



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การศึกษายีนแสดงออกในการเจริญพันธุ์ในปลาบึกเทศเมืง (*Pangasianodon gigas*)
STUDY OF MATURATION GENE EXPRESSION IN FEMALE MEKONG GIANT
CATFISH (*Pangasianodon gigas*).

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ :
ระบบการพัฒนาเชิงพาณิชย์ที่ยั่งยืนสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาบึก

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550 - 2551
จำนวน 570,930.00 บาท

หัวหน้าโครงการ ดร. จิราพร ไรจน์ทินกร

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

กันยายน 2553

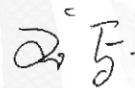
กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย จาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)) ปีงบประมาณ 2550 - 2551

ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และ ดร.จรัล ไชยองค์การ (จรัลฟาร์ม อ.พาน จ. เชียงราย) ที่สนับสนุนตัวอย่างปลาบึกเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ นักศึกษาช่วยงาน และบุคลากรในคณะฯ ทุกท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี



(ดร. จิราพร โรจน์ทินกร)

กันยายน 2553

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
สารบัญเรื่อง	ก
สารบัญภาพ	ค
สารบัญตาราง	จ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
คำนำ	
- ความสำคัญและที่มา	4
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
การตรวจเอกสาร	
1. การตกไข่ของปลาและปลาบึก	7
2. EST ของการตกไข่ของปลา และสิ่งมีชีวิตอื่น	12
การวิจัยปีที่ 1	
1.1 อุปกรณ์และวิธีการ	16
1) การเก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึก	16
2) การสกัด total RNA	16
3) การสกัด messenger RNA (mRNA)	17
4) การสร้าง Complementary DNA library (cDNA library)	17
1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์	19
1) การเก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึก	19
2) การเตรียม mRNA เพื่อสร้าง cDNA libraries	19
การวิจัยปีที่ 2	
2.1 อุปกรณ์และวิธีการ	22
1) การสร้าง Complementary DNA library (cDNA library)	22
2) การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของ cDNA library	26

3) การเตรียมพลาสมาและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์	26
4) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	26
2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์	27
1) ยีนแสดงออกในเลือดของแม่ปลาบึก	27
2) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่	32
- Activin A receptor	32
- Cystatin precursor	38
3) ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน	44
- MHC class II	44
- F-type lectin	53
- Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)	58
สรุปผล	66
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของไข่ปลา	8
2	แสดงการพัฒนาของไข่ปลาบึก	9
3	แผนผังการวิจัย	14
4	การทดสอบคุณภาพของ mRNA ที่แยกได้จาก total RNA	19
5	การเก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึก	20
6	สัดส่วนยีนแสดงออกในเลือดแม่ปลาบึกระหว่างฤดูวางไข่และนอกฤดูวางไข่	31
7	An oocyte morphogen gradient influences granulosa cell phenotypes	33
8	กลไก activin autocrine/paracrine mechanism เพื่อพัฒนาการตกไข่	33
9	Activin/SMAD signaling pathway	34
10	BLASTX alignment ของ EST clone O1024	34
11	การวิเคราะห์ <i>P. gigas</i> activin A receptor (EST clone O1024)	35
12	การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนแอซิดของ activin A receptor ในปลาบึก (EST clone O1024) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	37
13	โครงสร้างโปรตีน cystatin C ของมนุษย์	39
14	BLASTX alignment ของ EST clone O5030	40
15	การวิเคราะห์ <i>P. gigas</i> cystatin precursor (EST clone O5030)	41
16	การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนแอซิดของ cystatin precursor ในปลาบึก (EST clone O5030) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	43
17	โครงสร้างของ MHC class I และ class II	45
18	BLASTX alignment ของ EST clones ที่เทียบได้กับ MHC class II	46
19	การวิเคราะห์ <i>P. gigas</i> MHC class II alpha chain (EST clone A3017)	47
20	การเปรียบเทียบ alpha domain ของ MHC class II ของปลาบึก ปลาอื่น และมนุษย์	49
21	การวิเคราะห์ <i>P. gigas</i> MHC class II beta chain (EST clone O2089)	50

22	การเปรียบเทียบ beta domain ของ MHC class II ของปลาบึกและสัตว์อื่น	52
23	โครงสร้างโปรตีน F-type lectin ของปลาไหล (<i>Anguilla anguilla</i>)	54
24	BLASTX alignment ของ EST clone O1004	55
25	การวิเคราะห์ <i>P. gigas</i> III-FBPL precursor (EST clone O1004)	56
26	การทำงานร่วมกันของ Intercellular adhesion molecules	60
27	โครงสร้างโปรตีน Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) ของมนุษย์	62
28	BLASTX alignment ของ EST clone O1005	62
29	การวิเคราะห์ <i>P. gigas</i> ICAM2 (EST clone O1005)	63
30	การเปรียบเทียบโดเมน ICAM ของปลาบึกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ยีนรูชนิดในเลือดปลาบึกเพศเมียระหว่างฤดูวางไข่	28
2 ยีนรูชนิดในเลือดปลาบึกเพศเมียนอกฤดูวางไข่	29
3 เปรียบเทียบยีนแสดงออกในเลือดปลาบึกเพศเมียระหว่างฤดูวางไข่และนอกวางไข่	30

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	=	degree Celsius
%	=	percent
g	=	gram
cm	=	centimeter
mm	=	millimeter
nm	=	nanometer
µm	=	micrometer
l	=	liter
µl	=	micrometer
h	=	hour
rpm	=	round per minute

การศึกษาขึ้นแสดงออกในการเจริญพันธุ์ในปลาบึกเทศเมีย

(*Pangasianodon gigas*)

การศึกษาขึ้นแสดงออกในการเจริญพันธุ์ในปลาบึกเทศเมีย

(*Pangasianodon gigas*)

จิราพร โรจน์ทินกร⁽¹⁾

Jiraporn Rojtinakorn⁽¹⁾

(1) คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

Expressed sequence tag (EST) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการหาค้นหายีนใหม่ การตรวจหาการแสดงออกของยีนและหน้าที่ของยีน การวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค EST เพื่อวิเคราะห์ยีนแสดงออกของปลาบึกเทศเมียในระยะวางไข่และหลังวางไข่ โดยการสร้าง cDNA libraries จาก mRNA ที่สกัดจากเลือดของปลาบึกเทศเมียในฤดูวางไข่ 38 โคลน และนอกฤดูวางไข่ 28 โคลน นำ EST clones ทั้งหมด 66 โคลน เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI พบว่า เป็นยีนที่รู้จักทั้งหมด 30 ชนิด โดยในระยะวางไข่มีจำนวน 26 โคลน (69.23%) และหลังวางไข่มีจำนวน 16 โคลน (55.56 สำหรับยีนที่ไม่รู้จักในระยะวางไข่มี 12 โคลน (30.77%) และหลังวางไข่มีจำนวน 12 โคลน (44.45%) ขนาด EST clones เฉลี่ย 518 bp สำหรับ ovulation cDNA libraries และ 434 bp สำหรับ post-ovulation libraries โดยพบยีนสำคัญ 6 ยีน ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่ ได้แก่ activin A receptor และ cystatin precursor ซึ่งพบใน ovulation cDNA libraries ยีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน 3 ยีนจาก ovulation cDNA libraries คือ III-FBPL precursor (F-type lectin) intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) และ MHC class II beta chain และ 1 ยีนจาก post-ovulation libraries คือ MHC class II alpha chain งานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับข้อมูลในระดับอนุโมเลกุลของการตกไข่ในปลาบึก

ABSTRACT

Expressed sequence tag (EST) analysis is a high efficient for gene discovery, examining gene expression and functional genomics. This study was employed ESTs to analyze gene expression of Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*) in ovulation and after ovulation using a cDNA libraries constructed from mRNA extracted from blood. Sequences of total of 66 clones were analyzed through GenBank in NCBI. Among total 30 known genes, from 38 EST clones of ovulation and 28 EST clones of post ovulation were identified as orthologs to known genes from other organisms, 26 clones (69.23%) and 16 clones (55.56%), respectively. For unknown genes, there were 12 EST clones (30.77%) of ovulation and 12 clones (44.45%) of post ovulation. The average insert sizes of EST clones were 518 bp for ovulation cDNA libraries and 434 bp for post-ovulation libraries. We found the 6 important genes. There were 2 genes; putative proteins of activin A receptor and cystatin precursor, that involving to ovulation from ovulation cDNA libraries. There were 4 genes involving in immune system; 3 genes from ovulation cDNA libraries such putative proteins of III-FBPL precursor (F-type lectin), intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) and MHC class II beta chain, and 1 gene from post-ovulation libraries such as MHC class II alpha chain. This is the first report for molecular level of ovulation in Mekong giant catfish.



คำนำ

ความสำคัญและที่มา

ในการผลิตพันธุ์ปลาบึกเพื่อการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ปัจจัยจำกัดที่สำคัญ คือ ปริมาณและคุณภาพของไข่ปลาที่ไม่แน่นอน และอายุการเจริญพันธุ์ของแม่ปลาที่ต้องใช้เวลา นาน (15-17 ปี) การศึกษาการแสดงออกของยีนในปลาเพศเมียที่ระยะก่อนการเจริญพันธุ์และขณะสร้างไข่ จะสามารถทำให้เข้าใจถึงข้อมูลของสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ เพศ การพัฒนาความสมบูรณ์เพศ และการผลิตไข่ในแม่ปลา พร้อมทั้งมีการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมระบุเพศด้วยวิธี RAPD เพื่อให้สามารถจำแนกเพศปลาได้ในขณะที่อายุน้อย ผลจากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการจัดการแม่พันธุ์ปลาบึก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและคุณภาพในการเพาะ เลี้ยงปลาบึก

วิธีการผสมเทียมปลาบึกทำเช่นเดียวกับการผสมเทียมปลาชนิดอื่น โดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลา (เสนห์, 2526; เสนห์ และคณะ, 2536) ฮอร์โมนที่ใช้ เช่น ต่อมาได้สมองของปลาหาง่าย gonadotrophin releasing hormone analogue (GnRHa) เป็นต้น แล้วรอระยะเวลาในการเตรียมพร้อมของแม่ปลา การให้ฮอร์โมนสามารถกระตุ้นให้ไข่ของแม่ปลาสุกมากที่สุดเพื่อประสิทธิภาพในการผสม แล้วจึงรีดไข่แยกจากแม่ปลานำมาผสมกับน้ำเชื้อสดของพ่อปลา ปัญหาที่ประสบคือ การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นมีความผันแปรในการทดลองแต่ละครั้ง ทั้งในเรื่องปริมาณฮอร์โมนที่ใช้ (dose) ระยะเวลาที่รอ (interval time) รวมถึงความไม่แน่นอนของประสิทธิภาพไข่ปลาที่พร้อมจะผสม ทำให้ปริมาณและคุณภาพของลูกปลาที่ได้ไม่แน่นอน และในบางกรณีอาจประสบปัญหาสูญเสีย เนื่องจากความไม่พร้อมของฤดูกาล สภาพธรรมชาติ และช่วงอายุสมบูรณ์พันธุ์ของแม่ปลา ประกอบกับจำนวนแม่พันธุ์พ่อพันธุ์ได้มาจากธรรมชาติที่เกษตรกรจับมาน้อย ทำให้ปริมาณปลาที่จะใช้ทดลองไม่เพียงพอ ส่วนปลาบึกที่เกษตรกรเลี้ยงในประเทศไทย ต้องใช้ระยะเวลานานมากกว่า 12-15 ปี เพื่อความสมบูรณ์เพศที่จะให้ไข่ที่มีคุณภาพเพียงพอ

ดังนั้นปัจจัยจำกัดที่สำคัญในการเพาะขยายพันธุ์ลูกปลาบึก คือ แม่พันธุ์ปลาที่มีความพร้อมในการผลิตไข่ที่มีคุณภาพที่อายุ 13-15 ปี ซึ่งหมายถึงระยะเวลาการเลี้ยงแม่พันธุ์ด้วย และในการผสมเทียมแต่ละครั้งยังไม่สามารถกำหนดปริมาณและคุณภาพของไข่ที่ได้ งานวิจัยนี้จึงจะทำการศึกษายีนที่แสดงออกของแม่ปลาบึกที่ก่อนการเจริญพันธุ์และระยะที่มีการวางไข่ เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญในการเข้าใจเกี่ยวกับกลไกทางสรีระวิทยาของการพัฒนาความสมบูรณ์ในเพศเมีย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการแม่พันธุ์ปลาให้มีความพร้อมในการสร้างไข่ที่อายุน้อยลง และได้ไข่ที่มีปริมาณและคุณภาพสูง

จากผลการวิจัย พบว่า รูปแบบยีนแสดงออกในเลือดแม่ปลาบึกในระยะวางไข่และหลังวางไข่ มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยพบยีนสำคัญ 6 ยีน ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่ ได้แก่ activin A receptor และ cystatin precursor ซึ่งพบใน ovulation cDNA libraries ยีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน 3 ยีนจากระยะวางไข่ คือ III-FBPL precursor (F-type lectin) intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) และ MHC class II beta chain และ 1 ยีนจากระยะหลังวางไข่ คือ MHC class II alpha chain งานวิจัยนี้ยังเป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับข้อมูลในระดับอนุโมเลกุลของการตกไข่ในปลาบึก

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบยีนแสดงออกในและนอกระยะความสมบูรณ์เพศในปลาบึกเพศเมีย
2. ประเมินถึงสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการทางเพศและผลัดไข่ของปลาบึกเพศเมีย



การตรวจเอกสาร

1. การตกไข่ของปลาและปลาบึก

รังไข่และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

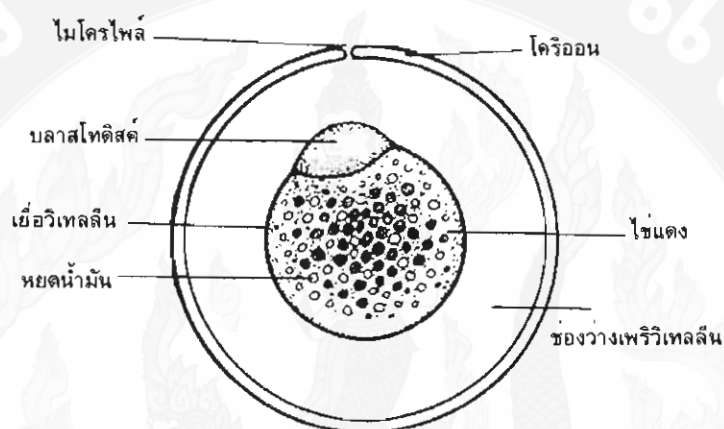
รังไข่มีลักษณะเป็นฝักคู่ และมีเยื่อมีโซวาเรียม (mesovarium) ยึดติดกับผนังช่องท้อง ไข่จะถูกปล่อยออกมาทางท่อนำไข่ (oviduct) และออกสู่ภายนอกทางช่องเปิด (urogenital pore) ซึ่งเป็นช่องเปิดร่วมกับปัสสาวะ ภายในรังไข่จะมีการสร้างไข่ (oogenesis) ซึ่งมีฟอลลิเคิลเซลล์จำนวนมาก ภายในฟอลลิเคิล มีเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น ซึ่งเมื่อปลาสมบูรณ์เพศเซลล์เหล่านี้จะแบ่งตัวแบบไมโทซิส เพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดโตขึ้น เรียกแต่ละเซลล์ว่า โอโอโกเนีย (oogonia) หลังจากนั้นโอโอโกเนียจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เมื่อสิ้นสุดการแบ่งไมโอซิสขั้นแรก ได้โอโอไซด์ปฐมภูมิ (primary oocyte) กับเซลล์ขั้ว (polar body) จากนั้นโอโอไซด์ปฐมภูมิจะผ่านกระบวนการสร้างไข่แดง (vitellogenesis) โดยเซลล์บุผิวที่อยู่รอบๆ สร้างอาหารสะสมในรูปของโปรตีนและไขมัน (granular yolk) การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นที่สองจะเกิดต่อไป แต่ปลาสวนใหญ่จะค้างอยู่ที่ระยะเมทาเฟส (metaphase II) จะมีการตกไข่ ซึ่งการแบ่งไมโอซิสขั้นที่สองจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อมีอสุจิเข้ามาผสม กับเซลล์ไข่ ผลจากการแบ่งจะได้นิวเคลียสของไข่ (female pronucleus) ซึ่งมีโครโมโซมครึ่งเดียว เมื่อผสมกับนิวเคลียสจากอสุจิจะได้ไซโกต (zygote) ซึ่งมีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์เหมือนพ่อแม่

ไข่ที่สุกแล้วจะถูกปล่อยออกมาทางช่องเพศ ยกเว้นในปลากระดูกอ่อนจะปล่อยออกมาทางทวารร่วม ซึ่งเป็นทางออกร่วมกับอุจจาระ โดยไข่ปลาจัดเป็นไข่แบบเทโลเลซิเทรล (telolecithal egg) คือมีไข่แดงจำนวนมากอยู่ขั้วหนึ่งซึ่งสะสมอาหารสำหรับตัวอ่อน เรียก ขั้วพืช (vegetal pole) อีกขั้วหนึ่งเป็นบริเวณที่มีนิวเคลียส เรียก ขั้วสัตว์ (animal pole) ซึ่งเป็นบริเวณที่จะเป็นตัวปลา ไข่มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ

1. ชั้นนอก เรียกโคริออน (chorion) เป็นชั้นที่หุ้มไข่เอาไว้ ทางขั้วสัตว์มีรูเล็กๆ เรียกไมโครไพล์ (micropyle) ซึ่งเป็นทางเข้าของอสุจิเพื่อเข้าไปปฏิสนธิกับไข่
2. ชั้นใน เรียกเยื่อไวลลีน (vitelline membrane) หุ้มไข่แดงและนิวเคลียสของไข่ ระหว่าง 2 ชั้นนี้มีช่องว่างเรียกว่าเพริวิทลลีน (perivitelline space)

ภายในไข่ประกอบด้วยไข่แดง ซึ่งรวมกันเป็นก้อน มีไซโทพลาสซึมหุ้มล้อมรอบเป็นชั้นบางๆ ทางด้านขั้วสัตว์มีลักษณะหนารูปรางเหมือนหมวก มีนิวเคลียสอยู่ เรียกบริเวณนี้ว่า เจอ

มิแนล ดิสก์ (germinal disc) หรือ บลาสโตดิสก์ (blastodisc) ซึ่งเป็นบริเวณที่จะมีการแบ่งตัวเจริญเป็นตัวอ่อน เมื่อไข่ได้รับการปฏิสนธิกับอสุจิ ภายในไข่แดงมีหยดน้ำมัน (oil globule หรือ oil droplet) หยดน้ำมันจะมีขนาดเล็กหรือใหญ่ จำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (อุทัยรัตน์, 2531)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของไข่ปลา

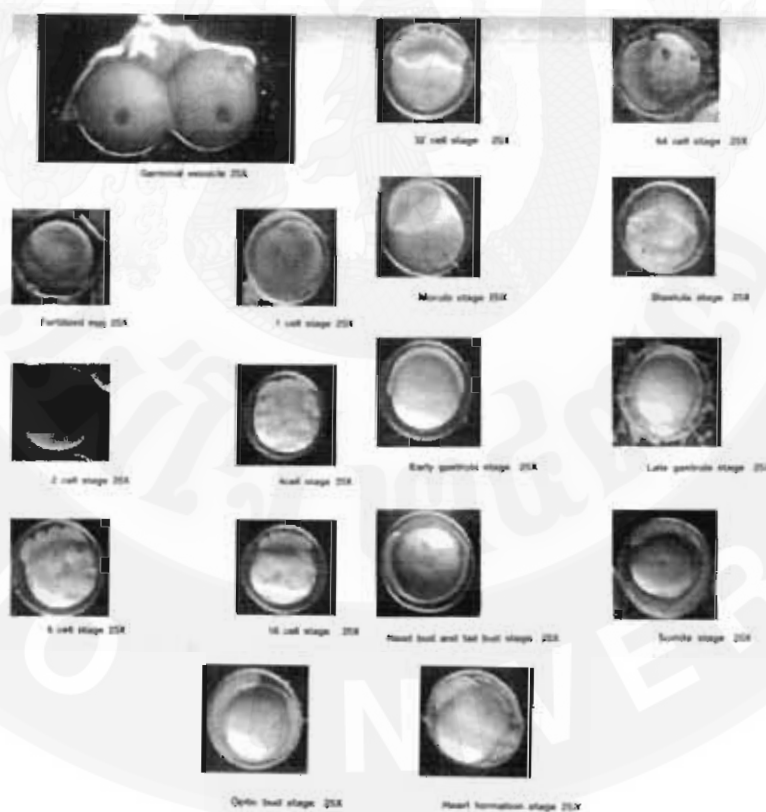
การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาบึกเทศเมีย

วีระชัย (2535) พบว่าระบบสืบพันธุ์ของปลาบึกเทศเมียวัยเจริญพันธุ์มีรังไข่มีขนาดใหญ่พบไข่ระยะต่างๆ บรรจุอยู่ โดยการเจริญของไข่แบ่งได้เป็น 5 ระยะ คือ

