i>	AF273036.1	72.1	75.5	82.7
<i>Oncorhynchus nerka (MSTN-2a)</i>	JN990761.1	63.2	60.1	73.2
<i>Salmo salar (MSTN-1a)</i>	AJ344158.3	71.9	75.3	81.8
<i>Salmo salar (MSTN-1b)</i>	AJ297267.3	72.1	74.5	82.8
<i>Salmo salar (MSTN-2a)</i>	JN990763.1	52.3	46.2	60.4
<i>Salvelinus fontinalis</i>	AF247650.2	71.7	74.5	82.8
<i>Sparus aurata</i>	AF258448.1	73.6	74.0	84.3
<i>Takifugu rubripes (MSTN-1)</i>	AY445322.1	71.1	69.4	79.3
<i>Takifugu rubripes (MSTN-2)</i>	AY445321.1	63.4	61.8	74.2
<i>Thymallus thymallus (MSTN-2a)</i>	JN990766.1	63.0	59.4	74.0
<i>Tilapia mossambica</i>	AF197193.3	67.0	72.0	83.1
<i>Umbrina cirrosa</i>	AF316881.1	71.9	72.9	83.1

ตารางที่ 17 ต่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์	Accession Number	ความเหมือน (%)		ความคล้ายคลึงของ
		ลำดับนิวคลีโอไทด์	กรดอะมิโน	กรดอะมิโน (%)
สัตว์ปีก				
Anser anser	AY448009.1	61.1	60.8	76.5
Columba livia	AF440863.1	61.7	60.5	77.0
Coturnix coturnix	AF407340.1	61.1	60.5	76.5
Gallus gallus	AY448007.1	62.7	60.4	76.3
Meleagris gallopavo	AF019625.1	61.1	59.7	75.3
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม				
Bos taurus	AF019620.1	60.6	58.9	73.8
Canis familiaris	AY367768.1	62.3	60.9	77.5
Capra hircus	GU377303.1	59.8	58.4	75.8
Equus caballus	AB033541.1	60.7	60.2	77.3
Homo sapiens	AF019627.1	60.1	60.7	77.8
Macaca fascicularis	AY055750.1	59.9	60.4	77.5
Mus musculus	BC105674.1	61.1	59.3	76.5
Papio hamadryas	AF019619.1	59.9	60.2	77.5
Rattus norvegicus	AF019624.1	61.8	59.3	76.3

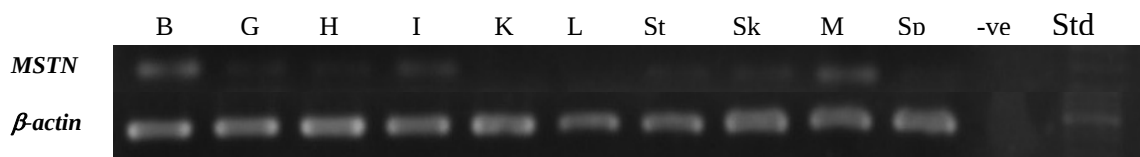
ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน *MSTN* ในปลาตุกอยู่กัปลากระดุกแข็งและสัตว์อื่นอีก 42 ชนิด แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและกลุ่มสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยในกลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มปลากระดุกแข็ง และกลุ่มสัตว์ปีก ที่รวมอยู่กัสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อพิจารณาโปรตีน *MSTN* ในกลุ่มของปลาพบว่า มี 2 รูปแบบ (Isoforms) และในรูปแบบที่ 1 (*MSTN-1*) แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มปลาที่มีเกล็ด และปลาไม่มีเกล็ด ซึ่งวิวัฒนาการของยีน *MSTN* ของปลาตุกอยู่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มปลาไม่มีเกล็ด (ภาพที่ 20)



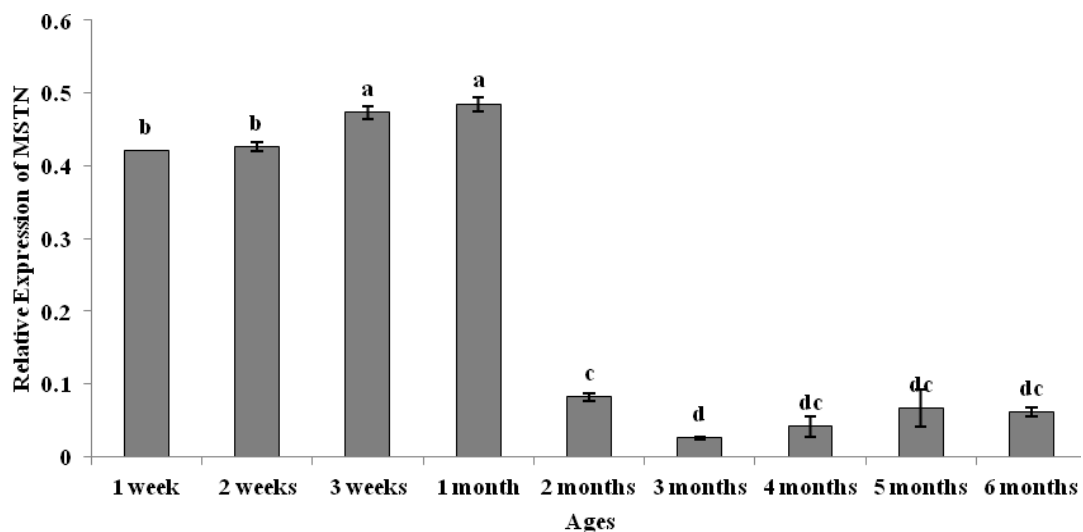
ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *MSTN* ในปลาดุกอู๋ เปรียบเทียบกับปลากระดูกแข็งและสัตว์อื่นๆ ตัวเลขคือค่าการบูต (%)

2. การแสดงออกของยีน *MSTN*

ยีน *MSTN* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อต่างๆ คือ สมอง หัวใจ ลำไส้ กระเพาะ ผิวน้ำ และกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 21) การแสดงออกของยีน *MSTN* ของปลาดุกอุยที่ระยะพัฒนาการ คือ ตั้งแต่ลูกปลาดุกอุยฟักออกจากไข่เป็นตัวหนึ่งสัปดาห์ จนกระทั่งปลาดุกอุยอายุ 6 เดือน พบว่า ค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* ที่ระยะต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.0001$) โดยปลาดุกอุยที่ระยะ 3 สัปดาห์ และปลาดุกอุยอายุ 1 เดือน มีระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* สูงสุด และปลาดุกอุยอายุ 3 เดือนมีระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* ต่ำสุด (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 21 การแสดงออกของยีน *MSTN* ในเนื้อเยื่อปลาดุกอุย B = สมอง; G = หัวใจ; H = ลำไส้; I = ลำไส้; K = ไต; L = ตับ; St = กระเพาะอาหาร; Sk = ผิวน้ำ; M = กล้ามเนื้อสันหลัง; Sp = ม้าม; -ve คือ ตัวควบคุมผลลบ และ Std คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน



ภาพที่ 22 การแสดงออกของยีน *MSTN* ที่พัฒนาการระยะต่างๆของปลาดุกอุย

อภิปรายผล (Discussion)

ผลของการเพิ่มอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของรังไข่ปลาตุ๊กตาทองหลังฤดูเพาะพันธุ์

การผสมพันธุ์ของปลาในเขตร้อนขึ้นจะเริ่มต้นเมื่อได้รับสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะฝน (Freund *et al.* 1995; Tan-Fermin *et al.* 1997) สำหรับปลาตุ๊กตาทองฤดูการเพาะพันธุ์จะเริ่มในต้นฤดูฝนราวๆเดือนพฤษภาคมต่อเนื่องถึงเดือนตุลาคม ผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปลาตุ๊กตาทองมีพัฒนาการของรังไข่สูงสุดในเดือนกรกฎาคม (GSI เท่ากับ $13.91 \pm 3.63\%$) ซึ่งเป็นเดือนที่มีปริมาณฝนมากที่สุดในรอบปี (313 มิลลิเมตร) และเมื่อฤดูฝนสิ้นสุดตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงมกราคม ค่า GSI ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดในเดือนพฤศจิกายน ($0.41 \pm 0.26\%$) ค่า GSI ของปลาตุ๊กตาทองในการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Panprommin และคณะ (2008) เมื่อพิจารณาพัฒนาการของรังไข่ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนกันยายน พบว่าค่า GSI เพิ่มขึ้น 115% โดยเฉพาะเดือนกรกฎาคมที่มีค่า GSI สูงสุดนั้นในรังไข่จะมีสัดส่วนไข่ระยะที่ 6 มากที่สุด ($58.8 \pm 1.3\%$) และเมื่อสิ้นสุดฤดูเพาะพันธุ์ระหว่างเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน พบว่า GSI มีค่าต่ำสุดและไม่พบไข่ระยะที่ 5 และ 6 ในรังไข่แม่ปลา ถ้าใช้ค่า GSI และระยะพัฒนาการของรังไข่เป็นเกณฑ์ในการเพาะพันธุ์จะพบว่าการผสมเทียมปลาตุ๊กตาทองโดยการฉีดฮอร์โมนสามารถเริ่มได้ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์เรื่อยไปจนถึงเดือนกันยายน แต่การผสมเทียมปลาตุ๊กตาทองตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงมกราคมอาจจะไม่ได้ผลเนื่องจากพัฒนาการของไข่อยู่ในระยะที่ 2-3 เป็นส่วนมาก โดยทั่วไปเพาะไข่ระยะที่ 6 เท่านั้นที่สามารถเร่งให้ตกไข่ด้วยการฉีดฮอร์โมนภายใน 16-18 ชั่วโมง (Ngamvongchon *et al.* 1988) อย่างไรก็ตาม รายงานของ Tan-Fermin และคณะ (1997) ระบุว่าฮอร์โมนเพื่อเร่งการตกไข่ตลอดทั้งปีสามารถทำได้ในแม่ปลาตุ๊กตาทองอายุ 2 ปีขึ้นไป เนื่องจากในรังไข่จะมีไข่ระยะที่ 6 จำนวนมาก

ระบบสืบพันธุ์ของปลาตุ๊กตาทองอยู่ภายใต้การควบคุมของกลไกภายใน เช่น ฮอร์โมน และ กลไกภายนอกร่างกายหรือสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ช่วงแสง และปริมาณฝน เป็นต้น (Ngamvongchon *et al.* 1988; Freund *et al.* 1995; Tan-Fermin *et al.* 1997) สำหรับปลาในเขตร้อนขึ้นนั้น เป็นที่ยอมรับกันว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการเจริญพันธุ์น้อยกว่าปลาในเขตหนาว อย่างไรก็ตามมีรายงานที่ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของปลาคาร์พ (*C. gariepinus*) และปลาช่อน (snakehead) ซึ่ง Richter และคณะ (1987) รายงานว่าการเลี้ยงแม่พันธุ์ปลาคาร์พในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิน้ำให้มีระดับคงที่ 25°C สามารถยืดระยะเวลาการเพาะพันธุ์และลดระยะเวลาที่รังไข่หยุดการเจริญเติบโตจาก 4-7 เดือนเหลือเพียง 2 เดือนต่อฤดูกาล เมื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์ปลาในบ่อดินที่อุณหภูมิน้ำในรอบปีมีการเปลี่ยนแปลงระหว่าง $15-30^{\circ}\text{C}$ และผู้วิจัยได้รายงานเพิ่มเติมว่าอุณหภูมิน้ำเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลในการควบคุมวงจรพัฒนาการของรังไข่มากกว่าปัจจัยช่วงแสง สำหรับปลาช่อนนั้นผู้วิจัยรายงานว่าการเพิ่มอุณหภูมิน้ำ (30°C) และการใช้ช่วงแสงที่ยาวขึ้นสามารถกระตุ้นพัฒนาการรังไข่และขยายช่วงเวลาก่อนการเพาะพันธุ์ปลาช่อน (Srivastava *et al.* 1991) การทดลองในปลาตุ๊กตาทองครั้งนี้ให้ผลทำนองเดียวกัน นั่นคือแม่พันธุ์ปลาตุ๊กตาทองที่เลี้ยงในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จะมีพัฒนาการของไข่ระยะที่ 6 เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับแม่ปลาที่เลี้ยงในบ่อดินที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย $27 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน ที่รังไข่มีเฉพาะไข่ระยะ 3 และระยะ 4 เท่านั้น ทั้งนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจนว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อการควบคุมการเจริญของรังไข่ปลาตุ๊กตาทอง

อย่างไร แต่มีรายงานอื่นๆระบุว่าอุณหภูมิอาจส่งผลโดยตรงหรือโดยทางอ้อมต่อการสร้างไข่ การสร้างไวเทลโลเจนิน และการหลั่งฮอร์โมนระบบสืบพันธุ์จากต่อมใต้สมอง (Lam 1983; Richter *et al.* 1987) สำหรับปลาเขตร้อน Lam (1983) ระบุว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นกระตุ้นการสร้าง Yolk vesicle ในไข่ระยะที่ 5 ส่วนในปลาซ่อนพบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งฮอร์โมน Gonadotropin ซึ่งมีผลต่อการเจริญของรังไข่ระยะสุดท้าย (Srivastava *et al.* 1991)

ผลการวิเคราะห์เลือดแม่ปลาที่อยู่ในตู้กระจกพบว่าปลาที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 35°C ระดับคอร์ติซอลในเลือดสูงกว่าปลาอีก 2 กลุ่ม ตลอดระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยทั่วไปปลาสามารถปรับตัวเพื่อตอบสนองความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงเมื่อต้องอาศัยในสภาพแวดล้อมนั้นๆ เป็นระยะเวลานาน ดัชนีชี้วัด ความเครียดต่างๆ เช่น ฮอร์โมนคอร์ติซอล และน้ำตาลกลูโคสในเลือดปลาจะมีระดับเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลาเริ่มแรก หลังจากนั้นดัชนีความเครียดจะมีค่าลดลงเมื่อปลาสามารถปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมนั้น สำหรับในงานทดลองนี้การเลี้ยงปลาดุกอยู่ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำให้เกิดความเครียดอย่างต่อเนื่อง เห็นได้จากระดับคอร์ติซอลในเลือดที่ลดลงเพียงเล็กน้อย ถ้าเลี้ยงแม่ปลาในสภาพนี้เกิน 6 สัปดาห์อาจมีผลกระทบต่อ การเจริญเติบโต พัฒนาการของรังไข่และระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Barton, 1997; Iwama *et al.* 1999)

คอร์ติซอลนอกจากมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองความเครียดแล้ว มีการศึกษาที่รายงานบทบาทของคอร์ติซอลต่อระบบสืบพันธุ์ในปลา (Pankhurst and Van Der Kraak 1997) โดยผู้วิจัยกล่าวว่าการหลั่งคอร์ติซอลเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้มีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งจะขึ้นกับระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ Billard และคณะ (1981) รายงานว่าคอร์ติซอลเป็นตัวเร่งกระบวนการ Vitellogenesis เนื่องจากแม่ปลาที่มีไข่ระยะ 4 และ 5 ในเลือดจะมีปริมาณคอร์ติซอลสูงกว่าแม่ปลาที่มีไข่ระยะสุดท้าย (ระยะ 6) ก่อนการตกไข่ แต่ในปลาบางชนิดพบว่าระดับคอร์ติซอลในเลือดที่เกิดจากความเครียดมีผลยับยั้งพัฒนาการของรังไข่ สำหรับในปลาดุกอยู่ระดับคอร์ติซอลในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลกระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนิน ทำให้แม่ปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C ที่มีคอร์ติซอลในเลือดสูงสร้างไข่ระยะ 5 จำนวนมาก

การโคลนยีน Heat shock protein 70 (HSC70) และการแสดงออกของยีนในการตอบสนองการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

การโคลนยีน *HSC70* ในงานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกสำหรับปลาดุกซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่สำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดของประเทศไทย ผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลเบื้องต้นของยีน *HSC70* ของปลาดุกจากรายงานของ Panprommin และคณะ (2007) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST ทางปลายด้าน 3' (หมายเลขอ้างอิง EB360505) ขนาด 371 คู่เบส ซึ่งในการสร้าง cDNA library ของเนื้อเยื่อตับปลาดุกเพศเมียที่เลี้ยงในสภาวะปกติในครั้งนั้น ปรากฏว่าสามารถจำแนก EST ของยีน *HSC70* ได้จำนวนมาก ในการโคลน cDNA และจีโนมิกดีเอ็นเอจึงได้ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST ที่กล่าวถึงข้างต้น และพบว่าในระหว่างการทำบริสุทธิ์ปรากฏแถบ cDNA ขนาดประมาณ 70 kDa จำนวน 2 แถบบนอะกาโรสเจล จึงได้โคลน cDNA ทั้งสองแถบแยกกัน ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าในปลาดุกอยู่มียีน *HSC70* มากกว่า 1 ยีน จึงตั้งชื่อ cDNA ทั้งสองเป็น *HSC70-1* และ

HSC70-2 เมื่อวิเคราะห์คุณลักษณะของทั้งสอง cDNA พบว่ามีความยาวเท่ากันคือ 2,278 คู่เบส และ Open reading frame (ORF) ขนาด 1,950 คู่เบสและแปลรหัสได้กรดอะมิโน 649 หน่วย ลำดับกรดอะมิโนทั้งสองสายมีความเหมือน 94% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *HSC70* ในปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ มีความเหมือนประมาณ 85-90% ทำให้ยืนยันได้ว่า cDNA ของปลาดุกอยู่ในทั้งสองสายเป็นยีนที่ต่างกันและจัดอยู่ใน HSP70 gene family

การวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ปรากฏว่าทั้งสองยีนประกอบด้วย Exon และ Intron จำนวนเท่ากัน คือ Exon 8 ชิ้น และ Intron 7 ชิ้น แต่มีขนาดต่างกัน ความแตกต่างที่ชัดเจนคือขนาด Intron ที่ 4 โดยมีขนาด 198 คู่เบสในยีน *HSC70-1* และมีขนาด 64 คู่เบสในยีน *HSC70-2* เนื่องจากรายงานโครงสร้างของยีน *HSC70* ในปลายังมีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับรายงาน cDNA อย่างไรก็ตามพบว่าโครงสร้างยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* ในปลาดุกมีความคล้ายกับยีน *HSC70* ในปลาชนิดอื่น เช่น ปลา *Rivulus marmoratus* (Park *et al.* 2001) ปลา common carp (Ali *et al.* 2003) และปลา Wuchang bream (Ming *et al.* 2010) เป็นที่น่าสนใจว่า Exon ของยีน *HSC70-1* ในปลาดุกมีขนาดเท่ากับ Exon ของยีน *HSC70* ในปลา Wuchang bream แต่ Intron มีขนาดต่างกันปลาทั้งสองชนิด การปรากฏของ Intron ในโครงสร้างยีนเป็นคุณลักษณะสำคัญของยีน *HSC70* ที่มีการแสดงออกในเซลล์ภายใต้สภาวะปกติ (Iwama *et al.* 1998) ขณะที่ Intron จะไม่ปรากฏในโครงสร้างของยีน *HSP70* ซึ่งจะมีแสดงออกเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ต่างจากธรรมชาติ หรือเมื่อเซลล์ได้รับความเครียด ทำให้เซลล์สามารถตอบสนองโดยการสร้างโปรตีน HSP70 อย่างรวดเร็วเนื่องจากไม่ต้องผ่านกระบวนการตัด Intron (Basu *et al.* 2002)

เนื่องจากความสำคัญของโปรตีน HSP70 ในการรักษาสมดุลร่างกาย จึงมีผู้สนใจศึกษาหน้าที่ของยีน *HSC70* ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาและมีรายงานเรื่องนี้จำนวนหลายฉบับ แต่บทบาทของยีน *HSC70* ต่อภูมิคุ้มกันของปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ ยังไม่ชัดเจนและมีรายงานค่อนข้างน้อย ตัวอย่างเช่น รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของยีน *HSC70* ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อต่างๆของปลา กุ้งทะเลและหอยทะเล เช่น Ramaglia และคณะ (2004) รายงานว่าในเตาทะเลที่ได้รับการฉีดเชื้อ *Citrobacter* จะมีระดับโปรตีน HSC73 สูงขึ้นในเนื้อเยื่อสมองและตับ Deane และคณะ (2004) รายงานว่าปลา Silver sea bream ที่ได้รับเชื้อ *Vibrio alginolyticus* จะมีการแสดงออกของยีน *HSC70* ในเนื้อเยื่อตับเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับปลา Wuchang bream ที่ได้รับการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* จะมีระดับ mRNA ของยีน *HSC70* เพิ่มสูงสุดในระยะเวลา 6 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อและลดระดับลงในชั่วโมงที่ 12 (Ming *et al.* 2010) ในสัตว์น้ำอื่น เช่น กุ้งกุลาดำพบว่า การฉีดเชื้อ *V. harveyi* ทำให้ระดับโปรตีน HSC70 ในเนื้อเยื่อเหงือกเพิ่มขึ้นในเวลา 12 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อและลดลงสู่ระดับปกติภายในเวลา 72 ชั่วโมง (Rungrussamee *et al.* 2010) และในหอยทะเล (*Meretrix meretrix*) ที่ได้รับเชื้อ จะมีระดับโปรตีน HSC71 เพิ่มขึ้นในตับและเหงือกภายใน 12 ชั่วโมงและลดระดับที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ (Yue *et al.* 2011)

การแสดงออกของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* สามารถตรวจพบในเนื้อเยื่อหลายชนิดในปลาดุกที่อยู่ในสภาวะปกติ แต่เมื่อปลาดุกได้รับความเครียดจากการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกต่างกันเนื้อเยื่อสมอง เหงือก ตับและกล้ามเนื้อสัน

หลัง ในระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ ยีน *HSC70-1* มีการแสดงออกในระดับต่ำในเนื้อเยื่อทั้ง 4 อวัยวะในปลากลุ่มควบคุมและปลาที่ได้รับเชื้อ ขณะที่ปลาที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย นั้น ยีน *HSC70-2* มีการแสดงออกเล็กน้อยในสมองและเหงือก แต่มีระดับการแสดงออกในระดับปานกลางในเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้อส่วนหลังเมื่อเทียบกับปลาชุดควบคุม ในปลาชนิดอื่นที่มีการค้นพบยีน *HSC70* สองยีนก็มีรายงานว่ายีน *HSC70* ทั้งสองยีนมีการตอบสนองเฉพาะเนื้อเยื่อและความเครียดที่แตกต่างกัน เช่น ในปลา common carp พบว่าระดับ *HSC70-1* ในตับเพิ่มขึ้นเมื่อปลาสัมผัสกับโลหะหนักแคดเมียม แต่เมื่อปลาได้รับความเย็นอย่างรวดเร็วจะมีระดับการแสดงออกของยีน *HSC70-2* เพิ่มขึ้นในกล้ามเนื้อ (Ali *et al.* 2003) การทดลองในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนหางของปลา yellowtail ผู้วิจัยรายงานว่ายีน *HSC70-1* มีการแสดงออกทั้งในสภาวะปกติและสภาพที่ได้รับความร้อนอย่างฉับพลัน (Heat shock) แต่ยีน *HSC70-2* แสดงออกเมื่อได้รับความร้อนอย่างฉับพลันเท่านั้น (Yabu *et al.* 2011) ซึ่งผลการทดลองในปลาดุกอุยครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานข้างต้น นั่นคือยีน *HSC70-1* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อทุกอวัยวะในสภาวะปกติ ขณะที่ยีน *HSC70-2* มีการแสดงออกเมื่อปลาได้รับการฉีดเชื้อเฉพาะบางอวัยวะเท่านั้น

แบคทีเรีย *A. hydrophila* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรค Hemorrhagic septicemia ในปลาน้ำจืดหลายชนิด ความรุนแรงของโรคทำให้ปลาตายภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ (Areerat 1987; Angka *et al.* 1995) ปลาดุกอุยที่เป็นโรคมียาการภายนอกที่สังเกตได้คือ ปลามีการตกเลือดที่บริเวณครีบทู ช่องท้องก็มีการตกเลือดเช่นเดียวกัน การที่ระดับการแสดงออกของยีน *HSC70-2* เพิ่มขึ้นในตับและกล้ามเนื้อปลาดุกอุยที่ได้รับเชื้อ อาจเกี่ยวข้องกับบทบาทของ *HSC70-2* ต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาดุกอุย ซึ่งการแสดงออกของยีน *HSC70-2* ในเนื้อเยื่อตับมีระดับสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงและลดระดับการแสดงออกเท่ากับปลาชุดควบคุมที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองในปลาดุกอุยคล้ายกับการศึกษาของ Ming และคณะ (2010) ที่รายงานผลการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ให้ปลา Wuchang bream และพบว่าการแสดงออกของยีน *HSC70* ในตับเพิ่มสูงกว่าปลาชุดควบคุมเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ และการแสดงออกของยีนลดลงสู่ระดับเดียวกับชุดควบคุมในชั่วโมงที่ 24 นอกจากนี้พบว่าการฉีดเชื้อให้ปลาดุกอุยกระตุ้นให้การแสดงออกของยีน *HSC70-2* ในกล้ามเนื้อส่วนหลังเพิ่มสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง

