บทคัดย่อ

เทคนิคการถ่ายยีนในปลาได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับแปลงพันธุกรรมปลาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาและงานวิจัยด้านต่าง ๆ ในปลา การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในปลาม้าลายโดยใช้พลาสมิด pAG ที่มียีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein) ต่อกับโปรโมเตอร์แอคตินที่ได้จากปลาเมดากะ โดยการฉีดพลาสมิด pAG เข้าสู่ไข่ของปลาม้าลายที่ได้รับการผสมแล้วที่ระยะ 1-2 เซลล์ เลี้ยงไข่ปลาที่ได้รับการฉีด pAG จนกระทั่งฟักเป็นตัวที่อุณหภูมิน้ำ 28 องศาเซลเซียส ทำการตรวจการถ่ายยีนโดยนำลูกปลามาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีนและวิเคราะห์ผลการถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว โดยวิธี PCR ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีการแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวในเซลล์ต่าง ๆ ของปลาม้าลาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรโมเตอร์แอคตินทำงานได้ในเซลล์ต่าง ๆ หรือเรียกได้ว่าเป็น house keeping gene เนื่องจากยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวได้มีการตัดต่อเข้ากับส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่เป็น nuclear localization signal ทำให้การเรืองแสงสีเขียวเกิดขึ้นมากที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงปลาที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วนำไปผสมพันธุ์กับปลาปกติเพื่อสร้างปลารุ่น F1 พบว่าอัตราการที่ลูกรุ่น F1 เป็นปลาที่ได้รับการถ่ายยีนมีค่าเท่ากับ 14 .23 $\pm$ 2.79 เปอร์เซนต์ จึงทำการเลี้ยงปลารุ่น F1 เพื่อผลิตปลารุ่น F2 ทำการตรวจการแสดงออกของยีนเรืองแสงสีเขียวในปลารุ่น F2 โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ และทำการตรวจการแสดงออกของยีนในระดับการทรานสคริบชันด้วยวิธี reverse transcription PCR

Abstract

Gene transfer technique has been used as a useful tool for genetic manipulation and genetic improvement in various kinds of fish research. In order to develop gene transfer technology for further biotechnological studies, gene transfer technique by microinjection was developed in zebrafish in this study. The plasmid (pAG) containing green fluorescent protein gene (*GFP* gene) driven by medaka actin promoter was used as the introduced gene. The plasmid pAG was microinjected into fertilized eggs at one- and two-cell stages of zebrafish. The injected embryos were maintained at 28 ^{0}C until hatching. The transgenic embryos were screened by fluorescent microscope. The transgenic embryos were confirmed by genomic DNA extraction and PCR. The GFP gene was ubiquitous, expressed in many cells of zebrafish embryos, demonstrating that actin promoter functioned as the housekeeping gene. Since the GFP gene was fused to the nucleotides encode nuclear localization signal (NLS), there was strong green fluorescence in the nucleus of the cell. The founder transgenic fish were cultured and used to produced F1 fish by mating with the wild type of fish. The percentage of transgenic F1 fish was 14 ± 2.79 %. F1 transgenic fish were kept and used to produce F2 transgenic fish. The expression of transgene of F2 embryos at protein level was observed by fluorescent microscope. In addition, the transcription of the transgene was examined by reverse transcription PCR.