1. oogonia
2. primary growth phase
3. early-vitellogenesis ขนาดของไข่และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นไซโตพลาสซึมเริ่มโตและมีการเพิ่มจำนวน นิวคลีโอลัส
4. mid-vitellogenesis ไข่ระยะนี้มีโครงสร้างห่อหุ้มหลายชั้น จากชั้นนอกเข้าไปข้างในตามลำดับ คือ theca externa, theca interna, follicular layer granulosa และ zona

radiata ไฮโดพลาสซึมมี yolk granules จำนวนมากอยู่ใกล้นิวเคลียส เริ่มมีการเคลื่อนตัวของนิวเคลียสไปอยู่ขอบเซลล์ด้าน animal pole ซึ่ง yolk granules จะเริ่มเชื่อมติดกันเกิดช่องว่างทำให้ไข่เริ่มใสขึ้น

5. maturation egg stage เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร yolk granules เชื่อมติดกันไข่มีลักษณะใสและนิวเคลียสมีตำแหน่งชิดขอบเซลล์ ความดกของไข่มีค่าประมาณ 600-700 ฟอง/กรัม



ภาพที่ 2 แสดงการพัฒนาของไข่ปลาบึก (ยงยุทธและคณะ, 2544)

ฮอร์โมนกับการเจริญพันธุ์ของปลา

นฤพล และวัฒนะ (2537) กล่าวไว้ในรายงานการศึกษา วงจรการสืบพันธุ์ในรอบปี ของแม่ปลาตะเพียนขาวว่าไข่ในระยะการสร้างไข่แดง เกิดขึ้นตลอดทั้งปีในแม่ปลาตะเพียนขาว จากการศึกษาในปลาทั่ว ๆ ไปการสร้างไข่แดง จะอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนโดยมี Estradiol (E2) เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างไข่แดงที่ตับ และ gonadotropin hormone (GtH) เป็นตัวกระตุ้นให้มีการดูดซึมไข่แดงเข้าไปในไข่ การเพิ่มของไข่ระยะที่มีไข่แดงจะสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ Gonadosomatic Index (GSI) และการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ของ E2 ส่วนการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของ E2 และ Testosterone (T) ในพลาสมาของแม่ปลาตะเพียนขาวในรอบปีระดับความเข้มข้นของ E2 ในแม่ปลาตะเพียนขาวจะสูงกว่า ระดับความเข้มข้นของ T ตลอดทั้งปี ในปัจจุบันหน้าที่ของ T ในปลาเพศเมียยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน แม้ได้มีการเสนอว่า T อาจทำหน้าที่เป็นสารเริ่มต้น (precursor) ของการสังเคราะห์ E2 ในปลาเพศเมียในระหว่างการพัฒนาของไข่ระยะ oocyte estradiol (E2) มีบทบาทสำคัญในขบวนการสร้างไข่แดงในไข่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า GSI ขณะที่ 17 - 20 - dihydroxy- 4 pregnen - 3 - one (DHP) จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง gonadotropin hormone (GtH) และเกิดการสุกของไข่ ส่วน testosterone (T) เป็นสารชักนำให้เกิดการสร้าง E2 (Scott et al., 1980) ในปลาทอง T จำเป็นต่อการสร้าง GtH (Kobayashi et al., 1986)

การวางไข่ของปลาบึก

เสนห์ (2526) ได้ทดลองผสมเทียมปลาบึกด้วยการฉีดฮอร์โมนสำเร็จเป็นคนแรก โดยใช้ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองปลาเกล็ดเงินฉีดให้พ่อแม่ปลาบึก เข็มแรก 0.5 โดสในเพศเมีย หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง เข็มที่สอง 1.4 โดสสำหรับแม่ปลา และฉีดพ่อปลาพร้อมกัน 0.5 โดส ผ่านไป 12 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่สาม ทั้งสองตัว 0.5 โดสผสม domperidone รอเวลา 4-6 ชั่วโมง ตรวจดูความพร้อมของแม่ปลา ถ้าไข่แก่ดี รีดไข่และรีดน้ำเชื้อผสม นำไปฟัก ที่ 25°C นาน 45-54 ชั่วโมง นำลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวไปอนุบาล

เสนห์ และคณะ (2536) ศึกษาเปรียบเทียบผลการใช้ salmon gonadotrophin releasing hormone analogue, sGnRHa 1 ชนิด คือ suprefact ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ dopamine antagonist 2 ชนิด คือ domperidone และ sulpiride ในสูตรต่างๆ 7 สูตร พบว่า ที่ได้ผลดีที่สุด และต้นทุนถูกที่สุด คือ การใช้ suprefact ร่วมกับ domperidone

จากการสังเกตความสมบูรณ์ของไข่ปลาบึกเพศเมียที่จับได้ และจากความสำเร็จในการผสมเทียมของเสนห์ ผลประสิทธิ์และคณะ บ่งชี้ว่า ปลาบึกมีฤดูผสมพันธุ์อยู่ในช่วงต้นฤดูฝน ประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน (เกรียงศักดิ์, 2543; Baird, 1996) ความดกไข่ของแม่ปลาบึกสมบูรณ์เพศตามธรรมชาติคาดประมาณว่า 800,000 ฟองต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม (เสนห์และภาณุ, 2540)

จิราพร (2547) ได้ศึกษาความต้องการสารชีวโมเลกุลของไข่ปลาในกลุ่ม *Pangasianodon* ให้พัฒนาสู่ระยะสุกสมบูรณ์ (ระยะ metaphase II) โดยทำการทดลองเลี้ยงไข่ปลาให้สุกในห้องทดลอง (in vitro maturation, IVM) ด้วยอาหารสูตรต่างๆ ได้ทำการทดลองในไข่ปลาบึกและไข่ปลาทราย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ซึ่งมีสายพันธุ์ใกล้เคียง (close species) กับปลาบึกมากที่สุด พบว่า ปริมาณสารต่างๆ เช่น IGF-I HCG LH ที่เปลี่ยนแปลง มีผลต่อไข่ปลาบึกมากกว่าไข่ปลาทราย ทำให้การเลี้ยงไข่ปลาบึกสุกในห้องทดลองทำได้ยากกว่าไข่ปลาทราย

2. EST ของการตกไข่ของปลา และสิ่งมีชีวิตอื่น

Chen และคณะ (2009) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนใน follicles ของแคะโดยการทำให้ suppressive subtractive hybridization (SSH) เพื่อหา Expressed sequence tag (EST) โดยพบ EST ใหม่จำนวน 14 โคลน และพบโคลนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์จำนวน 4 โคลน เป็นยีน LAPTM4A, SERPINE2, GSTA1 และ INHBA โดยเป็นรายงานแรกที่พบหน้าที่ใหม่ของยีน LAPTM4A ที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์

Zeng และ Gong (2002) ได้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนของม้าน้ำในอวัยวะและรังไข่ โดยการสร้าง cDNA libraries ของตัวอย่างทั้งสอง ได้โคลน EST 1025 โคลน โดยเป็นโคลนที่ได้จากรังไข่จำนวน 524 โคลน และอวัยวะจำนวน 501 โคลน สำหรับในรังไข่พบว่ามีมากกว่า 10% เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนในผนังเซลล์ไข่ (egg membrane proteins)

Chini และคณะ (2007) ศึกษาการแสดงออกของยีนและอวัยวะสืบพันธุ์ (อวัยวะและรังไข่) ในปลาบรูว์พินทูน่า โดยการสร้าง cDNA libraries ได้โคลนทั้งหมด 8,664 โคลน ประกอบด้วยโคลนที่ได้จากรังไข่จำนวน 2,743 โคลน จากอวัยวะจำนวน 2,907 โคลน จากตับจำนวน 3,014 โคลน อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยมีความยาวเฉลี่ยของ cDNA 400 – 700 คู่เบส นำยีนเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (NCBI) สำหรับโคลนที่ได้จากรังไข่มียีนที่สำคัญ เช่น cyclin B และ cathepsins ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญไข่และกระบวนการแบ่งเซลล์ ACP5 (acid phosphatase tartrate-resistant) เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อน AQP (กลุ่มของ aquaporins ที่เยื่อหุ้มเซลล์) มีผลต่อ follicle และ NPC2 เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อน zona pellucida proteins 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ follicle เช่น zona pellucida proteins 2,3 และ ACVRL1

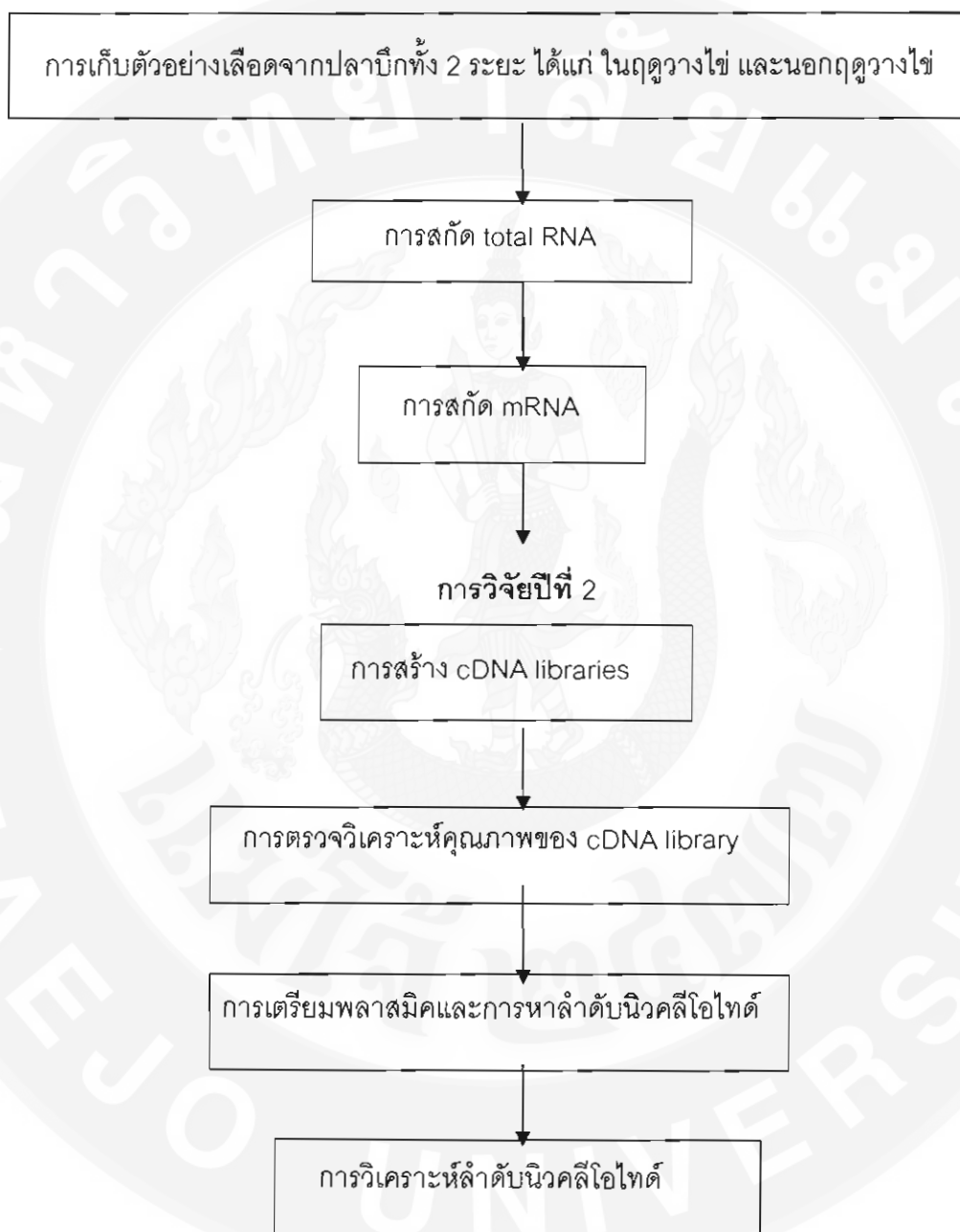
Li และคณะ (2008) ได้ศึกษาลักษณะการแสดงออกของ gonadotrophin (GTH) subunits common α , FSH β และ LH β ในปลากะรังจุดส้ม โดยการสร้าง cDNA library จากพิทูอิทารี พบ cDNA ที่สมบูรณ์ของโปรตีนทั้ง 3 มีความยาว 647, 594 และ 574 คู่เบส จากนั้นทำการโคลนยีนที่ได้เพื่อสร้างโปรตีนลูกผสม

Karsi และคณะ (1998) ได้ศึกษา EST ใน channel catfish โดยการคัดสรรสกัดจากต่อมพิทูอิทารีเพื่อกระตุ้นการตกไข่ และสร้าง cDNA library จากพิทูอิทารี เมื่อเปรียบเทียบกับ

ฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าเป็นยีนที่ทราบหน้าที่ 59% ของ EST โคลนทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ gonadotropin (GtH) α -subunit และ prolactin ในช่วงที่กระตุ้นให้มีการตกไข่ และระยะจากกระตุ้นการตกไข่พบ GtH α -I, GtH α -II, growth hormone, proopiomelanocortin (POMC)

Chu และคณะ (2004) ได้สร้าง cDNA library จากรังไข่ปลาหมอเทศเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน ได้โคลนทั้งหมดจำนวน 768 โคลน โคลนที่มีดีเอ็นเอที่สนใจมีขนาดมากกว่า 100 คู่เบส มีจำนวน 530 โคลน และพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการสืบพันธุ์จำนวน 6 ยีน คือ cofilin, fibulin-4, glucosamin-6-phosphate deaminase 2 (GNPDA), MCM-6, stathmin และ zona pellucida C5 (ZPC5) นอกจากนี้ยังพบยีนใหม่อีกจำนวน 9 ยีน

การวิจัยปีที่ 1



ภาพที่ 3 แผนผังการวิจัย

The logo of Maejo University is a circular emblem. The outer ring contains the text 'มหาวิทยาลัยแม่โจ้' in Thai script at the top and 'MAEJO UNIVERSITY' in English at the bottom, separated by two star-like symbols. The inner circle features a central figure of a deity or guardian figure standing on a lotus, holding a sword, and surrounded by flames. The text 'การวิจัยปีที่ 1' is superimposed over the center of the logo.

การวิจัยปีที่ 1

1.1 อุปกรณ์และวิธีการ

1) การเก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึก

เก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึกจาก คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และจรัลฟาร์ม จังหวัดเชียงราย ในฤดูวางไข่ และหลังวางไข่ โดยเจาะเลือดจาก บริเวณเส้นเลือดโคนหางเก็บเลือดที่เจาะได้ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ซึ่งประกอบด้วย 0.37% EDTA, 0.55% Citric acid, 0.88% Tri-sodium citrate, 0.263% NaCl และ 10% Glucose นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm 4°C นาน 3 นาที ที่ัง สารละลายใสส่วนบน เก็บเม็ดเลือดที่ได้ใน สารป้องกันการสลายตัวของ RNA (RNA preservation reagent) ที่อุณหภูมิ -20°C

1) การสกัด total RNA

การสกัด total RNA ด้วยชุดแยก total RNA Total RNA Extraction Kit (RBC bio science, Taiwan) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยชุดสกัดจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกโดยใช้ Lysis buffer จากนั้นทำการแยก total RNA โดยการใช้ Spin column

ขั้นตอนการสกัด

- เติม trizol reagent 500 ul ใช้เข็ม 20 G คูดสารละลายผสม เซลล์เม็ดเลือด - trizol ขึ้นลง โดยแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา
- ปลอ่ยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม chloroform 200 ul พลิกหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากันประมาณ 15 วินาที ปลอ่ยที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 15,000 rpm นาน 15 นาที
- สารละลายแยกออกเป็น 3 ชั้น ดูดเอาเฉพาะส่วนชั้นบน ซึ่งจะมีลักษณะใส ใสในหลอด ใหม่ขนาด 1.5 ml
- ไปเปิด 400 ul ของ isopropyl alcohol ให้สารละลายเข้ากันประมาณ 15 วินาที จากนั้น นำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วมากกว่า 15,000 rpm นาน 15 นาที
- ล้างตะกอน RNA (gel – like pellet) ด้วย 1 มิลลิลิตร 75% Ethanol ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นนำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วมากกว่า 15,000 rpm นาน 5 นาที

- ระบาย ethanol เปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย 20 ไมโครลิตร RNase – free water
- วัด OD260 โดยใช้ RNase – free water ไมโครลิตร total RNA 2 ไมโครลิตร (1:50)
- เก็บ total RNA ที่เหลือ (18 ul) ที่ -20°C

3) การสกัด messenger RNA (mRNA)

การสกัด mRNA สกัดจาก total RNA ด้วยชุดแยก mRNA PolyATtract mRNA Isolation Systems (Promega, USA) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ชุดสกัดจะแยก mRNA โดยอาศัย Streptavidin – Paramagnetic Particles (SA – PMPs)

ขั้นตอนการสกัด

- เตรียมตัวอย่าง โดยรวม total RNA ที่สกัดได้ 206.64 ug ใส่สารละลาย 38 ul ปรับปริมาตรให้เป็น 500 ul โดยใช้ RNase – Free water ใน 1.5 ml tube นำไปบ่มที่ 65°C นาน 10 นาที
- เติม 3 ul ของ Biotinylated – Oligo(dT) Probe และ 13 ul ของ 20XSSC ผสมเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเย็น
- เตรียม Stock Solution ดังนี้
 - A. 1.2 ml ของ Sterile 0.5XSSC โดยใช้ 30 ul ของ 20XSSC กับ 1.170 ml (1,170 ul) ของ RNase – Free Water ใน RNase –Free tube
 - B. 1.4 ml ของ Sterile 0.1XSSC โดยใช้ 7 ul ของ 20XSSC กับ 1.393 ml (1,393 ul) ของ RNase – Free Water ใน RNase –Free tube
- นำหลอด SA – PMPs พลิกหลอดเบาๆ จน SA – PMPs ให้กระจายทั่วทั้งหลอด จากนั้นนำไปวางใน Magnetic stand จนกระทั่ง SA – PMPs เกาะข้างหลอด (ประมาณ 30 วินาที) ไปเปิดสารละลายใส่ทิ้ง
- ล้าง SA – PMPs 3 ครั้ง ด้วย 0.5XSSC โดยนำไปวางใน magnetic stand จากนั้นใช้ไปเปิดดูดูส่วนใสด้านบนทิ้ง ระวัง อย่าดูด SA – PMPs
- ละลาย SA – PMPs คั้นด้วย 100 ul ของ 0.5XSSC
- นำสารละลาย total RNA ใส่ในหลอดของ SA – PMPs ที่ล้างเรียบร้อยแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ผสมโดยการพลิกหลอดเบาๆ ทุก 1 – 2 นาที

- นำหลอดไปใส่ใน magnetic stand ดูดสารละลายส่วนบนโดยระวังไม่ให้รบกวน SA – PMPs pellet
- ล้าง SA – PMPs จำนวน 4 ครั้ง ด้วย 0.1XSSC (300 ul ต่อการล้างหนึ่งครั้ง) โดยติดที่หลอดเบาๆ จนกว่า SA – PMPs จะละลายกลับมา ในการล้างครั้งสุดท้าย ให้นำสารละลายออกมาให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้โดยไม่รบกวน SA – PMPs pellet
- ละลาย SA – PMPs pellet ด้วย 100 ul ของ RNase Free water ผสมให้เข้ากันโดยดีดเบาๆ
- ใช้ magnetic stand ดูด SA – PMPs ไว้ จากนั้นใช้ไปเปิดเก็บ mRNA ใน sterile tube
- ทำการชะ mRNA ชั่วโดยใส่ 150 ul ของ RNase Free water ผสมให้เข้ากันโดยดีดเบาๆ ทำซ้ำ 2 ครั้ง (จะได้ ปริมาณ mRNA สุทธิประมาณ 250 ul)
- วัด OD260
- ปั่นตกตะกอนที่ 15,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- ไปเปิด absolute ethanol 750 ul (ได้เป็น ethanol 75%)
- ปั่นตกที่ 15,00 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- ทิ้งสารละลายใสส่วนบน ปล่อยให้แห้งนาน 10 นาที เติม 1 ml ของ DEPC – water เก็บที่ - 80°C

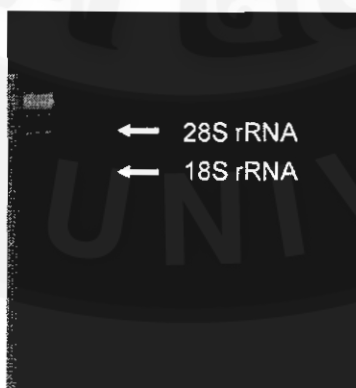
1.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

1) การเก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึก

ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึกจากบ่อเลี้ยงคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ และจรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย โดยเก็บในช่วงเวลาที่แม่ปลามีการวางไข่ และช่วงเวลานอกฤดูวางไข่ ปรากฏว่า ได้คุณภาพของตัวอย่างเลือดที่สามารถนำมาสกัด total RNA และนำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยในปีแรกได้เพียงอย่างละ 1 ตัวอย่างเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะที่ปลาถูกเจาะเลือดไม่เหมาะสม เช่น จับในช่วงบ่ายซึ่งอุณหภูมิสูง ปลามีความเครียดจากการถูกจับ เป็นต้น ต่อมาในปีที่ 2 จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างอีกครั้ง จึงจะได้ตัวอย่างที่เพียงพอสำหรับการทดลอง