การทดลองนี้พบว่าการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ให้ปลาดุกอุยไม่ได้กระตุ้นการแสดงออกของทั้งสองยีนในเนื้อเยื่อสมองเมื่อเทียบกับปลาชุดควบคุม ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานบทบาทของยีน *HSC70* ในสมองของปลาที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย แต่รายงานในเต่าทะเลโดย Ramaglia และคณะ (2004) พบว่าเมื่อเต่าทะเลได้รับเชื้อแบคทีเรียจะมีการแสดงออกของยีน *HSC73* ในเนื้อเยื่อสมองเพิ่มขึ้นซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับบทบาทของโปรตีน *HSC73* ในการทำหน้าที่เคลื่อนย้าย Synaptic vesicle เมื่อวิเคราะห์เนื้อเยื่อเหงือกของปลาดุกอุยที่ได้รับการฉีดเชื้อพบว่าระดับ mRNA ของยีน *HSC70-2* เพิ่มสูงกว่าปลาชุดควบคุมเล็กน้อยที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งการแสดงออกของยีน *HSC70-2* ในเหงือกปลาดุกอุยน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบควบคุมสมดุลไอออน

การโคลนยีน *MSTN* และการแสดงออกระหว่างพัฒนาการระยะต่างๆของปลาดุกอุย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปของ cDNA ที่สมบูรณ์ของยีน *MSTN* ของปลาดุกอุย มีความยาว 1,784 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 396 หน่วย ซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโนมากกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆ ยกเว้นแต่หอย Bay scallop (459 หน่วย) สำหรับยีน *MSTN* ในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีจำนวนกรดอะมิโน 375-376 หน่วย กลุ่มของสัตว์ปีกมีจำนวนกรดอะมิโน 362-375 หน่วย และในกลุ่มของปลาที่มียีน *MSTN-1* จะมีจำนวนกรดอะมิโน 373-393 หน่วย ส่วนกลุ่มของปลาที่มียีน *MSTN-2* มีจำนวนกรดอะมิโน 307-365 หน่วยซึ่งน้อยกว่ากรดอะมิโนของยีน *MSTN-1* สำหรับปลาดุกอุยยีน *MSTN* มีกรดอะมิโนจำนวนใกล้เคียงกับปลาในวงศ์ Siluriformes อื่นๆ คือ ปลา White catfish และ ปลา Yellow catfish คือ 393 หน่วย (Gregory *et al.* 2004; Pan *et al.* 2007) ปลา Blue catfish มีกรดอะมิโน 390 หน่วย (Gregory *et al.* 2004) และ ปลา Channel catfish มีกรดอะมิโน 389 หน่วย (Kocabas *et al.* 2002) โดยภาพรวมยีน *MSTN* ของปลากลุ่มนี้จะมีจำนวนกรดอะมิโนมากกว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากใน Exon ลำดับที่หนึ่งของยีน *MSTN* ในปลากลุ่มนี้ มีการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ CAG ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน Glutamine ลักษณะนี้จะไม่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง จำนวนการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ CAG ในปลาแต่ละชนิดก็ไม่เท่ากัน

ยีน *MSTN* ในกลุ่มปลากระดูกแข็งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หลากหลายมากกว่ากลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อาจเนื่องจากการที่ยีน *MSTN* ในปลามีการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นๆนอกจากกล้ามเนื้อ อีกทั้งหน้าที่ของยีน *MSTN* ในปลายังไม่ทราบแน่ชัด (Zhong *et al.* 2008) นอกจากนั้นยีน *MSTN* ในปลาบางชนิด มี 2 รูปแบบ เช่นยีน *MSTN-1* และ *MSTN-2* ในปลา Zebrafish (Biga *et al.* 2005; Kerr *et al.* 2005) และปลาในกลุ่ม Salmonids (Garikipati *et al.* 2007; Ostbye *et al.* 2007) มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน ตำแหน่งกรดอะมิโน Cysteine 9 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น Signal peptide ของยีน *MSTN* ในบริเวณต่อจากลำดับกรดอะมิโน RXXR (ซึ่งเป็นตำแหน่ง Proteolytic processing site) ไปทาง C-terminal ของโปรตีนและมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของ Mature peptide มีรายงานว่า การแทนที่กรดอะมิโนที่บริเวณนี้จะยับยั้งการทำหน้าที่ของ Mature peptide และยับยั้งการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ ตัวอย่างเช่น การเกิดลักษณะ Double muscle ในวัว เนื่องจากการแทนที่กรดอะมิโน Cysteine ด้วย กรดอะมิโน Tyrosine ใน Exon ที่ 3 ทำให้ยีน *MSTN* เสียการทำงานไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ (Kambadur *et al.* 1997)

การโคลนหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *MSTN* ในครั้งนี้ใช้เวลาค่อนข้างนาน เนื่องจากครั้งแรกผู้วิจัยใช้ปลาดุกอุยอายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่มีการแสดงออกของยีน *MSTN* ในระดับค่อนข้างต่ำ ไม่สามารถสกัด mRNA ให้ได้ปริมาณเพียงพอสำหรับการโคลนยีน ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้ปลาดุกอุยอายุ 2 ปีในการทดลอง ซึ่งในระยะเวลา 6 เดือนปลาดุกอุยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.56 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน จากรายงานของ Coniza และคณะ (2003) พบว่าการเลี้ยงปลาดุกอุยด้วยอาหารที่มีโปรตีน 28.9 % เป็นเวลา 120 วัน ปลามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 2.9 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน การเจริญเติบโตของปลาดุกอุยจะเป็นไปอย่างรวดเร็วใน 6 เดือนแรก ภายในระยะเวลา 1 ปี สามารถนำมาเพาะพันธุ์ได้ (Panprommin *et al.* 2008) และการเจริญเติบโต

จะช้าลงเมื่อปลาเริ่มอายุมากขึ้น จากรายงานของ Kocabas และคณะ (2002) พบว่า ปลา channel catfish อายุ 2 ปีมีการแสดงออกของยีน *MSTN* สูงสุด และการแสดงออกน้อยลงเมื่อปลาอายุ 3 ปี ขึ้นไป โครงสร้างของยีน *MSTN* ในปลา channel catfish ประกอบไปด้วย Exon 3 ส่วน และ Intron 2 ส่วน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* ในปลา channel catfish มีความหลากหลายสูงโดยเฉพาะใน Exon ที่หนึ่งมีการซ้ำกันของลำดับ CAG ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจะได้ Glutamine หลายหน่วย (Polyglutamine) เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* ของปลา ดุกอูย และปลา Catfish อื่นๆ (Gregory *et al.* 2004; Pan *et al.* 2007) การซ้ำกันของลำดับ CAG พบได้ในกลุ่มปลามีเกล็ดบางชนิด เช่น ปลา sea bream (Maccatrozzo *et al.* 2001) แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น มนุษย์, หนู, วัว และไก่ ไม่พบ Polyglutamine นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พบ Microsatellite และ Single Nucleotide polymorphism (SNP) หลายตำแหน่งในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* เช่น มีการพบ Microsatellite 4 ตำแหน่ง และ SNP อีก 19 ตำแหน่งในปลา Japanese flounder (Zhong *et al.* 2008) และมีการพบ Microsatellite 5 ตำแหน่ง และ SNP 11 ตำแหน่งในปลา Channel catfish (Kocabas *et al.* 2002) เป็นต้น ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ เหล่านี้มีประโยชน์ในงานวิจัยมากมาย

จากการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* เปรียบเทียบกับปลา และสัตว์อื่นๆ พบว่า ยีน *MSTN* ของปลาดุกอูยมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มปลา Catfish มากที่สุด (95.5-96.2%) ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน *MSTN* ของปลาดุกอูยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆอีก 42 ชนิด แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง และกลุ่มสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มของปลา (Fish) และ กลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) ซึ่งรวมอยู่กับสัตว์ปีก (Avians) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเฉพาะในกลุ่มของปลา จะพบว่ายีน *MSTN* ของปลาดุกอูยมีความใกล้ชิดกับกลุ่มปลา catfish ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน นอกจากนี้เมื่อดูความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน *MSTN* ของปลาบางกลุ่มพบว่ายีน *MSTN* มี 2 รูปแบบ ตัวอย่างคือยีน *MSTN-1* และ *MSTN-2* ในปลา Zebrafish (Biga *et al.* 2005; Kerr *et al.* 2005) ซึ่งยีนทั้งสองแบบมีจำนวนของกรดอะมิโนเท่ากับ 374 และ 366 หน่วยตามลำดับ และมีการแสดงออกที่แตกต่างกัน Helterline และคณะ (2007) รายงานว่าในปลา zebrafish ยีน *MSTN-2* มีการแสดงออกสูงในระยะ Somitogenesis ช่วงต้นประมาณ 11 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ แต่ ยีน *MSTN-1* มีการแสดงออกสูงในระยะ Somitogenesis ช่วงปลายประมาณ 15-19 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ส่วนในปลา zebrafish ตัวเต็มวัยพบว่าการแสดงออกของยีน *MSTN-1* มากกว่า ยีน *MSTN-2* ในเนื้อเยื่อที่ศึกษาทุกเนื้อเยื่อ ยกเว้นเนื้อเยื่อตา และกระเพาะลม ในปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆพบการแสดงออกของยีน *MSTN* ในเนื้อเยื่ออื่นๆนอกเหนือจากกล้ามเนื้อเช่นเดียวกัน ในปลา Rainbow trout มียีน *MSTN-2* อยู่ 2 รูปแบบ (Orthologs) ที่มีการแสดงออกต่างกัน โดยยีน *MSTN-2a* จะแสดงออกเฉพาะที่สมอง ส่วน ยีน *MSTN-2b* มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ศึกษา (Garikipati *et al.* 2007)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่พบการแสดงออกของยีน *MSTN* ที่กล้ามเนื้อสันหลัง (McPherron *et al.* 1997) และกล้ามเนื้อหัวใจ (Sharma *et al.* 1999) การแสดงออกของยีน

MSTN มีความสอดคล้องกับการพัฒนาของกล้ามเนื้อ แต่ในปลาการแสดงออกของยีน *MSTN* มีความซับซ้อนมาก เช่น ปลานิล และ ปลา Gilthead seabream จะพบการแสดงออกของยีน *MSTN* ในระยะหลังฟักเท่านั้น แต่ไม่พบในระยะตัวอ่อน (Maccatrozzo *et al.* 2001; Rodger *et al.* 2001) สำหรับปลา Japanese flounder มีรายงานโดย Zhong และคณะ (2008) ว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *MSTN* ในระยะตั้งแต่ไข่ยังไม่ปฏิสนธิ (Unfertilized eggs) ก่อนจะถึงระยะ Neurula ซึ่งการแสดงออกของยีน *MSTN* มีระดับคงที่ เนื่องจากในระยะนี้ยังไม่มีการสร้าง Somite หลังจากระยะ Neurula การแสดงออกของยีน *MSTN* เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึงระยะสร้างหัวใจ การแสดงออกของยีน *MSTN* ลดลงเล็กน้อยหลังจากไข่ปลาฟักเป็นตัวมีการแสดงออกของยีน *MSTN* เพิ่มขึ้น ซึ่งการแสดงออกของยีน *MSTN* ในปลา Japanese flounder สอดคล้องกับกระบวนการ Somitogenesis เหมือนการแสดงออกของยีน *MSTN-1* ในปลา Zebrafish และการศึกษาในปลาตุ๊กตาค้างคาวพบว่ายีน *MSTN* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะหลังฟักเป็นตัว การเจริญเติบโตของลูกปลาวัยอ่อนระยะนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนและขยายขนาดของมัดกล้ามเนื้อ (Koumans and Akster 1995)

สรุปผลและข้อเสนอแนะ (CONCLUSIONS AND RECOMMENDATION)

การทดลองที่ 1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอุณหภูมิน้ำ (30-35°C) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ กระตุ้นให้รังไข่ปลาตุ๊กตุ๋นมีพัฒนาการต่อเนื่องในช่วงหลังจากฤดูผสมพันธุ์ปกติระหว่างเดือน ตุลาคมถึงพฤศจิกายน ซึ่งรังไข่ปลาตุ๊กตุ๋นจะมีพัฒนาการของไข่เข้าสู่ระยะ 4-5 ขณะที่รังไข่แม่ปลาตุ๊กตุ๋น ที่เลี้ยงในบ่อดินและในตู้กระจกซึ่งเป็นชุดควบคุมอุณหภูมิจะหยุดที่ไข่ระยะที่ 3 เป็นส่วนใหญ่ ขณะเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิและการเลี้ยงในตู้กระจกทำให้แม่ปลาเกิดความเครียดซึ่งวัดได้จาก ระดับคอร์ติซอลที่เพิ่มขึ้นในแม่ปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 35°C และระดับคอร์ติซอลลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองที่ 6 สัปดาห์แสดงว่าแม่ปลายังไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เท่าที่ควร ถ้ายังคงเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิต่อไปอาจส่งผลเสียต่อการพัฒนารังไข่ ในทางปฏิบัติเพื่อ กระตุ้นให้แม่ปลาสร้างไข่ตลอดฤดูการเพาะพันธุ์นั้น ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าควรเลี้ยงรวบรวมแม่ปลา ตุ๊กตุ๋นจากบ่อดิน นำมาเลี้ยงในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 30°C ติดต่อกันเป็นระยะ ประมาณ 3 เดือนเริ่มตั้งแต่ปลายฤดูฝนต่อฤดูหนาว

การทดลองที่ 2 ผู้วิจัยได้โคลนยีนฮีตช็อกโปรตีนคือยีน *HSC70-1* และยีน *HSC70-2* ในปลา ตุ๊กตุ๋น ซึ่งฮีตช็อกโปรตีนมีบทบาทสำคัญยิ่งต่อระบบสมดุลของร่างกาย ซึ่งการสร้างฮีตช็อกโปรตีนจะ เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติเมื่อเซลล์ได้รับความเครียด ฮีตช็อกโปรตีนจึงมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า Stress proteins จากลำดับ cDNA พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากันคือ 649 หน่วย และมีความ เหมือนของกรดอะมิโน 94% และส่วนของ Signature sequence ในโปรตีนชนิดนี้มีการอนุรักษ์ใน ระดับสูงเมื่อเทียบกับปลาและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โครงสร้างของยีน *HSC70-1* และยีน *HSC70-2* ในปลา ตุ๊กตุ๋นมีความคล้ายกับโครงสร้างยีน *HSC70* ในปลาและสัตว์อื่นๆ แม้ว่ายีนฮีตช็อกโปรตีนทั้งสองเป็น ยีนที่มีการแสดงออกในสภาวะปกติ การฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้าช่องท้องปลาตุ๊กตุ๋นเพื่อทดสอบการ แสดงออกพบว่ายีนทั้งสองมีรูปแบบการแสดงออกของต่างกัน การติดเชื้อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ของระดับ mRNA ของยีน *HSC70-2* ในเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้ออย่างมีนัยสำคัญในช่วงเวลา 48 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ แสดงว่ายีน *HSC70-2* อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาตุ๊กตุ๋น ในขณะที่ระดับ mRNA ของ *HSC70-1* ก่อนข้างคงที่ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าควรมีงานทดลองเพื่อ ศึกษาการแสดงออกของยีน *HSC70-1* และยีน *HSC70-2* เพื่อเข้าใจบทบาทของยีนในการตอบสนอง ความเครียดลักษณะอื่น เช่น ความร้อน การปนเปื้อนโลหะหนัก สภาวะออกซิเจนในน้ำต่ำ รวมทั้งการ โคลนยีน Heat shock protein 70 (*HSP70*) ซึ่งเป็นยีนที่ไม่แสดงออกในเซลล์ปกติ แต่จะแสดงออก เมื่อเซลล์ได้รับความเครียดเท่านั้น ด้วยคุณสมบัตินี้จึงมีการทดลองเพื่อศึกษาความเป็นไปได้สำหรับ การใช้โปรตีน *HSP70* เป็น Bioindicator สำหรับความเครียดในสัตว์น้ำ เป้าหมายแรกเริ่มของ โครงการวิจัยนี้คือการโคลนยีน *HSP70* แต่เนื่องจากในการรวบรวมตัวอย่างเพื่อสกัด Total RNA นั้น ผู้วิจัยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับปลาตุ๊กตุ๋นที่เลี้ยงในสภาพปกติ เพราะคาดว่ายีน *HSP70* น่าจะมีการ แสดงออกในระดับต่ำ แต่เมื่อนำ mRNA มาทำบริสุทธิ์ปรากฏว่าได้เฉพาะ Transcript ของยีน Heat shock cognate protein (*HSC70*) ทำให้ต้องเปลี่ยนวัตถุประสงค์ของการทดลองเป็นการศึกษายีน *HSC70* และในระหว่างการศึกษาโคลน cDNA พบว่าปลาตุ๊กตุ๋นมียีน *HSC70* 2 ยีน จึงตั้งชื่อเป็น *HSC70-1* และยีน *HSC70-2*

การทดลองที่ 3 การศึกษาการโคลนยีน Myostatin และศึกษาการแสดงออกของยีนระหว่างพัฒนาการระยะต่างๆของปลาดุกอุย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* ในรูป cDNA ของปลาดุกอุยมีความยาว 1,784 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 396 หน่วย และพบตำแหน่งอนุรักษ์ของกรดอะมิโน Cysteine จำนวน 9 ตำแหน่ง การศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MSTN* เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบว่า ยีน *MSTN* ของปลาดุกอุยมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มปลา catfish มากที่สุดประมาณ 95% การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *MSTN* ของปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆอีก 42 ชนิด โดยการสร้าง Phylogenetic tree สามารถแบ่งความสัมพันธ์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังและกลุ่มสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มปลากระดูกแข็ง (Teleost fish) และกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) ซึ่งรวมอยู่กับสัตว์ปีก (Avians) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเฉพาะในกลุ่มของปลา จะพบว่ายีน *MSTN* ของปลาดุกอุยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มปลา catfish ด้วยกัน ยีน *MSTN* ของปลาดุกอุยมีการแสดงออกมากในกล้ามเนื้อสันหลังและการแสดงออกของยีน *MSTN* เล็กน้อย ในสมอง เหนือก หัวใจ ลำไส้ กระเพาะ และผิวหนัง ส่วนการแสดงออกของยีน *MSTN* ของปลาดุกอุยที่ระยะการพัฒนาดังกล่าว คือตั้งแต่ลูกปลาดุกอุยฟักออกจากไข่เป็นตัวหนึ่งสัปดาห์จนกระทั่งปลาดุกอุยอายุ 6 เดือน พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* ที่ระยะต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยปลาดุกอุยที่ระยะ 3 สัปดาห์ และปลาดุกอุยอายุ 1 เดือน มีระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* สูงสุด และปลาดุกอุยอายุ 3 เดือนมีระดับการแสดงออกของยีน *MSTN* ต่ำสุด

การโคลน cDNA ของยีน *MSTN* เป็นประโยชน์สำหรับการทำความเข้าใจโครงสร้างการทำงานและวิวัฒนาการของยีน *MSTN* และใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน *MSTN* (Functional analysis) โดยเทคนิค RNA interference (RNAi) เนื่องจาก ยีน Myostatin เป็น Major gene ที่มีผลมาต่อการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ ซึ่งความรู้นี้สามารถนำมาประยุกต์กับการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโตของปลาดุกอุย

เอกสารอ้างอิง (REFERENCES)

- Acosta J., Carpio Y., Borroto I., Gonzalez O., Estrada M.P. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebra giant phenotype. *Journal of Biotechnology* **119**, 324-331.
- Ali K.S., Dorgai L., Abraham M. and Hermesz E. 2003. Tissue- and stressor-specific differential expression of two *hsc70* genes in carp. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**, 503-509.
- Angka S.L., Lam T.J. and Sin Y.M. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* **130**, 103-112.
- Areerat S. 1987. *Clarias* culture in Thailand. *Aquaculture* **63**, 355-362.
- Barton B.A. 1997. Stress in finfish: past, present and future - a historical perspective, pp. 1-33. In G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, C. B. Schreck, (eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, UK.
- Basu N., Todgham A.E., Ackerman P.A., Bibeau M.R., Nakano K., Schulte P.M. and Iwama G.K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* **295**, 173-183.
- Biga P.R., Robert S.B., Lliev D.B., McCauley L.A.R., Moon J.S., Collodi P., Goetz F.W. 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry Physiology* **141**, 218-230.
- Billard R., Bry C. and Gillet C. 1981: Stress, environment and reproduction in teleost fish, pp. 185-208. In A. D. Pickering (ed.). **Stress and fish**. Academic Press, London, UK.
- Boman I.A., Klemetsdal G., Blichfeldt T., Nafstad O. and Våge D.I. 2009. A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (MSTN) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics* **40**, 418-422.
- Chuang K.H., Ho S.H. and Song Y.L. 2007. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Gene* **405**, 10-8.
- Clark R.W., Henderson-Arzapalo A. and Sullivan C.V. 2005. Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture* **249**, 497-513.
- Coniza E.B., Mae R.C., and Josefa D.T.F. 2003. Growth and yield of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther) fed different grow-out diets. *Aquaculture-Bamidgeh* **55**, 53-60.
- De Santis C. and Jerry D.R. 2011. Differential tissue-regulation of myostatin genes in the teleost fish *Lates calcarifer* in response to fasting: evidence for functional differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **335**, 158-165.
- Deane E.E., Li J. and Woo N.Y.S. 2004. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. *Diseases of Aquatic Organisms* **161**, 413-421.
- Department of Fisheries. 2009. Fisheries statistics of Thailand 2009. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok, Thailand. <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>

- Feder M.E. and Hofmann G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**, 243-282.
- Freund F., Hörstgen-Schwark G. and Holtz W. 1995. Seasonality of the reproductive cycle of female *Heterobranchus longifilis* in tropical pond culture. *Aquatic Living Resources* **8**, 297-302.
- Garikipati D.K., Gahr S.A., Roalson E.H. and Rodgers B.D. 2007. Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (*rtMSTN-2a* and *-2b*): genomic organization, differential expression, and pseudogenization. *Endocrinology* **148**, 2106–2115.
- Graser R.T., Malnar-Dragojevic D. and Vincek V. 1996. Cloning and characterization of a 70 kd heat shock cognate (*hsc70*) gene from the zebrafish (*Danio rerio*). *Genetica* **98**, 273-276.
- Gregory D.J., Waldbieser G.C. and Bosworth B.G. 2004. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species. *Animal Genetics* **35**, 425-430.
- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics* **17**, 71-74.
- Groman D.B. 1982. **Histology of the striped bass**. American Fisheries Society, Monograph number 3. 116 p.
- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B. and Vijayan M.M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **8**, 35-56.
- Iwama G.K., Vijayan M.M., Forsyth R.B. and Ackerman P.A. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist* **39**, 901-909.
- Jarimopas P., Tavarutmaneeagul P., Chinabut S. and Wongummarit U. 1995. Gonadal development of *Clarias macrocephalus* Günther. Technical Paper No. 170. National Inland Fisheries Institute, Bangkok. 42 p.
- Kambadur R., Sharma M. Smith T.P. and Bass J.J. 1997. Mutations in myostatin (GDF 8) in double-muscling Belgian blue and Piedmontese cattle. *Genome Research* **7**, 910–916.
- Kerr T., Roalson E.H., Rodgers B.D. 2005. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evolutionary & Development* **7**, 390-400
- Kim Y.S., Bobbili N.K., Lee Y.K., Jin H.J. and Dunn M.A. 2007. Production of a polyclonal anti-myostatin antibody and the effects of in ovo administration of the antibody on posthatch broiler growth and muscle mass. *Poultry Science* **86**, 1196–1205.
- Ko C.F., Chiou T.T., Chen T.T., Wu J.L., Chen J.C. and Lu J.K. 2006. Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Marine Biotechnology* **9**, 20–32.
- Kocabas A.M., Kuseyin H., Dunham R.A. and Liu Z. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochimica et Biophysica Acta*. **1575**, 99–107.
- Koumans J.T.M. and Akster H.A. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology* **110**, 3–20.

