การโคลน การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ และผลของแอนตาโกนิสต์ของเมลาโนคอติน 4 รีเซปเตอร์ต่อการกินได้ในปลาสลิด

นางสาวอารยา แจ้งไพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2553

CLONING, EXPRESSION OF mRNA, AND ANTAGONIST EFFECT OF MELANOCORTIN 4 RECEPTOR (*MC4R*) ON FEED INTAKE IN SNAKESKIN GOURAMI (*TRICHOGASTER PECTORALIS*)

Araya Jangprai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2010

การโคลน การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ และผลของแอนตาโกนิสต์ของเมลาโนคอติน 4 รีเซปเตอร์ต่อการกินได้ในปลาสลิด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

____

(ผศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)

ประธานกรรมการ

____

(ผศ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

____

(รศ. ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์)

กรรมการ

____

(ผศ. น. สพ. ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์)

กรรมการ

____

(อ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)

กรรมการ

____

(อ. ดร.วุฒิ ด่านกิตติกุล)

รักษาการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อารยา แจ้งไพร : การโคลน การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ และผลของแอนตาโกนิสต์ของเมลาโนคอติน 4 รีเซปเตอร์ต่อการกินได้ในปลาสลิด (CLONING, EXPRESSION OF mRNA, AND ANTAGONIST EFFECT OF MELANOCORTIN 4 RECEPTOR (*MC4R*) ON FEED INTAKE IN SNAKESKIN GOURAMI (*TRICHOGASTER PECTORALIS*)) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร, 163 หน้า.

ปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*) เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม แต่การศึกษาทางด้านลักษณะทางพันธุกรรมและทางอณูพันธุวิทยาของปลาสลิดยังมีอยู่น้อยมาก ยีนเมลาโนคอติน 4 รีเซปเตอร์ (melanocortin 4 receptor; *MC4R*) มีความเกี่ยวข้องกับสมรรถภาพการเจริญเติบโต และการควบคุมสมดุลพลังงานในสัตว์ การศึกษาลักษณะโครงสร้างของยีนและโปรตีน MC4R จากปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*) (*TpMC4R*) พบว่าโปรตีน TpMC4R มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน MC4R จากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ ผลการวิเคราะห์โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของโปรตีน TpMC4R กับ โปรตีน melanocortin receptor ชนิดต่าง ๆ ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบว่าโปรตีน TpMC4R อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับโปรตีน MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และโปรตีน TpMC4R มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับปลากระดูกแข็งมากที่สุด การศึกษาการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนที่ระยะ 5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากที่ปลาสลิดวางไข่ (hours post spawning : hps) รวมไปถึงไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ พบว่ายีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในทุกระยะของการพัฒนาการของตัวอ่อน นอกจากนี้ *TpMC4R* ยังมีการแสดงออกในไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิด้วย แสดงให้เห็นว่ายีน *TpMC4R* จัดเป็น maternal ยีนและจากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิดที่ระยะโตเต็มวัย พบว่ายีน *TpMC4R* มีการแสดงออกมากที่สุด ในสมองทุกส่วนและในอัณฑะ (testis) อวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระดับปานกลาง คือ เหงือก (gill) ตับ (liver) ไตส่วนบน (head kidney) ไตส่วนล่าง (trunk kidney) ลำไส้ (intestine) กล้ามเนื้อ (muscle) และ รังไข่ (ovary) อวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระดับต่ำ คือ กระเพาะอาหาร (stomach) และอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระดับต่ำที่สุด คือ ม้าม (spleen) การศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนของปลาสลิดในระหว่างมื้ออาหาร ได้ทำการฝึกให้ปลาสลิดกินอาหารวันละ 2 มื้อ ในเวลา 10.00 และ 16.00 น. และทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ที่เวลา 9.00 11.00 13.00 และ 15.00 น. พบว่าปลาสลิดมีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 15.00 น. หรือ 1 ชั่วโมงก่อนอาหารเย็น และเมื่อทำการศึกษาผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีน *TpMC4R* โดยทำการวิเคราะห์ระดับของยีน *TpMC4R* ที่