2) การเตรียม mRNA จากตัวอย่างเลือด

จากนั้นได้นำตัวอย่างเลือดที่ดีไปสกัดด้วย Total RNA Extraction Kit (RBC bio science, Taiwan) และสกัดแยก mRNA ให้บริสุทธิ์ด้วย PolyATtract mRNA Isolation Systems (Promega, USA) แล้วนำ mRNA ที่แยกได้มาทดสอบคุณภาพ โดยการทำ electrophoresis เพื่อดูขนาดของ mRNA จากนั้นนำไปเก็บที่ -80°C เพื่อใช้ในการสร้าง cDNA libraries ต่อไป



ภาพที่ 4 การทดสอบคุณภาพของ mRNA ที่แยกได้จาก total RNA



การตรวจสอบเพศของปลาบึกก่อนเก็บตัวอย่างเลือด



การเจาะเลือดจาก caudal vessel

ภาพที่ 5 การเก็บตัวอย่างเลือดแม่ปลาบึก

การวิจัยปีที่ 2

2.1 อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสร้าง Complementary DNA library (cDNA library)

การสร้าง cDNA libraries ด้วยชุดสร้าง cDNA libraries CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ชุดสร้าง cDNA libraries จะใช้ mRNA เริ่มต้น 1 – 5 ไมโครกรัม เพื่อสร้าง cDNA และใช้ competent cell เป็น ElectromAX DH10B เพื่อยัดดีเอ็นเอพาหะ pDONR222 ด้วยเครื่อง electroporation (BioRad Gene Pulser II, USA) โดยมีขบวนการดังนี้

Priming Reaction

- เจือจาง mRNA ด้วย DEPC – treated water ในหลอด PCR หรือหลอด 1.5 ml โดยให้มี mRNA เริ่มต้นประมาณ 1-5 ug
- ใส่ Biotin – attB2 – Oligo(dT) primer (30 pmol/ul) และ 10 mM (each) dNTPs อย่างละ 1 ul ผสมให้เข้ากันโดยไปเปิดเบาๆ และ centrifuge
- บ่มที่ 65 °C นาน 5 นาที
- ทำให้เย็นที่ 45 °C นาน 2 นาที
- นำไปใส่ใน priming reaction tube

First strand reaction

- ไปเปิด 5X First Strand buffer 4 ul, 0.1 M DTT 2 ul และ DEPC – treated water 1 ul ลงในหลอดใหม่
- ผสมโดยปิเปิดเบาๆ จากนั้นนำไป centrifuge
- ปิเปิดใส่ใน Priming reaction tube นำไปบ่มที่ 45 °C นาน 2 นาที
- จากนั้นเติม SuperScript II RT ในขณะที่หลอดยังอยู่ใน thermocycler หรือ water bath
- ผสมโดยปิเปิดเบาๆ และให้หลอดอยู่ใน thermocycler หรือ water bath ระวังไม่ให้เกิดฟอง นำไปบ่มที่ 45 °C นาน 60 นาที

Second strand reaction

- นำหลอดที่ได้จากขั้น first strand reaction เก็บในน้ำแข็ง และเติมสารดังนี้

DEPC-treated water	92 ul
5X Second Strand Buffer	30 ul
10 mM (each) dNTPs	3 ul
E. coli DNA Ligase (10 U/ ul)	1 ul
E. coli DNA Polymerase I (10 U/ ul)	4 ul
E. coli RNase H (2 U/ ul)	1 ul
Total volume	151 ul

- ผสมเบาๆ โดยใช้ไปเปิด และ centrifuge นำไปบ่มที่ 16 °C นาน 2 ชั่วโมง
- เติม 2 ul ของ T4 DNA polymerase เพื่อสร้าง Blunt – end ผสมเบาๆโดยใช้ไปเปิด และปั่นเหวี่ยง นำไปบ่มที่ 16 °C นาน 5 นาที
- เติม 10 ul ของ 0.5 EDTA pH 8.0 เพื่อหยุดปฏิกิริยา

Phenol/Chloroform Extraction

- เติม 160 ul phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)
- เขย่าด้วยมือนาน 30 วินาที
- ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที 14,000 rpm
- ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่

Ethanol Precipitation

- นำส่วนน้ำเติมสารดังนี้

Glycogen (20 ug/ul)	1	ul
7.5 M NH ₄ OAc	80	ul
100% ethanol	600	ul

- ย้ายหลอดมาไว้ในน้ำแข็งแห้งหรือ -80 °C นาน 10 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C 14,000 rpm นาน 25 นาที
- ดูด supernatant ทิ้งโดยระวังไม่ให้รบกวน cDNA pellet
- เติม 150 ml 70% ethanol
- ปั่นเหวี่ยงที่ 4 °C 14,000 rpm นาน 2 นาที
- ดูด supernatant ทิ้งให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้โดยระวังไม่ให้รบกวน cDNA pellet ทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5- 10 นาที

- ละลาย cDNA pellet ด้วย 18 ul DEPC – treated water ละลายโดยใช้ไปเปิดดูขึ้นลง ประมาณ 30 – 40 ครั้ง
- ปั่นเหวี่ยง แล้วย้ายลงหลอดใหม่ และเก็บในน้ำแข็ง

Stopping the Ligation Reaction

- นำหลอดจากชั้นที่แล้วมาบ่มที่ 70 °C นาน 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ ligase
- ย้ายหลอดลงน้ำแข็ง

Setting Up the Column

- วาง column บน stand
- วาง rack ที่ประกอบด้วยหลอด 1.5 ml ได้ column
- Outlet ของ column ควรอยู่ห่างจาก 1.5 ml tube ประมาณ 1 – 2 cm
- ต้องสามารถเคลื่อนย้าย rack ได้อย่างอิสระ

Washing the Column

- เปิดฝาด้านบน และด้านล่างเพื่อให้ ethanol ไหลออกจนหมด
- เมื่อ column หยุดไหล ให้ไปเปิด 0.8 ml TEN buffer ลงใน Column ปลดปล่อยให้ไหลออก
- ล้างซ้ำอีก 3 ครั้ง (ล้างทั้งหมด 4 ครั้ง) ปลดปล่อยให้แห้ง

Collecting Fractions

- นำ column ใส่ในหลอดที่ 1 โดยให้ห่างจากก้นหลอด 1 – 2 cm
- เติม 100 ul TEN buffer ลงใน cDNA 50 ul จากชั้นที่แล้ว ผสมโดยไปเปิดเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง
- ใส่ตัวอย่างลงใน column และปล่อยให้เข้าสู่ resin bed เก็บ effluent ลงในหลอดที่ 1 รอจนหลอดแห้ง
- ย้ายหลอดที่ 2 มาใส่ได้ column outlet จากนั้นเติม 100 ul TEN buffer ลงใน column เก็บ effluent ลงในหลอดที่ 2 รอจนหลอดแห้ง
- เติม 100 ul ของ TEN buffer และเก็บตัวอย่างจนครบ 20 หลอด

Preparing pEXP7 – tet Control DNA

- ทำ Serial dilution ของ pEXP7 – tet control DNA ใน TE buffer โดย ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น; 25, 10, 5 และ 1ng/ul ตามลำดับ
- DNA standards นี้ เก็บไว้ที่ -20 °C ได้นาน 1 เดือน

DNA Spotting Assay

- warm plate แล้ว หยด 1 ul ของแต่ละความเข้มข้นของ pEXP7 – tet control DNA dilution
- หยด 1 ul ของแต่ละตัวอย่างของ cDNA ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 5 – 15 นาที เอาฝาทิ้งออก จากนั้นนำมาตรวจได้แสง UV จากนั้นถ่ายภาพ
- ทำการรวม cDNA ที่ต้องการ

Ethanol Precipitation

- นำ cDNA ที่ได้จากการรวมกันมาเติมสารต่างๆ ดังนี้

Glycogen (20 ug/ul)	1 ul
7.5 M NH ₄ OAc	0.5 volume
100% ethanol	2.5 volumes
- ย้ายหลอดมาไว้ในน้ำแข็งแห้ง หรือ -80 °C นาน 10 นาที บั่นเหวี่ยงที่ 4 °C 14000 rpm นาน 25 นาที
- ไปเปิด supernatant ทิ้ง โดยพยายามไม่รบกวน cDNA pellet เติม 150 ul 70% ethanol บั่นเหวี่ยงที่ 4 °C 14000 rpm นาน 2 นาที ไปเปิด supernatant ทิ้ง
- เติม 150 ul 70% ethanol บั่นเหวี่ยงที่ 4 °C 14000 rpm นาน 2 นาที ไปเปิด supernatant ทิ้ง ปลอ่ยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 – 10 นาที
- ละลาย cDNA pellet ด้วย 4.5 ul TE buffer โดยใช้ไปเปิดเบาๆ 30 – 40 ครั้ง ย้ายลงหลอดใหม่

Preparing Aliquots for the Plate Spotting Assay

- ไปเปิด 0.5 ul cDNA จากชั้นที่แห้งลงหลอดใหม่ เติม 4.5 ul TE buffer เพื่อ ทำ 1: 10 dilution
- ไปเปิด 2.5 ul จาก 1: 10 dilution ลงหลอดใหม่ เติม 2.5 ul TE buffer เพื่อ ทำ 1: 20 dilution

Estimating the cDNA Yield

- warm plate แล้ว หยด 1 ul ของแต่ละความเข้มข้นของ pEXP7 – tet control DNA dilution หยด 1 ul ของแต่ละตัวอย่างของ cDNA ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 5 – 15 นาที
- นำมาตรวจได้แสง UV จากนั้นถ่ายภาพ
- คำนวณหา total cDNA yield

Electroporation

- ไปเปิด 50 ul ElectroMAXDH10B. competent cells ลงในหลอดที่มี DNA ไปเปิดขึ้นลงเบาๆ 1- 2 ครั้งระวังอย่าให้เกิดฟอง ย้ายลง cold 0.1 cm cuvette โดยใช้ไปเปิดแต่ที่ขอบของ cuvette ห้ามไม่ให้เกิดฟอง
- Electroporate ตามที่ตั้งไว้ หากเกิด Arc ให้ทิ้งทันที เติม 1 ml ของ S.O.C medium ลงใน cuvette ไปเปิดใส่ 15 ml snap-cap tubes ทำซ้ำจนครบทุก Aliquot
- นำไปเขย่า ที่ 37 °C 225-250 rpm อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
- เติม sterile freezing media ไปเปิด 200 ul ของ ทุกตัวอย่างรวม control ลงใน 1.5 ml tube เพื่อหา titer
- นำปริมาณที่เหมาะสมไป spread plate บ่มที่ 37 °C แล้วเก็บ EST clones

2.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของ cDNA library

การวิเคราะห์คุณภาพของ cDNA library ด้วยการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นยีนที่สนใจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsrG I* และการทำ *in situ* colony PCR ด้วย M13 reverse primer และ M13 forward primer

2.3 การเตรียมพลาสมิดและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยนำ EST clone ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (Luria-Bertani) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกพลาสมิดโดยใช้ชุดแยก Hiyield Plasmid Mini Kit (RBC bio science, Taiwan) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer คือ M13 reverse primer และ M13 forward primer ซึ่งอ่านด้วยเครื่อง ABI 3070 DNA Analyzer

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank โดยโปรแกรม BLASTX ใน NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และวิเคราะห์ตำแหน่งอนุรักษ์ต่างๆ ด้วย conserved domain search database cdd -- 37407 PSS-Ms ใน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

1) ยีนแสดงออกในเลือดของแม่ปลาบึก

จากการวิเคราะห์ยีน EST clones ทั้งหมด 66 โคลน ของเลือดแม่ปลาบึก 2 ตัว ในระยะฤดูวางไข่ และนอกฤดูวางไข่ พบว่า รูปแบบยีนแสดงออกของทั้งสองแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยในระยะวางไข่ มียีนกลุ่มที่พบในสัดส่วนมาก ได้แก่ ribosomal proteins translation factors และยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ส่วนในระยะหลังวางไข่ มียีนที่พบในสัดส่วนมาก ได้แก่ ribosomal proteins receptors and reception-associated proteins และ development and cell-cycle-related proteins อย่างไรก็ตามยีนที่ไม่รู้จักของทั้งสองตัวอย่างมีสัดส่วนที่สูง 30-40% (ตารางที่ 1-3)

ที่น่าสนใจ คือ พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่ ได้แก่ activin A receptor และ cystatin precursor ซึ่งพบเฉพาะในระยะวางไข่ เห็นได้ชัดว่าในระยะนี้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันสูงเช่นกัน (ตารางที่ 2-3) ยีนของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ III-FBPL precursor (F-type lectin) intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) MHC class II beta chain และ MHC class II alpha chain ก็มีความแตกต่างกันเช่นกัน โดย 3 ชนิดแรก พบในตัวอย่างเลือดปลาบึกในฤดูวางไข่ ส่วนชนิดหลัง พบในตัวอย่างเลือดนอกฤดูวางไข่

นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่า ยีนในกลุ่มอื่นๆ ก็มีความแตกต่างกัน คือ กลุ่มยีนที่แสดงออกมากกว่าในเลือดแม่ปลาบึกระหว่างฤดูวางไข่ ได้แก่ ยีนกลุ่ม ribosomal proteins, immune-relate proteins, enzymes and enzyme activity regulators, translational factors และ secretary proteins and others ส่วนกลุ่มยีนที่แสดงออกมากกว่าในเลือดแม่ปลาบึกนอกฤดูวางไข่ ได้แก่ receptors and reception-associated proteins, transcriptional factors, DNA and RNA binding proteins และ development and cell-cycle-related proteins

อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก EST clones ของแต่ละ cDNA libraries มีจำนวนน้อยเพียง 38 และ 28 โคลนเท่านั้น ซึ่งสังเกตได้จาก ยังไม่พบยีนในกลุ่ม hormones and their regulatory proteins และจำนวนที่เหมาะสมควรจะมากกว่า 150 โคลนของแต่ละตัวอย่าง จึงควรมีการหาลำดับเบส Est clones ของแต่ละตัวอย่างปลาบึกเพิ่มเติมให้ได้จำนวนที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 ยีนฐานในเลือดปลาบึกเพศเมียระหว่างฤดูวางไข่

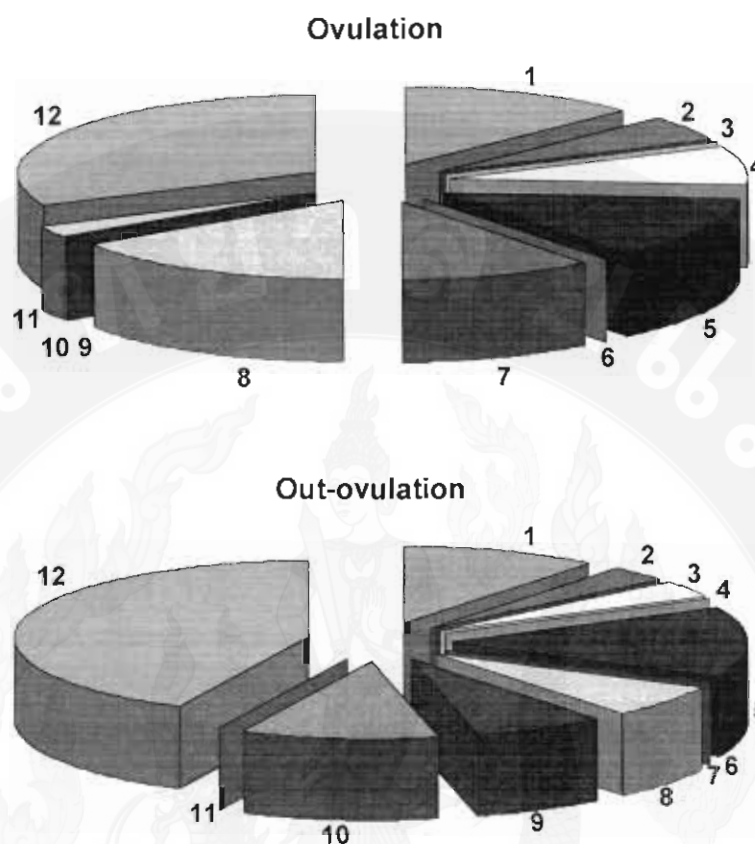
Clone No.	Accession No.	Putative identification	Closest species	Accession No.	Identity
<i>Ribosomal protein</i>					
O1029	HO224403	ribosomal protein L24	Zebra fish	gi:37747968	54/72 (75%)
O2007	HO224407	ribosomal protein L23a	Zebra fish	gi:335539	37/39 (94%)
O5010	HO224423	ribosomal protein L7	Channel catfish	gi:336710	69/92 (75%)
O2040	HO224417	60S acidic ribosomal protein P1	Zebrafish	gi:336719	37/39 (94%)
O2051	HO224419	60S ribosomal protein L37	Black-legged tick	gi:215503610	30/59 (50%)
<i>Immune-relate</i>					
O2089	HO224421	MHC class II beta chain	Channel catfish	gi:1763555	171/240 (70%)
O1004	HO224396	FBP32 precursor (F-type lectin)	Zebra fish	gi:139949081	85/142 (59%)
O1005	HO224397	intercellular adhesion molecule 2	Human	gi:62089342	23/25 (92%)
<i>Ovulation</i>					
O1024	HO224402	activin A receptor	Zebra fish	gi:24111232	203/218 (93%)
O5030	HO224426	cystatin precursor	rainbow smelt	gb:ACO09585.1	37/73 (50%)
<i>Translational factors</i>					
O5048	HO224430	translation elongation factor 1 beta 2	Zebrafish	gi:335370	133/170 (78%)
O2020	HO224411	translation elongation factor 1 beta 2	Zebrafish	gi:335370	130/170 (78%)
O1037	HO224405	elongation factor-1 alpha	Zebra fish	gi:53734016	29/32 (90%)
O5029	HO224425	elongation factor-1 alpha	Common carp	gi:28628941	31/51 (60%)
<i>Transport</i>					
O2009	HO224408	alpha-globin	Common carp	gi:2208885	39/46 (84%)
O2031	HO224416	alpha-globin	Common carp	gi:30507	58/68 (85%)
O2098	HO224422	alpha-globin	Common carp	gi:2208885	39/46 (84%)
O5031	HO224427	beta-globin	Korean catfish	gi:13241083	58/75 (77%)
O5045	HO224428	glucose transporter X	Grass carp	gi:30025447	36/71 (50%)
<i>Metabolism</i>					
O1006	HO224398	pyruvate dehydrogenase alpha 2	Human	gi:157696476	73/77 (94%)
O2012	HO224409	pyruvate dehydrogenase beta	Horse	gi:100050581	107/161 (66%)
O1011	HO224399	cytochrome c oxidase subunit III	Smallmouth bass	gi:209427679	28/49 (57%)
<i>Signaling and communication</i>					
O2072	HO224420	kinase C and casein kinase substrate	zebrafish	gi:404601	34/82 (41%)

ตารางที่ 2 ยีนฐานในเลือดปลาน้ำจืดเทศเมียนอกฤดูวางไข่

Clone No.	Accession No.	Putative identification	Closest species	Accession No.	Amino identity
<i>Ribosomal protein</i>					
A1009	HO224382	ribosomal protein L5	African lungfish	gi:44966839	42/79 (53%)
A1026	HO224386	ribosomal protein L37	Human	gi:119576406	31/34 (91%)
A1027	HO224387	ribosomal protein L11	Black-legged tick	gi:67084007	46/56 (82%)
<i>Translational factors</i>					
A1034	HO224392	elongation factor-1 alpha	Common carp	gi:28628941	31/51 (60%)
A2003	HO224393	zinc finger	Mouse	gi:126328549	61/69 (88%)
<i>Transport</i>					
A1017	HO224385	alpha-globin	Common carp	gi:2220885	21/23 (91%)
A1007	HO224381	beta globin	Korean catfish	gi:13241083	39/46 (84%)
A3011	HO224394	hemoglobin beta	Korean catfish	gi:13241983	61/83 (73%)
A1015	HO224384	hemoglobin-beta	Channel catfish	gi:24111232	17/19 (89%)
<i>Metabolism</i>					
A1012	HO224383	ubiquinol-cytochrome c reductase core I	Rainbow trout	gi:18496665	102/166 (61%)
A1028	HO224388	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	Zebrafish	gi:47087391	53/68 (77%)
<i>Internal/external structure and motility</i>					
A1006	HO224380	alpha 3 actin	Amberjack	gi:47550655	17/22 (77%)
A1030	HO224390	WW domain binding protein 2	Channel catfish	gi:86370962	124/145 (85%)
<i>Other</i>					
A1032	HO224391	ORF2-encoded protein	Zebrafish	gi:77403694	17/48 (35%)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบยีนแสดงออกในเลือดปลาปักเพศเมียระหว่างฤดูวางไข่และนอกวางไข่