- Kumar S., Tamura K. and Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Lam T.J. 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish, pp. 65-116. In W. S. Hoar, D. J. Randall, E. M. Donaldson, (eds.). *Fish Physiology*, vol. **9**, part **B**. Academic Press, New York, USA.
- Lee S.B., Kim Y.S., Oh M.-Y., Jae I., Seong K.-B., and Jin H.-J. 2010. Improving rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth by treatment with a fish (*Paralichthys olivaceus*) myostatin prodomain expressed in soluble form in *E. coli*. *Aquaculture* **302**, 270-278.
- Leung S.-M. and Hightower L.E. 1997. A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2607-2614.
- Maccatrozzo L., Bargelloni L., Radaelli G., Mascarello F. and Patarnello T. 2001. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Marine Biotechnology* **3**, 224-230.
- McPherron A.C. and Lee S.J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12457-12461.
- McPherron A.C., Lawler A.M. and Lee S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* **387**: 83-90.
- Ming J., Xie J., Xu P., Liu W., Ge X., Liu B., He Y., Cheng Y., Zhou Q. and Pan L. 2010. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish & Shellfish Immunology* **28**, 407-418.
- Na-Nakorn U., Rangsin W. and Witchasunkul S. 1993. Suitable conditions for induction of gynogenesis in the catfish, *Clarias macrocephalus*, using sperm of *Pangasius sutchi*. *Aquaculture* **118**, 53-62.
- Ngamvongchon S., Pawaputanon O., Leelapatra W. and Johnson W.E. 1988. Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of carp and catfish in Northeast Thailand. *Aquaculture* **74**, 35-40.
- Ostbye T.K., Wetten O.F., Tooming-Klunderud A., Jakobsen K.S., Yafe A., Etzioni S., Moen T. and Andersen O. 2007. Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. *Gene* **403**, 159-169.
- Pan J., Wang X., Song W., Chen J., Li C. and Zhao Q. 2007. Molecular cloning and expression pattern of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *DNA Sequence* **18**, 279-287.
- Pankhurst N.W. and Van Der Kraak G. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish, pp. 73-93. In G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter and C. B. Schreck, (eds.). *Fish stress and health in aquaculture*. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, UK.
- Panprommin D., Poompuang S. and Srisapoome P. 2007. Characterization of expressed sequence tags from liver and muscle tissues of walking catfish, *Clarias macrocephalus*. *ScienceAsia* **33**, 461-468.
- Panprommin D., Poompuang S. and Srisapoome P. 2008. Molecular characterization and seasonal expression of the vitellogenin gene from Günther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. *Aquaculture* **278**, 60-68.

- Park J.H., Lee J.J., Yoon S., Lee J.S., Choe S.Y., Choe L., Park E.H. and Kim C.G. 2001. Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element. *Nucleic Acids Research* **29**, 3041-3050.
- Ramaglia V., Harapa G.M., White N. and Buck L.T. 2004. Bacterial infection and tissue-specific Hsp72, -73 and -90 expression in western painted turtle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **138**, 139-148.
- Richter C.J.J., Viveen W.J.A.R., Eding E.H., Sukkel M., Rothuis A.J., Van Hoof M.F.P.M., Van Den Berg F.G.J. and Van Oordt P.G.W.J. 1987. The significance of photoperiodicity, water temperature and an inherent endogenous rhythm for the production of viable eggs by the African catfish, *Clarias gariepinus*, kept in subtropical ponds in Israel and under Israeli and Dutch hatchery conditions. *Aquaculture* **63**, 169-185.
- Rodgers B.D., Weber G.M., Sullivan C.V. and Levine M.A. 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* **142**, 1412-1418.
- Rungkrusamee W., Leelatanawit R., Jiravanichpaisal P., Klinbunga S. and Karoonuthaisiri N. 2010. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 1082-1089.
- Santacruz H., Vriz S. and Angelier N. 1997. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts. *Developmental Genetics* **21**, 223-233.
- SAS. 2003. **SAS Online Doc 9.1.3**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sharma M., Kambadur R., Matthews K.G., Somers W.G., Devlin G.P., Conaglen J.V., Fowke P.J. and Bass J.J. 1999. Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *Journal of Cell Physiology* **180**, 1-9.
- Shelton G.D. and Engvall E. 2007. Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. *Neuromuscular Disorder* **17**, 721-722.
- Srivastava S. J. and Singh R. 1991. Effects of constant photoperiod-temperature regimes on ovarian activity during the annual reproductive cycle in the murrel, *Channa punctatus* (Bloch). *Aquaculture* **96**, 383-391.
- Tan-Fermin J.D., Ijiri S., Ueda H., Adachi S. and Yamauchi K. 1997a. Ovarian development and serum steroid hormone profiles in hatchery-bred female catfish *Clarias macrocephalus* (Günther) during an annual reproductive cycle. *Fisheries Science* **63**, 867-872.
- Tan-Fermin J. D., Pagador R.R., and Chavez R.C. 1997b. LHRHa and pimozone-induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther) at different times during an annual reproductive cycle. *Aquaculture* **148**, 323-331.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S. and Bass J. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Biological Chemistry* **275**, 40235-40243.

- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Yabu T., Imamura S., Mohammed M.S., Touhata N., Minami T., Terayama M. and Yamashita M. 2011. Differential gene expression of HSP70/HSC70 in yellowtail cells in response to chaperone-mediated autophagy. *FEBS Journal* **278**, 673-685.
- Yamashita M., Hirayoshi K. and Nakata K. 2004. Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene* **336**, 207-218.
- Ye X., Brown S.R., Nones K., Coutinho L.L., Dekkers J.C. and Lamont S.J. 2007. Associations of myostatin gene polymorphisms with performance and mortality traits in broiler chickens. *Genetic Selection and Evolution* **39**, 73–89.
- Yue X., Liu B., Sun L. and Tang B. 2011. Cloning and characterization of a hsp70 gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology* **30**, 791-799.
- Zhang A., Zhou X., Wang X. and Zhou H. 2011. Characterization of two heat shock proteins (Hsp70/Hsc70) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): evidence for their differential gene expression, protein synthesis and secretion in LPS-challenged peripheral blood lymphocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry* **159**, 109-114.
- Zhong Q., Zhang Q., Chen Y., Sun Y., Qi J., Wang Z., Li S., Li C. and Lan X. 2008. The isolation and characterization of myostatin gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): ubiquitous tissue expression and developmental specific regulation. *Aquaculture* **280**, 247-255.

ผลผลิตจากโครงการ (Output)

1. สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ปริญญาเอก เรื่อง **Characterization of Two Constitutive Heat Shock Protein 70 Genes in *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864): cDNA Cloning and Their Response to Heat Stress and Bacterial Infection**
โดย นางสาวพรพรรณ พุ่มพวง
สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ปริญญาเอก เรื่อง **Molecular Characterization and Comparative Expression Analysis of the Myostatin Gene in *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) and *Clarias gariepinus***
โดย นางสาวปัญมณี กาญจนวรกุล
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

ภาคผนวก (Appendix)

ต้นฉบับ (Manuscript)

1. Poompoung P., Poompuang S., Kamonrat W. 2012. Effects of warm temperatures on ovarian development of walking catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) during post-spawning season. Submitted to Kasetsart Journal of Natural Science
2. Poompoung P., Panprommin D., Srisapoome S., Poompuang S. 2012. Cloning and expression of two HSC70 genes in walking catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) challenged with *Aeromonas hydrophila*. Submitted to Aquaculture Research Impact Factor = 1.25
3. Kanjanaworakul P., Poompuang S., Srisapoome S. 2012. Molecular cloning and expression analysis of the myostatin (MSTN) from walking catfish (*Clarias macrocephalus*, Günther 1864). Submitted to Aquaculture Research Impact Factor = 1.25

Effects of Warm Temperatures on Ovarian Development of Walking Catfish
***Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) During Post-Spawning Season**

Pornpun Poompoung¹, Supawadee Poompuang^{1*}, and Wongpathom Kamonrat²

ABSTRACT

This study aimed to determine the possibility of using temperature manipulation to stimulate ovarian activities of *Clarias macrocephalus* during post-spawning season. Ovarian development and monthly change in GSI of females held under pond conditions was monitored over a 1-year period from April 2008 to March 2009. In October, 13 month-old female fish (weight = 108 ± 12.7 g) were randomly collected from earthen pond and exposed to different temperatures at 25, 30 and 35°C under hatchery conditions for six weeks. Results indicated that change of GSI appeared to be correlated with the amount of rainfall, but not to variation in seasonal temperature. Significant variation of mean GSI values ($P < 0.05$) was observed among months with the highest value ($13.91 \pm 3.63\%$) in July. Histological examination of ovaries revealed that in females held under 25, 30 and 35°C, the number of vitellogenic oocytes progressively increased from 0.5-4.7% at week 2 to 4.6-19.7% at week 6, whereas in females held in the earthen pond, ovaries contained only immature oocytes. Exposure to warm temperatures resulted in significant elevations of plasma cortisol but not glucose concentrations. Although fully matured females could not be obtained, the present study suggested that temperature manipulation was probably the

practical way to increase the number of maturing females outside the reproductive season for walking catfish.

Keywords: *Clarias macrocephalus*, GSI, ovarian development, reproductive season, vitellogenesis

¹ Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand.

² Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author, e-mail: supawadee.p@ku.ac.th

INTRODUCTION

Aquaculture of catfish *Clarias macrocephalus* (Clariidae) is well established in Thailand and has been the popular species for domestic consumption for more than 40 years (Na-Nakorn *et al.*, 1993). Since the early 1990s, hybrid catfish (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) has replaced the culture of *C. macrocephalus* because they grow rapidly and are more resistant to diseases (Nukwan *et al.*, 1991). In 2009, hybrid catfish production was ranked second behind tilapia production with a total of 130,064 tons valued 4.9 billion Baht (Department of Fisheries, 2009). The expansion of hybrid catfish farming has led to increased demand for *C. macrocephalus* broodstock. Moreover, the availability of ripe females is low at the end of breeding season, precluding a year-round fry production.

Female *C. macrocephalus* reach sexual maturity at about one year of age. In Thailand, the spawning season starts at the beginning of rainy season in May and continues through September (Jarimopas *et al.* 1995; Panprommin *et al.*, 2008). It is well understood that induced spawning of catfish by hormone injection outside the natural breeding season is difficult due to low numbers of maturing oocytes (Tan-Fermin *et al.*, 1997b; Panprommin *et al.*, 2008).

Temperature is the important environmental factor influencing reproductive cycle and maturation in fish. Long-term manipulations of water temperature have been employed successfully to stimulate ovarian development and to extend the spawning period in African catfish *C. gariepinus* (Richter *et al.*, 1987), snakehead *Channa punctatus* (Srivastava and Singh, 1991), and in cold water species such as striped bass *Morone saxatilis* (Clark *et al.*, 2005). Temperature manipulations, however, have not been practiced to enhance reproduction capacity of *C. macrocephalus*. In the present study, we determined the possibility of using warm temperatures to stimulate oocyte development at the end of breeding season. In October 2008, 13 month old female walking catfish were randomly selected from the earthen pond and subjected to warm temperature at 30°C and 35°C in the hatchery for six weeks. Timing and duration of exposure coincided with the post-spawning period of catfish. Seasonal changes of reproductive development under pond conditions were monitored over a 1-year period from April 2008 to March 2009 by measuring gonadosomatic index (GSI) and histological examination of ovaries. Because exposure to increased water temperatures may be stressful, therefore, plasma cortisol and glucose concentrations were measured and compared among different groups of females to determine their response to temperature stress.

MATERIALS AND METHODS

Fish rearing

Fish used in this study were produced by artificial fertilization of 40 females (weight 210 ± 26 g) and 10 males (weight 202 ± 12 g) in August 2007 and were obtained from the Pathumthani Inland Fisheries Research and Development Center, Pathumthani Province. Larvae were reared in concrete tanks (2 x 3 x 1 m) at stocking density of 3,000/m² for two months (length = 5.7 ± 1.6 cm). Thereafter, 3,000 two-month old juvenile females were stocked in a 20 x 40 x 1 m earthen pond. They were fed commercial catfish pellet with 25% protein (2% body weight) twice daily at 0700 and 1600 hours. Water quality was measured every month throughout the experiment. Fifteen females were collected from the earthen pond monthly from April 2008 (age = 8 months) to March 2009, measured and weighed. Ovaries were collected and weighed for calculating the gonadosomatic index ($GSI = \text{gonad weight/body weight} \times 100$).

Ovarian tissues were fixed in Bouin solution for 24 hr, washed in 79% ethanol, and dehydrated using the automated tissue processor. The tissues were embedded in paraffin, sectioned to 5-10 μm , mounted on slides and stained with Haematoxylin and eosin. At least three hundred oocytes from the anterior, middle and posterior parts of the ovary of a female were examined using light microscope. Oocytes were classified into six stages of maturation according to Groman (1982) as follows: stage I: oocytes are undifferentiated and occur in nests with large nuclei and acidophilic cytoplasm; stage II: oocytes increase in size, each contains a large nucleus with basophilic chromatin; stage III: oocytes show a well defined follicular epithelium and basophilic cytoplasm; stage IV: oocytes are characterized by the appearance of euvitellin

nucleoli along the nuclear membrane, the presence of yolk granules in the cytoplasm, and a more distinct zona radiata in the cell membrane; stage V: oocytes are larger with abundant yolk vesicles, showing fewer euvitelin nucleoli in the nucleus and a degenerating nuclear membrane; stage VI: oocytes are fully grown, containing large amount of acidophilic yolk granules in the cytoplasm. Additionally, oocytes of *C. macrocephalus* can be classified as immature or pre-vitellogenic (stages I to III), maturing or vitellogenic (stages IV and V), and mature or post-vitellogenic (stage VI) (Richter *et al.*, 1987).

Ovarian development under warm temperatures

Three hundred female fish (age = 13 months; weight = 108 ± 12.7 g) were collected from the earthen pond during October 2008 and transferred to 5 x 10 x 1 m concrete tanks seven days prior to the experiment. One hundred and eighty fish were stocked randomly over fifteen 50 L aquaria (length, 90 cm; width, 45 cm; depth, 45 cm.) at a density of twelve fish per aquarium. The fish were divided into three groups. Fish in the first group were maintained at an ambient temperature of $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Fish in the second and third groups were raised in the aquaria containing aerated water heated by immersion heater to 30°C and 35°C respectively. The experimental fish were fed commercial pellets containing 25% protein at 2% body weight twice daily and maintained for six weeks. Dissolved oxygen and pH were measured daily. Blood samples and ovaries were collected from fifteen individuals from each group after two, four and six weeks of rearing. Based on information from our preliminary study, the range of temperature and duration of exposure were non-lethal for this species under hatchery conditions.

Before tissue and blood collection, fish were anesthetized with 2-phenoxyethanol (0.75 mg.L^{-1}). Blood samples were taken from the caudal vein using 1-ml syringes coated with $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Titriplex III, Merck, Darmstadt, Germany), placed into 1.5 ml microcentrifuge tubes, and centrifuged at 1,500 rpm at 4°C for 10 min. Plasma was stored at -20°C until use. Cortisol levels were quantified by radioimmunoassay (RIA) using a commercial kit (Cortisol Bridge kit, TKCO1, L&R Enterprise Co. Ltd, Thailand). Plasma glucose was measured by colorimetric test using a commercial kit (no. RA 122-10: End point, BIOTECH, Bangkok, Thailand).

Statistical analysis

Data on GSI, percent of eggs in different stages, glucose and cortisol levels were presented as means $\pm$ S.E. Statistical differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range tests for comparisons of means by stage of development. Simple linear regression analysis was used to evaluate the relationship between GSI and rainfall as well as between GSI and proportion of post-vitellogenic eggs. Analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS 11.0). Results were tested for significance at the 95% level and highly significant results at the 99% level.

RESULTS

Reproductive cycle of walking catfish under pond conditions

Monthly changes in GSI of mature females, water temperature, and rainfall were monitored over a 1-year period (Fig. 1). Water temperatures varied from 25°C to 30°C , with the lowest temperature in December and January. The amount of rainfall

varied from 0 mm during December to February to 313 mm in July. Significant variation of mean GSI values ($P < 0.05$) was observed among months. From April until August, mean GSI values ranged from $5.7 \pm 2.0\%$ to $11.3 \pm 6.3\%$ with the highest value ($13.9 \pm 3.6\%$) in July. The GSI decreased in September and October and remained low in November and December ($0.4 \pm 0.2\%$ to $0.9 \pm 0.5\%$). From January to March, the GSI gradually increased from $2.2 \pm 1.5\%$ to $9.3 \pm 2.1\%$. There was significant relationship between GSI and rainfall ($r = 0.656$, $P < 0.01$) (Fig. 2).

Histological analysis of ovaries exhibited seasonal patterns of oocyte development and were classified into six stages. Mean oocyte diameters were 0.046, 0.062, 0.185, 0.35, and 1.0 mm for stages 2 to 6 respectively (Fig. 3). During the natural breeding season from April to September, the ovaries contained large quantities of post-vitellogenic (stage 6) oocytes (34.1 ± 0.7 to $59.0 \pm 1.3\%$) (Fig. 4). During the post-spawning season in October and November, no advanced oocytes (stages 5 and 6) were observed, but the ovaries contained high proportions of previtellogenic (stage 3) oocytes (46.8 ± 1.4 to $63.1 \pm 1.5\%$). In December, oocytes in stages 5 ($12.8 \pm 1.6\%$) and 6 ($1.9 \pm 0.4\%$) were observed and the proportions of stage 6 oocytes gradually increased until March ($26.7 \pm 1.4\%$) when ovaries of females contained oocytes at all stages. Positive correlation was found between GSI and the proportion of stage 6 oocytes ($r = 0.803$, $P < 0.001$, Fig. 5).

Oocyte development under warm temperatures

Oocyte development was examined in fish exposed to different levels of warm temperatures and at ambient temperature of 25°C (Fig. 6). At week 2, percentage of oocytes at stages 2 to 4 was nearly identical among groups. At week 4, oocyte development of females in the treated groups proceeded into stage 5, while oocytes of

females held at 25°C as well as those of females in the pond remained at stages 2 to 4. The difference of ovarian growth was pronounced at week 6, with increased percentage of vitellogenic (stage 5) oocytes ($19.7 \pm 1.1\%$) in fish held at 35°C compared to 6.5 ± 0.6 and $4.6 \pm 1.7\%$ in the 25 and 30°C groups, but ovaries of females in earthen ponds were unchanged and contained only previtellogenic oocytes (Fig. 4). Similarly, at week 6 GSI values were higher (0.64-0.68 %) for fish in 30 and 35°C groups, compared to 0.42-0.47% for those in the pond and fish held at 25°C.

Plasma cortisol levels were higher at elevated temperatures during 6 weeks of exposure (Table 1). Cortisol concentration was unchanged at 25°C and 30°C. However, at 35°C, cortisol level was highest at week 4 ($313.6 \pm 30.5 \text{ ng.mL}^{-1}$) and slightly decreased to $251.5 \pm 18.5 \text{ ng.mL}^{-1}$ at week 6. Although glucose concentrations ($123.4 \pm 12.7 \text{ mmol.L}^{-1}$) were highest at 35°C of week 6, the values did not differ significantly across temperature levels throughout the experimental period.

DISCUSSION

Reproductive seasonality of tropical freshwater fishes – including walking catfish – is synchronized by environmental cues, particularly rainfall (Freund *et al.*, 1995; Tan-Fermin *et al.*, 1997a). In Thailand, the onset of *C. macrocephalus* reproduction occurs at the beginning of rainy season (May) and continues through October. Results in this study indicated that the highest reproductive investment of female catfish reared in earthen ponds was in July (GSI = $13.91 \pm 3.63\%$) when the amount of rainfall was highest (313 mm). At the end of the rainy season from October until January, the GSI significantly decreased, with the lowest value in November

($0.41 \pm 0.26\%$). Our results were in agreement with those of Panprommin *et al.* (2007). However, the GSI values in this study were lower than those reported by, Tan-Fermin *et al.*, (1997a), likely due to the differences in age and size of females and culture conditions.

During February to September, recruitment of ovarian follicles to maturation resulted in a 115% increase in GSI. The highest numbers of post-vitellogenic (stage 6) oocytes ($58.8 \pm 1.3\%$) were observed as the GSI value peaked in July. At the end of breeding between October and November, GSI was lowest, with the absence of advanced-stage eggs (stages 5 and 6) in the ovaries. Based on GSI values and distribution of oocytes, induced spawning by hormone injection can be performed as early as February and continues through September. Induced spawning, however, would be difficult from October to January, when pre-vitellogenic oocytes dominate the ovaries. Generally, only stage 6 eggs can be induced by hormone treatment in which ovulation occurs within 16-18 hr post injection (Ngamvongchon *et al.* 1988). A study by Tan-Fermin *et al.* (1997b) reported that induce spawning of 2 years old females throughout the reproductive cycle was possible, because the ovaries contain a large number of post-vitellogenic oocytes which development is arrest during the off-season.

As in other teleost species, endogenous mechanisms of reproduction are well understood in walking catfish, but little is known about environmental control of their reproductive cycle (Ngamvongchon *et al.*, 1988; Freund *et al.*, 1995; Tan-Fermin *et al.*, 1997a; Tan-Fermin *et al.*, 1997b). Nevertheless, results of the present study implied that endogenous mechanisms rather than environmental factors may suppress reproductive activity. The inference is based on the observation of reduced ovarian size in October and November despite favorable conditions to oocyte development,

i.e., moderate amount of rainfall and optimal temperature. In some species, ovarian regression coincides with the presence of a refractory period during which ovarian recrudescence is suppressed regardless of environmental conditions and their origin (Lam, 1983; Richter *et al.*, 1987; Van Oordt *et al.*, 1987; Freund *et al.*, 1995).

Although temperature is considered less important in tropical species (Lam, 1983), several studies have documented the influences of temperature on reproductive maturation. For instance, in African catfish (*C. gariepinus*), ovarian development was enhanced and the resting period was shortened from 4-7 months to 2 months when the fish were kept at a constant 25°C water temperature compared to those kept in outdoor ponds with ambient temperature fluctuations (15° to 30°C) (Richter *et al.*, 1987). Additionally, the authors suggest that water temperature plays a more significant role in regulating the ovarian cycle than photoperiod. In snakehead, a combination of warm temperature (30°C) and long photoperiod stimulated reproduction and extended the spawning period during the annual reproductive cycle (Srivastava *et al.*, 1991). In this study, increased quantities of vitellogenic eggs were observed in females held at warm temperatures after six weeks of exposure. Moreover, ovaries of fish held at 25°C also contained low proportions of vitellogenic eggs ($6.5 \pm 0.6\%$). In contrast, no vitellogenic oocytes were observed in fish held in earthen pond under seasonal temperature regime ($27 \pm 2.5^\circ\text{C}$) during October and November. It is not clear how elevated temperature exerts its effects on oocyte recruitment in walking catfish. Studies suggest that temperature may have direct or indirect effects on initiation of oogenesis, production of vitellogenin, or secretion of pituitary and reproductive hormones (Lam, 1983; Richter *et al.*, 1987). For tropical species, warm temperatures were found to stimulate the formation of yolk vesicles in maturing oocytes (Lam, 1983). In snakehead, high temperatures were reported to

induce a release of gonadotropin, resulting in complete maturation of the ovary (Srivastava *et al.*, 1991).

Walking catfish exposed to constant temperature at 35°C had higher levels of cortisol compared to fish held at 25 and 30°C and the cortisol concentration in fish held at 35°C remained high throughout the experiment. Generally, a fish has the ability to adapt to altered environments caused by long-term stress (Barton, 1997). However, a slight reduction in cortisol levels after 6 weeks of heat exposure implied that stress due to high temperature may exceed the adjustment ability of walking catfish. In such a case, a longer period of thermal stress would severely affect growth, reproduction and immune response in fish (Iwama *et al.*, 1997; Barton, 1997). Cortisol is known to mediate the effects of stress on fish reproduction in addition to its role in physiological stress response (Pankhurst and Van Der Kraak, 1997). The release of cortisol into the circulation can have either stimulatory or inhibitory effects on the reproductive capacity of fish, depending on the stage of gametic development (Pankhurst and Van Der Kraak, 1997). Cortisol is thought to accelerate vitellogenesis, which is inferred from a higher level of plasma cortisol in maturing females than in fully mature females (Billard *et al.*, 1981). In some species, long-term elevation of cortisol suppressed the production of mature oocytes (Pankhurst and Van Der Kraak, 1997). For walking catfish, increased levels of cortisol may enhance the production of vitellogenin, which was inferred by an increase in number of stage-5 oocytes in ovaries of females kept in the hatchery.

CONCLUSION

The present study demonstrated the use of warm water temperatures to stimulate ovarian development of female catfish at the end of natural breeding season. Significant proportions of vitellogenic oocytes were observed, when females were kept in the hatchery at constant temperatures (30 and 35°C) for six weeks compared to fish held at 25°C. Increased plasma levels of cortisol in treated fish may have a stimulatory effect on yolk protein synthesis. Although post-vitellogenic eggs could not be obtained by short-term exposure to warm temperatures in the hatchery, this study suggested that temperature manipulation was probably the practical way to increase proportion of maturing oocytes during the off-season. It would be useful to determine whether long-term exposure, i.e., 3 months of heat stress during dry season can induce a formation of post-vitellogenic oocytes. However, factors such as stocking density and water quality also can cause additional stress in fish and may affect reproductive performance. Further research is required to determine the effects of cortisol on final maturation as well as the possibility of manipulations of other environmental factors to enhance year-round breeding for walking catfish.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Agricultural Research Development Agency (ARDA) and the Thailand Research Fund (Grant # RMU5180015).