ระยะเวลาการอดอาหาร 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่เวลาการอดอาหาร 6 และ 12 ชั่วโมงมีระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระดับต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีน *TpMC4R* มีความสัมพันธ์กับการกินอาหารในรอบวันและสมดุลพลังงานในระหว่างการอดอาหาร และการศึกษาผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ในปลาสลิด ที่ฉีด HS024 ที่ระดับ 1 μg/kg และ 3 μg/kg เปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับการฉีด (กลุ่มควบคุม) และปลาสลิดที่มีการฉีดด้วยน้ำเกลือ (0.9% NaCl) พบว่าปลาสลิดที่ฉีดด้วย antagonist HS024 มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการกินได้ที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (*P*>0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา ____________________

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _______________

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม____________

ARAYA JANGPRAI : CLONING, EXPRESSION OF mRNA, AND ANTAGONIST EFFECT OF MELANOCORTIN 4 RECEPTOR (*MC4R*) ON FEED INTAKE IN SNAKESKIN GOURAMI (*TRICHOGASTER PECTORALIS*). THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASARN, Ph.D., 163 PP.

MELANOCORTIN 4 RECEPTOR/ MC4R/ MC4R ANTAGONIST/ FEED INTAKE/ SNAKESKIN GOURAMI/ *Trichogaster pectoralis*

Snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*) has been not only important as commercial species but also popular as aquarium fish, but its genetic aspects including conventional and molecular genetic studies are limited. Melanocortin 4 receptor (*MC4R*) has been reported to involve with growth performance and control of energy homeostasis in animals. Characterization of MC4R from Snakeskin gourami (*Trichogaster pectorali*s) (*TpMC4R*) showed that its protein sequence is similar to that of vertebrates. Phylogenetic trees analysis of TpMC4R and other vertebrates melanocortin receptors showed that TpMC4R was MC4R orthologues, closely related to piscine MC4Rs. *TpMC4R* expression was determined during embryogenesis at 5, 7, 11, 15, 21, 24 and 48 hours post spawning (hps). The expression of *TpMC4R* was also analyzed in unfertilized egg. The *TpMC4R* transcripts were detected in embryo at all developmental stages. Its mRNA was also detected in unfertilized eggs, suggesting that *TpMC4R* could be classified as maternal mRNA. Real-time RT-PCR graded expression in each organ of adult fish indicated that *TpMC4R* expression was strong in all brain regions and testis; moderate in gill, liver, head kidney, trunk kidney, intestine, muscle and ovary; low in stomach; and rare

in spleen. Fish were fed twice a day at 10:00 and 16:00, the expression profile of *TpMC4R* during daily feeding in each region of the brain was examined at 9:00, 11:00, 13:00 and 15:00. Significant reduction of the *TpMC4R* expression was seen at 15:00 (1 h before dinner). Moreover, effects of short term fasting (6, 12, 18 and 24 h) on *TpMC4R* expression were determined. Significantly lower expression of *TpMC4R* was observed at 6 and 12 hour fasting periods. The findings revealed that *TpMC4R* was related to daily feed intake and energy balance due to food deprivation. The effect of MC4R antagonist (HS024) on feed intake was also investigated. Fish injected with HS024 at 1 and 3 µg/kg-fish comparing with the uninjected fish (control group) and fish injected with normal saline (0.9% NaCl) indicated that the antagonist HS024 did not significantly increase the feed intake of the experimental fish (P>0.05).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology Student's Signature _________________

Academic Year 2010 Advisor's Signature ________________

Co-advisor's Signature ______________

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสการศึก ษาให้คำแนะนำและแนวคิดที่เป็นประโยชน์ทั้งด้านวิชาการ ด้านการดำเนินการวิจัยตลอดจนการช่วยตรวจแนะนำในการเขียน และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ อีกทั้งการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่านที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอน ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี-มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัย อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 รวมทั้งบุคลากรของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ น้อง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในระหว่างทำวิทยานิพนธ์

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ญาติพี่น้อง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในการศึกษา

อารยา แจ้งไพร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)........ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)........ค
กิตติกรรมประกาศ........ฉ
สารบัญ........ช
สารบัญตาราง........ฎ
สารบัญภาพ........ฏ
บทที่
1 บทนำ........1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย........1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย........3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย........3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย........4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ........4
2 วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง........5
2.1 ชีววิทยาของปลาสลิด........5
2.2 ระบบเมลาโนคอติน........10
2.3 เมลาโนคอติน........10
2.4 เมลาโนคอตินรีเซปเตอร์........11
2.5 Melanocotin 4 receptor (MC4R)........14
2.5.1 โครงสร้างของ MC4R........14
2.5.2 การแสดงออกของ *MC4R*........15
2.6 บทบาทของ *MC4R*........15
2.6.1 บทบาทของ *MC4R* ต่อระบบสืบพันธุ์........15
2.6.2 บทบาทของ *MC4R* ต่อความเครียด........16
2.6.3 บทบาทของ *MC4R* ต่อการควบคุมสมดุลของพลังงาน........16
2.6.4 บทบาทของ *MC4R* ต่อการควบคุมการกิน........19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7 การยับยั้งการทำงานของยีน *MC4R* ต่อการกินได้ 22

3 วิธีดำเนินการวิจัย 28

3.1 ปลาสลิดที่ใช้ในการศึกษา 28

3.2 สถานที่ทำการทดลอง 28

3.3 อุปกรณ์และสารเคมี 28

3.4 แผนการดำเนินงานที่ 1 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* เส้นสมบูรณ์ และการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนและในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด 31

3.4.1 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* และยีน β*-actin* ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Amplification 31

3.4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนปลาสลิด 57

3.4.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ 61

3.5 แผนการดำเนินงานที่ 2 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติ และผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในปลาสลิด 64

3.5.1 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติ 64

3.5.2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหาร 65

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6 แผนการดำเนินงานที่ 3 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด และการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในปลาสลิด 65

3.6.1 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด....65

3.6.2 การศึกษาระดับการใช้ MC4R antagonist ต่อการแสดงออก mRNA ของยีน *TpMC4R*....67

4 ผลการศึกษา.... 69

4.1 แผนการดำเนินงานที่ 1 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* เส้นสมบูรณ์ และการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนและในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด 69

4.1.1 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Amplification 69

4.1.2 การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้างของ cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* 87

4.1.3 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *TpMC4R* ของปลาสลิดและสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ 92

4.1.4 การโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ในปลาสลิด....97

4.1.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนปลาสลิด....111

4.1.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ 112

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 แผนการดำเนินงานที่ 2 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติ และผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในปลาสลิด 114

4.2.1 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติการเปลี่ยน....114

4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหาร 116

4.3 แผนการดำเนินงานที่ 3 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด และการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R*....119

4.3.1 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด....119

4.3.2 การศึกษาผลการใช้ MC4R antagonist ต่อการแสดงออก mRNA ของยีน *TpMC4R*....121

5 อภิปรายผล.... 125

6 สรุปและข้อเสนอแนะ 134

รายการอ้างอิง 136

ภาคผนวก 143

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย 144

ภาคผนวก ข ตารางการวิเคราะห์ Melting curve และการวิเคราะห์วาเรียนส์ 149

ประวัติผู้เขียน 163

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 ปริมาณและมูลค่าต่อหน่วยน้ำหนัก ของปริมาณผลผลิต การเลี้ยงสัตว์น้ำจืด 5 อันดับแรกของประเทศ ปี 2548 2

2.1 สรุปการเพาะพันธุ์ และการเจริญเติบโตของปลาสลิด 7

2.2 ความยาวของโปรตีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ 13

2.3 การเปรียบเทียบสารสังเคราะห์ α-MSH, MC4R antagonists (SH9119, HS131, HS014, HS024) และ MC4R agonist (MTII) 22

2.4 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์ 24

3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา 37

4.1 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่สมบูรณ์ และ Transmembrane (TM) domain ระหว่าง TpMC4R และ MC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน 90

5.1 การแสดงออกของยีน *MC4R* ในไก่และปลาชนิดต่าง ๆ 133

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ปลาสลิด.....5

2.2 ระบบ melanocortin ในสมองต่อการรักษาสมดุลพลังงาน.....18

2.3 การทำงานของ *MC4R* ต่อการควบคุมการกินได้.....21

3.1 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *MC4R* ด้านปลาย 3’ ของปลาสลิด.....34

3.2 แผนภาพพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy และลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multi-cloning site ของพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy.....40

3.3 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ ของปลาสลิด กับยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ขอปลาสลิด.....46

3.4 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β-*actin* ของปลาชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ของปลาสลิด.....53