Putative identification	Closest species	Accession No.	Amino identity	Frequency	
				Ovulation	Out ovulation
Ribosomal protein					
ribosomal protein L5	African lungfish	gi:44966839	42/79 (53%)	-	2
ribosomal protein L7	Channel catfish	gi:336710	69/92 (75%)	1	-
ribosomal protein L11	Black-legged tick	gi:67084007	46/56 (82%)	-	1
ribosomal protein L23a	Zebra fish	gi:335539	37/39 (94%)	1	-
ribosomal protein L24	Zebra fish	gi:37747968	54/72 (75%)	1	-
60S Acidic ribosomal protein P1	Zebrafish	gi:336719	37/39 (94%)	1	-
60S Ribosomal protein L37	Human	gi:119576406	31/34 (91%)	1	1
Immune-relate					
FBP32 precursor	Zebra fish	gi:139949081	85/142 (59%)	1	-
intercellular adhesion molecule 2	Human	gi:62089342	23/25 (92%)	1	-
MHC class II beta chain	Channel catfish	gi:1763555	157/200 (78%)	1	-
Ovulation					
activin A type II like 1 receptor	Zebra fish	gi:24111232	203/218 (93%)	2	-
cystatin precursor	Northern pike	gb:ACO09585.1	37/73 (50%)	1	-
Translational factors					
elongation factor-1 alpha	Zebra fish	gi:53734016	29/32 (90%)	2	1
eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Zebrafish	gi:335370	133/170 (78%)	2	-
zinc finger	Mouse	gi:126328549	61/69 (88%)	-	1
Transport					
alpha-globin	Common carp	gi:2220885	21/23 (91%)	3	1
beta-globin	Korean catfish	gi:13241083	39/46 (84%)	1	3
glucose transporter X	Grass carp	gi:30025447	36/71 (50%)	1	-
Metabolism					
cytochrome c oxidase subunit III	Smallmouth bass	gi:209427679	28/49 (57%)	1	-
pyruvate dehydrogenase alpha 2	Human	gi:157696476	73/77 (94%)	1	-
pyruvate dehydrogenase beta	Horse	gi:100050581	107/161 (66%)	1	-
ubiquinol-cytochrome c reductase	Rainbow trout	gi:18496665	102/166 (61%)	-	1
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	Zebrafish	gi:47087391	53/68 (77%)	-	1
Internal/external structure and motility					
alpha 3 actin	Amberjack	gi:47550655	17/22 (77%)	-	1
WW domain binding protein 2	Channel catfish	gi:86370962	124/145 (85%)	-	1
Signaling and communication					
protein kinase C and casein kinase substrate	Zebrafish	gi:404601	34/82 (41%)	1	-
Other					
ORF2-encoded protein	Zebrafish	gi:77403694	17/48 (35%)	-	1
Unknown genes					
unknown genes				12	12



ภาพที่ 6 สัดส่วนยีนแสดงออกในเลือดแม่ปลาปีระหว่างฤดูวางไข่และนอกฤดูวางไข่

กลุ่มต่างๆ ของโปรตีนจากยีนแปรรหัส และสัดส่วนร้อยละ ดังนี้

กลุ่มของโปรตีนจากยีนแปรรหัส	Ovulation	Out-ovulation
1. ribosomal proteins	13.16	10.71
2. immune-relate proteins	7.89	3.57
3. structural proteins	0	3.57
4. ovulate proteins	7.89	0
5. receptors and reception-associated proteins	10.53	14.29
6. hormones and their regulatory proteins	0	0
7. enzymes and enzyme activity regulators	10.53	0
8. translational factors	15.79	7.14
9. transcriptional factors, DNA and RNA binding proteins	0	7.14
10. development and cell-cycle-related proteins	0	10.72
11. secretary proteins and others	2.63	0
12. unknowns	31.58	42.86

2) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่

จาก EST clones ทั้งหมดที่ได้ พบว่า มี จำนวน 2 EST clones ที่คาดว่า เป็น โปรตีนเกี่ยวข้องกับโปรตีนการตกไข่ 2 ชนิด ดังรายละเอียด ต่อไปนี้

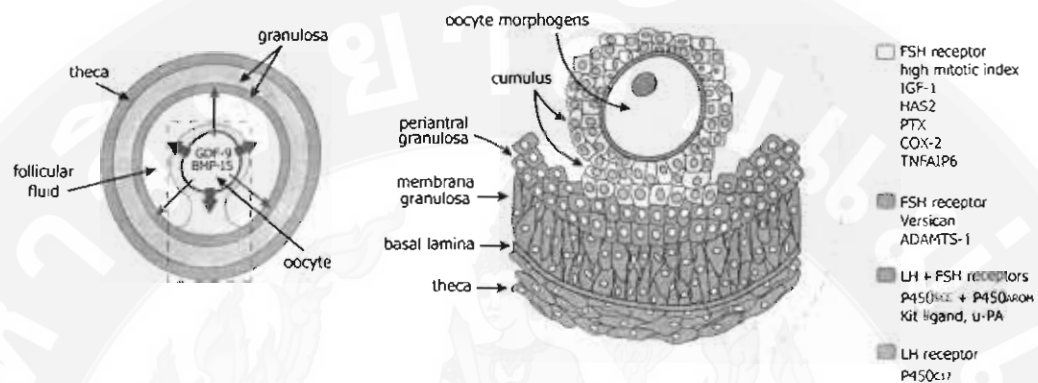
Activin A receptor

activin A receptor หรือ activin type I receptor (ACVR1) หรือ ALK-2 Activins เกี่ยวข้องกับขบวนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและเป็น differentiation factors ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ transforming growth factor-beta (TGF beta) superfamily หน้าที่เป็นโปรตีนส่งสัญญาณ (signaling proteins) activins ส่งสัญญาณผ่าน heteromeric complex ของ receptor serine kinases ซึ่งประกอบด้วย type I และ type II receptors โดย type I receptor มีความสำคัญในการเกาะจับของ activin ส่วน type II receptor เป็นส่วนช่วยในการจับ และเกี่ยวข้องโดยตรงกับขบวนการ SMAD (ภาพที่ 9) ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในการสร้างเซลล์ใหม่

Hillier (1991) รายงานว่า โปรตีนชนิดนี้มีผลต่อการควบคุมการหลั่งสาร follicle-stimulating hormone (FSH) ในกระบวนการตกไข่ในมนุษย์ Williams และ Erickson (2008) ระบุว่า activin A receptor ในขบวนการ preantral folliculogenesis ซึ่งเป็นการพัฒนาของ follicle ระยะแรก เกิด activin autocrine/paracrine mechanism กลไกนี้เกิดที่ส่วน granulosa cells และ periantral granulosa cells เป็นขบวนการกระตุ้นการจับฮอร์โมน FSH เพื่อพัฒนาการตกไข่ต่อไป (ภาพที่ 8)

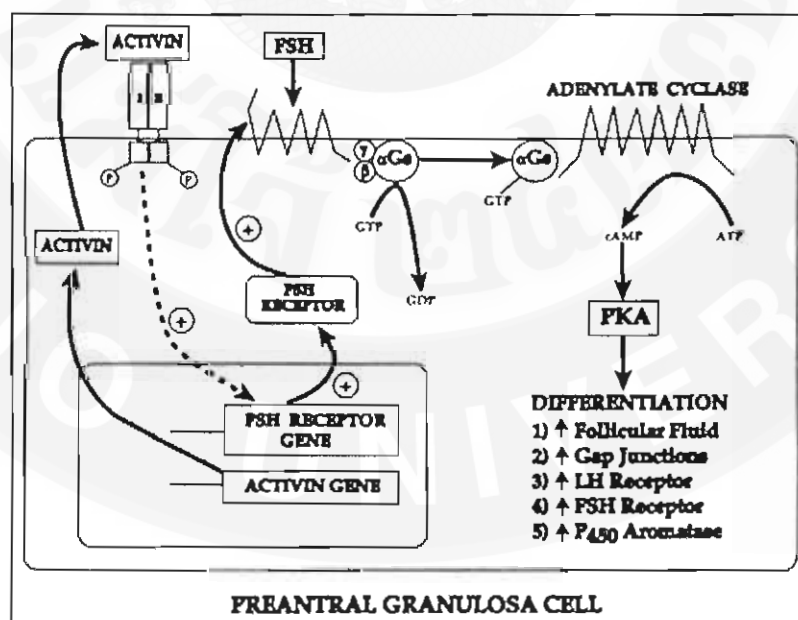
activin A receptor จากปลาบึกมีความเหมือนกับยีนนี้ของปลาม้าลาย (*Danio rerio*) 93% (203/218 amino acids) ที่ด้าน C-terminus ลำดับที่ 272-489 ดังภาพที่ 10 โดยมีตำแหน่งอนุรักษ์ต่างๆ ได้แก่ ATP binding site, substrate binding site (ภาพที่ 11A) และ Protein Kinases (PKs), catalytic (c) domain (ภาพที่ 11B) ที่ด้าน N-terminus

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของอะมิโนแอซิดของ activin A receptor ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (ภาพที่ 12) พบว่า โปรตีนนี้ของปลาบึกมีตำแหน่ง motif สำคัญทั้ง 2 ตำแหน่ง คือ Protein kinases ATP-binding motif site (PK site) ที่ด้าน N-terminus และ Serine/Threonine protein kinases motif site (S/T site) ที่ด้าน C-terminus



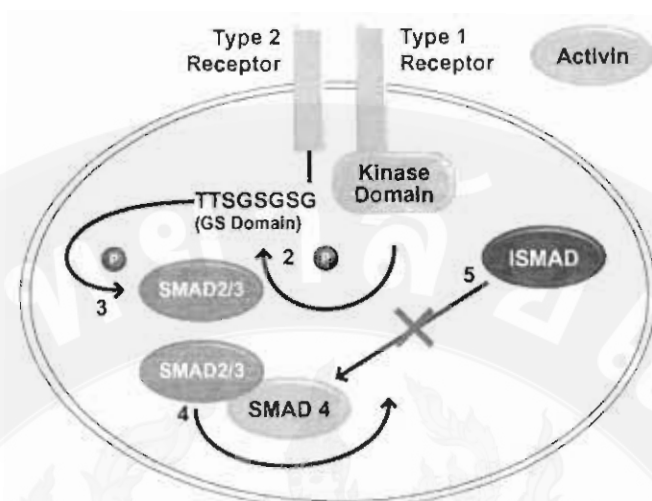
ภาพที่ 7 An oocyte morphogen gradient influences granulosa cell phenotypes

ที่มา : Erickson and Shimasaki, 2000



ภาพที่ 8 กลไก activin autocrine/paracrine mechanism เพื่อพัฒนาการตกไข่

ที่มา : Erickson, 1997



ภาพที่ 9 Activin/SMAD signaling pathway

ที่มา : www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11242&pid=10039

```
>ref|NP_705929.1| activin A receptor type II-like 1 [Danio rerio]
gb|AAM53074.1|AF435024_1 serine/threonine kinase receptor [Danio rerio]
gb|AAM53075.1|AF435025_1 serine/threonine kinase receptor [Danio rerio]
Length=499

GENE ID: 266753 acvr1l | activin A receptor type II-like 1 [Danio rerio]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 418 bits (1074), Expect = 2e-115
Identities = 203/218 (93%), Positives = 211/218 (96%), Gaps = 0/218 (0%)
Frame = +3

Query 3 HELGSLYDFLQYNTLDPEACLMCLSIASGLVHLHTEILTQGKPAIAHRDLKSRNILVK 182
        HELGSLYDFLQY+TLDPE CL MCLSIASGLVHLHTEIL+TQGKPAIAHRDLKSRNILVK
Sbjct 272 HELGSLYDFLQYSTLDPEGLRMCLSIASGLVHLHTEILTQGKPAIAHRDLKSRNILVK 331

Query 183 RNGQCCIADLGLAVIHSQSNQNDYLDVGNPNRVGTRKRYMAPEVLDESIRVDIFESYKQTDIW 362
        RNGQCCIADLGLAVIHSQSYLDVGNPNRVGTRKRYMAPEVLDE+IRVD+FESYKQTDIW
Sbjct 332 RNGQCCIADLGLAVIHSQSTDYLDVGNPNRVGTRKRYMAPEVLDETIRVDVFESYKQTDIW 391

Query 363 ALGLVLWEITRRTIVNGIVEEYRPPFFDVPSDPSFEEMKKVVCVDQYRPLHNRLHSH 542
        ALGLVLWEITRRTIVNGIVEEYRPPFFDVPSDPSFEEMKKVVCVDQ+RP LHNRLHSH
Sbjct 392 ALGLVLWEITRRTIVNGIVEEYRPPFFDMVPSDPSFEEMKKVVCVDQHRPSLHNRLHSH 451

Query 543 ILSAIAKIMKECFQSPSARLTALVRKTLAKLDQDQD 656
        ILSAIAKIMKECFQSPSARLTALVRK+L+KLDQD D
Sbjct 452 ILSAIAKIMKECFQSPSARLTALVRKSLSKLDQDHD 489
```

ภาพที่ 10 BLASTX alignment ของ EST clone O1024

A. Nucleotide and deduced peptide

TCCACGAGCTGGGCTCTCTCTATGACTTCCTGCAGTACAACACCTTGGATCCTGAGGCGTGTTTGTGCATGTGCCTGTCGATAGCCAGCG 90
H E L G S L Y D F L Q Y N T L D P E A C L C M C L S I A S G 30

GCCTGGTACACCTTCACACAGAAATCCTCTTACCACTCAGGGCAAGCCGGCCATCGCCCACCGTGACCTCAAAAGCCGCAACATCCTGGT 180
L V H L H T E I L T T Q G K P A I A H R D L K S R N I L V K 60

GAAGAGGAACGGCCAGTGCTGCATCGCTGACCTGGGTCTGGCTGTCATTTCATTCTCAGTCCAACGATTACCTGGACGTAGGGAACAACCC 270
R N G Q C C I A D L G L A V I H S Q S N D Y L D V G N N P R 90

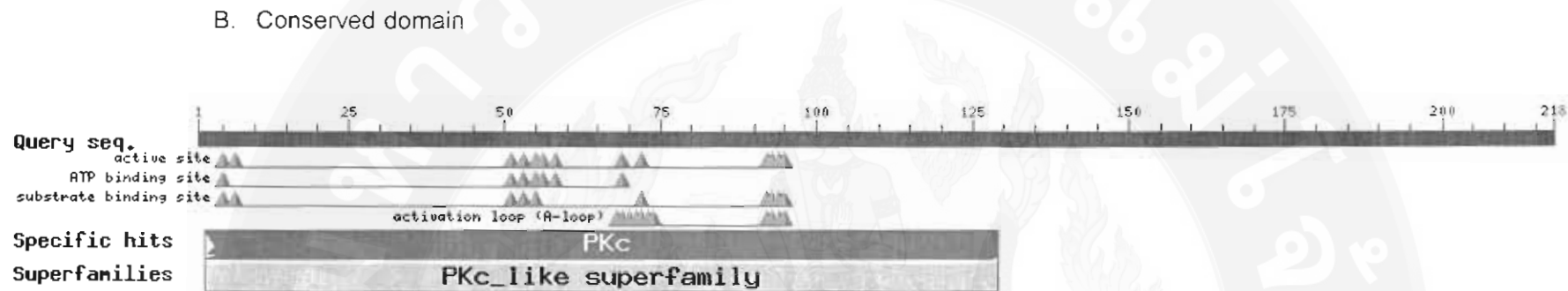
AAGGGTGGGCACCAAACGCTACATGGCCCCTGAGGTCTAGATGAGAGTATCCGTGTGGACATCTTTGAATCATACAAGCAGACTGATAT 360
V G T K R Y M A P E V L D E S I R V D I F E S Y K Q T D I W 120

CTGGGCTTTGGGACTGGTTTTGTGGGAGATCACCCGCCGAACCATCGTAAATGGAATTGTGAGGAGTATCGCCTGCCTTTTTTTTGACGT 450
A L G L V L W E I T R R T I V N G I V E E Y R L P F F D V V 150

GGTGGCCTCCGACCCCAGTTTTGAAGAGATGAAGAAAGTGGTGTGTGTGGACCAGTACAGGCCTTGCCCTTCACAACCGACTGCACTCCCA 540
P S D P S F E E M K K V V C V D Q Y R P C L H N R L H S H P 180

TCTCGATTCTGTCTGCTATAGCTAAAATCATGAAGGAGTGCTGGTTCCAGAGTCCCTCAGCTCAAGTCTCACTGCCCTGCGTGTGCGTAA 630
I L S A I A K I M K E C W F Q S P S A R L T A L R V R K T L 210

GACCCTGGCAAAGCTGGACCAAGACCAAGACTGCA 666
A K L D Q D Q D 218



C. Description of domain analysis

	Description	PssmId	Multi-dom	E-value
[+] PKc[cd00180], Protein Kinases (PKs), catalytic (c) domain.		173623	yes	1.18e-24

ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ *P. gigas* activin A receptor (EST clone O1024)

- A. ลำดับของอะมิโนแอซิดอยู่ที่ตำแหน่งแรกของ codon
B. และ C. ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งโดเมน

```

01024      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100
human      : -----MTLGSPRKOLLHLHML--VTQDDPVKPSR-----GPLVTCCTESP-HCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRUPQEHROCGNLMRELCRGRTEFVIMHYCCDSHLCHMNV : 100
cattle     : -----MTLMLPRRLHLHLIALG-LTQDDPLKPSR-----GPLVTCCTENP-HCKRPTCQGSWCTVVLVWEDQ-HLREYRCQNDGPEVCRARPEFVIMHYCCXSPLCHMNV : 100
rat        : -----MTLGIFRRVFLHLVVALG-LTKGDLVKPSR-----GQLVNCCTENP-HCKRPTCQGAWCTVVLVREGRUPQVYRGCGLNQLCLGRPTFVIMHYCCYRSCCHMNV : 101
zebrafish  : -----MKASVHLAVLPVLVYSGYATTADHLHETS TLKQDESSLQCSCENTMLCENNWCORICFYTSV-----HGRVVRGC-FQTAEQCVPAIPGVYTKCCYTHHCNAMLT : 102
hydra      : -----

01024      *          120          *          140          *          160          *          180          *          200          *
human      : -----LVLEATQPPSEQPGTGGQALILGPVLALLALVALGVGLWVRRRQEKQRGLHSELGESSILKASEQGDSDLGDLSDCTTGSGGLPFLVQRTVARQVALVE : 208
cattle     : -----LTLEATQTAPQPGQDGLPLILOPVLAFVLVALGALGLWVRRRQEKQRGLHSELGESSILKASEQGDSDLGDLSDCTTGSGGLPFLVQRTVARQVALVE : 208
rat        : -----LHLEATQTPSEPEVDAMLPLILGPVLALLVLVALGTLGLWVRRRQEKQRGLHSELGESSILKASEQGDSDLGDLSDCTTGSGGLPFLVQRTVARQVALVE : 209
zebrafish  : -----MPEKPVKPK-----IRVILLVGVPLLVLIAMAAAGLVWLR---TRRQYCHPVEHDTMLKVPSCGDPYEGDIFDEFCYSGSGTGLPYLVQRTMARQISLVE : 200
hydra      : -----MEAAIYIYRIYKIKKQKNSNDRQVMLPPDEKTE-----STCSTGLKS---KLAQRSPAREISTYKLV : 61
              x              o g              l q r a r v e

01024      220          *          240          *          260          *          280          *          300          *          320
human      : -----HELGSLYDFLQXHTLDPEACLMCLSIASGLVHLHTE : 37
cattle     : -----GKGRYGEVVRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWFRETEIYNTVLLRHQNLGFIASDMTSRNSSSTQLWLITHYHENGSLYDFLQRTLEPHLALRLAVSAACGLAHLHVE : 316
rat        : -----GKGRYGEVVRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWFRETEIYNTVLLRHQNLGFIASDMTSRNSSSTQLWLITHYHENGSLYDFLQRTLEPHLALRLAVSAACGLAHLHVE : 316
zebrafish  : -----GKGRYGEVVRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWFRETEIYNTVLLRHQNLGFIASDMTSRNSSSTQLWLITHYHENGSLYDFLQRTLEPHLALRLAVSAACGLAHLHVE : 317
hydra      : -----GKGRFSVYITGLYQDQVLAVKIVDESDEYSWQREQHEFYKGYLCHENILSFYIADIVERN-TVARNLITQYHFGSLCTFLQNHSDFSIFERLVYSSVCGIRYLHNP : 160
              q y r v u          n r k i          d e s w r e          y t l h n i l f i          d          n          I t H e G S L y d F L Q          3 l p          1 6          S a          G 6          h L H e

01024      *          340          *          360          *          380          *          400          *          420          *
human      : -----ILTTQCKPATAHRLDKSRHILVKRNGQCCIADLGLAVIHSQSDYLDVGNPVRVGTGRVMAPEVLDESIRV-DIFESYKQTDIWAFLGLVWEITRRTIVNGIVEEYRL : 144
cattle     : -----IFGTQCKPATAHRLDKSRHILVKSNLQCCIADLGLAVMHSQSDYLDIGNPVRVGTGRVMAPEVLDEQIRT-DCFE SYKWTDIWAFGLVWEIARRTIIVNGIVEDYRP : 423
rat        : -----IFGTQCKPATAHRLDKSRHILVKSNLQCCIADLGLAVMHSQSDYLDIGNPVRVGTGRVMAPEVLEEQIRT-DCFE SYKWTDIWAFGLVWEIARRTIIVNGIVEDYRP : 423
zebrafish  : -----ILSTQCKPATAHRLDKSRHILVKRNGQCCIADLGLAVIHSQSDYLDVGNPVRVGTGRVMAPEVLDETIRV-DVFESYKQTDIWAFLGLVWEITRRTIVNGIVEEYRP : 415
hydra      : -----ISGSHCKPATAHRLDISSRHILVKDNLQCCISDLALAVEENAG-ESKLISSKAKLPMPRYMAPEVLNPFYSTNQTSFYQKADMYSLVHWIILLRYEIEGVAEPYRL : 275
              I          3 q C K P A T A H R D I S S R H I L V K D N L Q C C I S D L A L A V E E N A G - E S K L I S S K A K L P M P R Y M A P E V L N P F Y S T N Q T S F Y Q K A D M Y S L V H W I I L L R Y E I E G V A E P Y R L
              I          3 q C K P A T A H R D I S S R H I L V K D N L Q C C I S D L A L A V E E N A G - E S K L I S S K A K L P M P R Y M A P E V L N P F Y S T N Q T S F Y Q K A D M Y S L V H W I I L L R Y E I E G V A E P Y R L

01024      440          *          460          *          480          *          500          *          520
human      : -----PFEDVVPNDPSPFEDMKKVVCDQYRPLHNRLHSHPIILSAIAKDKCEWFGSPSARLTALRVKRTLAHLDDQDQD----- : 218
cattle     : -----PFYDVVPNDPSPFEDMKKVVCDQYRPTIPNRLAADPVLSGLAQHREWCYYPNP SARLTALRIKKTLOKLSNHP-----KPKVIQ----- : 303
rat        : -----PFYDVVPNDPSPFEDMKKVVCDQYRPTIPNRLAADPVLSGLAQHREWCYYPNP SARLTALRIKKTLOKLSNHP-----KPKVIQ----- : 303
zebrafish  : -----PFEDVVPNDPSPFEDMKKVVCDQYRPLHNRLHSHPIILSAIAKDKCEWFGSPSARLTALRVKRTLAHLDDQDQD----- : 304
hydra      : -----PFQYVGLNPSTHETDIIINVKLTPEIPKGYILDQNRNIIKSMKNSKYSANRSFYSLKSLNKKCHQEKTKLTEIGDTSNNTCSTTVT : 367
              P F d V p I P S f e M K K 6 6 c V d q          P          6          n d l          p          l s          6 a          M 4 e c w          p s a R L 3 a l R 6 4 K 3 L          K