LITERATURE CITED

Barton, B.A. 1997. Stress in finfish: past, present and future - a historical perspective, pp. 1-33. In G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, C. B. Schreck,

- 297 (eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Society for Experimental
 298 Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, UK.
- 299 Billard, R., C. Bry and C. Gillet. 1981: Stress, environment and reproduction in
 300 teleost fish, pp. 185-208. *In* A. D. Pickering (ed.). **Stress and fish**. Academic
 301 Press, London, UK.
- 302 Clark, R.W., A. Henderson-Arzapalo, and C.V. Sullivan. 2005. Disparate effects of
 303 constant and annually-cycling daylength and water temperature on
 304 reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture* 249:
 305 497-513.
- 306 Department of Fisheries. 2009. Fisheries statistics of Thailand 2009. Department of
 307 Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok, Thailand.
 308 <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>
- 309 Donaldson, E.M., and G.A. Hunter. 1983. Induced final maturation, ovulation, and
 310 spermiation in cultured fish, pp. 351-403. *In* W. S. Hoar, D. J. Randall and E.
 311 M. Donaldson, (eds.). **Fish Physiology, vol. 9, part B**. Academic Press, New
 312 York, USA.
- 313 Freund, F., G. Hörstgen-Schwark, and W. Holtz. 1995. Seasonality of the
 314 reproductive cycle of female *Heterobranchus longifilis* in tropical pond
 315 culture. *Aquat. Living. Resour.* 8: 297-302.
- 316 Groman, D.B. 1982. **Histology of the striped bass**. American Fisheries Society,
 317 Monograph number 3. 116 p.
- 318 Iwama, G.K., M.M., Vijayan, R.B., Forsyth, and P.A. Ackerman. 1999. Heat shock
 319 proteins and physiological stress in fish. *Am. Zool.* 39: 901-909.
- 320 Jalabert, B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish
 321 compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 261-279.

- 322 Jarimopas, P., P. Tavarutmaneegul, S. Chinabut, and U. Wongummarit, U. 1995.
 323 Gonadal development of *Clarias macrocephalus* Günther. Technical Paper
 324 No. 170. National Inland Fisheries Institute, Bangkok. 42 p.
- 325 Lam, T.J. 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish, pp. 65-116. *In*
 326 W. S. Hoar, D. J. Randall, E. M. Donaldson, (eds.). **Fish Physiology, vol. 9,**
 327 **part B.** Academic Press, New York, USA.
- 328 Na-Nakorn, U., W. Rangsin and S. Witchasunkul. 1993. Suitable conditions for
 329 induction of gynogenesis in the catfish, *Clarias macrocephalus*, using sperm
 330 of *Pangasius sutchi*. *Aquaculture* 118: 53-62.
- 331 Ngamvongchon, S., O. Pawaputanon, W. Leelapatra, and W.E. Johnson. 1988.
 332 Effectiveness of an LHRH analogue for the induced spawning of carp and
 333 catfish in Northeast Thailand. *Aquaculture* 74: 35-40.
- 334 Nukwan, S., M. Tangtrongpiros, K. Lawanyawut, and P. Veerasidth. 1990. Cross
 335 breeding between *Clarias macrocephalus* and *Clarias gariepinus*, pp. 553-
 336 567. *In* Proceeding 28th Kasetsart University Conference, 29-31 January 1990.
 337 Bangkok.
- 338 Pankhurst, N.W. and G. Van Der Kraak. 1997. Effects of stress on reproduction and
 339 growth of fish, pp. 73-93. *In* G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter and
 340 C. B. Schreck, (eds.). **Fish stress and health in aquaculture.** Society for
 341 Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, UK.
- 342 Panprommin, D., S. Poompuang and P. Srisapoome. 2008. Molecular characterization
 343 and seasonal expression of the vitellogenin gene from Günther's walking
 344 catfish *Clarias macrocephalus*. *Aquaculture* 278: 60-68.
- 345 Richter, C. J. J., W.J.A.R. Viveen, E.H. Eding, M. Sukkel, A.J. Rothuis, M. F. P. M.
 346 Van Hoof, F. G. J. Van Den Berg and P. G. W. J. Van Oordt. 1987. The

- 347 significance of photoperiodicity, water temperature and an inherent
348 endogenous rhythm for the production of viable eggs by the African catfish,
349 *Clarias gariepinus*, kept in subtropical ponds in Israel and under Israeli and
350 Dutch hatchery conditions. *Aquaculture* 63: 169-185.
- 351 Srivastava, S. J. and R. Singh. 1991. Effects of constant photoperiod-temperature
352 regimes on ovarian activity during the annual reproductive cycle in the murrel,
353 *Channa punctatus* (Bloch). *Aquaculture* 96: 383-391.
- 354 Tan-Fermin, J. D., S. Ijiri, H. Ueda, S. Adachi and K. Yamauchi. 1997a. Ovarian
355 development and serum steroid hormone profiles in hatchery-bred female
356 catfish *Clarias macrocephalus* (Günther) during an annual reproductive cycle.
357 *Fish. Sci.* 63: 867-872.
- 358 Tan-Fermin, J. D., R.R. Pagador and R.C. Chavez. 1997b. LHRHa and pimozone-
359 induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther) at
360 different times during an annual reproductive cycle. *Aquaculture* 148: 323-
361 331.

Table 1 Cortisol and glucose data (mean $\pm$ S.E.) for female walking catfish exposed to different temperatures for 14, 28, and 42 days.

	Cortisol (ng/ml)	Glucose (mmol/l)
Week 2		
25°C	157.46 $\pm$ 9.53	79.57 $\pm$ 5.01
30°C	121.43 $\pm$ 3.14	81.86 $\pm$ 11.12
35°C	299.67 $\pm$ 29.30*	101.25 $\pm$ 8.17
Week 4		
25°C	199.72 $\pm$ 10.75	61.72 $\pm$ 5.46
30°C	133.69 $\pm$ 17.18	79.13 $\pm$ 3.98
35°C	313.61 $\pm$ 30.5*	92.67 $\pm$ 3.83
Week 6		
25°C	104.93 $\pm$ 8.01	73.84 $\pm$ 10.53
30°C	133.16 $\pm$ 5.18	71.92 $\pm$ 7.19
35°C	251.54 $\pm$ 18.62*	123.41 $\pm$ 12.70

Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$) within week.

Captions for figures

Fig. 1 GSI values, temperature and rainfall (mm) throughout the reproductive seasonality of female walking catfish. GSI levels associated with histogram bars with the same letters do not differ significantly.

Fig. 2 Correlation between GSI in female walking catfish and rainfall.

Fig. 3 Oocytes at different developmental stages (2-6) in the ovary of a mature female walking catfish (scale bar = 0.5 mm).

Fig. 4 Proportion of oocytes at different developmental stages through the reproductive seasonality of female walking catfish. Values with different letter for each stage indicate significant differences ($P < 0.05$).

Fig. 5 Correlation between GSI and stage 6 oocytes in female walking catfish.

Fig. 6 Proportions of oocytes at different developmental stages (2-5) in females held under elevated temperatures for different durations. Values with different letter for each developmental stage indicate significant differences ($P < 0.05$).

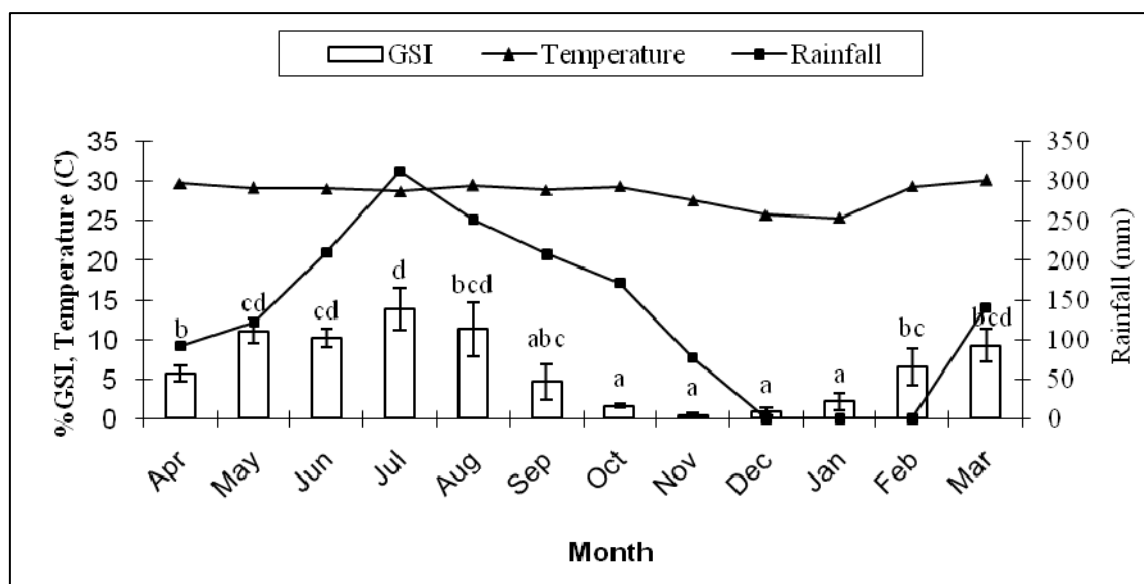
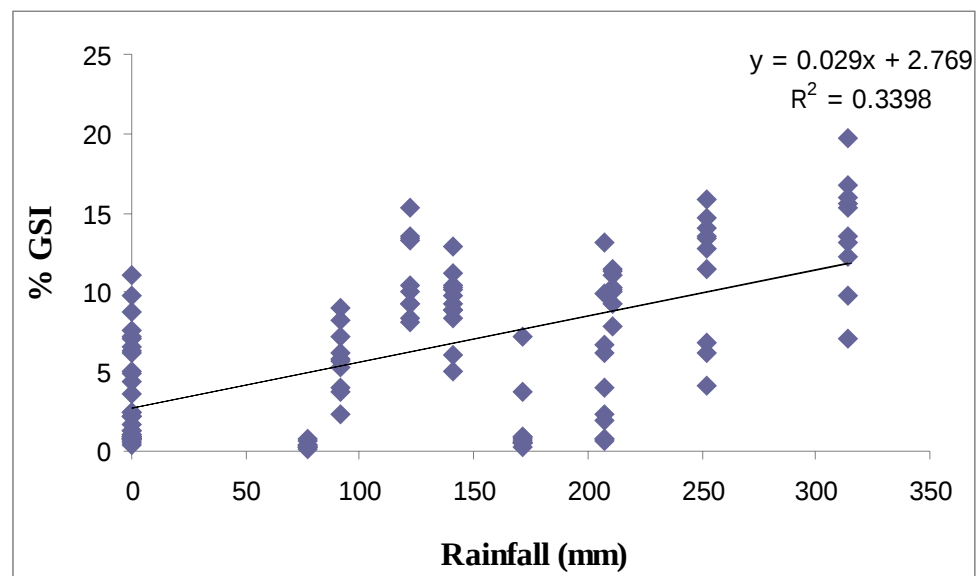


Fig. 1

**Fig. 2**

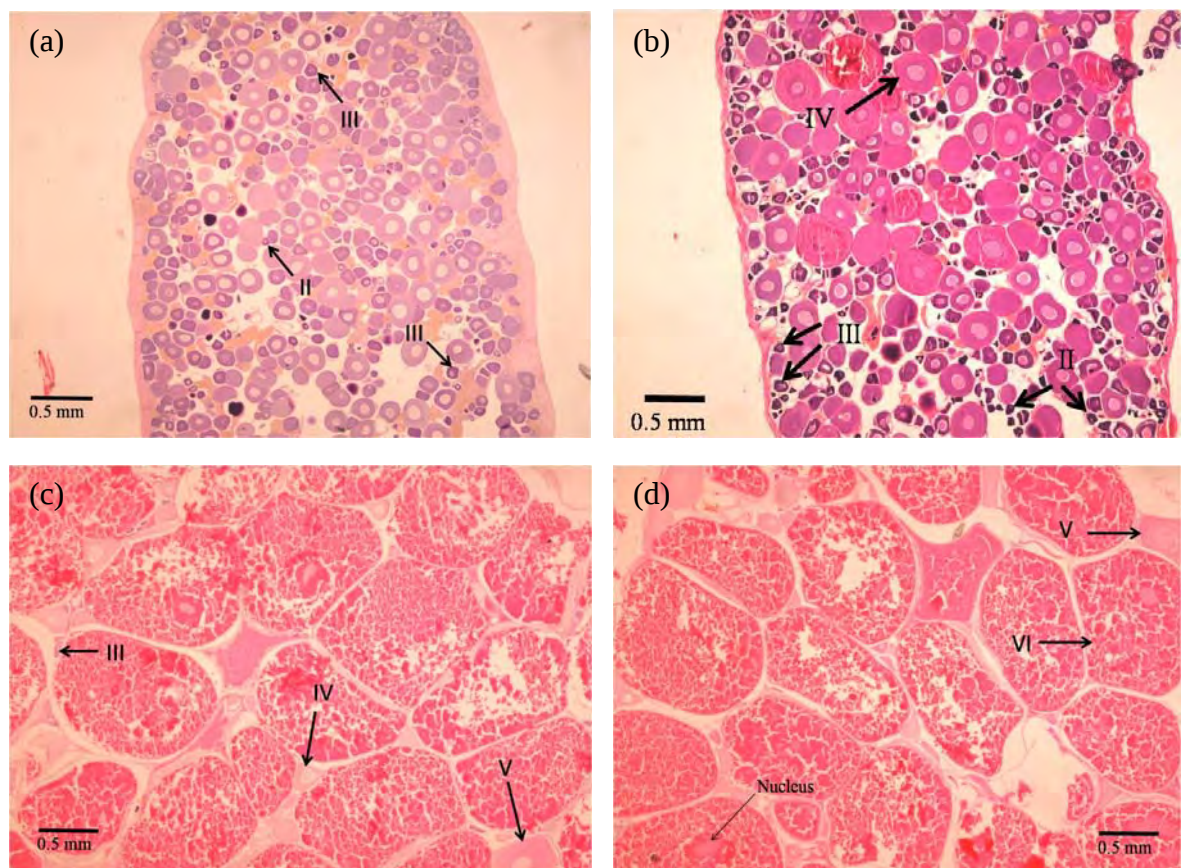


Fig. 3

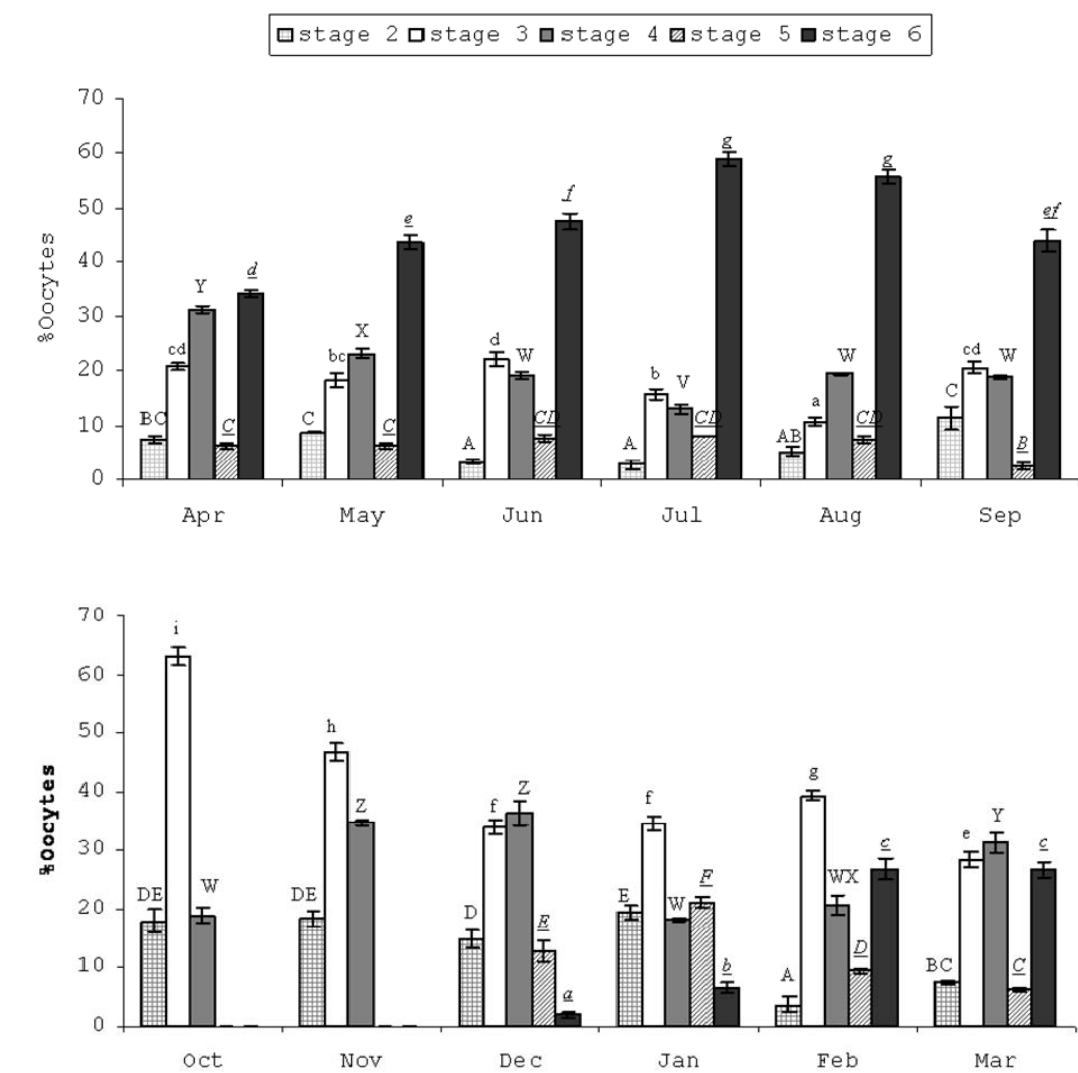
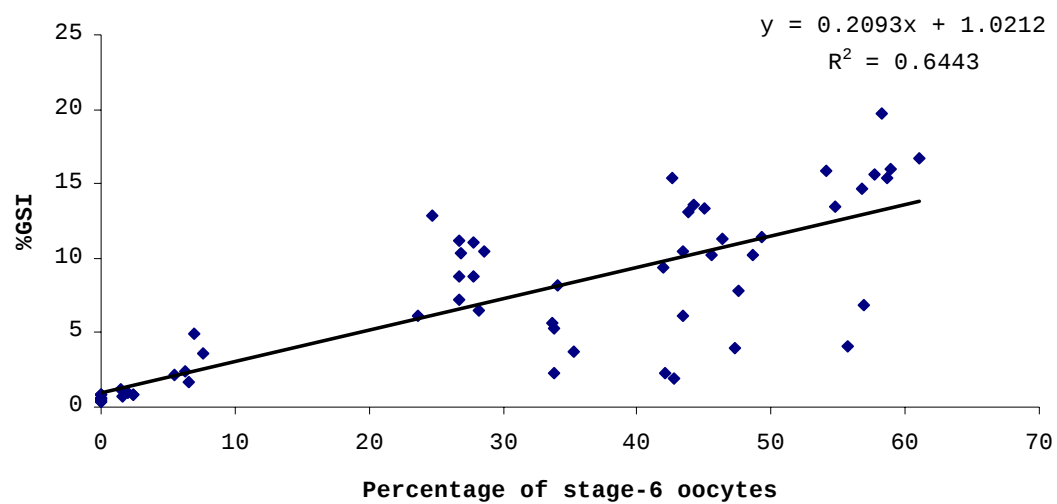


Fig. 4

**Fig. 5**

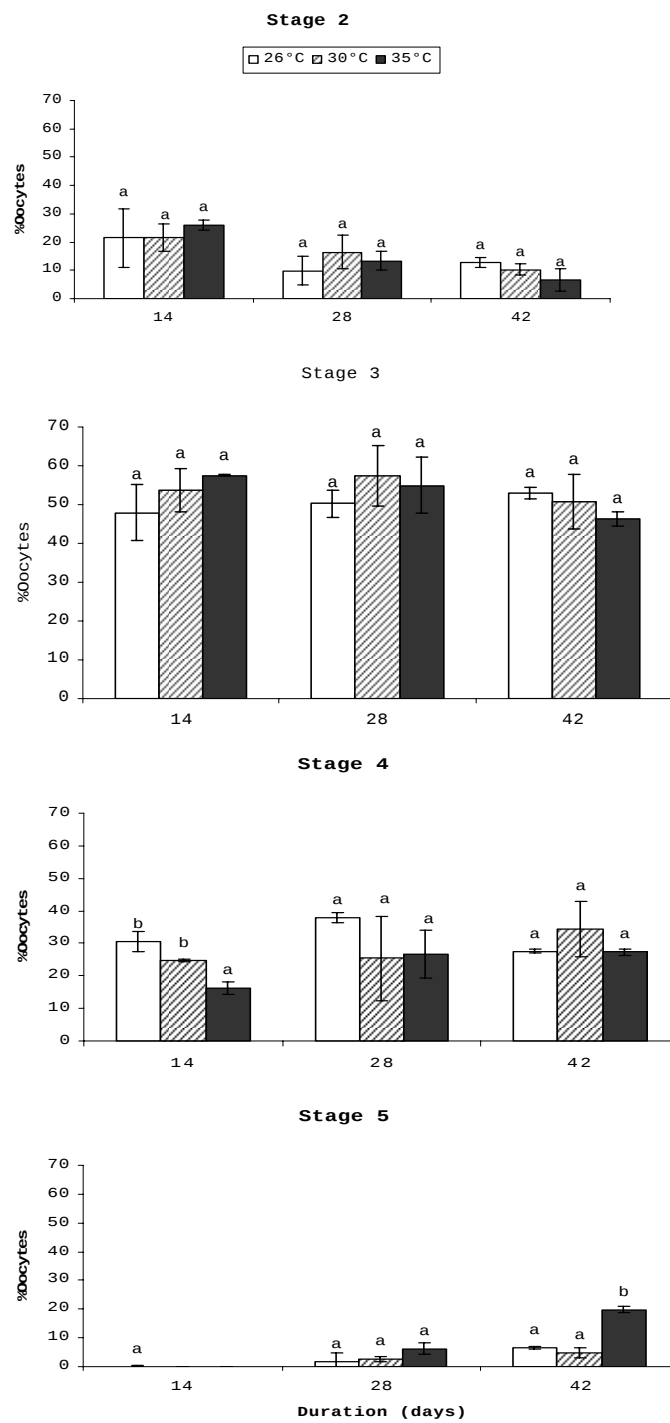


Fig. 6



Cloning and expression of two HSC70 genes in walking catfish *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) challenged with *Aeromonas hydrophila*

Journal:	<i>Aquaculture Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Poompuang, Supawadee; Kasetsart University, Aquaculture
Keywords:	<i>Clarias macrocephalus</i> , HSC70, cDNA cloning, <i>Aeromonas hydrophila</i>

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Cloning and expression of two HSC70 genes in walking catfish *Clarias***
2 ***macrocephalus* (Günther, 1864) challenged with *Aeromonas hydrophila***

3

4 Pornpun Poompoung¹, Dutrudi Panprommin², Prapansak Srisapoom¹, Supawadee
5 Poompuang^{1*}

6

7 ¹Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok,
8 10900, Thailand

9 ²School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao, 56000,
10 Thailand

11

12

13

14 *Correspondence: Supawadee Poompuang, Department of Aquaculture, Faculty of
15 Fisheries, Kasetsart University, 50 Paholyothin Road, Bangkok 10900, Thailand.

16 E-mail: supawadee.p@ku.ac.th

17 Phone: 66-2-579-2924

18 Fax: 66-2-561-3984

19

20

21 ABSTRACT

22 Two different cDNAs encoding heat shock cognate protein 70 genes were
23 isolated from liver of walking catfish. The complete cDNA sequences for walking
24 catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* were of identical length (2,278 bp), with an open
25 reading frame of 1,950 bp and a predicted 649 amino acid protein. Genomic
26 sequences of the walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* genes were composed of
27 eight exons, and seven introns, but exon and intron sizes were different. Amino acid
28 sequences of both proteins shared 94% similarity with 38 substitutions. The walking
29 catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* proteins shared 82-95% identity of amino acids with
30 those of other teleosts, chicken and human. Phylogenetic analysis revealed that
31 walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* clustered with channel catfish *HSC71*. Under
32 normal conditions, *HSC70-1* and *HSC70-2* transcripts were expressed at similar levels
33 in liver, gills, brain, and skeletal muscle of walking catfish. Bacterial infection by
34 *Aeromonas hydrophila* differentially induced the expression of *HSC70s* in these
35 tissues during 48 h. *HSC70-1* was constitutively expressed at low levels in most
36 tissues, whereas, *HSC70-2* was up-regulated at moderate and high levels in liver and
37 skeletal muscle respectively. The significant increase in the expression of *HSC70-2* in
38 these tissues may relate to the role of *HSC70-2* in the immune response of walking
39 catfish.

