บทคัดย่อ

ในการจำแนก ESTจาก ห้องสมุด cDNA ของเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้อบริเวณกระดูกสันหลังจากปลาดุกอุยเพศเมีย ได้สุ่มเลือกโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลิโอไทด์ทั้งหมด 2,229 โคลน (ตับ 991 โคลนและกล้ามเนื้อ 1,038 โคลน) พบว่า EST จำนวน 1,334 โคลนมีลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ตรงกับยีนในฐานข้อมูล ทั้งนี้เป็นยีนในตับ 303 ยีนและยีนกล้ามเนื้อ 234 ยีน ทั้งนี้พบยีนที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์สมบูรณ์ 51 ยีน ยีนที่จำแนกได้จำนวนหนึ่งแสดงออกเฉพาะเนื้อเยื่อตับหรือกล้ามเนื้อ ยีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อตับได้แก่ กลุ่มเมตาบอลิสม กลุ่มป้องกันและรักษาสมดุล และกลุ่มสื่อสาร และยีนที่มีการแสดงออกมากที่สุดในตับ คือ Vitellogenin (VTG) นอกจากนี้ยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันก็พบเฉพาะในเนื้อเยื่อตับ ในขณะที่ยีนโครงสร้างและควบคุมการเคลื่อนไหว เช่น actin myosin troponin และ parvalbumin มีการแสดงออกค่อนข้างมากในกล้ามเนื้อ และ EST จำนวน 202 ลำดับมีไมโครแซทเทลไลท์ร่วมอยู่ด้วย แต่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 27 ตำแหน่งซึ่งเป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่มีความหลากหลายของอัลลิลเพียง 16 ตำแหน่ง จำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 2-16 อัลลิล ไมโครแซทเทลไลท์จากปลาดุกอุยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) ปลาสวาย (*Pangasius hypophthalmus*) ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) และปลาบึก (*Pangasianodon gigas*)

ลำดับ cDNA ที่สมบูรณ์ของยีน VTG (4,192 เบส) ประกอบด้วยปลาย 5'UTR (51 เบส) บริเวณแปรรหัส (4,050 เบส) เป็นกรดอะมิโน 1,350 หน่วย ปลาย 3'UTR (60 เบส) และปลาย poly(A) (31 เบส) ลำดับกรดอะมิโนของยีน VTG ปลาดุกอุยมีความเหมือนกับปลาคาร์พ (58.9%) มากที่สุด รองลงมาคือ ปลาม้าลาย (56.9%) ปลาเรนโบว์เทร้า (41.7%) กบ (32.6%) และไก่ (8.1%) เทคนิค Northern blot และ RT-PCR ยืนยันว่ายีน VTG มีการแสดงออกเฉพาะในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยเพศเมีย ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ VTG mRNA ในตับและค่าดัชนี GSI ในรอบปีของปลาที่เจริญพันธุ์ ได้เก็บตัวอย่างปลาตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2549 ถึงเดือนพฤษภาคม 2550 โดยในแต่ละเดือนวัดค่าดัชนี GSI และวัดปริมาณ VTG ด้วยเทคนิค Real-time PCR ผลการศึกษาปรากฏว่าในแต่ละเดือนค่าเฉลี่ยดัชนี GSI และปริมาณ VTG มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคมค่าเฉลี่ยดัชนี GSI เท่ากับ 8.60± 0.35% และ 13.07±0.59% ปริมาณ VTG และค่าเฉลี่ยดัชนี GSI มีค่าสูงสุด(18.27 ± 2.51%) ในเดือนกันยายน ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงมีนาคมรังไข่มีน้ำหนักลดลงอย่างต่อเนื่องและค่าเฉลี่ยดัชนี GSI มีค่าต่ำสุด(0.77 ± 0.38%) ในเดือนมกราคม โดยสรุประดับการแสดงออกของยีน VTG สะท้อนการเปลี่ยนแปลงในรอบปีของระบบสืบพันธุ์ปลาเพศเมียโดยระดับ VTG mRNA มีค่าสูงสุดระหว่างฤดูเพาะพันธุ์และมีค่าต่ำสุดหลังฤดูวางไข่

ABSTRACT

Expressed sequence tags have been generated from cDNA libraries constructed from liver and muscle tissues of adult female walking catfish. Two thousand and twenty-nine randomly picked cDNA clones, 991 from the liver library and 1,038 from the muscle library were sequenced. A total of 1,334 EST clones showed significant sequence similarity to known genes in the databases, representing 303 genes from the liver library and 234 genes from the muscle library. Fifty-one full-length genes were identified in both libraries. A number of identified genes appeared to be expressed in specific tissues. Genes associated with primary functions of liver, metabolism, defense and homeostasis, and signaling and communication, were well represented in liver cDNA library. Vitellogenin (VTG) genes were highly expressed in the liver of female walking catfish. Further, genes responsible for innate immune function, in particular, acute phase proteins were found only in the liver. In contrast, genes encoding structural proteins were restricted to the muscle library. ESTs represented structure and motility (actin, myosin, troponin, and parvalbumin) were relatively highly expressed in muscle cDNA library. Two hundred and two EST sequences contained microsatellite repeat sequences. Primers for DNA amplification were designed and synthesized for twenty-seven loci. Sixteen loci were polymorphic with the number of alleles ranging from 2-16 alleles per locus. Cross-species amplification was observed in other catfishes including *Clarias gariepinus*, *Pangasius hypophthalmus*, *P. larnaudii*, and *Pangasianodon gigas*. Analysis of the cDNA libraries indicates that EST approaches can provide effective way for characterizing expressed genes in walking catfish and these libraries would be useful resource for identification of EST and microsatellite markers for mapping purposes.

The complete cDNA sequence for walking catfish VTG (4,192 bp) contained 51 bases of 5'-untranslated region, the open reading frame of 4,050 bp coding for a 1,350 amino acids, 60 bases of 3'-untranslated region and a poly (A) tail of 31 nucleotides. The deduced amino acid sequence of the walking catfish VTG shared 58.9%, 56.9%, 41.7%, 32.6% and 8.1% identity with VTGs of common carp, zebrafish, rainbow trout, frog and chicken, respectively. Northern blot and RT-PCR revealed that VTG was specifically expressed in the liver of female fish. To establish the relationship between gonadosomatic index (GSI) and the level of hepatic VTG transcript, monthly change in GSI of females was monitored over a 1-year period from June 2006 to May 2007. The relative copy number of VTG mRNA was determined by quantitative

real-time PCR. Significant variations of mean GSI values and VTG mRNA levels ($P<0.05$) were observed among months. From June to August, mean GSI values ranged from 8.60± 0.35% to 13.07±0.59%. Highest mean GSI value (18.27 ± 2.51%) and maximum VTG transcript levels were observed in September. From October through March, ovarian weight steadily declined with the lowest mean GSI value (0.77 ± 0.38%) in January. The relative levels of VTG transcript correlated well with GSI. The expression profile of VTG gene reflected the annual changes in reproductive cycle of female walking catfish, showing high levels during breeding period and low levels during resting periods.