```

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนเอซิดของ activin A receptor ในปลาปัก (EST clone O1024) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยแสดงตำแหน่ง protein kinases ATP-binding motif site (PK site) และ serine/threonine protein kinases motif site (S/T site)

human : *Homo sapiens* (np:001104537.1), cattle : *Bos Taurus* (gb:AA133312.1); rat : *Rattus norvegicus* (gb:EDM00402.1); zebrafish : *Danio rerio* (gi:24111232); hydra : *Hydra magnipapillata* (dbj:bab29802.1)

Cystatin precursor

cystatins ได้ถูกค้นพบครั้งแรกไขขาวของไข่ไก่ในปลายทศวรรษ 1960 โดย Whitaker (Colella et al., 1989) เป็นกลุ่ม superfamily ของ cysteine protease inhibitors มีรายงานพบได้ในทุกสิ่งมีชีวิต แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ type 1 cystatins (A และ B) เรียกว่า กลุ่ม stefins เป็น intracellular proteins ส่วน type 2 cystatins (C, D, E/M, F, G, S, SN และ SA) เรียกว่า กลุ่ม cystatins เป็น extracellular proteins ในขณะที่ type 3 cystatins (L และ H-kininogens) เรียกว่า กลุ่ม kininogens เป็น intravascular proteins โปรตีนกลุ่มนี้ทำงานหลายหน้าที่ ได้แก่ ยับยั้งกลไก cysteine peptidases ของเอนไซม์ papain (C1) family และชนิดยับยั้งกลไกของเอนไซม์ legumain (C13) family ได้ กลไกการยับยั้งทำโดยการเกาะจับและเป็นแบบ reversible inhibitor การยับยั้งเป็นแบบไม่จำเพาะ มีทั้งแบบ endo- และ exo-peptidase

โปรตีนกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการทางสรีระหลายขบวนการ ได้แก่ intracellular protein degradation เช่น cathepsins B, H และ L เป็นส่วนสำคัญในขบวนการเสริมสร้างกระดูก เช่น cathepsin K เกี่ยวข้องในขบวนการกำจัดเชื้อโรค เช่น cathepsin S และ mammalian legumain เกี่ยวข้องในขบวนการของระบบภูมิคุ้มกันและการแข็งตัวของเลือด และเกี่ยวข้องกับกลไกที่มีการเพิ่มการทำงานของ peptidases เช่น ลักษณะการเกิดโรคสรีระของการกระจายมะเร็งและการอักเสบ การติดเชื้อโปรโตซัวและแบคทีเรียที่มีผลต่อเยื่อของเจ้าบ้าน นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้า cystatins ถูกลดการทำงานลงหรือล้มเหลว จะมีผลต่อการเกิดโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคจากเชื้อจุลินทรีย์ กลไกการสร้างเซลล์ประสาท (neurodegeneration) โรคเกี่ยวกับเส้นเลือดหัวใจ (cardiovascular diseases) โรคกระดูกพรุน โรคไขข้ออักเสบ และมะเร็ง ส่วนความชัดเจนที่เกี่ยวข้องในขบวนการตกไข่และการพัฒนาของไข่และตัวอ่อนยังอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัย (Barrett, 1986; Abrahamson et al., 2003; Jones et al., 2005; Turk et al., 2008)

cystatins ถูกสร้างเป็น precursor และส่วนใหญ่โปรตีนทำงานจะมีขนาด 110-120 อะมิโนแอซิด และเป็นกรด โครงสร้างประกอบด้วย conserved cysteine 4 ตำแหน่ง ซึ่งจะประกอบเป็น 2 disulfide bonds และอาจมีส่วนของ glycosylated หรือ phospholeated

ในปลาคาร์พ cystatin 12 kDa ซึ่งประกอบด้วยยีน cDNA ขนาด 531 bp รูปแบบ precursor มีขนาด 129 residues เป็นส่วน signal peptides 18 residues และ mature protein muj, อะมิโนแอซิด 111 residues ที่น่าสนใจมาก คือ พบว่า cystatin นี้มีแสดงออกและ

สะสมเฉพาะที่รังไข่ของปลาเท่านั้น และยังพบว่า ระดับการแสดงออกของยีนนี้ มีความแตกต่างกัน ในการให้อาหารและฤดูวางไข่ กลุ่มวิจัยคาดว่า cystatins แต่ละชนิดน่าจะทำงานแต่อย่างที่มีความจำเพาะ (Tsai et al., 1996) แต่จากการวิจัยนี้พบยีน cystatin ในเซลล์เลือดของแม่ปลา ระยะวาง

cystatin มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ cysteine proteases ในขบวนการ vitellogenin เพื่อสร้าง yolk protein ในไข่เดือนดิน (*Caenorhabditis elegans*) (Sarwar et al., 2006)

cystatin precursor จากปลาก็มีความเหมือนกับยีนนี้ของปลา 2 ชนิด ดังนี้ rainbow smelt 50% (37/73 amino acids) จากลำดับที่ 59-129 และ Northern pike 39% (48/123 amino acids) จากลำดับที่ 18-130 (ภาพที่ 14) โดยมีตำแหน่งอนุรักษ์ของ protease inhibition site ด้าน N-terminus และ cystatin-like domain (ภาพที่ 15B) เมื่อเปรียบเทียบกับ โปรตีนของสิ่งมีชีวิตอื่น พบว่า โปรตีนนี้ของปลาก็มีตำแหน่งอนุรักษ์ของ cysteine proteases inhibitors motif site (CPI site) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 16) จากผลการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank *P. gigas* cystatin มีลักษณะคล้าย cystatin C



ภาพที่ 13 โครงสร้างโปรตีน cystatin C ของมนุษย์

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Cystatin_C

>gb|AC009585.1| Cystatin precursor [Osmerus mordax]
Length=130

Score = 87.4 bits (215), Expect = 1e-15
Identities = 37/73 (50%), Positives = 53/73 (72%), Gaps = 2/73 (2%)
Frame = +1

```
Query 151 VVNVIraqTQVVAGVKYIFTVEMAKTSCKKSEdENTCATNSDTTIAQPHECKLAVWSCSK 330
          V VI+ Q QVVAG+KYIFTV+MA+TSC+K E TCA + D +A+P++CK VW S+
Sbjct 59 VAKVIKQKQVVAGIKYIFTVDMARTSCRKGAETTCAIHEDPQVARPYQCKFEVW--SR 116

Query 331 PWVPSMMLIENTC 369
          PW+ + +++N C
Sbjct 117 PWISDIRVVKNEC 129
```

>gb|AC014463.1| Cystatin precursor [Esox lucius]
Length=132

Score = 85.5 bits (210), Expect = 4e-15
Identities = 48/123 (39%), Positives = 72/123 (58%), Gaps = 10/123 (8%)
Frame = +1

```
Query 1 VASADLVGSPVDTDINNTE*SC*SRMPCVSWQAVARYNAERLF*LHVHQ*VVNVIraqTQ 180
          VAS +VG+P D D+N+ + AV +N +R +++ Q V +V++AQ Q
Sbjct 18 VASEKMGAPSDADMND-----QGLKNALQFAVVEHN-KRTNDMYIRQ-VASVVKaQKQ 69

Query 181 VVAGVKYIFTVEMAKTSCKKSEdENTCATNSDTTIAQPHECKLAVWSCSKPWVPSMMLIE 360
          VVAG+KYIFTV M +T CKKS E C+ + D +A + C VW S+PW+ + L++
Sbjct 70 VVAGIKYIFTVMGRTPCKKSGAETNCSVHEDPGMAATYRCTFEVW--SRPWMSDIQLLK 127

Query 361 NTC 369
          N C
Sbjct 128 NDC 130
```

ภาพที่ 14 BLASTX alignment ของ EST clone O5030

A. Nucleotide and deduced peptide

GTGGCGAGTGCTGACTTGGTCGGAAGCCCGGTGGATACAGACATCAACAACACGGAATAATCATGTTAGTCCAGGATGCCCTGCGTTTCT	90
V A S A D L V G S P V D T D I N N T E * S C * S R M P C V S	30
TGGCAGGCAGTCGCTCGGTATAACGCAGAGAGACTCTTTTAACTGCATGTACACCAGTAGGTTGTGAATGTGATCAGGGCCCAGACACAG	180
W Q A V A R Y N A E R L F * L H V H Q * V V N V I R A Q T Q	60
GTTGTTGCCGGTGTGAAGTACATCTTCACTGTGAGATGGCTAAGACTTCCTGTAAAAATCAGAAGATGAAAACACGTGTGCCACCAAT	270
V V A G V K Y I F T V E M A K T S C K K S E D E N T C A T N	90
TCGGACACAACGATCGCACAACCCCATGAATGCAAACCTGCAGTGTGGTCTTGCAGTAAGCCTTGGGTGCCCAGCATGATGCTGATTGAG	360
S D T T I A Q P H E C K L A V W S C S K P W V P S M M L I E	120
AATACCTGCTAATAGAGATCACTTTCAATCAAACTGATGAGCTTGTTTAAGAGGTTAAATAGGGAATATAATAGCACTTTACAATGTAC	450
N T C *	123
GTTGTACTTTTTAGCCTCCTCTTGGCCTAACATATTCTATCAACTAACACCATCGTGTGATAATCTAGGCTCTGAGATTAGAAAAGGTTG	540
TTTGCAGGGGGGAAAAAAGGTTGTAGAATGTAACAGAACTTATTAAAGTATATAGCTCGAAGTGCTATTATTGATTATAATAAAAGGTT	630
TTTGTGAATGC	641

B. Conserved domain



C. Description of domain analysis

	Description	PssmId	Multi-dom	E-value
[+]CY[cd00042], Cystatin-like domain; Cystatins are a family of cysteine protease inhibitors that occur...		28923	yes	2.16e-14

ภาพที่ 15 การวิเคราะห์ *P. gigas* cystatin precursor (EST clone O5030)

- A. ลำดับของอะมิโนแอซิดอยู่ที่ตำแหน่งแรกของ codon
- B. และ C. ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งโดเมน

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
05030 : -----VASADLVGSPVDTINNYESCSRHPCVSWQAVARYHAERLFHVVHVVVNVIRAQTQVVAIVKYLEFTVTHAKYSCCKS-EDENTCAT : 85
human : MAQHLSLTLILLATLAVALAHSPEEDRIIPGGIYNADLNDEWVQRALH----FAISEYNKATKDDYYRRPLRVLRARQTVGGVHTYFDVTVGRITCKSQPMLDTCAF : 106
pick : -----MDDWKIVVPLLAVALTVASEKRVGAPSDADMDQGLKALQ----FAVVEHKKRTNDHYIRQVASVVKAKQVVAIGIKYIFTVTHGRTPCKKS-GAETNCSV : 98
chicken : MAGARGCVVLAALHLVGAVLGSEDRSRLGAPVPVDEDEGLQRALQ----FAMAENRASNDKYSRVVVRVISAQRQLVSGITNYTLQVIGRTTCPKSSGDLQSCDF : 106
salmon : -----MDDWKIVVPLLAVALTVASAGLIGCPHDANDQGLTRDALQ----FAVVEHKKSNDFVRQVAKVVKAKQLVSGIKYIFTVTHGRTPCKKS-GVEKVCSE : 98
solf_tick : -----MIRSAVVLTVLVGVCLAQRGFVGWSDPKIRPDILLEAH---PAVASQTAG--LEYDHTVLELTKASQVVAIGVHTYTLKVAIPSKCKVS-ETVYSKEL : 95
      G      1 n      6      EA6      n      v      6      A      Q      V      Q      6      Y      6      6      3      C      ks      o

      120      *      140
05030 : NSDTTIAQPHCKLAVWS----- : 103
human : MEQPELQKKQLCSFEIYEVFWENRRSLVKSRCQES : 141
pick : HEDPGMAATYRCTFEVWSRPWMSDIQLLKNDCPQ- : 132
chicken : KDEPEMAKYTTCTFVWYSIPWLNQIKLLESKCQ-- : 139
salmon : HKDTQMAAPYKCTFEVWSRPWLSDIQMVKNQCKQ- : 132
solf_tick : CQPQLMAAPKDCERQLYVFWRNRYKEVTSEFCN-- : 120
      a      C      63      pw      c
  
```

CPI site

ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับอะมิโนแอซิดของ cystatin precursor ในปลาปัก (EST clone O5030) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยแสดงตำแหน่ง cysteine proteases inhibitors motif site (CPI site)

human : *Homo sapiens* (emb:CAA36497.1); Northern pick : *Esox lucius* (gb:ACO14463.1); chicken : *Gallus gallus* (gb:AAA48744.1); Atlantic salmon : *Salmo salar* (gb:ACI68292.1), solf tick : *Ornithorhynchus anatinus* (gb:ACH45790.1)

3) ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

ได้พบ EST clones 4 ยีนของโปรตีน 3 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการระบบภูมิคุ้มกัน ดังรายละเอียด ต่อไปนี้

MHC class II

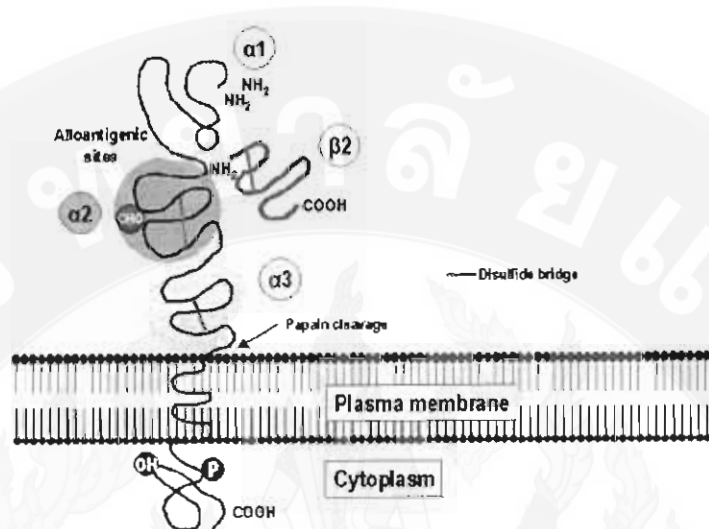
major histocompatibility complex (MHC) เป็น transmembrane protein ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ humoral และ cell-mediated immune response ยีนของ MHC มีความหลากหลาย (polymorphic) สูง มีหลาย alleles MHC แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ใหญ่ คือ MHC class I และ class II MHC class I พบในเซลล์ที่มีนิวเคลียส แต่ MHC class II พบเฉพาะในเซลล์ชนิด antigen presenting cells (APCs) ได้แก่ dendritic cells, macrophages, B cells และอาจพบในเซลล์อีกบางชนิด

MHC class II ประกอบด้วย 2 สายเปปไทด์ที่แตกต่างกัน คือ alpha chain และ beta chain จับกันด้วยพันธะ non-covalent bond และในแต่ละสาย ประกอบด้วย disulfide bridge เพื่อรักษาโครงสร้าง ทั้ง alpha และ beta chain เป็น glycosylated ส่วน beta chain มักจะสั้นกว่า alpha chain และประกอบด้วย alloantigenic sites (ภาพที่ 17)

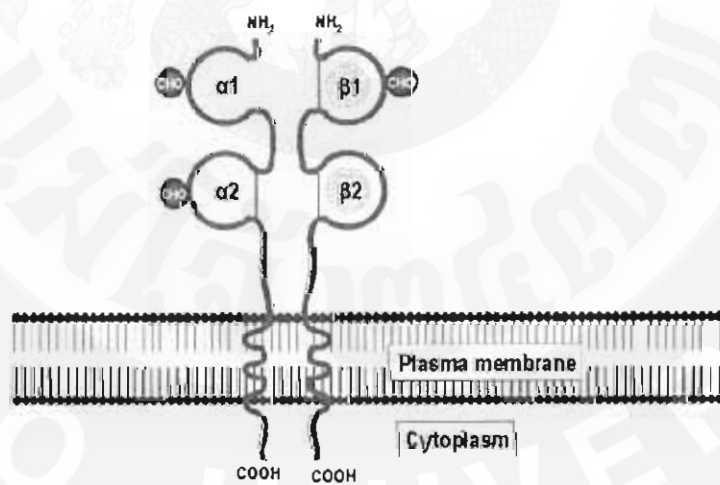
Sültmann และคณะ (1993, 1994) ทำการศึกษา MHC genes ของปลาม้าลาย (Brachydanio rerio) ซึ่งเป็นรายงานแรกของยีนนี้ในปลากระดูกแข็ง โดยการหำนี้มีรายงานในปลาฉลาม ต่อมา Yoder และคณะ (1999) ได้รายงานพบ 2 ยีน ที่มีโครงสร้างของ MHC class II ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนของ MHCs ในปลาน้ำจืดมีความหลากหลายสูงมากกว่าสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม

MHC class II alpha และ beta chain ของปลาบึก มีความเหมือนกับยีนนี้ของปลาคอดอเมริกัน ที่ลำดับ 1-210 และ 1-241 ตามลำดับ (ภาพที่ 18) โดย alpha chain ประกอบด้วย MHC II alpha domain และ beta chain ที่ปลาย N-terminus และ Ig superfamily ที่ปลาย C-terminus ดังในภาพที่ 19B และ 21B ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบส่วนนี้ในปลาและมนุษย์ พบว่า alpha และ beta domains ของปลาบึกมีส่วนอนุรักษ์ที่สำคัญ (ภาพที่ 20 และ 22 ตามลำดับ)

A. MHC class I



B. MHC class II



ภาพที่ 17 โครงสร้างของ MHC class I และ class II

- A. MHC class I ประกอบด้วย 3 globular domains alpha 1 (สีเหลือง), alpha 2 (สีเขียว) and alpha 3 (สีฟ้า) โดยมักจะมี ส่วนของ non-MHC -encoded beta 2 microglobulin (สีชมพู) เกาะจับอยู่
- B. MHC class II ประกอบด้วย 2 ส่วนโปรตีนที่แตกต่างกัน เกาะกันด้วยพันธะ non-covalent โดยมีโครงสร้างเป็น loop

ที่มา : pathmicro.med.sc.edu/bowers/mhc.htm

A. EST clone A3017

> gb|AAD39869.1| MHC class II antigen [Ictalurus punctatus]
Length=235

Score = 394 bits (1013), Expect = 3e-108
Identities = 187/210 (89%), Positives = 195/210 (92%), Gaps = 0/210 (0%)
Frame = +1

```

Query  91  MRLFLLCFTLVCVKDTEAQNKLHHLQLSACSEKDKEFMIGDDGEVELYADFKKKDVTVMF  270
          MRLFLLCFTLVCVKDTEAQNK HHL+LSACSEKDKE+M+G DGE  YADF+KKD V
Sbjct  1   MRLFLLCFTLVCVKDTEAQNKFHHLELSACSEKDKEYMVGSDGEEMFYADFEKKDIVNAL  60

Query  271 PPFADPMQYPGFYEGAESRTANCQANLQVLSVEFKDKPLPHDAPQSSIIYARTGVQLGSEN  450
          PPFADP ++ G + AES+TANCQANLQVLSVEFKDKPLP DAPQSSIIYARTGVQLGSEN
Sbjct  61  PPFADPGEFTGGFAFAESKTANCQANLQVLSVEFKDKPLPDAPQSSIIYARTGVQLGSEN  120