40 **Keywords:** *Clarias macrocephalus*; *HSC70*; *Aeromonas hydrophila*; cDNA cloning;
41 genomic cloning; bacterial infection

42

43

44

45 INTRODUCTION

46 Exposure to stress causes protein disruption and results in an accumulation of
47 denatured and aberrantly folded proteins within the cell (Krone et al. 1997). Heat
48 shock or stress proteins (HSPs), are ubiquitous, highly-conserved proteins that play a
49 central role in controlling cellular homeostasis in response to a wide range of stresses,
50 including heat stress, oxidative stress, heavy metals and bacterial infection (Iwama et
51 al. 1998). HSPs are found in all organisms from bacteria to fishes and mammals,
52 among which heat shock protein 70 (HSP70) is the most widely studied group of
53 HSPs (Feder and Hofmann 1999). HSP70 is not expressed in most tissues, but is
54 highly inducible under stress conditions. However, some members of the HSP
55 families are constitutively expressed in cells under normal conditions, such as the 70
56 kDa heat shock cognate protein (HSC70) (Iwama et al. 1998). HSC70 acts primarily
57 as molecular chaperone for other proteins to facilitate protein synthesis, folding,
58 translocation, assembly, and degradation (Feder and Hofmann 1999). HSC70s have
59 received attention in fish and shellfish due to increasing evidence of the involvement
60 of HSC70 in the immune system (Basu et al. 2002; Robert 2003). HSC70 and HSP70
61 levels in liver and hepatopancreas tissues were modulated during bacterial and viral
62 infections (Leung and Hightower 1997; Deane et al. 2004; Chuang et al. 2007; Ming
63 et al. 2010; Rungrussamee et al. 2010; Yue et al. 2011). It has been suggested that the
64 role of HSC70 during infection is associated with various pathways of protein
65 translocation, whereas HSP70 is able to stimulate innate immune response through the
66 nuclear factor (NF) κ b signaling pathway (Basu et al. 2002; Robert 2003; Deane et al.
67 2004). *HSC70* genes have been cloned from several fish species, including platyfish
68 (Yamashita et al. 2004), Wuchang bream (Ming et al. 2010), and grass carp (Zhang et
69 al. 2011). In addition, two *HSC70* genes were identified in zebrafish *Danio rerio*

70 (Graser et al. 1996; Santacruz et al. 1997), common carp *Cyprinus carpio* (Ali et al.
71 2003) and yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Yabu et al. 2010).

72 Walking catfish *Clarias macrocephalus* (Clariidae) is an important species for
73 domestic consumption in Thailand. It commands high retail prices due to its superior
74 meat quality. Although *C. macrocephalus* is widely distributed throughout Southeast
75 Asia, culture of this species is well established in Thailand for more than 50 years.
76 However, during the culture period, walking catfish may suffer from hemorrhagic
77 septicemia or ulcerative disease caused by the Gram-negative bacterium *Aeromonas*
78 *hydrophila* (Angka et al. 1995). The outbreak of the disease appears to be secondary
79 infection of stressed fish. *A. hydrophila* was reported to be the cause of high mortality
80 in walking catfish from nursing to grow-out periods, resulting in heavy economic
81 losses (Areerat 1987; Angka et al. 1995).

82 In the present study, we cloned cDNA and genomic sequences of two cognate
83 HSC70s from walking catfish in order to predict amino acid sequences and determine
84 their evolutionary distances from those of other teleosts and higher vertebrates. The
85 HSC70 EST clone obtained from previous work (Panprommin et al. 2007) was used
86 to design primers for RACE techniques. To investigate the role of HSC70s in the
87 walking catfish immune system, the fish were injected intraperitoneally with *A.*
88 *hydrophila*. The expression profiles of the two HSC70 genes determined by semi-
89 quantitative RT-PCR were compared in brain, gill, liver and muscle tissues during 48
90 h post injection. This is the first report describing the cloning and characterization of
91 *HSC70* genes in walking catfish.

92

93

94 MATERIALS AND METHODS

95 **Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)**

96 The 371-bp HSC70 EST clone (EB360505) containing the partial open reading
 97 frame and the 3' untranslated region (UTR) was obtained from the previous work
 98 (Panprommin et al. 2007); therefore, only 5' RACE was performed. Total RNA was
 99 extracted from liver tissue of an adult female (152 g) using TRIzol reagent (Molecular
 100 Research Center, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions.
 101 The extracted RNA was purified using a QuickPrep™ Micro mRNA Purification kit
 102 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). The 5' RACE technique was
 103 utilized to recover the 5' information of target cDNA using a BD Smart™ RACE
 104 cDNA Amplification kit (BD Biosciences ClonTech, San Jose, CA, USA) according
 105 to the manufacturer's instructions. Approximately 1 µg of mRNA was used for first-
 106 strand cDNA synthesis. For the 5'-RACE-ready cDNA, 1 µg of mRNA, 1 µl of BD
 107 Smart II A oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') and 1 µl
 108 of 5'-CDS primer (5'-(T)₂₅VN-3', N = A, C, G or T; V = A, G or C) were used to
 109 generate the nucleotide sequence at the 5' end. After first-strand cDNA synthesis, the
 110 5'-RACE-ready cDNA was used as template to generate the nucleotide sequence at
 111 the 5' end. For RACE PCR reactions, a 50-µl PCR reaction mixture consisted of 2.5
 112 µl of 5'-RACE-ready cDNA, 5 µl of 10x BD Advantage 2 PCR buffer, 1 µl of 10mM
 113 dNTP Mix (each at 2.5 mM), 1 µl of 50x BD Advantage 2 Polymerase Mix, 5 µl of
 114 10x Universal Primer Mix (UPM: Long (0.4 µM), 5'-
 115 CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT GGTATCAACGCAGAGT-3' and
 116 Short (2 µM), 5'-CTAATACGACTCACTATA GGGC-3'), and 1 µl of 10 µM of gene
 117 specific primers, HSC70-1R1, HSC70-1R2, HSC70-1R3, HSC70-1R4 for HSC70-1
 118 and HSC70-2R1, HSC70-2R2, HSC70-2R3, HSC70-2R4 for HSC70-2 (Table 1),

under the following conditions for 25 cycles: 94°C for 3 min, 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 3 min.

The RACE products were gel-purified using the GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas, Germany) according to the manufacturer's instructions. Band doubles at 1,000 bp were observed on the agarose gel; therefore, two bands were cloned separately. The DNA fragment was ligated into pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) and transformed into *E. coli* strain JM109. The positive clones were selected for extraction of the plasmid using GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Three µl of extracted plasmid DNA was sequenced using the Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The M13 forward and reverse primers were used for nucleotide sequencing of the inserts.

Genomic cloning of two HSC70 cDNAs

The two heat shock cognate cDNAs obtained in this study were called walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2*. Primers for genomic cloning of walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* were designed based on the full-length cDNAs (Table 1). Genomic DNA was extracted from liver tissue (20-30 mg) of a female fish using a Genomic DNA purification kit (Fermentas). The extracted DNA was subjected to PCR amplification using eight primers (Table 1). A 25-µl PCR mixture consisted of 1 µl of genomic DNA, 2.5 µl of 10x *Taq* buffer, 0.75 µl of MgCl₂, 1.5 µl each of dNTPs, 1 µl each of forward and reverse primers, 0.2 µl of 1 U *Taq* DNA polymerase, and 17.05 µl of sterile water under the following conditions for 25 cycles: 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 1 min 30 s. PCR products were cloned and sequenced

as described above. The genomic nucleotide sequences were compared to cDNA sequences to determine the exon-intron boundaries of the genes.

Sequence analysis and phylogenetic analysis

The nucleotide and deduced amino acid sequences were searched for homology and compared using the BLAST programs (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al. 1997). The Clustal W program (Thompson et al. 1994) was used for multiple sequence alignment of amino acids from HSC70 and HSC71 proteins of other teleost species. These amino acid sequences were used to construct the *HSC70* phylogenetic tree by the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) and bootstrapped for 1000 replicates using MEGA version 3.1 (Kumar et al. 2004).

Tissue distribution by RT-PCR

Total RNA was extracted from gill, liver, brain and muscle tissues of five walking catfish (150 ± 5.3 g in weight) using TRIzol reagent (Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions. Approximately 1 μ g of total RNA was used for first-strand cDNA synthesis using iScript™ Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions.

PCR amplifications were performed using the primers listed in Table 1. The level of expression of β -actin was used as an internal control. Primers for the β -actin gene was based on information obtained from channel catfish *Ictalurus punctatus* (AY555575). PCR was carried out in a 25- μ l reaction mixture containing 1x *Taq* buffer, 0.75 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 μ M of each forward and reverse primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) and 0.5 μ l of first-strand cDNA. The PCR was performed under the following conditions: pre-denaturation at 96°C for 3

168 min, and 26 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 58°C for 30 sec
169 and 72°C for 1 min. The last extension at 72°C was extended for 5 min. Ten µl of
170 each PCR product was subjected to electrophoresis through a 1.5% agarose gel in 1x
171 TBE buffer at 100 volts. A 100-bp DNA ladder was used to estimate molecular
172 weight. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml) and amplification
173 products were observed under UV light.

174

175 **Bacterial challenge**

176 One hundred four-month old healthy fish (body weight = 29.7±6.4 g) were
177 collected from an earthen pond at the Department of Aquaculture, Kasetsart
178 University, and transferred to a 6x4 m² concrete tanks seven days prior to the
179 experiment. The fish were stocked randomly into two 250-L fiberglass tanks at 26-28
180 °C at fifty individuals each. Fish in the first group were injected intraperitoneally with
181 0.1 ml of 0.85% NaCl and served as a control. Fish in the second group were injected
182 with 0.1 ml of 10⁹ CFU/ml of *A. hydrophila* by the same route as control. The
183 experimental fish were fed commercial pellets at 5% body weight twice daily. Tissue
184 samples, including brain, gills, liver and skeletal muscle, were randomly collected
185 from injected and control fish at 6, 12, 24 and 48 h post-injection for total RNA
186 extraction.

187

188 **Expression of HSC70-1 and HSC70-2 mRNA by semi-quantitative RT-PCR**

189 Total RNA was extracted from brain, gills, liver and muscle tissues using the
190 TRIzol reagent (Molecular Research Center) according to the manufacturer's
191 instructions. First-strand cDNA synthesis was carried out using a RevertAid™ First
192 Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions.

193 Approximately 1 µg of total RNA was incubated with 1 µl of oligo(dT)₁₈ at 70°C for 5
194 min. Four µl of 5x reaction buffer, 1 µl of RiboLock™ Ribonuclease inhibitor and 2
195 µl of 10 mM dNTP mix was added and the reaction was incubated at 37°C for 5 min.
196 One micro-liter of RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase was added and the
197 mixture was incubated at 42°C for 60 min, followed by 70°C for 10 min.

198 PCR reactions were performed using two sets of gene-specific primers,
199 RTHSC70-1F, RTHSC70-1R, RTHSC70-2F, and RTHSC70-2R (Table 1). PCR
200 amplification was carried out in a 25-µl reaction volume containing 0.5 µl of cDNA
201 first-strand template, 0.2 mM of each dNTPs, 1x *Taq* buffer, 1 U of *Taq* DNA
202 polymerase, 1 µM of forward primer, and 1 µM of reverse primer. PCR profiles for
203 26 cycles were as follows: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 58°C for 30
204 sec and extension at 72°C for 1 min. The level of expression of β-actin was used as an
205 internal control.

206 The PCR products were separated and visualized on a 1.5% agarose gel
207 containing ethidium bromide (0.5 mg/ml). The density of bands was measured by
208 FluorChem™ 8000 Advanced Fluorescence, Chemiluminescence and Visible Light
209 Imaging (Alpha Innotech Corporation) which corresponded to pixel density values
210 (Integrated Density Value, or IDV). Expression of the *HSC70-1* and *HSC70-2* genes
211 was measured as pixel density values. The pixel density value of each product was
212 used to calculate the ratio of the selected gene's expression relative to β-actin
213 expression. The expression of β-actin was normalized to 100.

214

215 **Statistical analysis**

216 Data on relative expression levels of the two *HSC70* genes at four time points
217 were presented as means ± S.E. for each tissue, where *n* = 20 fish. Statistical

218 differences in gene expression levels between groups were analyzed by one-way
219 analysis of variance (ANOVA) using SPSS 11.0. A student's *t*-test was used to
220 compare means between groups of *HSC70* genes at the same time point. For all
221 statistical tests, significance was set at $P < 0.05$.

222

223 RESULTS

224 Cloning of two full-length HSC70 cDNAs

225 The full-length cDNA sequences of the walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2*
226 genes were 2,278 bp, with an open reading frame of 1,950 bp encoding 649 amino
227 acids. Both cDNAs contained 33 and 295 bases of 5'- and 3'-untranslated regions
228 (Figs 1 & 2). The 3'-untranslated region of both cDNAs included the termination
229 signal (TAA) and a conserved polyadenylation signal (AATAAA) located 19 bases
230 before the poly(A) tail. Molecular masses determined from the deduced amino acid
231 sequences were approximately 71.24 and 71.27 kDa, respectively, for HSC70-1 and
232 HSC70-2. A homology search of these proteins using the BLAST program revealed
233 highest homology to the cytosolic and constitutively expressed HSC70 family.

234 Amino acid sequence analysis identified three signature sequences of the heat
235 shock protein 70 family: IDLGTTYS in the N-terminal domain, IFDLGGGTFDVSIL,
236 and IVLVGGSTRIPKIQK in the middle domain, and the EEVD cytoplasmic motif at
237 the C-terminus for both HSC70-1 and HSC70-2 (Figs 1 & 2). One repeat of the
238 tetrapeptide motif (GGMP) was present in the C-terminal region of HSC70-1, while
239 HSC70-2 contained two GGMP motif repeats. Overall, HSC70-1 and HSC70-2
240 sequences were 94% identical, with 38 substitutions between the two predicted
241 proteins (Fig 3).

Alignment of the amino acid sequences of HSC70-1 and HSC70-2 with HSC70 and HSC71 from other species revealed that the three signature sequences of heat shock protein 70 family and the EEVD motif were highly conserved. The two HSC70 proteins of walking catfish contained 649 amino acids, similar to those of zebrafish HSC70, channel catfish HSC71 and Wuchang bream HSC70. The HSC70 amino acid sequences of all fish species varied from 612 to 650 residues, whereas clawed frog HSC70 and human HSC70 contained 646 amino acids (Table 2). The HSC70-1 and HSC70-2 shared 82-95% identity of amino acids with other teleosts, chicken and human (Table 3). The amino acid sequences of HSC70-1 and HSC70-2 were submitted to the GenBank data base with accession numbers JX112294 and JX112295 respectively.

Genomic DNA structure of HSP70-1 and HSP70-2

Initially, primers (HSC70F1-R1) were designed based on information of a 371-bp EST clone (EB360505) of *C. macrocephalus*. These primers were used to clone a fragment of 1,048 bp. Subsequently, primers HSC70F2-HSC70-1R2 and HSC70F3-HSC70-1R3 were designed and were used to clone a 1,351-bp and a 1,165-bp fragment, respectively. A genomic sequence of *HSC70-1* (3,179 bp) was obtained. The coding region consisted of seven introns (144, 85, 89, 203, 199, 233, and 195 bp) and eight exons (205, 206, 153, 556, 203, 199, 233, and 195 bp) (Fig 4). The genomic sequence of the walking catfish *HSC70-1* gene was deposited in GenBank under accession number JX273642.

Primers HSC70F1-R1, HSC70F2-HSC70-2R2 and HSC70F3-HSC70-2R3 were used to clone three genomic fragments (921 bp, 1,094 bp, and 1,110 bp respectively) of *HSC70-2*. A genomic sequence of *HSC70-2* (2,980 bp) was obtained.

The coding region of *HSC70-2* consisted of seven introns (144, 85, 22, 64, 117, 126, and 144 bp) and eight exons (205, 206, 172, 539, 201, 213, 219, and 195) (Fig 4). The genomic sequence of the walking catfish *HSC70-2* gene was deposited in GenBank under accession number JX273643. Comparisons of genomic structure revealed that the exon and intron sizes of the two genes were different for exons 3, 4, 5, 6 and 7 and for introns 3, 4, 5 and 6.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed based on 15 amino acid sequences of *HSC70* and *HSC71*. A phylogenetic tree showed two distinct braches for fishes and clawed frog, chicken and human (Fig 5). Among teleosts, the *HSC70-1* and *HSC70-2* sequences of walking catfish were clustered with channel catfish *HSC71*, which would be expected given their membership in Order Siluriformes. A second group of teleost sequences comprised members of Family Cyprinidae, including common carp, gibel carp, Wuchang bream, zebrafish, and fathead minnow, and sequences from Japanese flounder and killifish. The two clusters joined the sequence from Atlantic salmon. The second major branch consisted of sequences from higher vertebrates, including human, chicken and clawed frog.

Expression analysis of *HSC70-1* and *HSC70-2* in response to *A. hydrophila* challenge

Under normal conditions, the mRNA levels of *HSC70-1* and *HSC70-2* were similar in liver, gills, brain, and skeletal muscle of walking catfish. The temporal expression of *HSC70-1* and *HSC70-2* after a bacterial challenge was analyzed in the same tissues. The *A. hydrophila* challenge resulted in differential expression of the

two genes in walking catfish tissues during a period of 48 h (Fig 6). The expression levels of the *HSC70-1* and *HSC70-2* in the brain were similar at each time point ($P<0.05$). However, slight but significant differences in *HSC70-1* mRNA levels were observed in the brain at 12 h, with 0.5-1.0 fold increase ($P<0.05$) in comparison with the control. The *HSC70-2* was up-regulated significantly in gills at 24 h post-injection and remained unchanged at 48 h, whereas the mRNA level of *HSC70-1* changed only slightly during a 48-h period. In the liver, results of *t*-test showed that the expression levels of *HSC70-1* and *HSC70-2* were significantly different at each time point. While the mRNA levels of *HSC70-1* in liver tissue increased slightly at 12 h and remained unchanged at 48 h, the *HSC70-2* was significantly up-regulated at 24 h and decreased markedly at 48 h post-injection. In skeletal muscle, the *HSC70-2* concentration increased gradually from 6 h and peaked at 48 h post-injection, with 3-fold increase compared to that of the control. In contrast, the mRNA level of *HSC70-1* changed only slightly during a 48-h period.

DISCUSSION

In the present study, we isolated and characterized two cognate heat shock protein 70 cDNAs from liver of walking catfish. Band doubles at 70 kDa were observed on an agarose gel for purification of cDNA; therefore, the two bands were cloned separately. We obtained two complete cDNAs and were designated *HSC70-1* and *HSC70-2*. The lengths of *HSC70-1* and *HSC70-2* cDNAs were 2,278 bp, with ORFs of 1950 bp encoding 649 amino acids. The walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* proteins shared high amino acid sequence identity (85-90%) with those of *HSC70s* from other fish species and, therefore, were placed in the *HSP70* gene family. The amino acid sequences of fish *HSC70s* showed a high degree of similarity at the N-terminus, whereas the sequences at the C-terminus were more variable.

318 Characterization of genomic sequences revealed that the walking catfish *HSC70-1* and
319 *HSC70-2* genes were composed of eight exons and seven introns. Differences in exon
320 and intron sizes were observed between the two loci. The major difference was in the
321 size of intron 4, which was larger (198 bp) in *HSC70-1* than in *HSC70-2* (64 bp). In
322 common carp, the similarities of *HSC70-1* and *HSC70-2* were 88% and 78% at the
323 protein and DNA levels respectively (Ali et al. 2003). There were 69 substitutions
324 between the two common carp proteins, 31 of which located in the C-terminus.
325 Walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* sequences were 94% identical, with 38
326 substitutions between the two predicted proteins. Nucleotide sequences of the two
327 cDNAs shared 91% identity.

328 Genomic structures of the two loci were similar to those of other teleost fishes,
329 including *Rivulus marmoratus* (Park et al. 2001), common carp (Ali et al. 2003), and
330 Wuchang bream (Ming et al. 2010). Interestingly, exon sizes were identical between
331 walking catfish *HSC70-1* and Wuchang bream *HSC70*, but the intron sizes were
332 different (Ming et al. 2010). The functional significance of this similarity, however, is
333 not known (Basu et al. 2002). The presence of introns is a major characteristic of the
334 constitutive forms of the HSP70 family, whereas the inducible forms do not contain
335 introns (Iwama et al. 1998). The lack of introns in the inducible HSP70s allows rapid
336 translation of mRNA into nascent protein during stress (Basu et al. 2002). It has been
337 suggested that multiple forms of HSP70/HSC70 in fish genomes arose by gene
338 duplication during vertebrate evolution (Yamashita et al. 2004; Yabu et al. 2011).

339 The heat shock protein (HSP70) family contains both inducible and
340 constitutively expressed members. The role of inducible *HSP70* in immune system of
341 fish is well characterized, but the function of *HSC70* during bacterial infection has yet
342 to be elucidated. Until recently, studies reported that bacterial challenge modulated

the mRNA levels of the cognate *HSC70* in various tissues of fishes and shellfishes. Ramaglia et al. (2004) reported an increase in protein levels of heat shock cognate, *HSC73* in liver and brain of the western painted turtle infected with *Citrobacter spp.* the causative agent of septicemic cutaneous ulcerative dermatitis. Deane et al. (2004) reported an increase in expression of *HSC70* in liver of silver sea bream after *Vibrio alginolyticus* challenge. Wuchang bream that received an injection of *A. hydrophila* showed that *HSC70* levels in liver tissue peaked at 6 h and decreased to baseline after 24 h (Ming et al. 2010). Tiger prawn (*Penaeus monodon*) exposed to *V. harveyi* had increased levels of heat shock cognate *HSP70* in gill tissue after 12 h of treatment, and expression returned to the same levels as controls after 72 h (Rungrussamee et al. 2010). In addition, Yue et al. (2011) reported that the *HSC71* mRNA levels in hepatopancreas of gill of Asiatic hard clam (*Meretrix meretrix*) were significantly increased at 12 h post injection of *V. parahaemolyticus* and decreased to baseline at 24 h.

In this study, the expression of *HSC70-1* and *HSC70-2* was detected in various tissues of walking catfish under normal conditions (data not shown). By contrast, bacterial infection differentially induced the expression of the two genes in brain, gills, liver and skeletal muscle of adult fish during a 48-h period after *A. hydrophila* challenge. *HSC70-1* was constitutively expressed at low levels and was slightly induced in most tissues. *HSC70-2*, however, was slightly expressed in brain and gills and moderately up-regulated in liver and skeletal muscle. The mRNA levels of *HSC70-2* peaked at 24 h and returned to the same levels as controls after 48 h. In contrast, the *HSC70-2* transcript in skeletal muscle gradually increased after 6 h and its level was highest at 48 h. Stress-inducible *HSC70* isoforms have been reported in zebrafish, common carp, and yellowtail. Expression patterns of these genes were

different under various stress conditions, e.g., heat stress, cold shock, and heavy metal treatment, and appeared to be tissue-specific. For instance, common carp *HSC70-1* was expressed at high levels in liver after cadmium exposure, while the expression of common carp *HSC70-2* was induced by cold shock in muscle (Ali et al. 2003). In culture tailfin cells, yellowtail *HSC70-1* was constitutively expressed under normal and heat-shock conditions, whereas *HSC70-2* was up-regulated by heat shock treatment (Yabu et al. 2011). Our results showed similar findings, suggesting that *HSC70-1* was constitutively expressed in most tissues, whereas the expression of *HSC70-2* was induced by bacterial infection in a tissue-specific manner.

The bacterium *A. hydrophila* is a causative agent of hemorrhagic septicemia, an important disease in freshwater fishes. Systemic infection results in mortality within 24-48 h (Areerat 1987; Angka et al. 1995). The most common clinical signs and lesions are hemorrhage in skin, fins, abdominal cavity and muscles (Rey et al. 2009; Silva et al. 2012). Histological changes include focal cellular necrosis in the liver and haemopoietic cells, heart and skeletal muscles (Rey et al. 2009). In this study, the significant increase in the expression of *HSC70-2* in walking catfish liver and muscle may relate to the role of *HSC70-2* in immune response of these tissues after bacterial infection. Ming et al. (2010) reported that *A. hydrophila* injection modulated the expression of *HSC70* and *HSP70* in liver of Wuchang bream in a time-dependent pattern. Both *HSC70* and *HSP70* mRNA levels significantly increased at 6 h and returned to baseline at 24 h. A similar pattern of *HSC70* expression was observed after walking catfish were infected with *A. hydrophila* in this study. The *HSC70-2* mRNA concentrations peaked at 24 h and decreased to level of the control at 48 h. Unlike liver, the *HSC70-2* mRNA level was very high in skeletal muscle at 48 h. Because fish infected with *A. hydrophila* showed severe skin and muscle lesions at

the injected site, the high level of HSC70-2 in muscle may suggest the involvement of *HSC70-2* in cell protection and survival.

A. hydrophila infection did not modulate the expression of both HSC70 isoforms in brain of walking catfish. There has been no report on the role of HSC70 in brain tissues of other teleosts under infectious challenge. Nevertheless, a study in western painted turtle (*Chrysemys picta bellii*) reported that bacterial infection induced significant mRNA levels of constitutive HSP73 in the brain (Ramaglia et al. 2004); high levels of HSP73 in the brain may suggest the role of this protein in translocation and synaptic vesicle recycling.

The expression of *HSP70-2* in gills of walking catfish slightly increased after injection with *A. hydrophila* at 24 h. It was likely that *HSC70-2* was insensitive to the bacteria at the early hours following injection. The increased levels of HSC70-2 in gills may correlate with osmotic regulation in the walking catfish.

In conclusion, we cloned and characterized two cDNAs encoding 649 amino acid heat shock cognate proteins designated *HSC70-1* and *HSC70-2* in walking catfish. The two *HSC70* genes showed high levels of similarity of protein products, but less similarity at the DNA level. Gene structure and deduced amino acid sequences of these heat shock cognate protein 70s in walking catfish were similar to those of homologous genes from other species. *A. hydrophila* infection caused a tissue-specific expression of HSC70-2. The mRNA levels of *HSC70-2* were modulated in liver and skeletal tissues, but not in brain and gills. The expression of *HSC70-2* might be associated with the immune response of walking catfish. Further research is needed to elucidate the role of the two copies of *HSC70s* in response to other stressors and to determine the functional significance of the two copies of *HSC70* in the walking catfish genome.

418

419

420 **ACKNOWLEDGMENTS**

421 This work was supported by the Thailand Research Fund (Grant #

422 RMU5180015) and the Agricultural Research Development Agency (ARDA). We

423 thank Saowalak On-ming for technical assistance.

424

425 **REFERENCES**

426 Ali K.S., Dorgai L., Abraham M., & Hermes E. (2003) Tissue- and stressor-specific
427 differential expression of two *hsc70* genes in carp. *Biochemical and*
428 *Biophysical Research Communications* **307**, 503-509.

429

430 Altschul S.F., Gish W., Miller W., Meyers E.W. & Lipman D.J. (1997) Basic local
431 alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.

432

433 Angka S.L., Lam T.J., & Sin Y.M. (1995) Some virulence characteristics of
434 *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*
435 **130**, 103-112.

436

437 Areerat S. (1987) *Clarias* culture in Thailand. *Aquaculture* **63**, 355-362.

438

439 Basu N., Todgham A.E., Ackerman P.A., Bibeau M.R., Nakano K., Schulte P.M., &
440 Iwama G.K. (2002) Heat shock protein genes and their functional
441 significance in fish. *Gene* **295**, 173-183.

442

443 Chuang K.H., Ho S.H. & Song Y.L. (2007) Cloning and expression analysis of heat
444 shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Gene*
445 **405**, 10-8.

446

447 Deane E.E., Li J. & Woo N.Y.S. (2004) Modulated heat shock protein expression
448 during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. *Diseases of*
449 *Aquatic Organisms* **161**, 413-421.

450

451 Feder M.E. & Hofmann G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones,
452 and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual*
453 *Review of Physiology* **61**, 243-282.

454

455 Graser R.T., Malnar-Dragojevic D. & Vincek V. (1996) Cloning and characterization
456 of a 70 kd heat shock cognate (*hsc70*) gene from the zebrafish (*Danio rerio*).
457 *Genetica* **98**, 273-276.

458

- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B. & Vijayan M.M. (1998) Heat shock protein expression in fish. *Review in Fish Biology Fisheries* **8**, 35-56.
- Krone P.H., Sass J.B. & Lele Z. (1997) Heat shock protein gene expression during embryonic development of the zebrafish. *Cellular Molecular Life Science* **53**, 122-129.
- Kumar, S., Tamura K. & Nei M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Leung S.-M. & Hightower L.E. (1997) A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2607-2614.
- Ming J., Xie J., Xu P., Liu W., Ge X., Liu B., He Y., Cheng Y., Zhou Q. & Pan L. (2010) Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish & Shellfish Immunology* **28**, 407-418.
- Panprommin D., Poompuang S. & Srisapoome P. (2007) Characterization of expressed sequence tags from liver and muscle tissues of walking catfish, *Clarias macrocephalus*. *ScienceAsia* **33**, 461-468.
- Park J.H., Lee J.J., Yoon S., Lee J.S., Choe S.Y., Choe L., Park E.H. & Kim C.G. (2001) Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element. *Nucleic Acids Research* **29**, 3041-3050.
- Ramaglia V., Harapa G.M., White N. & Buck L.T. (2004) Bacterial infection and tissue-specific Hsp72, -73 and -90 expression in western painted turtle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **138**, 139-148.
- Rey A., Verján N., Ferguson H.W. & Iregui C. (2009) Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record* **164**, 493-499.
- Robert J. (2003) Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental and Comparative Immunology* **27**, 449-464.
- Rungrussamee W., Leelatanawit R., Jiravanichpaisal P., Klinbunga S. & Karoonuthaisiri N. (2010) Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 1082-1089.

- 507 Saitou, N. & Nei M. (1987) The neighbor joining method: a new method for
508 reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-
509 425.
- 510
- 511 Santacruz H., Vriz S. & Angelier N. (1997) Molecular characterization of a heat
512 shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the
513 corresponding transcripts. *Developmental Genetics* **21**, 223-233.
- 514
- 515 Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Viera, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q. & Martins, M.L.
516 (2012) Haemorrhagic septicemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma*
517 *corruscans* × *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*.
518 *Aquaculture Research* **43**, 908-916.
- 519
- 520 Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the
521 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence
522 weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic*
523 *Acids Research* **22**, 4673–4680.
- 524
- 525 Yabu T., Imamura S., Mohammed M.S., Touhata N., Minami T., Terayama M. &
526 Yamashita M. (2011) Differential gene expression of HSP70/HSC70 in
527 yellowtail cells in response to chaperone-mediated autophagy. *FEBS Journal*
528 **278**, 673-685.
- 529
- 530 Yamashita M., Hirayoshi K. & Nakata K. (2004) Characterization of multiple
531 members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution
532 of stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene* **336**, 207-218.
- 533
- 534 Yue X., Liu B., Sun L. & Tang B. (2011) Cloning and characterization of a hsp70
535 gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the
536 immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology* **30**,
537 791-799.
- 538
- 539 Zhang A., Zhou X., Wang X. & Zhou H. (2011) Characterization of two heat shock
540 proteins (Hsp70/Hsc70) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): evidence
541 for their differential gene expression, protein synthesis and secretion in LPS-
542 challenged peripheral blood lymphocytes. *Comparative Biochemistry and*
543 *Physiology, Part B* **159**, 109-114.

Table 1 List of gene-specific primers, nucleotide sequences and positions of primers used in this study

Primer	Primer sequence (5' to 3')	Position ^a		Objective
		<i>HSC70-1</i>	<i>HSC70-2</i>	
HSC70-1R1	CCAATGCCTGGTTGCCTTGAA	2210-2231		5'RACE
HSC70-1R2	GTCTCTGCTGTTGACAAGAGC	1495-1515		5'RACE
HSC70-1R3	CCAGTATTGAGATCGACTCCC	872-892		5'RACE
HSC70-1R4	GCTCTGAGAGAAATGTCCTTATTTTCGA	602-629		5'RACE
HSC70-2R1	CCAATGCCTGGTTGCCTTGAA		2210-2232	5'RACE
HSC70-2R2	GGAGTTCCTCAAATCGAAGTG		1441-1461	5'RACE
HSC70-2R3	CTACAGCAGGAGACACTCACC		695-715	5'RACE
HSC70-2R4	CTCAGCGTCAAGCCACAAAAGATGCTGG		491-518	5'RACE
HSC70F1	CAGATTGAGGTCACATTTGAC	2085-2106	1820-1841	Genomic cloning
HSC70R1	CCAATGCCTGGTTGCCTTGAA	3088-3110	2822-2845	Genomic cloning
HSC70F2	GCTATTGCCTATGGGTTG	800-818	800-818	Genomic cloning
HSC70-1R2	GTCTCTGCTGTTGACAAGAGC	2119-2130		Genomic cloning
HSC70-2R2	GGAGTTCCTCAAATCGAAGTG		1843-1865	Genomic cloning
HSC70F3	CCAGCTGTTGGCATTGATCTG	46-67	46-67	Genomic cloning
HSC70-1R3	CCAGTATTGAGATCGACTCCC	1169-1190		Genomic cloning
HSC70-2R3	CTACAGCAGGAGACACTCACC		903-924	Genomic cloning
RTHSC70-1F	GCTATTGCCTATGGGTTGGAC			Semi-quantitative RT-PCR
RTHSC70-1R	GTCTCTGCTGTTGACAAGAGC			Semi-quantitative RT-PCR
RTHSP70-2F	GCTATTGCCTATGGGTTGGAC			Semi-quantitative RT-PCR
RTHSP70-2R	CAGAACTTCTGCAGGACTTC			Semi-quantitative RT-PCR
Ip β -actin-F ^b	AGAGAGAAATTGTCCGTGACATC			Semi-quantitative RT-PCR
Ip β -actin-R ^b	CTCCGATCCAGACAGAGTATTG			Semi-quantitative RT-PCR

^a Nucleotide positions are based on walking catfish DNA sequences submitted to GenBank (Accession number JX273642 for *HSC70-1* and accession number JX273643 for *HSP70-2*).

^b Primers for β -actin are based on GenBank sequence (Accession number AY555575).

Table 2 Comparison of HSC70 amino acid sequence of walking catfish with those of teleosts and other species.

Species	ORF (bp)	Amino acid residues
<i>Clarias macrocephalus</i> HSC70-1	1950	649
<i>Clarias macrocephalus</i> HSC70-2	1950	649
<i>Ictalurus punctatus</i> HSC71	1950	649
<i>Fundulus heteroclitus</i> HSC70	1839	612
<i>Acanthopagrus schlegelii</i> HSC70	1953	650
<i>Paralichthys olivaceus</i> HSC71	1839	612
<i>Pimephales promelas</i> HSC70	1953	650
<i>Megalobrama amblycephala</i> HSC70	1950	649
<i>Danio rerio</i> HSC70	1950	649
<i>Cyprinus carpio</i> HSC70-2	1935	644
<i>Carassius auratus gibelio</i> HSC70	1950	649
<i>Xenopus laevis</i> HSC70	1953	650
<i>Gallus gallus</i> HSC70	1941	646
<i>Homo sapiens</i> HSC70	1941	646

3 **Table 3** Percent identity and similarity of walking catfish HSC70-1 and HSC70-2
 4 amino acid sequences to those of other fishes, clawed frog, chicken and human
 5 HSC70 and HSC71 amino acid sequences.
 6

Species	HSC70-1		HSC70-2		Accession #
	Identity	Similarity	Identity	Similarity	
<i>Ictalurus punctatus</i> HSC71	94	96	90	94	P47773
<i>Fundulus heteroclitus</i> HSC70	95	91	90	89	DQ202278
<i>Salmo salar</i> HSC70	95	91	90	89	BT059361
<i>Acanthopagrus schlegelii</i> HSC70	94	83	89	80	AAX07833
<i>Paralichthys olivaceus</i> HSC71	95	91	90	89	AB006814
<i>Pimephales promelas</i> HSC70	93	95	89	93	AAS46619
<i>Megalobrama amblycephala</i> HSC70	95	91	91	89	EU623471
<i>Danio rerio</i> HSC70	91	94	87	91	CAA72216
<i>Cyprinus carpio</i> HSC70-2	93	95	90	89	AAP51388
<i>Carassius auratus gibelio</i> HSC70	94	97	91	95	AAO43731
<i>Gallus gallus</i> HSC70	90	93	87	91	NP_990334
<i>Homo sapiens</i> HSC70	91	94	87	91	NP_006588
<i>Xenopus laevis</i> HSC70	93	96	89	93	AAH41201

Captions for figures

Figure 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of walking catfish *HSC70-1*.

Three signatures of the heat shock protein 70 family are shown in boxes, a putative nuclear localization signal is underlined, and a consensus sequence EEVD at the C-terminus is indicated in italics. The numbers on the right are positions of the nucleotides and amino acids. The polyadenylation signal (AATAAA) is underlined.

Figure 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of walking catfish *HSC70-2*.

Three signatures of the heat shock protein 70 family are shown in boxes, a putative nuclear localization signal is underlined, and a consensus sequence EEVD at the C-terminus is indicated in italics. The numbers on the right are positions of the nucleotides and amino acids. The polyadenylation signal (AATAAA) is underlined.

Figure 3 Alignment of amino acid sequences of HSC70-1 and HSP70-2. Identical amino acids are marked with asterisk (*), highly related amino acids with a colon (:), and related amino acids with single dot (.). Numbers refer to the position in amino acid sequence.

Figure 4 Predicted gene structures of walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2*. White boxes represent exons, black boxes are 5'- and 3'untranslated regions, and lines represent introns. The sizes (base pairs) of each exon and intron are indicated. The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are also indicated.

Figure 5 Phylogenetic tree showing relationships of HSC70-1 and HSC70-2 deduced amino acid sequences of walking catfish and amino acid sequences of HSC70/HSC71 from other species. GenBank accession numbers are as follows: *Clarias macrocephalus* HSC70-1 (JX112294), *C. macrocephalus*

HSC70-2 (JX112295), *Cyprinus carpio* HSC70 (AAP51388), *Carassius auratus gibelio* HSC70 (AAO43731), *Danio rerio* HSC70 (CAA72216), *Ictalurus punctatus* HSC71 (P47773), *Pimephales promelas* HSC70 (AAS46619), *Megalobrama amblycephala* HSC70 (EU623471), *Salmo salar* HSC70 (BT059361), *Fundulus heteroclitus* HSC70 (DQ202278), *Paralichthys olivaceus* HSC71 (AB006814), *Xenopus laevis* HSC70 (AAH41201), *X. tropicalis* HSC71 (XM002937528), *Gallus gallus* HSC70 (NP_990334), and *Homo sapiens* HSC70 (NP_006588). The numbers at branches indicate bootstrap values after 1000 replications.

Figure 6 Relative expression of HSC70-1 and HSC70-2 in brain (A), gills (B), liver (C) and muscle (D) after bacterial challenge. Levels associated with histogram bars with the same letters do not differ significantly at $P<0.05$. Asterisks indicate significant differences in expression levels between HSC70-1 and HSC70-2 at the same time point.

AACTTCTCTAAAGTGCTCGAAGAATTTTGTAAACCATGTCTAAGGGACCAGCTGTTGGCATT 60
 M S K G P A V G [H] 9
 GATCTGGGGACCACATACTCCTGTGTTGGAGTCTTCCAGCATGGCAAAGTGGAATCATTT 120
 [D] L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I 29
 GCTAATGACCAAGGAACAGGACCACACCAAGCTACGTGGCCTTCACTGATAGCGAAAGG 180
 A N D Q G N R T T E S Y V A F T D S E R 49
 TTGATTTGGTGTATGCAGCCAAAGAACAGGTGGCCATGAACCCCAACACCAATCTTTGAT 240
 L I G D A A K N Q V A M N P T N T I F D 69
 GCCAAACGTCTGTATGGCAGAAGGTTTGAAGACTCCGTGGTTCACTGACATGAAACAT 300
 A K R L I G R R F E D S V V Q S D M K H 89
 TGGCCTTTCAAGGTCTATCAGTGTGGTGGACGTCCCAAAGTGGAGTTGAATATAAGCA 360
 W F F K V I S D G G R F K V E V E Y K A 109
 GAGACTAAGAACTTCTACCCGTGAGGAAATCTCCTCCATGCTGCTGGTGAAGATGAAGGAA 420
 E T K N F Y P E E I S S M V L V K M K E 129
 ATTGCTGAAGCCTATCTTGGAAAGACCGTCACCAATGCTGTGATCACAGTACCAGCTTAC 480
 I A E A Y L G K T V T N A V I T V P A Y 149
 TTCAATGACTCTCAGCGTCAAGCCACAAAGATGCTGGCACCCTCTCTGGTTTAAATGTC 540
 F N D S Q R Q A T K D A G T I S G L N V 169
 CTGCGAATTATTAAATGAGCCTACTGCTGCTGCTATTGCTATGGGTGGACAAGAAGGT 600
 L R I I N E P T A A A I A Y G L D K R V 189
 GGCTCTGAGAGAAATGTCTTATTTTCGATCTTGGCGGCGGCACCTTCGATGTGTCTATC 660
 G S E R N V L [I] F D L G G G T F D V S [I] 209
 CTGACCTTGGAGTGGTATCTTTGAGGTCAAATCCACTGCTGGTGACACTCACCTGGGT 720
 [H] T I E D G I F E V K S T A G D T H L G 229
 GGTGAAGACTTTCGACAACCGCATGGTGAACCAATTTTCATTGCTGAGTTCAAGCGCAAGTAC 780
 G E D F D N R M F Y P E I A E F K R K Y 249
 AAGAAGGACATCAGTGACAACAAGAGAGCTGTTTCGCGCTCTGGTACCGCTGCGAGCGA 840
 K K D I S D N K R A V R R L R T A C E R 269
 GCCAAGCGCACCTGTCTCCAGCACTCAGGCCAGTATTGAGATCGACTCCCTTTATGAG 900
 A K R T L S S S T Q A S I E I D S L Y E 289
 GGTGTCGATTCTACACCTCCATCACAAGAGCTCGTTTGGAGAGCTCAACGCTGACCTC 960
 G V D F Y T S I T R A R F E E L N A D L 309
 TCCGTGGAAACCTCGACCCCTGTTGAGAAATCTCTCCGTGATGCTAAATAGACAAATCT 1020
 F R G T L D P V E K S L R D A K L D K S 329
 CAGATCCATGACATTGCTGCTGGTGGTCTTACCCGCATCCCTAAGATCCAGAAGTCT 1080
 Q I H D [I] V L V G G S T R I E K I Q [K] L 349
 CTCCAAGATTTTAAATGGCAAGGAGCTCAATAAGAGCATCAACCCCTGATGAGGCTGTG 1140
 L Q D F N G K E L N K S I N P D E A V 369
 GCTTACGGAGCAGCTGTCCAGGCTGCCATCCTCTCTGGGGACAGTCTGAAATGTTTCA 1200
 A Y G A A V Q A A I L S G D K S E N V Q 389
 GACCTGCTGCTGCTGGATGTCTCCCTGTCTCTGGTATTGAACTGCTGGAGGTGTC 1260
 D L L L L D V T F L S L G I E T A G G V 409
 ATGACCGCTCTCATCAACGCAACACCTCCATTCCAAACCAAGCAGACCCAAACCTTCACC 1320
 M T A L I K R N T S I P T K Q T Q T F T 429
 ACCTACTCTGACAACAGCCTGGTGTGCTGATTCAGGTATATGAAGGTGAGCGTGCCATG 1380
 T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A M 449
 ACCAAGGACAACAACCTTTTGGGCAAAATTTGAGCTCACTGGAATTCCTCCTGCACCCGT 1440
 T K D N N L L G K F E L T G I P F A P R 469
 GGTGTCCTCAGATTGAGGTCACTTTGACATTGATGCCAATGGCATCCTTAATGTCTCT 1500
 G V P C Q I E V T F D I D A N G I L N V S 489
 GCTGTTGACAAGAGCACTGGCAAAGAGAATAAGATCAACATCACTAATGACAAAGGTCGT 1560
 A V D K S T G K E N K I T I T N D K G R 509
 TTGAGTAAGGAGACATTGAGCGCATGGTGCAGGAAGCTGAGAAATACAAAGCTGAGGAT 1620
 L S K E D I E R M V Q E A E K Y K A E D 529
 GATGTGCAGCGTGATAAGGTGTCTGCCAAGAATGGTCTGGAGTCTTATGCTTTCAACATG 1680
 D V Q R D K V S A K N G L E S Y A F N M 549
 AAGTCCACTGTAGAGGATGAGAAGCTAAAGGATAAAATCAGTGTAGGATAAGCAGACG 1740
 K S T V E D E K L K D K I S D E D K Q T 569
 ATTCTTGACAAGTGAATGAAGTAATCAGCTGGCTTGACAAGAACCAGACCCGAGAGAG 1800
 I L D K C N E V I S W L D K N Q T A E K 589
 GAAGATATGAGCATCAACATAAGGAGCTGGAGAAGGTCTGTAAACCAATCATCACCCAA 1860
 E E Y E H Q H K E L E K V C N P I I T K 609
 CTGTACCAGAGTGCTGGTGTATGTCAGGTGGTATGCTGATGGGATGCTGGTGGTTTC 1920
 L Y Q S A G D M P G G M P D G M P G G F 629
 CCAGGAGCCGGAGCTGCTCCCGGTGGCGGATCTTCTGGTCCCACCATCGAGGAGGTGAT 1980
 P G A G A P G G S S G P T I E E V D 649
 TAAGCCATTCTAAACCTGCTCTACCTCTCCAATGTTTACTGCCCTTTGTAGCAGAATTCC 2040
 *
 TGAGACCTATTAAATGTGTTGGGGCTTTAGATTTTTTCTGCTGCAGAGTGAATGCTTATT 2100
 TATAAATAAAAAAGGGGGGAGATTAAGGGGATCACTTCATCACAGGGAACAGTTTTATT 2160
 TATACCTTGAATGTTGCACAACTTCTCAATTATAGATGTTAAGCCTTTTGGCAATGCCTGG 2220
 TTTGCTTGAAGTAAATCTGAATAAGTGAACCTTTTCCCCCTCAAAAAAAAAAAAA 2278

Figure 1

Figure 2

```

CmHSC70-1  MSKGPAVGIDLGTTYS CVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDSERL 50
CmHSC70-2  MSKGPAVGIDLGTTYS CVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDSERL 50
*****

CmHSC70-1  IGDAAKNQVAMNPTNTIFDAKRLIGRRFEDSVVQSDMKHWPFPKVISDGGR 100
CmHSC70-2  IGDAAKNQVAMNPTNTIFDAKRLIGRRFEDSVVQSDMKHWPFPKVISDGGR 100
*****

CmHSC70-1  PKVEVEYKAETKNFYPEEISSMVLVKMKEIAEAYLGKTVTNNAVITVPAYF 150
CmHSC70-2  PKVEVEYKAETKNFYPEEISSMVLVKMKEIAEAYLGKTVTNNAVITVPAYF 150
*****

CmHSC70-1  NDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGSEENVLIIFDL 200
CmHSC70-2  NDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKGKKTERKLLIFDL 200
*****:***:*****

CmHSC70-1  GGGTFDVSIIITIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIAEFKRKYK 250
CmHSC70-2  GGGTFDVSIIITIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVTHFVEEFKRKHK 250
*****:*****:*****:***:*****:

CmHSC70-1  KDISDNKRAVRRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRA 300
CmHSC70-2  KDISQNKRALRRLRTACERAKRTLSSSSQASIEIDSLYEGTDFYTSITRA 300
*****:*****:*****:*****:*****:*****

CmHSC70-1  RFEELNADLFRGTLDPEKSLRDAKLDKSQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLL 350
CmHSC70-2  RFEELCSDLFRGTLDPEKALRDAKMDKSQIHEIVLVGGSTRIPKIQKLL 350
*****:*****:*****:*****:*****:*****

CmHSC70-1  QDFFNGKELNKSINPDEAVAYGA AVQAAILSGDKSENVQDLLLLLDVTPLS 400
CmHSC70-2  QDFFNGRELNKSINPDEAVAYGA AFQAAILSGDTSGNVQDLLLLLDVAPLS 400
*****:*****:*****:*****:*****:*****

CmHSC70-1  LGIETAGGVMTALIKRNTSIPTKQTQFTTYSNQPGLVLIQVYEGGERAMT 450
CmHSC70-2  LGIETAGGVMTPLIKRNTTIPTKQTQTFSTYADNLPGLVLIQVYEGGERAMT 450
*****:*****:*****:***:*****

CmHSC70-1  KDNLLGKFELTGIPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSAVDKSTGKENK 500
CmHSC70-2  KDNLLGKFDLTGIPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVYEGDKSTGKENK 500
*****:*****:*****

CmHSC70-1  ITITNDKGRLSKEDIERMVQEA EKYKAEDDVQORDKVS AKNGLESYAFNMK 550
CmHSC70-2  ITITNDKGNLSKEDIERMVQEA EKYKAEDDVQORDKVS AKNGLESYAFNMK 550
*****:*****

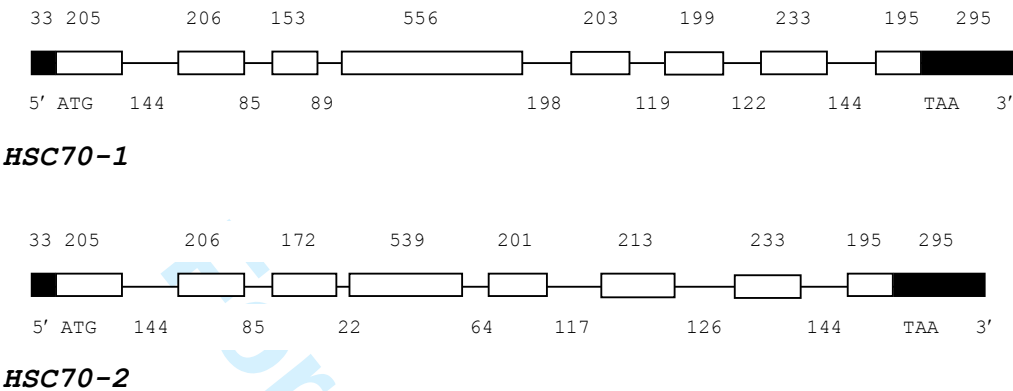
CmHSC70-1  STVEDEKLKDKISDEDKQITILDKCNEVISWLDKNQTAEKEEYEHQHKELE 600
CmHSC70-2  STVEDEKLKDKISDEDKQKILDKCNEVISWLDKNQTAEKEEYEHQHKELE 600
*****:*****

CmHSC70-1  KVCNPIITKLYQSAGDMPGMPDGMPPGGFPGAGAAPGGGSSGPTIEEVD 649
CmHSC70-2  KVCNPIITKLYQSAGGMPGMPDGMPPGGFPGAGAAPGGGSSGPTIEEVD 649
*****:*****