Query  451 LLICHASRFFPPFVRVRWTKNNLDVTDKSSLSQYYPNDDETFNQFSLPFTPQEGDVYTC  630
          LLICHASRFFPPFVRVRWTKNNLDVTDKSSLSQYYPNDDETFNQFSLPFTPQEGDVYTC
Sbjct  121 LLICHASRFFPPFVRVRWTKNNLDVTDKSSLSQYYPNDDETFNQFSLPFTPQEGDVYTC  180

Query  631 TVQHEALQTPDTRTWEVNVLDLPSVGPAVFC  720
          TVQHEALQTPDTRTWEVNVLDLPSVGPAVFC
Sbjct  181 TVQHEALQTPDTRTWEVNVLDLPSVGPAVFC  210

```

B. EST clone O2089

> gb|AAB67871.1| MHC class II beta chain [Ictalurus punctatus]
Length=249

Score = 345 bits (886), Expect(2) = 2e-93
Identities = 171/241 (70%), Positives = 195/241 (80%), Gaps = 0/241 (0%)
Frame = +1

```

Query  4   MALLVKILLIVLPAVFSTARWTIFIGRNKSANTALRIYTTVYLQTHVYNKLMFLQYNSSL  183
          M+ L+KILLIVLPAV TA + + + Y++ + NK+ +L+YNS++
Sbjct  1   MSKLLKILLIVLPAVLHTAHGNFLSQPDWCISKEDLSDMEYIKPLIINKIKYLEYNSTV  60

Query  184 GKFGVGYTELGVKNAETANKDTAYLQGMKANLESTCKPNAKLYYENIFGQTVEPQVQVRSV  363
          GK VGYTELG+KNA+ NKD A++QG+KA L+S CK N YY I +TVEPQV+V+ V
Sbjct  61  GKVVGYTELGIKNADRFNKDPAFMQGLKAELDSVCKNNVGNYYSGILSKTVEPQVKVCLV  120

Query  364 KKS DGTHPAVLVCSAYSFYPKYISVTWLRNGKEIKGDVTSTEEMADGDWYYQVHSHLEYM  543
          KKS DGTHPA L+CSAYSFY P ISVTWLRNGKEIKG VTSTEEMADGDWYYQVHSHLEYM
Sbjct  121 KKS DGTHPATLMCSAYSFYPPAISVTWLRNGKEIKGGVTSTEEMADGDWYYQVHSHLEYM  180

Query  544 PESGEEISCVVQHASF KKPLNYKWDSSMPEPDKSKIAIGASGLVLGIVLSAAGFIYYKKK  723
          PESGEEISCVVQHASF KP+NYKWDSSMPEPDKSKIAIGASGLVLGIVLSAAGFIYYKKK
Sbjct  181 PESGEEISCVVQHASF TKPMNYKWDSSMPEPDKSKIAIGASGLVLGIVLSAAGFIYYKKK  240

Query  724 S 726
          S
Sbjct  241 S 241

```

ภาพที่ 18 BLASTX alignment ของ EST clones ที่เทียบได้กับ MHC class II

A. Nucleotides and deduced peptides

GTGTGTGTGAGAGTGTGTGAGAGAGTTAGAGTGTGTGTAGTCGGTGAGGAGTGGATTGATGTGAGCTGCTGATTGAACACACACTTCAGG 90

ATGAGATTATTTCTGCTCTGTTTCACACTGGTGTGTGTGAAGGACACTGAAGCACAGAATAAATTGCACCATTTGCAGTTGTCCGCGTGC 180

M R L F L L C F T L V C V K D T E A Q N K L H H L Q L S A C 30

TCAGAGAAGGATAAGGAGTTTATGATTGGTGATGATGGAGAGGTGGAGCTTTACGCAGATTTTAAGAAGAAGGATACAGTGTATATGTTT 270

S E K D K E F M I G D D G E V E L Y A D F K K K D T V Y M F 60

CCTCCGTTTCGCTGATCCGATGCAGTACCCCGGATTTTACGAGGGCGCCGAGAGTCGGACTGCCAACTGTCAAGCAAACCTTACAGGTGCTT 360

P P F A D P M Q Y P G F Y E G A E S R T A N C Q A N L Q V L 90

TCAGTAGAATTTAAAGACAAGCCGCTGCCACACGACGCCCCACAGAGCTCCATCTATGCCAGAACTGGTGTACAGCTGGGTTCAGAGAAC 450

S V E F K D K P L P H D A P Q S S I Y A R T G V Q L G S E N 120

CTGCTGATCTGCCACGCCTCACGGTTCTTCCCTCCACCTGTCCGTGTGCGCTGGACCAAAAAACAACCTGGACGTGACGGATAAATCCTCA 540

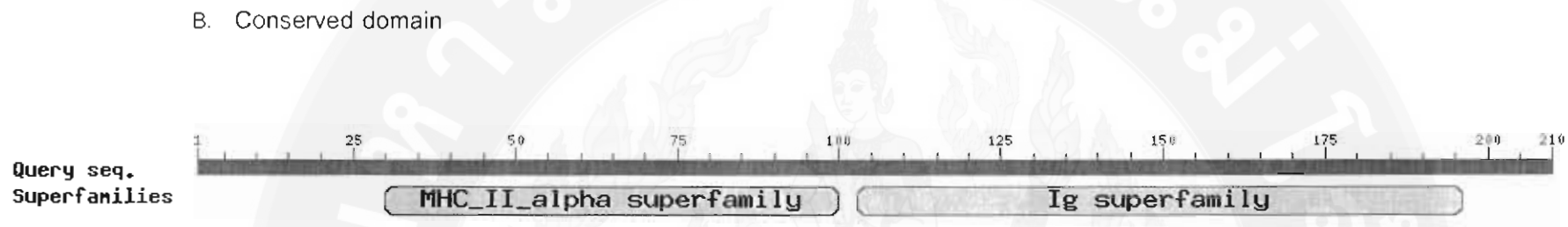
L L I C H A S R F F P P P V R V R W T K N N L D V T D K S S 150

CTCAGCCAGTATTACCCCAATGATGACGAAACCTTCAACCAGTTCTCCACCTGCCCTTCACTCCACAGGAAGGAGACGTGTACACCTGC 630

L S Q Y Y P N D D E T F N Q F S H L P F T P Q E G D V Y T C 180

ACGGTGCAGCACGAGGCCCTGCAGACGCCTGACACCAGGACATGGGAGGTGAATGTTGATCTCCCCAGTGTGGGTCCGGCTGTGTTTTGT 720

T V Q H E A L Q T P D T R T W E V N V D L P S V G P A V F C 210



C. Description of domain analysis

	Description	PssmId	Multi-dom	E-value
Ig super family[cl11960], Ig: immunoglobulin (Ig) domain found in the Ig superfamily. The Ig superfamily is a...		176433	no	2.06e-31
MHC_II_alpha super family[cl03058], Class II histocompatibility antigen, alpha domain.		144547	no	7.96e-12

ภาพที่ 19 การวิเคราะห์ *P. gigas* MHC class II alpha chain (EST clone A3017)

- A. ลำดับของอะมิโนแอซิดอยู่ที่ตำแหน่งแรกของ codon
B. และ C. ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งโดเมน

human	6	YGRSGQYSHEFDGDEEFYVLERKETVWQLFLFRFRFRFPDQFALTNIAVLKHNLNIVIKRSNST	86
giant catfish	18	SEKDKEFMIGDUGEVELYADFKKKDTVYNFPFFADPMQYPYEGAESRTANQQANLQVLSVEFKDP	100
channel catfish	21	SQTDKEYVLGIDKEBVYYADFEVKQLIVKALPFFADTLNPPYQSAGAEIDICKTNLGVYRTEFKDP	100
zebrafish (1)	1	DADQEGFIVQEDDEQLAHVDFEKEQKDVITLPEFADQAVLPYVDKRAEFNCKAYLAVLAEVYASV	81
zebrafish (2)	21	SQTEKDDLTGFDGEEYHTDFIRKEGVMTLPDEADPYSYPYAGVANMEICKQNLATDIKAYNSE	98
striped sea-bass (1)	24	SDSDGEEKMYGLDGEVWYADFINKKGVEPQPSFIDHTIYPYSAVAQQQICRONLKVALQAYKNQ	100
striped sea-bass (2)	24	SDSDGEDMIALDGEVWYADFINKKGVEPQPSFIDHTIYPYSAVAQQQICRONLEVERKAYKDT	101
striped sea-bass (3)	20	SDSDGEEMYGLDGEVWYADFINKKGVEPQPSFIDHTIYPYSAVAQQQICRONLGLALKAVKDP	98
Atlantic salmon	19	SDSDGLDMYGLDGEEMWYADFNKKQEGVVALPPFADPFTFPYEQAVGNQGVCKONLAKCIKAYKNE	96
rainbow trout	21	SDSDGVDMYGLDGEELWYADFNKKQEGVVALPPFADQISFPYEQAVGNQRTCKGDLGVDIKAYKNT	99

ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบ alpha domain ของ MHC class II ของปลาบึก ปลาอื่น และมนุษย์

Homo sapiens (human) (2NNA_A), *Danio rerio* (zebrafish) (gi 82104442), *Ictalurus punctatus* (channel catfish) (gi 82120506), zebrafish (1) (*Danio rerio*) (gi 82228396), zebrafish (2), striped sea-bass (1) (*Morone saxatilis*) (gi 82072177), striped sea-bass (2) (gi 82072166), striped sea-bass (3) (gi 82072175), *Salmo salar* (Atlantic salmon) (gi 82135967), *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) (gi 82174796)

A. Nucleotides and deduced peptides

ACAATGGCACTGCTGGTAAAAATTCTTCTGATCGTCCTGCCTGCAGTTTTTCAGCACCGCCAGATGGACAATTTTTATAGGGCGCAACAAG	90
M A L L V K I L L I V L P A V F S T A R W T I F I G R N K	29
AGTGCAAATACAGCTCTGAGGATCTACACGACAGTGTACTTACAGACTCATGTTTACAACAAGCTTATGTTCCCTGCAGTATAACAGCAGT	180
S A N T A L R I Y T T V Y L Q T H V Y N K L M F L Q Y N S S	59
CTCGGGAAGTTTGTGGGATACACTGAGTTAGGCGTCAAAAACGCAGAGACAGCTAACAAAGACACTGCATATCTGCAAGGAATGAAAGCC	270
L G K F V G Y T E L G V K N A E T A N K D T A Y L Q G M K A	89
AACCTGGAATCTACCTGTAAGCCTAATGCTAAGCTTTACTATGAAAACATCTTTGGTCAAACGGTTGAGCCACAAGTTCAAGTGCGATCG	360
N L E S T C K P N A K L Y Y E N I F G Q T V E P Q V Q V R S	119
GTCAAGAAGTCAGACGGCACCCATCCTGCTGTGCTGGTTTGTAGCGCCTACAGTTTTTACCCTAAGTACATCTCGGTGACGTGGCTGAGG	450
V K K S D G T H P A V L V C S A Y S F Y P K Y I S V T W L R	149
AACGGGAAGGAGATTAAAGGTGACGTGACGTCCACTGAGGAGATGGCTGATGGAGACTGGTACTATCAGGTCCACTCCCATCTGGAGTAC	540
N G K E I K G D V T S T E E M A D G D W Y Y Q V H S H L E Y	179
ATGCCTGAATCTGGAGAGGAGATCTCCTGTGTGGTCCAACACGCCAGCTTCAAAAAACCCTTGAAGTATAAGTGGGACTCCTCGATGCCT	630
M P E S G E E I S C V V Q H A S F K K P L N Y K W D S S M P	209
GAACCTGATAAGAGTAAGATTGCTATCGGGGCTTCAGGGCTGGTGTGGGGATTGTGCTTTTCAGCTGCTGGATTTCATCTACTACAAGAAG	720
E P D K S K I A I G A S G L V L G I V L S A A G F I Y Y K K	239
AAATCCCTCAG	731
K S	241



C. Description of domain analysis

Description	PssmId	Multi-dom	E-value
Ig super family[cl11960], Ig: immunoglobulin (Ig) domain found in the Ig superfamily. The Ig superfamily is a...	176433	no	3.21e-21
MHC_II_beta super family[cl03042], Class II histocompatibility antigen, beta domain.	110002	no	6.65e-14

ภาพที่ 21 การวิเคราะห์ *P. gigas* MHC class II beta chain (EST clone O2089)

- ลำดับของอะมิโนแอซิดอยู่ที่ตำแหน่งแรกของ codon
- และ C. ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งโดเมน

human	9	ETTCISFNKDLLTCWDPEENKMAPCNVLSQHGNQKDTLMQRLNGLQNCATHTPQFWG	82
giant catfish	28	YLQTHVYNKLMFLQYNSSLGKFEVGYVKNAETANKDTAYLQGMANLESTCKENAKLYY	103
channel catfish	28	YIKPLIINKIKYLEYNSTVGKFEVGYTELGVKNAETANKDTAYLQGMKANLESTCKPN	103
Chinese longsnout catfish	42	FIQPOVINKVKCAEYNSTLGKFEVGYTELCIKNADRFNKDTALLQGLKDALDSLCKNN	98
zebrafish	26	VHDNYIFNKDVYIREFNSTLGYFVGYYVNAQLWKQRYQLLEQEAHEORFCKYNAEIDY	101
zebrafish DA-beta	31	LLSSGSFNKVVVDQYNSTVGKFEVGYVIFARNFNKNQAYLQORAESVFCRHNAQISD	106
common carp (1)	25	YLLSYSENGQLDAQFNSSVGKFEVGYMKDAEYWNNNPAELQORAQVDTYCRHNAQILD	100
common carp (2)	31	YIDNYIFNKDVYIQFNSTVGFEVGYVYNAERFNKBNILQQAQVERYCKHNAELYQ	106
common carp (3)	25	EVDNYIFNKDVYHIFQFNSTVGFEVGYVHNAELWNKDTTGLQQAQVDSFCKHNAQIRQ	100
African cichlid	24	YIYSQYNNKLEIYRFSSSVGKFEVGYVKQAKYFNQPAVVAQRAAKETYCOHNIGIYW	99
Atlantic salmon	27	FIDSYYFNKAELYIREFNSTVGKFEVGYVKNAELAWNSDAAVLAVEGELERYCKHNADLHY	102
rainbow trout	30	FIDSYYFNKAELHVRFNSTVGRYVGYLKNALAWNSDAGILQQAELERYCKPSAAIDY	105

ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบ beta domain ของ MHC class II ของปลาน้ำจืดและสัตว์อื่น

human (*Homo sapiens*) (1HDM_B), channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (gi 1763555), Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*) (gi 264685029), zebrafish (*Danio rerio*) (gi 82228395), zebrafish DA-beta (gi 82191594), common carp (1) (*Cyprinus carpio*) (gi 82191600), common carp (2) (gi 82191598), common carp (3) (gi 82191599), African cichlid (*Aulonocara hansbaenschii*) (gi 82191543), Atlantic salmon (*Salmo salar*) (gi 82228414), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (gi 82191651)

F-type lectin

โปรตีนกลุ่ม lectins เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับน้ำตาลจำเพาะชนิด พันธะการจับเป็นแบบอ่อนแต่มีความสามารถสูง ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ คือ carbohydrate-recognition domain (CRD) ปัจจุบันมีรายงานการพบเลคตินได้ 13 กลุ่มชนิด แบ่งตามตำแหน่งที่อยู่ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่เป็น intracellular lectins คือ calnexin family, M-type, L-type และ P-type กลุ่มที่เป็น extracellular lectins คือ C-type, R-type, siglecs และ galectins และกลุ่มใหม่ ซึ่งบางชนิดทำงานร่วมกับ 2 กลุ่มแรก คือ F-box lectins, ficotins, chitinase-like lectins, F-type lectins และ intelectins

เลคตินมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immune) โดยจดจำที่ตำแหน่ง glycans บนพื้นผิวของเชื้อโรค และส่งสัญญาณต่อให้แอนติบอดีหรือเม็ดเลือดขาวมาจับกิน เชื้อไวรัสบางชนิดอาศัยความสามารถของเลคติน โดยให้ถูกจับเพื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้

F-type lectins หรือ fuclectins เป็นเลคตินที่จับกับน้ำตาลฟucose (fucose-binding proteins) F-type domain พบได้ตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยไม่รวมสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก และสัตว์เลื้อยคลาน ทั้งยังไม่พบในเชื้อราและพืช ยีนของ F-type lectin เป็นยีนที่การสูญหายได้ง่ายในการถ่ายทอดพันธุกรรม F-type lectin ถูกพบครั้งแรกในปลาไหล (Bianchet et al., 2002) และพบว่ามียีนที่มีความสำคัญในสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มปลา โดยพบมีการซ้ำของชุดยีนหลายชุด ซึ่งคาดว่าเกิดจากการได้เจอเชื้อโรคหลากหลาย นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน F-type lectins ขึ้นกับสภาพแวดล้อมและอุณหภูมิด้วย

F-type lectin ของปลากะพง (*Morone saxatilis*) (MsaFBP32) ซึ่งประกอบด้วย F-type motif 2 ชุดในโครงสร้าง ซึ่งมักพบร่วมกับโดเมนอื่น เช่น transmembrane receptor ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเลคตินกลุ่มนี้มีหน้าที่กว้าง MsaFBP32 ที่ด้าน N-terminal domain มีโครงสร้างเหมือน fucose recognition domain ใน agglutinin ของปลาไหล ส่วนด้าน C-terminal domain เป็นตำแหน่งที่ใช้จำแนกจำเพาะชนิดของ fucosylated ligands นอกจากนี้ยังพบว่าภายในยีนนี้มียีนสร้างซ้ำหลายชุด ทำให้ระบุได้ว่าเป็นส่วนที่มีความหลากหลายระหว่างพันธุกรรมสูง (Odom and Vasta, 2006)

F-type lectin จากปลาบึกเป็นชนิด III-FBPL precursor ซึ่งมีความเหมือนกับยีนนี้ของปลาม้าลาย 2 ตำแหน่ง คือ ลำดับที่ 3-161 และ 165-306 โดยมีความเหมือนที่ 55% (89/161 amino acids) และ 59% (85/142 amino acids) ตามลำดับ (ภาพที่ 24) ยีน F-type lectin ของปลาบึกมีตำแหน่งอนุรักษ์ของ F5/8 type C domain ชิดด้าน C-terminus (ภาพที่ 25B)



ภาพที่ 23 โครงสร้างโปรตีน F-type lectin ของปลาไหล (*Anguilla anguilla*)

ที่มา : www.imperial.ac.uk/research/animalllectins/ctld/classes/Fucolectin1.htm

```
> ref|NP_001077343.1| hypothetical protein LOC799904 [Danio rerio]
gb|ABB29995.1| III-FBPL precursor [Danio rerio]
Length=306
```

```
GENE ID: 799904 LOC799904 | III-FBPL precursor [Danio rerio]
(10 or fewer Pubmed links)
```

```
Score = 178 bits (452), Expect = 2e-43
Identities = 85/142 (59%), Positives = 106/142 (74%), Gaps = 1/142 (0%)
Frame = +2
```

```
Query 71 TENLAVGAPAVQSSTYNLSLGAAKNAVDGNSDSNYMRGSCHTAGD-NPWWRVDLRKPHKV 247
++N+A GA QSST G A NAVDG+++ Y +GSC+H+ G+ NPWWRVDL + +
Sbjct 165 SKNIAAGAAVDQSSTVPHDGDAGNAVDGSTECKYKKGSCSHSLGETNPWWRVDLGRVFSI 224

Query 248 TRVITNRGDCCAERIAGAQIRIGNSLAYNGNRNWLVTTIRAIPSGGTQTFDFSPVKGRY 427
RV ITNRGDCC ER+ GA+IRIGNSL NGN N LV T+ IP+G T+TF+F PV+GR+
Sbjct 225 RRVISITNRGDCCERLNGAEIRIGNSLENNGNSNHLVATVEHIPAGNTETFEFQPVQGRF 284

Query 428 VNIYLPGTNKYLTLCVQVQFED 493
+NI LPG N YLTLCVQVF D
Sbjct 285 LNIVLPGVNVYLTLCVQVFTD 306
```

```
Score = 169 bits (429), Expect = 8e-41
Identities = 89/161 (55%), Positives = 117/161 (72%), Gaps = 5/161 (3%)
Frame = +2
```

```
Query 14 GDLVILLTLFPGLCIAHLTE-NLAVGAPAVQSSTYNLSLGAAKNAVDGNSDSNYMRGSC 190
G+ V+ L L GLC+ + NLA+GA AVQSST + G A++AVDGN++++Y +GSCT
Sbjct 3 GEPVMYWLALLLGLCVTDVAPANLALGAAAVQSSTGDPNGNAEHAVDGNTEADYRKGSCT 62

Query 191 HTAGD-NPWWRVDLRKPHKVTRVITNRGDCCAERIAGAQIRIGNSLAYNGNRNWLVT- 364
HT + NPWWRVDL V +V ITN GDCC ERI GAQIRIG+SL NGN N L T
Sbjct 63 HTIREFNPWWRVDLGGVSIVNKVTITNTGDCCERIRGAQIRIGDSLENNGNNNQLAATL 122

Query 365 IRAIPSGGTQTFDFSPVKGRYVNIYLPGTNKYLTLCVQVF 487
+ AI G+QTF+F P++GRY+N++LPG ++ L+LCEV+VF
Sbjct 123 LDAIK--GSQTFEFQPIQGRYLVNVLPGNDETLSLCEVEVF 161
```

ภาพที่ 24 BLASTX alignment ของ EST clone O1004

A. Nucleotides and deduced peptides

CCCACGCGTCCGGGGTGACCTTGTGATTTTGTGCTCACACTTTTTCCTGGGCTGTGCATTGCTCATTTGACAGAGAATCTTGCTGTTGG	90
G D L V I L L L T L F P G L C I A H L T E N L A V G	26
AGCTCCAGCTGTCCAGTCTTCTACATAACAATTCTTTAGGAGCTGCTAAAAATGCTGTTGATGGCAATAGTGACTCAAATTACATGCGCGG	180
A P A V Q S S T Y N S L G A A K N A V D G N S D S N Y M R G	56
GTCCTGCACTCACACTGCAGGGGACAATCCGTGGTGGAGAGTTGACTTGAGGAAACCACACAAGGTAACCAGGGTTATTATCACTAATCG	270
S C T H T A G D N P W W R V D L R K P H K V T R V I I T N R	86
AGGAGACTGTTGTGCAGAGAGGATAGCTGGTGCTCAGATCCGTATCGGCAACAGCCTGGCATATAATGGCAACAGAAATTGGCTGGTTAC	360
G D C C A E R I A G A Q I R I G N S L A Y N G N R N W L V T	116
AACTATTAGGGCCATCCCATCTGGAGGCACACAAACATTTGATTTTAGTCCTGTTAAGGGGAGATATGTCAACATTTATCTACCTGGGAC	450
T I R A I P S G G T Q T F D F S P V K G R Y V N I Y L P G T	146
CAATAAATACCTCACTCTGTGTGAAGTCCAGGTGTTTGAGGATTAAGTGCAGCAAGATGAAGTTACACCTCAGTCCACCCATCCCTGAAG	540
N K Y L T L C E V Q V F E D	159
CAAATA	547



C. Description of domain analysis

	Description	PssmId	Multi-dom	E-value
[+] cl09947, F5_F8_type_C, F5/8 type C domain		143726	N/A	3e-36

ภาพที่ 25 การวิเคราะห์ *P. gigas* III-FBPL precursor (EST clone O1004)

- A. ลำดับของอะมิโนแอซิดอยู่ที่ตำแหน่งแรกของ codon
- B. และ C. ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งโดเมน

Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)

Intercellular adhesion molecules เป็นกลุ่ม Ig superfamily เป็น cell surface proteins ของเซลล์ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับเซลล์อื่น ซึ่งมักจะเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยยารจับนี้ มีทั้งการจับกับเซลล์ตัวเอง การจับกับ endothelial cells การจับกับ extracellular matrix หรือการส่งสัญญาณของแผลและการติดเชื้อมีเกี่ยวข้องกับการจับของ ICAMs สามารถแบ่ง ICAMs ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ immunoglobulin (Ig) superfamily, integrin family และ selectin family

ICAMs กลุ่ม Ig superfamily ประกอบด้วย ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 และ MadCAM-1 ซึ่งทำหน้าที่จับกับ integrins บนเม็ดเลือดขาว และเป็นตัวกลางช่วยให้เซลล์เลือดขาวลี้ปตัวออกนอกเส้นเลือดไปสู่เนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดบาดแผลได้

สำหรับ ICAMs กลุ่ม integrin family เป็น receptors ของ ICAMs และ VCAMs integrins มีโครงสร้างเป็น heterodimeric proteins ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ alpha และ beta chain ทำหน้าที่เป็นตัวกลางของเม็ดเลือดขาวในการจับกับ vascular endothelium หรือกลไกการจับระหว่างเซลล์ด้วยกันเอง (cell-cell interactions) เซลล์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดจะมี integrins ที่แตกต่างกัน ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อ ICAMs ต่างชนิดซึ่งอยู่ที่ vascular endothelium.

ส่วน selectin family ประกอบด้วย L-selectin, P-selectin และ E-selectin, เกี่ยวข้องในการจับของเม็ดเลือดขาวกับ activated endothelium โดยกลไกการจับนี้เกิดจากปฏิกิริยาอย่างอ่อนแบบ rolling motion ของเม็ดเลือดขาวไปบน endothelial surface P-Selectin และ L-Selectin ทำงานร่วมกันในกลไกนี้ ส่วน E-selectin เป็นปฏิกิริยาแบบแรงซึ่งเกิดต่อเนื่องจากปฏิกิริยาอย่างอ่อน ช่วยให้เม็ดเลือดขาวออกนอกเนเลือดไปสู่ lymphoid tissues และตำแหน่งที่มีการอักเสบได้

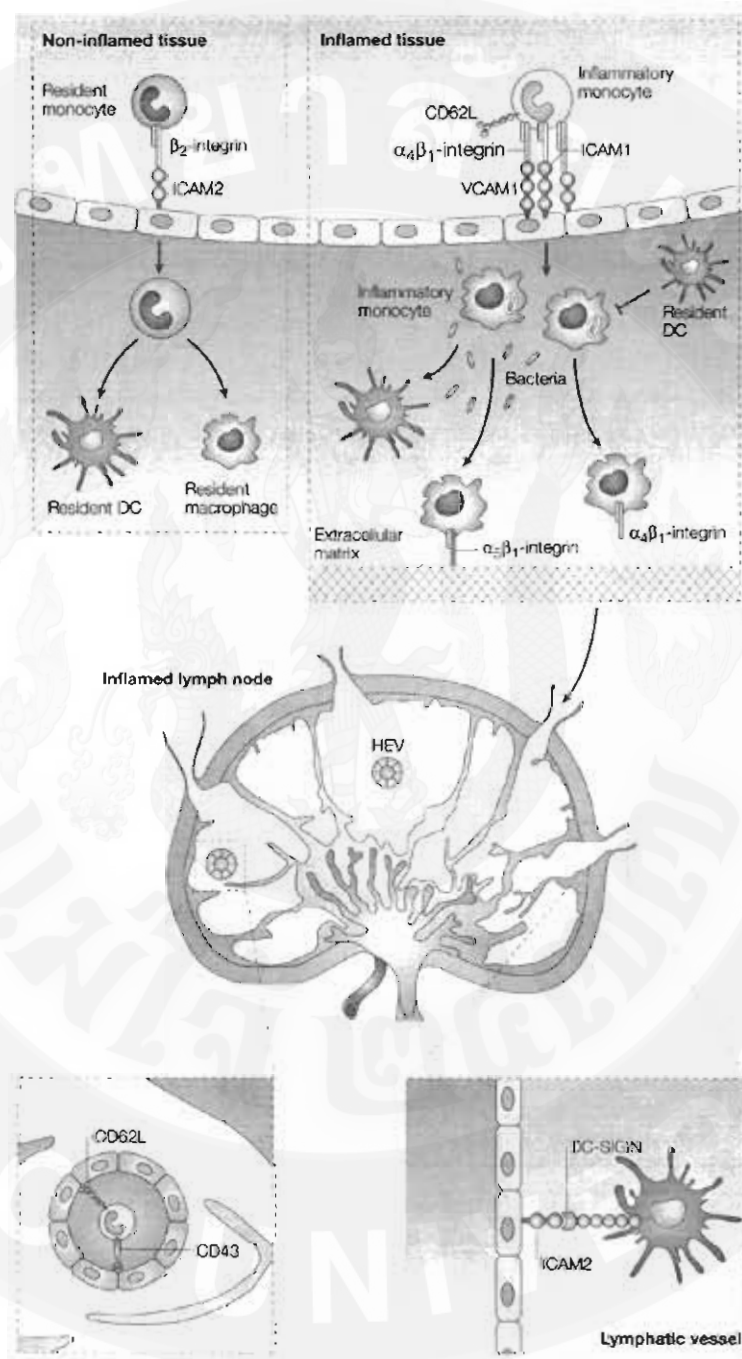
ICAM2 หรือ CD102 (Cluster of Differentiation 102) เป็น type I transmembrane glycoproteins ประกอบด้วย 2-9 immunoglobulin-like C2-type domains และจับกับ leukocyte adhesion LFA-1 protein ICAM2 มีบทบาทสำคัญในขบวนการ lymphocyte recirculation by blocking LFA-1-dependent cell adhesion. เป็นตัวกลางสำหรับปฏิกิริยาการจับ (adhesive interactions) ในระบบภูมิคุ้มกันจำเพาะ ได้แก่ antigen-specific

immune response, NK-cell mediated clearance, lymphocyte recirculation และการจับกันของโปรตีน

ICAM2 มีความสำคัญมากในระบบตอบสนองต่อเชื้อโรคและการอยู่รอดของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบทั่วไป (innate immunity) และจำเพาะ (specific immunity) ICAM2 แสดงออกที่ เซลล์เลือดขาว, T และ B lymphocytes, monocytes, platelets, early CD34+ hematopoietic progenitor cells และ endothelial cells โดยทำงานในขบวนการไหลเวียนเซลล์เลือดขาว การกระจายของเซลล์ และการไหลเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ (Staun-ton et al., 1989; de Fougerolles et al., 1991; Diacovo et al., 1994) มีรายงานความเกี่ยวข้องของ ICAM2 ในระบบภูมิคุ้มกันทั่วไป ได้แก่ ช่วยลดกลไกการอักเสบในปอดจากอาการภูมิแพ้โดยหยุดยั้งการสะสมเซลล์เลือดขาวชนิด eosinophil ในเซลล์ปอด (Gerwin et al., 1999) เกี่ยวข้องกับ cell survival signal และสามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ได้ (Perez et al., 2002) ช่วยให้ [gamma][delta]- T-cells กำจัดเซลล์มะเร็ง pancreatic cancer cells ได้ (Zhiyong et al., 2009)

ชิ้นส่วน ICAM2 จากปลาปักเป้าที่ได้ มีความเหมือนมากกับยีนนี้ของมนุษย์ถึง 92% (158/171 amino acids) จากลำดับที่ 61-231 (ภาพที่ 28) ซึ่งเป็นส่วนกลางของโปรตีน โดยมีตำแหน่งอนุรักษ์ของ ICAM N-terminal domain และบางส่วนของ Ig superfamily (ภาพที่ 29B) และเมื่อเปรียบเทียบส่วน ICAM domain กับ ICAM1 และ ICAM2 ของมนุษย์และหนูบ้าน พบว่ามีตำแหน่งอนุรักษ์ภายในเช่นกัน (ภาพที่ 30)

ยีนและโปรตีนชนิดนี้มีรายงานพบเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น โดยรายงานจากงานวิจัยนี้ เป็นรายงานแรกที่พบในปลา



ภาพที่ 26 การทำงานร่วมกันของ Intercellular adhesion molecules

CD62 ligand (CD62L หรือ L-selectin) กระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวกลิ้งไปบน vascular endothelium แล้ว integrins จึงเข้ามาทำงาน ส่วน ICAM2 ทำหน้าที่เป็น counter-receptor สำหรับ monocyte β_2 -integrins ในขบวนการที่ไม่เกิดการอักเสบ

ICAM1, ICAM2 และ VCAM1 เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายของ monocytes ไปสู่น้ำเยื่อที่มีการอักเสบ เมื่อ inflammatory monocytes เคลื่อนที่ไปถึง peripheral tissue จะใช้ $\alpha_4\beta_1$ - and $\alpha_5\beta_1$ -integrins เพื่อการจับกับ extracellular matrix และส่งสัญญาณไปที่ lymph node นอกจากนี้ Inflammatory monocytes ยังส่งสัญญาณไปยัง lymph nodes โดยผ่าน high endothelial venules (HEVs) ซึ่งใช้ CD62L และ CD43 มีการเคลื่อนย้ายของ activated dendritic cells (DCs) จากน้ำเยื่อที่อักเสบผ่านทางระบบน้ำเหลืองด้วย โดยมี DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) เป็น counter-receptor สำหรับ ICAM2

ที่มา : Imhof and Aurrand-Lions, 2004



ภาพที่ 27 โครงสร้างโปรตีน Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) ของมนุษย์

ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/ICAM2>

```
> gb|EAW94220.1| intercellular adhesion molecule 2, isoform CRA_d [Homo sapiens]
Length=330

GENE ID: 3384 ICAM2 | intercellular adhesion molecule 2 [Homo sapiens]
(Over 10 PubMed Links)

Score = 322 bits (826), Expect = 7e-87
Identities = 158/171 (92%), Positives = 161/171 (94%), Gaps = 0/171 (0%)
Frame = +3

Query 33 GSPWLVPASPWRLEPMSSIGYRTLTVLFTLICCPGSDEKVFVHVRPKKLAVEPKGSLE 212
          GSPWLVPASPWRLEPMSS GYRTLTVLFTLICCPGSDEKVFVHVRPKKLAVEPKGSLE
Sbjct 61 GSPWLVPASPWRLEPMSSFGYRTLTVLFTLICCPGSDEKVFVHVRPKKLAVEPKGSLE 120

Query 213 VNCGTTTCNQPEVGGLETSLDKILLEVQAQWKQNLVSNISHDTVLQCHFTCSAKLESMNSN 392
          VNC TTCNQPEVGGLETSLDKILL+ QAQWK LVSNISHDTVLQCHFTCS K ESMNSN
Sbjct 121 VNCSTTCNQPEVGGLETSLDKILLDEQAQWKHYLVSNISHDTVLQCHFTCSGKQESMNSN 180