```

Figure 3

Figure 4



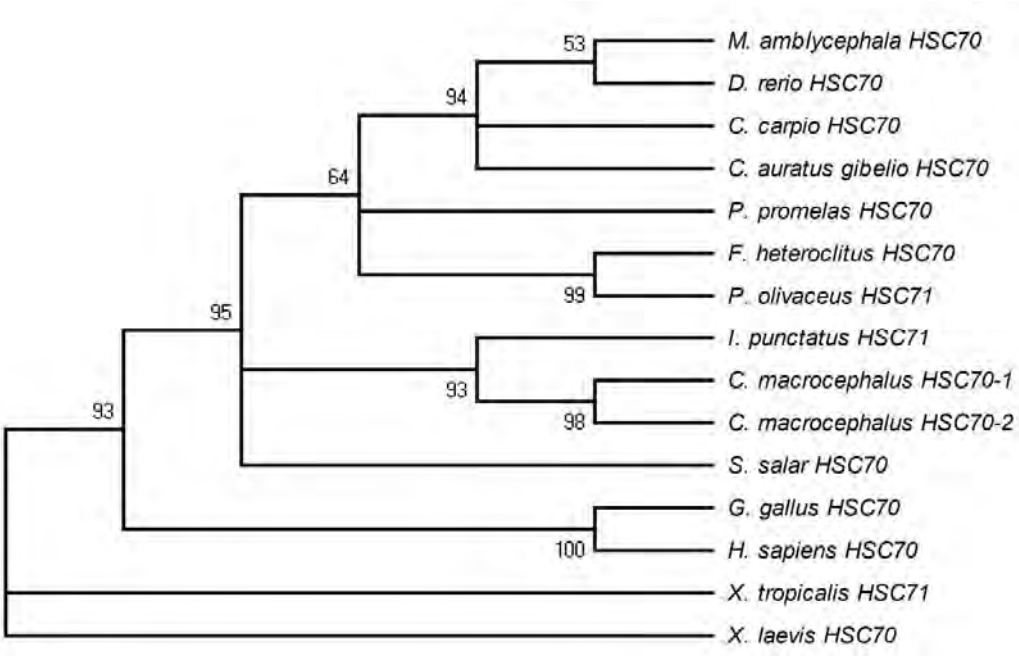


Figure 5

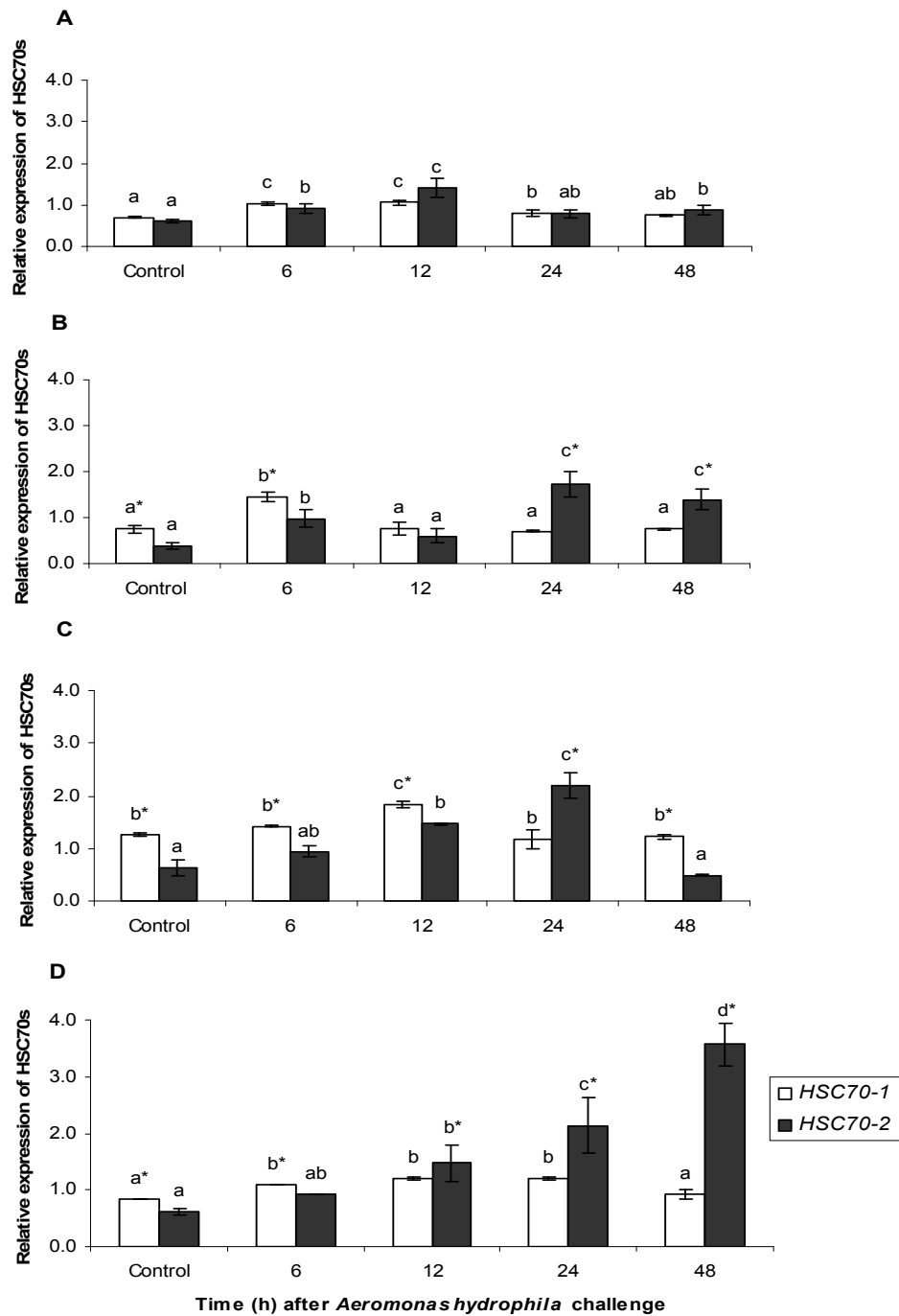


Figure 6

1 **Molecular cloning and expression analysis of the myostatin (MSTN) from**
2 **walking catfish (*Clarias macrocephalus*, Günther 1864)**

3

4 Poonmanee Kanjanaworakul^{1,2}, Supawadee Poompuang^{3*}, Prapansak Srisapoome³

5

6

7 ¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakorn Pathom, 73140,
8 Thailand

9 ² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE),
10 Bangkok 10900, Thailand

11 ³Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok
12 10900, Thailand

13

14

15 *Correspondence: Supawadee Poompuang, Department of Aquaculture, Faculty of
16 Fisheries, Kasetsart University, 50 Paholyothin Road, Bangkok 10900, Thailand.

17 E-mail: supawadee.p@ku.ac.th

18 Phone: 66-2-579-2924

19 Fax: 66-2-561-3984

20

ABSTRACT

The complete cDNA sequence of walking catfish myostatin (*MSTN*) (1,784 bp) contained 147 bases of 5'-untranslated region, an open reading frame of 1,191 bp encoding 396 amino acids, 446 bases of 3'-untranslated region, and a poly(A) tail of 27 nucleotides. The deduced amino acid sequence of walking catfish *MSTN* shared 94%, 78%, 75%, and 60% identity with *MSTNs* of channel catfish, common carp, rainbow trout and higher vertebrates, including avians and mammals, respectively. Results indicated that nucleotide and amino acid sequence of fish were more variable than those in higher vertebrates. Unlike terrestrial animals in which *MSTN* transcripts were expressed only in skeletal muscle, walking catfish *MSTN* mRNA was detected in other tissues, including brain, gills, stomach and skin. Temporal expression of *MSTN* was determined in whole fish during one to three weeks post hatch and in skeletal muscle of fish at one to six months. The *MSTN* mRNA showed highest levels of expression at 3 weeks and the expression was lowest in 3-month old fish. The *MSTN* expression profile of *MSTN* gene reflected specific growth rate of walking catfish which was lowest during larval stage and highest during 3 to 6 months.

Keywords: *Clarias macrocephalus*; Myostatin; cDNA cloning; muscle growth; gene expression

INTRODUCTION

Myostatin (MSTN) is a member of the Transforming Growth Factor- β (TGF- β) family that plays an essential role in regulating skeletal muscle growth (McPherron and Lee, 1997). The gene was first discovered in mice. During embryogenesis of mouse, myostatin was found to express in the myotome compartment of developing somites. Myostatin continues to express throughout development and in adult animals. Adult mice that lack the gene were 25-30% heavier than the wild-type (McPherron and Lee 1997; McPherron et al. 1997). Myostatin also was found to express in developing and adult skeletal muscle in other higher vertebrates, including human, cattle, pig, chicken, and goat. The naturally occurred mutation of *MSTN* gene in cattle leads to hyperplasia and hypertrophy of skeletal muscle known as double muscling phenotype, resulting in 40% increase of body weight (Kambadur et al. 1997; McPherron et al. 1997; Grobet et al. 1997). The *MSTN* gene is highly conserved among terrestrial vertebrates. In particular, the predicted proteins of these species are identical in the carboxy-terminal region of mature protein (Kambadur et al. 1997; McPherron et al. 1997; Boman et al. 2009). Because of its relevant role in muscle growth regulation, myostatin is an important candidate locus for improvement of animal production (De-Santis & Jerry 2007).

After the discovery of myostatin function in mice and other vertebrates, the *MSTN* genes have been cloned from several fish species, including zebrafish (Biga et al. 2005), orange-spotted grouper (Ko et al. 2007), channel catfish (Kocabas et al. 2002), gilthead seabream (Maccatrozzo et al. 2002), rainbow trout (Garikipati et al. 2007), Atlantic salmon (Ostbye et al. 2007), tilapia (Rodgers et al. 2001), and white bass (Rodgers et al. 2001). *MSTN* is a highly conserved protein of 373–376 amino acids. Unlike terrestrial vertebrates, the *MSTN* transcripts were detected in other

tissues, including eyes, brain, intestine, kidney, gill, heart, ovaries, spleen and testis. The expression of myostatin in these tissues suggests that myostatin of fish may have multiple functions.

In the present study, we cloned cDNA of the myostatin locus from walking catfish (*Clarias macrocephalus*), an important freshwater species in Thailand. Walking catfish commands high retail prices due to its high meat quality. However, culture of walking catfish is diminishing due to its slow growth rate and susceptibility to diseases. Since the mid-1990s, hybrid catfish (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) has replaced most of walking catfish production. Hybrid catfish grow faster and are more resistant to disease. Selection for growth in walking catfish in the past resulted in slight or no improvement (Na-Nakorn et al. 1993). Molecular characterization and expression analysis of the myostatin locus from walking catfish would be useful for understanding muscle growth and development. Myostatin may prove useful as candidate growth gene for this species.

MATERIALS AND METHODS

Experimental fish

The fish used in this study were produced from a full-sib family in June 2010 and were obtained from the hatchery of Department of Aquaculture, Kasetsart University. Larvae were reared in concrete tanks (2 x 3 x 1 m) at stocking density of 3,000/m² for two months (length = 5-7±1.4 cm). Thereafter, juveniles were reared in a 1000 L fiberglass tank at stocking density of 60/m² and reared until 6 months. They were fed commercial catfish pellet with 25% protein (2% body weight) twice daily at 0700 and 1600 hours. Larvae were sampled at 1, 2, 3 and 4 weeks post hatch for measurement of length and body weight and samples of whole fish were kept in

TRIZol reagent (Invitrogen™ life technologies) for total RNA extraction. From one month to six months, fish were sampled every month for measurement and collection of skeletal muscle for total RNA extraction.

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

All primers used in this experiment are listed in Table 1. Degenerate primers were designed from conserved sequences of MSTN from *Ictalurus punctatus* (AY540992.1), *Ameiurus catus* (AY540994.1), *Pseudobagrus fulvidraco* (DQ767966.1), *Megalobrama pellegrini* (GU553284.1), *Gobiocypris rarus* (FJ482232.1), *Labeo rohita* (GQ332409.1), *Procypris rabaudi* (GU553283.1), *Cyprinus carpio* (GQ214769.1), *Ctenopharyngodon idella* (EU555520.1) and *Pimephales promelas* (EU714297.1). Multiple sequence alignment of MSTN was performed using Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). The program FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.html>) was used for design of primers.

Total RNA was extracted from skeletal muscle of a 2-year old fish (220 g in weight) using Trizol reagent (Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions. Approximately 1 µg of total RNA was used for first-strand cDNA synthesis using RevertAid™ cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed using degenerated primers listed in Table 1. PCR was carried out in a 25 µl reaction mixture containing 1x *Taq* buffer, 0.75 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each forward and reverse primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) and 0.5 µl of first-strand cDNA. The PCR was performed under the following conditions: 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min and 72°C for 1 min. The last extension at 72°C was extended for 10 min. Ten µl of each PCR product was

subjected to electrophoresis through a 1% agarose gel in 1x TBE buffer at 100 volts. A 100-bp DNA ladder was used to estimate molecular weight. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml). The PCR products were gel-purified using the GeneJET™ Gel Extraction kit (Fermentas, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA fragment was ligated into pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) and transformed into *E. coli* strain DH10B and incubated at 37°C. The positive clones were selected and colony PCR was performed using degenerate primers and condition as previously described. Positive clones were grown overnight in LB-ampicillin broth. Plasmid extraction was performed using GeneJET™ Plasmid Miniprep kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Three µl of extracted plasmid DNA was sequenced using the Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The universal primer T7 was used for nucleotide sequencing of the inserts. The cDNA sequences were searched for homology using the BLAST programs (NCBI, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Altschul et al., 1997) and were used to design gene-specific primers for the rapid amplification of cDNA ends (RACE) of MSTN.

Total RNA was extracted from skeletal muscle of a 2-year old fish as previously described. The extracted RNA was purified using a QuickPrep mRNA Purification Kit (GE Healthcare). The RACE technique was utilized to clone full-length cDNAs in the 5' and 3' ends using a SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. Approximately 1 µg of mRNA was used for first-strand cDNA synthesis. For the 5'-RACE-ready cDNA, 1 µg of mRNA, 1 µl of BD Smart II A oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') and 1 µl of 5'-CDS primer

142 (5'-(T)₂₅VN-3', N = A, C, G or T; V = A, G or C) were used to generate the
 143 nucleotide sequences at the 5'end. In the other tube, the 3'-RACE-ready cDNA, 1 µg
 144 of mRNA and 1 µl of 3'-CDS primer
 145 (5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀VN-3', N = A, C, G or T; V = A,
 146 G or C) were used to generate the nucleotide sequences at the 3'end. After first-strand
 147 cDNA synthesis, the 5' and 3'-RACE-ready cDNAs were used as templates to
 148 generate the nucleotide sequences at the 5' and 3' ends, respectively. For RACE PCR
 149 reactions, a 25-µl PCR reaction mixture consisted of 1.25 µl of 5' or 3'-RACE-ready
 150 cDNA, 2.5 µl of 10x LA PCR buffer, 2.5µl of MgCl₂, 1 µl of 10mM dNTP Mix, 0.25
 151 µl of LA *Taq* polymerase, 2.5 µl of 10x Universal Primer Mix (UPM), 5'
 152 CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3' and 1
 153 µl of 10 µM gene-specific primer (GSP).

154 The 5'-RACE was carried out using reverse primers, 5'RACE_MSTN and
 155 Universal Primer Mix (UPM) under the following touchdown conditions: 94°C for 30
 156 s and 72°C for 3 min for 5 cycles, 94°C for 30 s, 70°C for 30 s and 72°C for 3 min for
 157 5 cycles, and 94°C for 30 s, 68°C for 30 s, and 72°C for 3 min for 25 cycles. The 3'-
 158 RACE was carried out using forward primers, 3'RACE_MSTN and UPM under the
 159 same conditions as the 5'-RACE amplification.

160 The RACE products were gel-purified using the Wizard[®] SV Gel and PCR
 161 Clean-Up System kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's
 162 instructions. The DNA fragment was ligated into vector using pGEM[®]-T Easy Vector
 163 (Promega, Madison, WI, USA). The positive clones were selected for extraction of
 164 the plasmid using the Aurum[™] Plasmid Mini kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
 165 according to the manufacturer's instructions. Three µl of extracted plasmid DNA was

sequenced using the Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The M13 forward and reverse primers were used for sequencing the 5' and 3' ends of the cDNA. The cDNA sequences were searched for homology using the BLAST programs (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1997).

Sequence alignment and phylogenetic analysis

The 5' and 3' UTR sequences of the full-length MSTN cDNA were removed using Genetyx version 7.0. The Clustal W program (Thompson et al., 1994) was used for multiple sequence alignment of amino acids from MSTN of *Ameiurus catus* (AY540994.1), *Anser anser* (AY448009.1), *Bos Taurus* (AF019620.1), *Canis familiaris* (AY367768.1), *Capra hircus* (GU377303.1), *Chlamys farreri* (DQ988329.3), *Columba livia* (AF440863.1), *Coturnix coturnix* (AF407340.1), *Cyprinus carpio* (GQ214769.1), *Danio rerio* MSTN-1 (AF019626.1), *Danio rerio* MSTN-2 (AY687474.1), *Epinephelus coioides* (AY856860.1), *Equus caballus* (AB033541.1), *Gallus gallus* (AY448007.1), *Homo sapiens* (AF019627.1), *Ictalurus furcatus* (AY540992.1), *Ictalurus punctatus* (AF396747.1), *Macaca fascicularis* (AY055750.1), *Megalobrama amblycephala* (JQ065336.1), *Meleagris gallopavo* (AF019625.1), *Morone Americana* (AF290911.1), *Morone chrysops* (AF197194.1), *Morone saxatilis* (AF290910.1), *Mus musculus* (BC105674.1), *Oncorhynchus clarkii* MSTN-2a (JN990758.1), *Oncorhynchus mykiss* MSTN-1 (AF273035.1), *Oncorhynchus mykiss* MSTN-2 (AF273036.1), *Oncorhynchus nerka* MSTN-2a (JN990761.1), *Papio hamadryas* (AF019619.1), *Pseudobagrus fulvidraco* (DQ767966.1), *Rattus norvegicus* (AF019624.1), *Salmo salar* MSTN-1a (AJ344158.3), *Salmo salar* MSTN-1b (AJ297267.3), *Salmo salar* MSTN-2a

(JN990763.1), *Salvelinus fontinalis* (AF247650.2), *Sparus aurata* (AF258448.1),
Takifugu rubripes (AY445322.1), *Thymallus arcticus* *MSTN-2a* (JN990765.1),
Thymallus thymallus *MSTN-2a* (JN990766.1), *Tilapia mossambica* (AF197193.3) and
Umbrina cirrosa (AF316881.1), which were used to construct the *MSTN* phylogenetic
tree by the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) and bootstrapped for 1000
replicates using the MEGA version 5.1 (Kumar et al. 2001). The TGF- β 1 sequences
from zebrafish (NM_182873.1) and rat (NM_021578.2) were used as out-groups.

Tissue expression by RT-PCR

Tissues were collected from different tissues of adult walking catfish (gills, heart,
intestine, kidney, liver, ovary, skeletal muscle, skin, spleen and testis). Total RNA
was extracted from these tissues using TRIzol reagent (InvitrogenTM life
technologies). First strand cDNA was synthesized using RevertAidTM First Strand
cDNA Synthesis kit (Fermentas). PCR amplifications were performed using the
primers listed in Table 1. The level of expression of β -actin was used as an internal
control. Primers for the β -actin gene was based on information obtained from channel
catfish *Ictalurus punctatus* (AY555575). PCR was carried out in a 25- μ l reaction
mixture containing 1x *Taq* buffer, 0.75 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 μ M of
each forward and reverse primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) and 0.5 μ l of
first-strand cDNA. The PCR was performed under the following conditions: pre-
denaturation at 96°C for 3 min, and 26 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec,
annealing at 58°C for 30 sec and 72°C for 1 min. The last extension at 72°C was
extended for 5 min. Ten μ l of each PCR product was subjected to electrophoresis
through a 1.5% agarose gel in 1x TBE buffer at 100 volts. A 100-bp DNA ladder was

used to estimate molecular weight. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml) and amplification products were observed under UV light.

Temporal expression of MSTN by semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was whole fish of 1-4 week old larvae and from skeletal muscle of five fish sampled every month for six months using the TRIzol reagent (Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis was carried out using a RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Approximately 1µg of total RNA was incubated with 1 µl of oligo(dT)₁₈ at 70°C for 5 min. Four µl of 5x reaction buffer, 1 µl of RiboLock™ Ribonuclease inhibitor and 2 µl of 10 mM dNTP mix was added and the reaction was incubated at 37°C for 5 min. One micro-liter of RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase was added and the mixture was incubated at 42°C for 60 min, followed by 70°C for 10 min.

PCR reactions were performed using gene-specific primers, RTMSTN_F and RTMSTN_R (Table 1). PCR amplification was carried out in a 25-µl reaction volume containing 0.5 µl of cDNA first-strand template, 0.2 mM of each dNTPs, 1x *Taq* buffer, 1 U of *Taq* DNA polymerase, 1 µM of forward primer, and 1 µM of reverse primer. PCR profiles for 26 cycles were as follows: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 58°C for 30 sec and extension at 72°C for 1 min. The level of expression of β-actin was used as an internal control. The PCR products were separated and visualized on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide (0.5 mg/ml). The density of bands was measured by FluorChem™ 8000 Advanced Fluorescence, Chemiluminescence and Visible Light Imaging (Alpha Innotech Corporation) which corresponded to pixel density values (Integrated Density Value, or IDV). Expression

of the *MSTN* gene was measured as pixel density values. The pixel density value of each product was used to calculate the ratio of the selected gene's expression relative to β -actin expression. The expression of β -actin was normalized to 100.

Statistical analysis

Data on relative expression levels were presented as means $\pm$ S.E. Statistical differences in gene expression levels between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using R program (R Development core team, 2008), and followed by Duncan's multiple range tests for comparisons of means by month. All significance levels were set at $P < 0.05$.

RESULTS and DISCUSSION

The complete cDNA sequence for walking catfish *MSTN* (GenBank accession number JX456396) is shown in Fig. 1, together with the deduced amino acid sequence. The 1,784 bp sequence contained 147 bases of 5'-untranslated region, the open reading frame of 1,191 bp encoding a 396 amino acid protein, 446 bases of 3'-untranslated region and a poly(A) tail of approximately 27 nucleotides. The 3'-untranslated region included the termination signal (TGA).

The *MSTN*'s conserved RXXR proteolytic processing site and nine cysteine residues were present. Mutations in the C-terminal part of mature peptide lead to the loss function of *MSTN*. For instance, a substitution of tyrosine for cysteine resulted in a double muscled phenotype of the Belgian Blue cattle breed (Kambadur et al. 1997). The carboxy terminal region of *MSTN* was highly conserved among teleost species, with 241 identical amino acids. The conservation of this region was highest between catfishes (Order Siluriformes), with 356 amino acids (Fig 2). The amino acid

sequence of walking catfish was 396 residues, while those for white catfish, yellow catfish, blue catfish and channel catfish were 393, 393, 390, and 389 residues respectively. The variation of amino acid in catfishes was due to the different number of CAG, a codon encoded for glutamine (Gregory et al. 2004; Pan et al. 2007). This characteristic also was observed in gilthead seabream (Maccatrozzo et al. 2001), but not in higher vertebrates.

The deduced amino acid sequence of walking catfish *MSTN* shared 94%, 78%, 75%, and 60% identity with *MSTNs* of channel catfish, common carp, rainbow trout and higher vertebrates, including avians and mammals, respectively (Table 2). Results indicated that nucleotide and amino acid sequence of fish were more variable than those in higher vertebrates.