Query 393 VSVYQPPRQVILTLLQPTLVAVGKSFTIECRVPTVERLDSLRLNLFRCNDSL 545
          VSVYQPPRQVILTLLQPTLVAVGKSFTIECRVPTVE LDSL L LFRGN++L
Sbjct 181 VSVYQPPRQVILTLLQPTLVAVGKSFTIECRVPTVEPLDSLTLFLFRGNETL 231
```

ภาพที่ 28 BLASTX alignment ของ EST clone O1005

A. Nucleotides and deduced peptides

TAGACCTGCGGGCACCATCTCCCTCCAGGCAGCCCTTGGCTGGTCCCCTGCGAGCCCGTGAGACTGCCAGAGATGTCCTCTCT
G S P W L V P A S P W R L P E M S S

GAGACCTGACTGTGGCCCTCTTCACCCTGATCTGCTGTCCAGGATCGGATGAGAAGGTATTTCGAGGTACACGTGAGGCCA
R T L T V A L F T L I C C P G S D E K V F E V H V R P

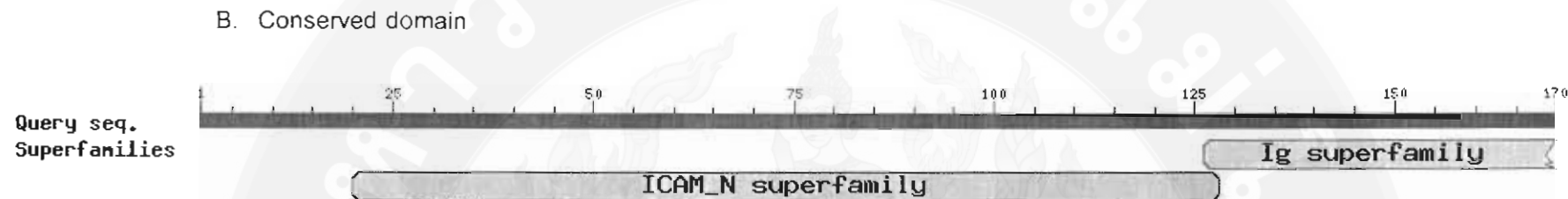
TCGGTTGAGCCCCAAAGGGTCCCTCGAGGTCAACTGCGGCACCACCTGTAACCAGCCTGAAGTGGGTGGTCTGGAGACCTCT
A V E P K G S L E V N C G T T C N Q P E V G G L E T S

TTCTGCTGGAGGTACAGGCACAGTGGAAACAAACTTGGTCTCAAACATCTCCCATGACACGGTCCTCCAATGCCACTTC
L L E V Q A Q W K Q N L V S N I S H D T V L Q C H F

CACAAGCTGGAGTCAATGAATTCCAACGTCAGCGTGTACCAGCCTCCAAGGCAGGTCATCCTGACACTGCAACCCACTTTG
K L E S M N S V S V Y Q P P R Q V I L T L Q P T L V

CGCAAGTCCTTCACCATTGAGTGCAGGGTGCCACCGTGAGCGGCTGGACAGCCTCAGGCTCAACCTGTTCCGTGGCAAT
K S F T I E C R V P T V E R L D S L R L N L F R G N D

AAGCTCAGACCTGCGGGCACCATCTCCCTCCAGGCAGCCCTTGGCTGGTCCCCTGCGAGCCCGTGGAGACTGCCAGAGATGTCCTCTATCG	90
G S P W L V P A S P W R L P E M S S I G	20
GTTACAGGACCCTGACTGTGGCCCTCTTCACCCTGATCTGCTGTCCAGGATCGGATGAGAAGGTATTCGAGGTACACGTGAGGCCAAAGA	180
Y R T L T V A L F T L I C C P G S D E K V F E V H V R P K K	50
AGCTGGCGGTTGAGCCCAAAGGGTCCCTCGAGGTCAACTGCGGCACCACCTGTAACCAGCCTGAAGTGGGTGGTCTGGAGACCTCTCTAG	270
L A V E P K G S L E V N C G T T C N Q P E V G G L E T S L D	80
ATAAGATTCTGCTGGAGGTACAGGCACAGTGGAAACAAAACCTTGGTCTCAAACATCTCCCATGACACGGTCTCCAATGCCACTTCACCT	360
K I L L E V Q A Q W K Q N L V S N I S H D T V L Q C H F T C	110
GCTCCGCCAAGCTGGAGTCAATGAATTCCAACGTGAGCGTGTACCAGCCTCCAAGGCAGGTATCCTGACACTGCAACCCACTTTGGTGG	450
S A K L E S M N S V S V Y Q P P R Q V I L T L Q P T L V A V	140
CTGTGGGCAAGTCCTTCACCATTGAGTGCAGGGTGCCACCGTGGAGCGGCTGGACAGCCTCAGGCTCAACCTGTTCCTGGCAATGACA	540
G K S F T I E C R V P T V E R L D S L R L N L F R G N D S L	170
GTCTC	545



C. Description of domain analysis



Description

[+]pfam03921, ICAM_N, Intercellular adhesion molecule (ICAM), N-terminal domain

[+]Ig super family[cl11960], Ig: immunoglobulin (Ig) domain found in the Ig superfamily. The Ig superfamily is a...

PssmId	Multi-dom	E-value
112721	N/A	4e-36
176433	no	1.74e-10

ภาพที่ 29 การวิเคราะห์ *P. gigas* ICAM2 (EST clone O1005)

- A. ลำดับของอะมิโนแอซิดอยู่ที่ตำแหน่งแรกของ codon
- B และ C ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งโดเมน

giant catfish	19	GYRTLTLTFTLICCPGSDKFEVHVRPKKLAVEPKGSLVNCSTTCNQPEVGGLETSLDKILLLEV	86
human ICAM-2	4	ACWSLSLILFYSPGGGKKFEVYIWSEIQTVEATESWAKINCSTNCAAPDMGGLETPTNKIMLEE	69
house mouse ICAM-2	4	GYRTLTLTFTLICCPGSDKFEVHVRPKKLAVEPKGSLVNCSTTCNQPEVGGLETSLDKILLLE	71
human ICAM-1	5	FRPALPLVLLGALFPGFGAQTSPSPSVILPRGGSVLVTCSTSCDQPKLLGIETPLPKKELLL	71
house mouse ICAM-1	5	AKPTLPLDALVTVVIPGPGAQVSIHPREAFIPGGSVQVNCSSCKEDLSLGLETQWLKDELES	71
human ICAM-3	12	ACWTLVCCLLTPGVQGGFLLRVEPQHPVLSAGCSLEVNCSTDCPSSEKIALETSLSKELVAS	76
giant catfish	87	AQWKQNLVSNISHDITVLQCHFTCSAKLESMSNSVSVYQPPRQ	120
human ICAM-2	70	QGWKQFLVSNVSKDTVFECHETCSGRQHSSELIQVYQPPRQ	114
house mouse ICAM-2	72	QAWKRYLVSNISHDITVLQCHFTCSGRQESMSNSVSVYQPPRQ	114
human ICAM-1	72	NNRKVYELSNVQSDSQPMCYSNCEGGSTAKTLTVYWTPEP	115
house mouse ICAM-1	72	PNWKLFELSEIGEDSSPLCFENCGTVQSSASAITVYSFPES	114
human ICAM-3	77	MGWAAPNLNVNTGNSRIICSVYCNGSQITGSSITVYRLPER	119

ภาพที่ 30 การเปรียบเทียบโดเมน ICAM ของปลาบึกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Human ICAM-1 (*Homo sapiens*) (gi 68067956), house mouse ICAM-1(*Mus musculus*) (gi 124099), human ICAM-3 (gi 206729872), human ICAM-2, house mouse ICAM-2 (gi 462381)



สรุปผล

จากผลยีนทั้งหมดสามารถแบ่งเป็นยีนกลุ่มต่างดังนี้

1. ยีนเกี่ยวข้องกับการตกไข่ 2 ยีนจาก ovulation cDNA libraries ได้แก่ activin A type II like 1 receptor และ cystatin precursor
2. ยีนเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน 4 ยีนจาก ovulation cDNA libraries ได้แก่ III-FBPL precursor (F-type lectin) intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2), MHC class II beta chain และ MHC class II alpha chain
3. ยีนของ ribosomal proteins 8 ยีน ได้แก่ ribosomal L5, L7, L11, L23a, L24, L37, 60S Acidic ribosomal protein P1 และ L37
4. ยีนเกี่ยวข้องกับการแปลรหัส 3 ยีน ได้แก่ elongation factor-1 alpha, eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 และ zinc finger
5. ยีนเกี่ยวข้องกับการขนส่ง 3 ยีน ได้แก่ alpha-globin, beta-globin และ glucose transporter X
6. ยีนเกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึม 6 ยีน ได้แก่ cytochrome c oxidase subunit III, pyruvate dehydrogenase alpha 2, pyruvate dehydrogenase beta, ubiquinol-cytochrome c reductase, 1-acylglycerol-3-phosphate และ O-acyltransferase 3
7. ยีนเกี่ยวข้องกับการโครงสร้างและการมีชีวิตอยู่ 2 ยีน ได้แก่ alpha 3 actin และ WW domain binding protein 2
8. ยีนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณและการสื่อสาร 1 ยีน ได้แก่ protein kinase C and casein kinase substrate
9. ยีนที่พบ ORF 1 ยีน ได้แก่ ORF2-encoded protein
10. ยีนที่ไม่รู้จัก จำนวน 24 ยีน

โดยยีนของ ICAM2 เป็นรายงานแรกพบในปลา

พบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีนระหว่างแม่ปลาในระหว่างฤดูวางไข่และนอกวางไข่มีความแตกต่างกันชัดเจน ทั้งกลุ่มของโปรตีนจากยีนเหล่านี้ และชนิดของโปรตีนจากงานวิจัยนี้ได้พบยีนทั้งหมด 30 ชนิด ซึ่งทั้งหมดเป็นรายงานแรกในปลาบึกและปลาหนัง และจากผลยีนที่ได้สามารถประเมินได้ว่า สารชีวโมเลกุลที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการตกไข่ในแม่ปลาบึก ได้แก่ activin A receptor และ cystatin precursor ซึ่งพบใน ovulation cDNA libraries เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน 3 ยีน ได้แก่ III-FBPL precursor (F-type lectin) intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2) และ MHC class II beta chain

ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า แม่ปลาในช่วงวางไข่จะมีการทำงานของระบบสืบพันธุ์ที่แตกต่างจากช่วงเวลาปกติ โดยมีการผลิตโปรตีนทำงานที่แตกต่างมี 2 กลุ่ม คือ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการวางไข่ และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

ยีนสำหรับโปรตีนที่เกี่ยวข้องการวางไข่ที่ได้จากงานวิจัยทั้ง 2 ยีนนี้ สามารถนำไปศึกษาพัฒนาใช้เป็นเครื่องหมายในระดับโมเลกุล (molecular marker) เพื่อระบุถึงการวางไข่ของแม่ปลาบึกได้ นอกจากนี้ควรที่นำข้อมูลยีนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาบึกไปศึกษา เนื่องจากยังไม่มีรายงานการเกิดโรคปลาบึกธรรมชาติหรือการระบาดของโรคในปลาบึกเลี้ยง ทั้งที่เป็นปลาหนึ่งและอายุยาวนาน ซึ่งคาดว่าระบบภูมิคุ้มกันของปลาบึกน่าจะมีประสิทธิภาพสูง

ข้อเสนอแนะ

การเก็บตัวอย่างเลือดปลาบึก ควรดำเนินการใช้ช่วงเช้า เพราะช่วงบ่ายปลาจะมีความเครียดสูง การเกิดลิ่มเลือดรวดเร็ว ทำให้เลือดข้น น้ำยาเก็บรักษายืนในเซลล์เลือดไม่สามารถเข้าถึงเซลล์ได้ดี มีผลให้ได้ปริมาณยีนลดลง

บรรณานุกรม

- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2540. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. องค์การค้าคุรุสภา. 325 หน้า.
- กรมประมง. 2527. การเพาะเลี้ยงปลาบึก. เอกสารเผยแพร่ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 9 หน้า.
- กองประมงน้ำจืด. 2532. แนวทางการอนุบาลปลาบึกวัยอ่อน. สัมมนาวิชาการ กรมประมง. หน้า 1-19.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2543. ปลาบึก. เอกสารเผยแพร่ ชุด โครงการ "อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ" สกว. ชุดที่ 1. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 134 หน้า.
- เข็มชาติ นิยมสมบูรณ์, ยงยุทธ ทักษิณ และเกียรติคุณ เจริญสวรรค์. 2530. การเพาะพันธุ์ปลาบึกที่เลี้ยงในกระชัง. รายงานประจำปี สถานีประมงน้ำจืด นครสวรรค์. กองประมงน้ำจืด กรมประมง. หน้า 30-33.
- จิราพร โรจน์ทินกร. 2547. การเตรียมไข่ปลาสุกในห้องทดลองเพื่อประสิทธิภาพการผสมเทียมปลาบึก (*Pangasianodon gigas*). ทูลสนับสนุนการวิจัยและอาจารย์รุ่นใหม่ รหัสโครงการ MRG4680067. ทบวงมหาวิทยาลัยและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
- ชลิต วิทยานนท์ และสมศักดิ์ รุ่งทองใบสุรีย์. 2536. อนุกรมวิธานปลาบึกและปลาสวาย (วงศ์ Pangasiidae). สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด. กรมประมง. 57 หน้า.
- ธีรพันธ์ ภูคาสวรรค์. 2511. ปลาบึก. วารสารการประมง 21(3):244-252.
- ธีรพันธ์ ภูคาสวรรค์. 2526. ปลาบึกเลี้ยงของ. วารสารการประมง 36(4):399-346.
- นภาพร ศรีพุฒินพนธ์. 2529. การทดลองเลี้ยงปลาบึกด้วยอาหารชนิดต่างๆ. รายงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 24 สาขาประมง. หน้า 289-292.
- นฤพล สุขุมาสวิน และวัฒนะ สีสลักทร. 2537. วงจรการสืบพันธุ์ในรอบปีของแม่ปลาตะเพียนขาว. วารสารการประมง 47(1): 21-30.
- มนัส จันทรสูตร, เรวัตร ฤทธาภรณ์, สมหวัง พิมพ์บุตร, สุพงษ์ วิวัชรโกเศศ และนฤมล สุขุมาสวิน. 2532. การเพาะพันธุ์ปลาบึกปี 2531. รายงานประจำปี 2530-2531. สถานีประมงน้ำจืด จังหวัดพะเยา กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 31-42.
- ยงยุทธ อุณากรสวัสดิ์, ปฐมาวดี ปิตตาทะโน และ เมธา คชาภิชาติ. 2544. การเพาะพันธุ์ปลาบึกครั้งแรกของโลกจากพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดิน. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดพะเยา. 57 หน้า

- วิจัย ศรีสุวรรณทัช, มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ และสมศักดิ์ ล้วนปรีดา. 2527. การอนุบาลปลาบึก. สถานีประมงน้ำจืดแห่งชาติ.
- วีระชัย โชติรัตนศักดิ์. 2535. การศึกษาลักษณะทางมิถุนวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาบึก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาชีววิทยา, ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 75 หน้า.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์ และภาณุ เทวรัตน์มณีกุล. 2541. ชีววิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาบึก. วารสารการประมง 51(2):107-115.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเพาะขยายพันธุ์ปลาบึก. วารสารการประมง 46(5):339-415.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, ภูวดล ภูวพาณิชย์ และ เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดียว. 2529. การศึกษาประวัติปลาบึกที่ติดเครื่องหมายในแหล่งน้ำ. วารสารการประมง 39: 555-561.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, มาโนช เบญจกาญจน์ และ เรวัต ฤทธาภรณ์. 2535. การพัฒนาระบบการเลี้ยงปลาบึกเชิงพาณิชย์. เอกสารวิชาการฉบับที่ 14. กองประมงน้ำจืด กรมประมง. 51 หน้า.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. 2526. การผสมเทียมปลาบึก. วารสารการประมง 36(4):347-360.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. 2527. การเพาะพันธุ์ปลาบึก. เอกสารการประชุมวิชาการครั้งที่ 22 สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 403.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2531. การเพาะขยายพันธุ์ปลา ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 146 หน้า
- Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M and Nathanson CM. 2003. Cystatins. Biochemical Social Symposium (70):179-99.
- Baird G. 1996. Khnoe Falls Fisheries. Mekong Fisheries Network Newsletter 2(2):1-5.
- Barrett A.J. 1986. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. Biomedical Biochemical Acta 45(11-12):1363-74.
- Bianchet, M.A., Odom, E.W., Vasta, G.R. and Amzel, L.M. 2002. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. Natural Structural & Molecular Biology 9(8):628-34.
- Colella R., Yoshiaki Sakaguchi Y., Hideaki Nagase H., and Bird J.W.C. 1989. Chicken Egg White Cystatin : Molecular cloning, nucleotide sequence, and tissue distribution. The Journal of Biological Chemistry 264 (29): 17164-17169.

- Chen Q.A, Wang Z.G., Xu Z.R., Dong Yu S.D. and Yang Z.G. 2009. Analysis of gene expression in granulosa cells of ovine antral growing follicles using suppressive subtractive hybridization. *Animal Reproduction Science*.
- Chen Y.C., Jan-Ming H., Lee, Shyh-Jye. 2006. Profile analysis of expressed sequence tags derived from the ovary of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*. 251,537 – 548.
- Chu S.L., Weng, Ching-Feng., Hsiao, Chung-Der., Hwang, Pung-Pung., Karsi A., Li P., Dunham R A. and Liu Z J. 1998. Transcriptional activities in the pituitaries of channel catfish before and after induced ovulation by injection of carp pituitary extract as revealed by expressed sequence tag analysis. *Molecular Endocrinology*.21, 121–129.
- Diacovo T.G., deFougerolles A.R., Bainton D.F. and Springer T.A. 1994. A functional integrin ligand on the surface of platelets: inter-cellular adhesion molecule-2. *Journao of Clinical Investigation* 94: 1243-1251.
- deFougerolles A.R., Stacker S.a., Schwarting R. and Springer T.A. 1991. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *Journal of Experiment Medicine* 174: 253-267.
- Erickson G.F. 1997. Dissociation of Endocrine and Gametogenic Ovarian Function. In Lobo, R. (ed.): *Perimenopause*. Serono Symposia, Springer-Verlaag, Reproduced with permission from Springer-Verlag, New York.
- Erickson G.F. and Shimasaki S. 2000. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 11:193.
- Gahmberg C.G., Tian L., Ning L.,Nyman-Huttunen H. 2008. ICAM-5 – A novel two-facetted adhesion molecule in the mammalian brain. *Immunology Letters* 117: 131-135.
- Gerwin, N., Gonzalo, J.A., Lloyd, C., Coyle, A.J., Reiss, Y., Banu, N., Wang, B., Xu, H., Avraham, H., Engelhardt, B., Springer, T.A., Gutierrez-Ramos, J.C. 1999. Prolonged eosinophil accumulation in allergic lung interstitium of ICAM-2 deficient mice results in extended hyperresponsiveness. *Immunity* 10: 9-19.

- Imhof B.A. and Aurrand-Lions M. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Immunology* 4: 432-444.
- Jones A.L., Hulett M.D. and Parish C.R. 2005. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunology and Cell Biology* 83: 106–118.
- Kobayashi M., Aida K. and Hanyu I. 1986. Annual changes in plasma levels of gonadotropin and steroid hormones in goldfish. *Bull. Japan. Soc. Sci.* 52(7), 1153-1158.
- Li C.J., Li Zhou, Wang Y., Hong Y.H. and Gui J.F. 2005. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common α , FSH β and LH β in groupers. *Molecular and Cellular Endocrinology* 233 (2005) 33–46.
- Odom E.W. and Vasta G.R. 2006. Characterization of a Binary Tandem Domain F-type Lectin from Striped Bass (*Morone saxatilis*). *J. Biol. Chem.* 281(3) 1698-1713.
- Perez O.D., Kinoshita S., Hitoshi Y., Payan D.G., Kitamura T., Nolan G.P. and Lorens J.B. 2002. Activation of the PKB/AKT pathway by ICAM-2. *Immunity* 16(1): 51-65.
- Scott A.P., Bye V.J., Baynes S.M. and Springate J.R.C. 1980. Seasonal variations in plasma concentration of 11-ketotestosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *Fish Biol.* 17, 495-505.
- Sheng Z. and Gong Z. 2002. Expressed sequence tag analysis of expression profiles of zebrafish testis and ovary
- Staunton D.E., Dustin M.L. and Springer T.A. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339: 61-64.
- Sültmann H., Mayer W.E., Figueroa F., O'hUigin C., Klein J. 1993. Zebrafish Mhc class II alpha chain-encoding genes: polymorphism, expression, and function. *Immunogenetics* 38 : 408–420.
- Sültmann H., Mayer W.E., Figueroa F., O'hUigin C., Klein J. 1994. Organization of Mhc class II B genes in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics* 23 :1–14.

- Tsai Y-J, Chang G-D., Huang C-J., Chang Y-S. and Huang F.L. 1996. Purification and Molecular Cloning of Carp Ovarian Cystatin. *Comparative Biochemical Physiology* 113B (3): 573-580.
- Turk V., Stoka V. and Turk D. 2008 . Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers of Bioscience* 13:5406-20.
- Valentina C., Cattaneo A.G., Rossi F., Bernardini G., Terova G., Saroglia M. and. Gornati R. 2008. Genes expressed in Blue Fin Tuna (*Thunnus thynnus*) liver and gonads. *Gene*. 410, 207–213.
- Williams C.J. and Erickson G.F. 2008. Morphology and physiology of the ovary. Endotext.com เข้าถึงได้จาก <http://www.endotext.org/female/female1/femaleframe1.htm>
- Yoder J.A., Haire R.N. and Litman G.W.. 1999. Cloning of two zebrafish cDNAs that share domains with the MHC class II-associated invariant chain. *Immunogenetics* 50: 84–88.
- Zhiyong L., Ben G. and Richard D.L. 2009. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 or ICAM-2 is critical in determining sensitivity of pancreatic cancer cells to cytotoxicity by human $\gamma\delta$ -T cells: Implications in the design of $\gamma\delta$ -T-cell-based immunotherapies for pancreatic cancer. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 24(5): 900-911.



ภาคผนวก

EST clones ของปลาบึกเพศเมียระหว่างฤดูวางไข่

Clone	dbEST_Id	Accession no.	Putative identification	Closest species	Accession no.	Length	Identity	E-value
O1004	70646568	HO224396	III-FBPL precursor	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:78191600	547	85/142 (59%)	2E-43
O1005	70646569	HO224397	Intercellular adhesion molecule 2	human (<i>Homo sapiens</i>)	GI:62089342	654	158/171 (92%)	7.00E-87
O1006	70646570	HO224398	pyruvate dehydrogenase alpha 2	human (<i>Homo sapiens</i>)	GI:157696476	661	188/195 (96%)	4.00E-104
O1011	70646571	HO224399	cytochrome c oxidase subunit III	smallmouth bass (<i>Micropterus dolomieu</i>)	GI:209427679	200	28/49 (57%)	5E-03
O1016	70646572	HO224400	unknown			382		
O1021	70646573	HO224401	activin A receptor type II-like 1	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:24111232	666	203/218 (93%)	2E-78
O1024	70646574	HO224402	activin A receptor type II-like 1	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:24111232	666	203/218 (93%)	1E+00
O1029	70646575	HO224403	ribosomal protein L24	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:37747968	573	54/72 (75%)	1E-51

Clone	dbEST_Id	Accession no.	Putative identification	Closest species	Accession no.	Length	Identity	E-value
O1034	70646576	HO224404	Unknown			425		
O1037	70646577	HO224405	elongation factor-1 alpha	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:53734016	432	23/27 (85%)	5.00E-10
O2003	70646578	HO224406	unknown			398		
O2007	70646579	HO224407	ribosomal protein L23a	zebra fish(<i>Danio rerio</i>)	GI:335539	558	37/39 (94%)	1.00E-43
O2009	70646580	HO224408	alpha globin	common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	GI:2208885	385	39/46 (84%)	9.00E-29
O2012	70646581	HO224409	pyruvate dehydrogenase beta	horse (<i>Equus caballus</i>)	GI:100050581	717	107/161 (66%)	2E-50
O2013	70646582	HO224410	unknown			257		
O2020	70646583	HO224411	elongation factor 1 beta 2	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:41053941	816	133/170 (78%)	1.00E-69
O2021	70646584	HO224412	cytochrome c oxidase subunit 5B, mt precursor	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:50344982	646	98/111 (88%)	2E-55
O2023	70646585	HO224413	Unknown			720		

Clone	dbEST_Id	Accession no.	Putative identification	Closest species	Accession no.	Length	Identity	E-value
O2029	70646586	HO224414	unknown			715		
O2030	70646587	HO224415	unknown			879		
O2031	70646588	HO224416	alpha-globin	common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	GI:30507	494	94/139 (67%)	1.00E-39
O2040	70646589	HO224417	ribosomal protein P1	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:336719	239	37/39 (94%)	2E-13
O2048	70646590	HO224418	elongation factor 1 beta 2	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:41053941	816	133/170 (78%)	1.00E-69
O2051	70646591	HO224419	ribosomal protein L37	black-legged tick(<i>Ixodes scapularis</i>)	GI:215503610	335	30/59 (50%)	3E-14
O2072	70646592	HO224420	protein kinase C and casein kinase substrate in neuron 2	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:404601	240	34/82 (41%)	1E-04
O2089	70646593	HO224421	MHC class II beta chain	channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	GI:1763555	534 ,730	157/200 (78%)	3E-91
O2098	70646594	HO224422	alpha globin	common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	GI:30507	364	39/46 (84%)	9.00E-29
O5010	70646595	HO224423	ribosomal protein L7	channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	GI:336710	404	69/92 (75%)	2E-32

Clone	dbEST_Id	Accession no.	Putative identification	Closest species	Accession no.	Length	Identity	E-value
O5017	70646596	HO224424	unknown			603		
O5029	70646597	HO224425	elongation factor 1 alpha	common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	GI:28628941	398	31/51 (60%)	2E-03
O5030	70646598	HO224426	cystatin precursor	salmon (<i>Salmo salar</i>)	GI:209734846	642	42/107 (39%)	2E-12
O5031	70646599	HO224427	beta-globin	Korean catfish (<i>Parasilurus asotus</i>)	GI:13241083	346	58/75 (77%)	2.00E-27
O5045	70646600	HO224428	glucose transporter X	grass carp (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	GI:30025447	393	36/71 (50%)	6.00E-16
O5047	70646601	HO224429	transmembrane protein 144	lunicates (<i>Monodelphis domestica</i>)	GI:198434124	497	29/65 (44%)	3.00E-18
O5048	70646602	HO224430	elongation factor 1 beta 2	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:41053941	817	133/170 (78%)	1E-69

EST clones ของปลาน้ำจืดชนิดอื่นนอกตู้วางไข่

Clone	dbEST_Id	Accession no.	Putative identification	Closest species	Accession no.	Length	Identity	E-value
A1006	70646552	HO224380	alpha 3 actin	Amberjack (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	GI:47550655	281	17/22 (77%)	0.004
A1007	70646553	HO224381	beta globin	Korean catfish (<i>Parasilurus asotus</i>)	GI:13241083	236	39/46 (84%)	8.00E-16
A1009	70646554	HO224382	ribosomal protein L5	African lungfish (<i>Protopterus dolloi</i>)	GI:44966839	324	42/79 (53%)	3.00E-22
A1012	70646555	HO224383	ubiquinol-cytochrome c reductase core I protein	spotted green pufferfish (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	GI:47218978	725	106/166 (63%)	5.00E-46
A1015	70646556	HO224384	haemoglobin-beta	channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	GI:24111232	164	17/19 (89%)	0.05
A1017	70646557	HO224385	alpha-globin	common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	GI:2220885	224	21/23 (91%),	2.00E-11
A1026	70646558	HO224386	ribosomal protein L37	human (<i>Homo sapiens</i>)	GI:119576406	247	31/34 (91%)	3.00E-14
A1027	70646559	HO224387	ribosomal protein L11	black-legged tick (<i>Ixodes scapularis</i>)	GI:67084007	386	39/56 (69%)	2.00E-26

Clone	dbEST_Id	Accession no.	Putative identification	Closest species	Accession no.	Length	Identity	E-value
A1028	70646560	HO224388	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:48734808	463	58/80 (72%)	2.00E-48
A1029	70646561	HO224389	1-acylglycerol-3-phosphate o-acyltransferase	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:47087391	845	98/103 (95%),	5.00E-64
A1030	70646562	HO224390	WW domain binding protein 2	channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	GI:86370962	611	124/145 (85%)	5.00E-58
A1032	70646563	HO224391	reverse transcriptase-like protein	zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	GI:77403694	229	17/48 (35%)	0.95
A1034	70646564	HO224392	elongation factor-1 alpha	common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	GI:28628941	429	31/51 (60%)	1.00E-06
A2003	70646565	HO224393	zinc finger, UBR1 type 1	mouse (<i>Monodelphis domestica</i>)	GI:126328549	653	61/69 (88%)	8E-53
A3011	70646566	HO224394	beta-globin	Korean catfish (<i>Parasilurus asotus</i>)	GI:13241083	409	/83 (73%)	1.00E-28
A3017	70646567	HO224395	MHC class II alpha chain	channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	GI:5106888	720	187/210 (89%)	3.00E-108