Phylogenetic analysis was performed based on 42 amino acid sequences of *MSTN*. A phylogenetic tree showed two distinct groups for fishes and terrestrial vertebrates (Fig 3). Among teleosts, the *MSTN* sequence of walking catfish was clustered with sequences of yellow catfish, blue catfish, channel catfish, and white catfish which would be expected given their membership in Order Siluriformes. A second group of teleost sequences comprised members of Family Cyprinidae, including common carp and zebrafish, sequences from salmonids, and sequences from seabream, sea bass, and tilapia. The two clusters joined the sequence from Atlantic salmon. The second major group consisted of sequences from higher vertebrates, including mammals and avians.

Tissue expression analyses of particular proteins are used to confirm that genes of interest are expressed in appropriate tissues and to determine their expression in tissues of other systems in fish body. In terrestrial vertebrates, the expression of *MSTN* is restricted to skeletal muscle (De-Santis and Jerry 2007). The role of *MSTN*

in regulating muscle growth and development is well understood. However, in walking catfish, expression of *MSTN* was expressed in various tissues, including brain, gills, heart, skeletal muscle, skin, stomach, and intestine. The *MSTN* mRNA levels varied among tissues, with highest in the skeletal muscle, intermediate in brain and skin. This suggested that *MSTN* may involve in other physiological processes in fish. Differential expression of *MSTN* in tissues of walking catfish was similar to those reported in other teleosts (Kocabas et al. 2002; Maccatrozzo et al., 2001; Rodger et al. 2001). In rainbow trout, two *MSTN* orthologs were identified (Rescan et al. 2001). While the *rtMSTN-2b* was expressed in all tissues, the *rtMSTN-2a* was exclusively expressed in the brain.

From larval, juvenile to adult stages, the expression of *MSTN* was highest at 3-week post hatch and remained unchanged at 1-month old (Fig. 4). However, the levels of *MSTN* transcripts decreased dramatically at 2 month and remained low until fish were 6 month old. In walking catfish, from larval stage to fingerlings, the growth rate is slow. Fish grow faster during juvenile stage at 3-6 month old. In channel catfish, *MSTN* expression was detected in 1-day-old embryo and gradually increased and was highest in 2 weeks post fertilization (Kocabas et al. 2002). In older channel catfish, expression was high at 3 years of age and dropped three to five fold at 4-7 years. Expression of *MSTN* during growth and development in fish differed across species. For instance, zebrafish was found to express two *MSTN* isoforms, *zfMSTN-1* and *zfMSTN-2*, encoding 374 and 366 amino acids respectively (Helterline et al. 2007). While the *zfMSTN-2* was highly expressed during early somitogenesis (11 hours post fertilization), the expression of *zfMSTN-1* was strong during late somitogenesis (15-19 hours post fertilization). In adult zebrafish, higher levels of the *zfMSTN-1* transcripts were detected in all tissues except eye and gall bladder

(Helterline et al. 2007). In other studies, the *MSTN* expression of tilapia and gilthead seabream was detected in post hatched larvae but undetectable in embryos (Maccatrozzo et al. 2001; Rodger et al., 2001). In Japanese flounder, *MSTN* was detected in unfertilized eggs and the transcript levels remained constant through the neurula stage and the expression increased steadily to the heart-beating stage and continued until hatching (Zhong et al. 2008). Similar expression of *MSTN* was also observed in the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*) (Delgado et al. 2008).

In conclusion, we cloned and characterized *MSTN* cDNA encoding 396 amino in walking catfish. Deduced amino acid sequence of *MSTN* in walking catfish was similar to those of homologous genes from other species. In contrast to land vertebrates, *MSTN* of walking catfish was expressed in other tissues, including brain, gills, stomach and skin. However, the functional significance of *MSTN* in these tissues was not known. The expression of *MSTN* was highest in 3-week old larva and lowest in 3-month old fish. The expression profile of *MSTN* was in agreement with muscle growth and development of walking catfish. However, further research in needed to elucidate the gene structure and evolution of *MSTN* in the walking catfish genome.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE) and the Thailand Research Fund (Grant # RMU5180015).

REFERENCES

Biga P.R., Roberts S.B., Lliev D.B., McCauley L.A.R., Moon J.S., Collodi P. & Goetz F.W. (2005) The isolation, characterization, and expression of a novel

- 340 GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*.
 341 *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry*
 342 *and Molecular Biology* **141**, 218-230.
- 343
 344 Boman I.A., Klemetsdal G., Blichfeldt T., Nafstad O. & Våge D.I. (2009) A
 345 frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (MSTN)
 346 affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis*
 347 *aries*). *Animal Genetics* **40**, 418-422.
- 348
 349 Delgado I., Fuentes E., Escobar S., Navarro C., Corbeaux T., Reyes A.E., Vera M.I.,
 350 Álvarez M. & Molina A. (2008) Temporal and spatial expression pattern of the
 351 myostatin gene during larval and juvenile stages of the Chilean flounder
 352 (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B:*
 353 *Biochemistry and Molecular Biology* **151**, 197-202.
- 354
 355 De Santis C. & Jerry D.R. (2011) Differential tissue-regulation of myostatin genes in
 356 the teleost fish *Lates calcarifer* in response to fasting. Evidence for functional
 357 differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **335**, 158-165.
- Garikipati D.K., Gahr S.A., Roalson E.H. & Rodgers B.D. (2007) Characterization of
 rainbow trout myostatin-2 genes (*rtMSTN-2a* and *-2b*): genomic organization,
 differential expression, and pseudogenization. *Endocrinology* **148**, 2106–2115.
- Gregory D.J., Waldbieser G.C. & Bosworth B.G. (2004) Cloning and characterization
 of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species. *Animal Genetics* **35**,
 425-430.
- 358
 359 Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein
 360 A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R. Hanset R. & Georges M.
 361 (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled
 362 phenotype in cattle. *Nature Genetics* **17**, 71-74.
- 363
 364 Helterline D.L., Garikipati D., Stenkamp D.L. & Rodgers B.D. (2007) Embryonic and
 365 tissue-specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish.
 366 *Genetics & Comparative Endocrinology* **151**, 90-97.
- 367
 368 Kambadur R., Sharma M., Smith T.P. & Bass J.J. (1997) Mutations in myostatin
 369 (GDF 8) in double-muscled Belgian blue and Piedmontese cattle. *Genome*
 370 *Research* **7**, 910-916.
- 371
 372 Ko C.F., Chiou T.T., Chen T.T., Wu J.L., Chen J.C. & Lu J.K. (2006) Molecular
 373 cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and
 374 developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper
 375 *Epinephelus coioides*. *Marine Biotechnology* **9**, 20-32.
- 376
 377 Kocabas A.M., Kuseyin H., Dunham R.A. & Liu Z. (2002) Molecular characterization
 378 and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1575**, 99–107.

- Kumar S., Tamura K. & Nei M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Maccatrozzo L., Bargelloni L., Radaelli G., Mascarello F. & Patarnello T. (2001) Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Marine Biotechnology* **3**, 224-230.
- McPherron A.C. & Lee S.J. (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12457-12461.
- McPherron A.C., Lawler A.M. & Lee S.J. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* **387**, 83-90.
- Na-Nakorn U., Rangsin W. and Witchasunkul S. (1993) Suitable conditions for induction of gynogenesis in the catfish, *Clarias macrocephalus*, using sperm of *Pangasius sutchi*. *Aquaculture* **118**, 53-62.
- Ostbye T.K., Galloway T.F., Nielsen C., Gabestad I., Bardal T. & Andersen O. (2001) The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European Journal of Biochemistry* **268**, 5249-5257.
- Pan J., Wang X., Song W., Chen J., Li C. & Zhao Q. (2007) Molecular cloning and expression pattern of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *DNA Sequence* **18**, 279-287.
- Rescan P.Y., Jutel I. & Ralliere C. (2001) Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* **204**, 3523-3529.
- Rodgers B.D., Weber G.M., Sullivan C.V. & Levine M.A. (2001) Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* **142**, 1412-1418.
- Saitou, N. & Nei M. (1987) The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* **4**, 406-425.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Zhong Q., Zhang Q., Chen Y., Sun Y., Qi J., Wang Z., Li S., Li C. & Lan X. (2008) The isolation and characterization of myostatin gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): Ubiquitous tissue expression and developmental specific regulation. *Aquaculture* **280**, 247-255.

Table 1 List of gene-specific primers, nucleotide sequences and positions of primers used in this study

Primer	Primer sequence (5' to 3')	Position*	Objective
MSTN1_F	TGCAGATATCGCGACTCATGC	578-598	cDNA cloning
MSTN1_R	CTTGCCGTAGATGATCTGCTC	1132-1152	cDNA cloning
3'RACE_MSTN	CTGGTGAAGAGGGACTGCTTCCATTCTTGG	1-17	cDNA cloning
5'RACE_MSTN	GCACATAGTCACACACTCGCCCGAGCAGTAGT	411-431	cDNA cloning
MSTN2_F	ATCATGCATTTGGCGCAGGT	983-1012	5'RACE
MSTN2_R	GCCATGCTCATGACGGTCTC	794-823	3'RACE
RTMSTN_F	CAACGATCTGGCTATCACTTCTGC	765-789	Semi-quantitative RT-PCR
RTMSTN_R	CGAGCAGTAGTTAGCTTTGTAGCG	969-993	Semi-quantitative RT-PCR
Ip β -actin-F**	AGAGAGAAATTGTCCGTGACATC		Semi-quantitative RT-PCR
Ip β -actin-R**	CTCCGATCCAGACAGAGTATTTG		Semi-quantitative RT-PCR

*Nucleotide positions are based on walking catfish sequence submitted to GenBank (Accession number JX456396 for *MSTN*).

**Primers for β -actin are based on GenBank sequence (Accession number AY555575).

Table 2 Identity and similarity of nucleotide and amino acid sequences of walking catfish *MSTN* with other teleosts and higher vertebrates.

Species	Accession Number	Identity (%)		Similarity of amino acids (%)
		Nucleotides	Amino acids	
Teleost fishes				
<i>Ameiurus catus</i>	AY540994.1	90.3	94.5	96.2
<i>Ictalurus furcatus</i>	AY540992.1	89.2	92.5	95.5
<i>Ictalurus punctatus</i>	AF396747.1	81.8	93.7	95.7
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	DQ767966.1	88.6	93.2	96.2
<i>Cyprinus carpio</i>	GQ214769.1	73.5	78.3	85.6
<i>Danio rerio MSTN-1</i>	AF019626.1	72.0	77.3	83.6
<i>Danio rerio MSTN-2</i>	AY687474.1	63.3	59.8	73.2
<i>Epinephelus coioides</i>	AY856860.1	71.9	74.1	83.6
<i>Megalobrama amblycephala</i>	JQ065336.1	62.8	60.1	74.0
<i>Morone americana</i>	AF290911.1	72.0	73.1	83.8
<i>Morone chrysops</i>	AF197194.1	71.8	71.9	83.1
<i>Morone saxatilis</i>	AF290910.1	71.9	73.1	83.8
<i>Oncorhynchus clarkii</i> (MSTN-2a)	JN990758.1	60.7	59.8	73.0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (MSTN-1)	AF273035.1	71.1	75.8	81.8
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (MSTN-2)	AF273036.1	72.1	75.5	82.7
<i>Oncorhynchus nerka</i> (MSTN-2a)	JN990761.1	63.2	60.1	73.2
<i>Salmo salar</i> (MSTN-1a)	AJ344158.3	71.9	75.3	81.8
<i>Salmo salar</i> (MSTN-1b)	AJ297267.3	72.1	74.5	82.8
<i>Salmo salar</i> (MSTN-2a)	JN990763.1	52.3	46.2	60.4
<i>Salvelinus fontinalis</i>	AF247650.2	71.7	74.5	82.8
<i>Sparus aurata</i>	AF258448.1	73.6	74.0	84.3
<i>Takifugu rubripes</i> (MSTN-1)	AY445322.1	71.1	69.4	79.3
<i>Takifugu rubripes</i> (MSTN-2)	AY445321.1	63.4	61.8	74.2
<i>Thymallus thymallus</i> (MSTN-2a)	JN990766.1	63.0	59.4	74.0
<i>Tilapia mossambica</i>	AF197193.3	67.0	72.0	83.1
<i>Umbrina cirrosa</i>	AF316881.1	71.9	72.9	83.1
Avians				
<i>Anser anser</i>	AY448009.1	61.1	60.8	76.5
<i>Columba livia</i>	AF440863.1	61.7	60.5	77.0
<i>Coturnix coturnix</i>	AF407340.1	61.1	60.5	76.5
<i>Gallus gallus</i>	AY448007.1	62.7	60.4	76.3
<i>Meleagris gallopavo</i>	AF019625.1	61.1	59.7	75.3
Mammals				
<i>Bos taurus</i>	AF019620.1	60.6	58.9	73.8
<i>Canis familiaris</i>	AY367768.1	62.3	60.9	77.5
<i>Capra hircus</i>	GU377303.1	59.8	58.4	75.8
<i>Equus caballus</i>	AB033541.1	60.7	60.2	77.3
<i>Homo sapiens</i>	AF019627.1	60.1	60.7	77.8
<i>Macaca fascicularis</i>	AY055750.1	59.9	60.4	77.5
<i>Mus musculus</i>	BC105674.1	61.1	59.3	76.5
<i>Papio hamadryas</i>	AF019619.1	59.9	60.2	77.5
<i>Rattus norvegicus</i>	AF019624.1	61.8	59.3	76.3

Captions for figures

Figure 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of walking catfish *MSTN*. ATG and TGA are start and stop codons. C represents the conserved amino acid cysteine. NSS and RXXR represent N-glycosylation and proteolytic processing sites respectively. The numbers on the left and right are positions of the nucleotides and amino acids.

Figure 2 Multiple alignment of amino acid sequences of *MSTNs*. Identical amino acids are marked with asterisk (*), highly related amino acids with a colon (:), and related amino acids with single dot (.). Numbers refer to the position in amino acid sequence.

Figure 3 Phylogenetic tree showing relationships of *MSTN* deduced amino acid sequence of walking catfish and amino acid sequences of *MSTN* from other species.

Figure 4 Relative expression levels of walking catfish *MSTN* at various stages. Levels associated with histogram bars with the same letters do not differ significantly at $P < 0.05$.

10 ACATGGGATCAACGCAGAGTACATGGGGATGCCGTCTGCCGTACCTGTCCGGTGTGCATGGCGCACGGTGTATTGTTACTGCTGCCAC 90
 91 ACAGAGACGCACCAAGTTCTCCGCACTCACTCACGCGCCGCTCTGACCGCGCTCATCATGCATTGCGCAGGTTCTCATCCCCTGGGT 180
 1 M H L A Q V L I P L G 11
 181 TTCGTGGTGGCTTTTCGGCCCGATGGCGCACACTGACACCGGAGCACCGGAGCACAGCAGCAGCAACACCCGCAACACCCGCAACAG 270
 12 F V V A F G P M A H T D T G A P E H Q Q Q Q Q H P Q H P Q Q 41
 271 CAGCAACCCACCGCCGTGACCGAGGAGGCGCAGTGTTCGCCGCCAGCGTGTGCGCGTTCCGCCAGCACAGCAAGCAGCTCCGTCTGCAG 360
 42 Q Q P T A V T E E A Q C S A A S V C A F R Q H S K Q L R L Q 71
 361 GCCATCAAGTCTCAGATCTGAGCAAGCTGCGCCTGAAAGCACGCGCCCAACGTGAGCCGAGACGTGGTCAAGCAGCTGCTGCCGAAAGCG 450
 72 A I K S Q I L S K L R L K H A P N V S R D V V K Q L L P K A 101
 451 CCGCCCGTGCAGCAGCTGCTCGACCACTACGACGTGCTCGGGGACGACGGCAAGCCGGGACCGCGCTCCCGGACGACGAGGAGGACGAA 540
 102 P P V Q Q L L D Q Y D V L G D D G K P G T A L P D D E E D E 131
 541 GAGGAGCGCGCCACCGAGACCGTATGAGCATG6GCGCGGAGGCCAACCCGACGTTCAAGTAGACCAAAACCGAAAGTGTGTTTT 630
 132 E E R A T T E T V M S M A A E P N P D V Q V D Q K P K C C F 161
 631 TTCTCCTTCAGCCCAAAGATCCAAGCGAGCCGATTGTAAGGGCACAGCTTTGGGTGCACTTGCGCCCAACGGACGAAGCAACCACATTG 720
 162 F S F S P K I Q A S R I V R A Q L W V H L R P T D E A T T L 191
 721 TTCTTGAGATATCACGACTCATGCCTATCAAAGATGGTAGAAGGCATGTAAGAATACGTTTCGCTGAAAATCGACGTGGAGGCCGGTGTG 810
 192 F L Q I S R L M P I K D G R R H V R I R S L K I D V E A G V 221
 811 AGGTCGTGGCAGAGCATCGATGTCAAGCAGGTGCTTGCGGTGTGGCTGAGGCAACCGGAAACCAACTGGGGGATCGAGATCAATGCGTTC 900
 222 R S W Q S I D V K Q V L A V W L R Q P E T N W G I E I N A F 251
 901 GATTCCAAAGCAACGATCTGGCTATCACTTCTGCAGAGCCTGGTGAAGAGGGACTGCTTCCATTCTTGGAGGTCAAAATTTCCGAAAGTG 990
 252 D S K S N D L A I T S A E P G E E G L L P F L E V K I S E V 281
 991 CCCAAGCGAACCCGGAGAGAATCGGGACTGGACTGTGACGAGAATTGCTCCGAGTCCCGTGTGCCGCTACCCCTTACGGTGGACTTT 1080
 282 P K R T R R E S G L D C D E N S S E S R C C R Y P L T V D F 311
 1081 GAAGACTTCGGCTGGGATTGGATTATTGCCCCGAAACGCTACAAAGCTAACTACTGCTCGGGCGAGTGTGACTATGTGCATTTCAGAGAAG 1170
 312 E D F G W D W I I A P K R Y K A N Y C S G E C D Y V H L Q K 341
 1171 TATCCGCACACGCACTTGGTAAACAAAGCCAACCCGCGTGGCACTGCCGGTCCCTGCTGCAGGCCACCAAGATGTCTCCCATCAACATG 1260
 342 Y P H T H L V N K A N P R G T A G P C C T P T K M S P I N M 371
 1261 CTCTACTTCAACGGAAGAGCAGATCATCTACGGCAAGATCCCTTCCATGGTGGTGGATCGCTGTGGCTGTTCTGTGATTCGATGTGCCCA 1350
 372 L Y F N G K E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S * 397
 1351 TGCAGGGACTTGTGCCGTTCTGTTTCCAAACATTTCCCTCTGGACTTCTTTACGACACCTTACAACATTATCCATGCTAACACTGTGCA 1440
 1441 ATATGCAATAGAACCAAGATCGCAGCAAGCAAGGAACCATCCACAGACACCGCTTACTTTCACTGACTTTTTATTGCTTACGCTTTAT 1530
 1531 CTGCATCTTGGGGTCAGAGGTCTCATGGACGTACTGAAGGAATGTAATGCCGGTCCAACCTGGAGGAATGGACGAAAAAATAATCTATAC 1620
 1621 AGTTACGTAAGTACCAAAAAACACACGTTTTGTTCAAACCTGCTCGACAATATCCATTTAGTCATGTTCTCACTCCAAACAGCTGTTGA 1710
 1710 GAGTCAAGTATCCAAGAGCAACAGAGAGGGACTCAAGGACACTTTTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1784

Figure 1

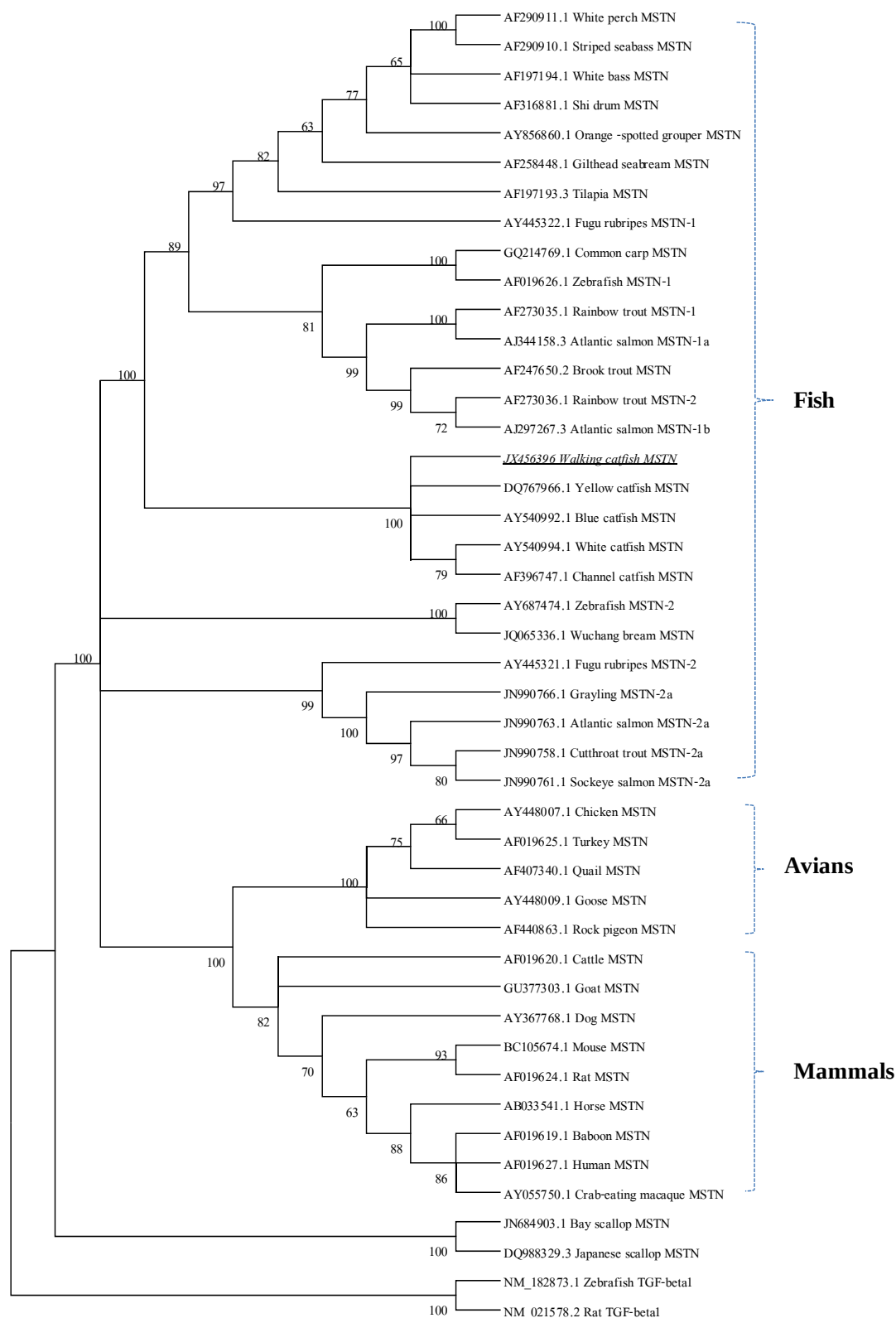


Figure 3

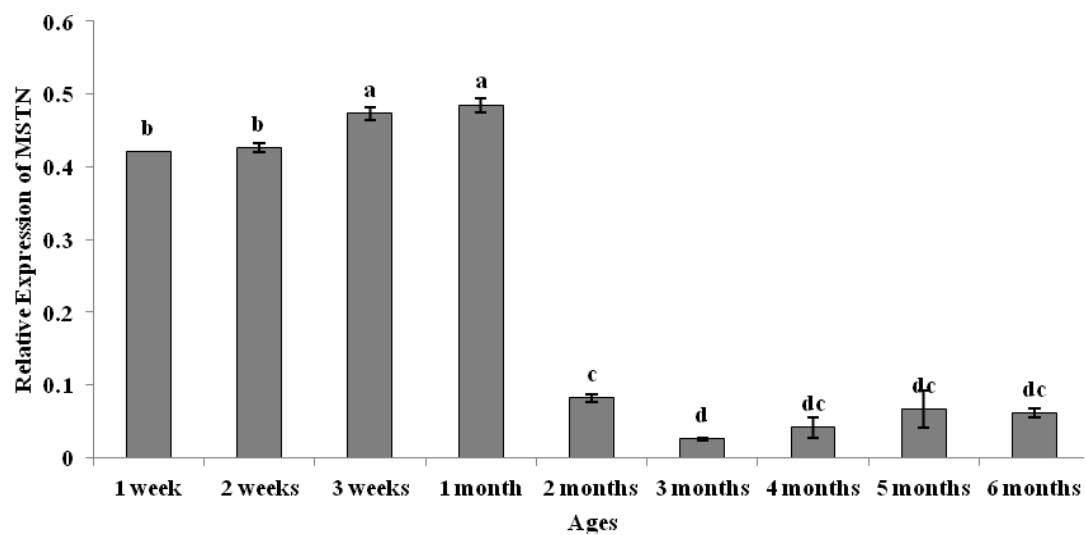


Figure 4