3.5 การออกแบบไพรเมอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นขนาด 289 bp จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน *TpMC4R* เส้นสมบูรณ์ในปลาสลิด.....59

3.6 การออกแบบไพรเมอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 95 bp จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ ในปลาสลิด.....60

4.1 ผลของ Primary PCR ของการโคลน cDNA ของ *MC4R* ด้านปลาย 3’ ด้วยวิธี RACE.....70

4.2 ผลของ Second PCR ของการโคลน cDNA ของ *MC4R* ด้านปลาย 3’ ด้วยวิธี RACE.....71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.3 ผลการแยกขนาดและการทำให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของ second PCR....72
4.4 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย....74
4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของ *MC4R* ด้านปลาย 3’ ที่มีการเชื่อมต่อเวคเตอร์....76
4.6 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มี cDNA ของ *MC4R* โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI*....76
4.7 ผลการการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *MC4R* ด้านปลาย 3’ ของปลาสลิด....78
4.8 ผลของ Primary PCR และ second PCR ของการโคลน cDNA ของ *MC4R* ด้านปลาย 5’....80
4.9 ผลการแยกขนาดและการทำให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของ Third PCR....82
4.10 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของยีน *MC4R* ด้านปลาย 5’ ด้วยวิธีอย่างง่าย....84
4.11 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ที่มีการเชื่อมต่อเวคเตอร์....86
4.12 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มี cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI*....86
4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R....89
4.14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง TpMC4R และMC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน....91
4.15 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin receptor....93
4.16 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin 4 receptor....95
4.17 ผลของ PCR ของการโคลน cDNA ของยีน β-*actin*....98
4.18 ผลการแยกขนาดและการทำให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของยีน β-*actin*....100
4.19 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ ด้วยวิธีอย่างง่าย....102

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.20 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของยีน β-*actin* ที่มีขนาดประมาณ 500 bp จากการใช้ gene specific primer (GSP) ด้วยวิธีอย่างง่าย 103
4.21 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน β-*actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP) และชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3' ที่มีการเชื่อมต่อเวคเตอร์ 104
4.22 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน β-*actin* โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI* 105
4.23 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3' ในปลาสลิดด้วยวิธี RACE (Tp actin 3'RACE) 107
4.24 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน β-*actin* ในปลาสลิด ด้วยวิธี PCR โดยใช้ gene specific primer (Tp actin GSP) 109
4.25 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน β-*actin* ของปลาสลิดและปลาชนิดต่าง ๆ 110
4.26 การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนที่ระยะต่าง ๆ ของปลาสลิด....111
4.27 การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด 113
4.28 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหาร (daily feeding) 115
4.29 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารระยะสั้น (short fasting period)....117
4.30 ระดับกลูโคสในเลือดของปลาสลิดที่มีการอดอาหารในระยะสั้น 118

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.31 ผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ของปลาสลิด
โดยทำการฉีด HS024 ที่ความเข้มข้น HS024 1 μg/kg และ 3 μg/kg 120
4.32 ผลของการฉีด HS024 ต่อระดับการแสดงออกของ mRNA
ของ *TpMC4R* ในสมองของปลาสลิด 122
4.33 ผลของการแช่ (incubate) สมองปลาสลิดในสาร MC4R antagonist
(HS024) ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R*
ในสมองของปลาสลิด...124

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

ปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ถึงแม้ว่าปลาสลิดจะมีปริมาณการผลิตและมูลค่าของผลผลิตเป็นอันดับที่ 4 ของผลผลิตสัตว์น้ำจืดในประเทศรองลงมาจาก ปลานิล ปลาดุก และปลาตะเพียน แต่ปลาสลิดมีมูลค่าต่อหน่วยน้ำหนักสูงสุด (ตารางที่ 1.1) ปลาสลิดถูกนำไปประกอบอาหารทั้งในรูปปลาสด ทำเค็มและตากแห้ง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ปลาสลิดตากแห้งเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศ และส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ ในอดีตแหล่งที่ผลิตปลาสลิดปริมาณมากคือ พื้นที่ในจังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตปลาสลิดใหญ่ที่มีชื่อเสียงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ ต่อมาได้มีการขยายพื้นที่เลี้ยงไปยังจังหวัดอื่น ๆ ได้แก่ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา และสุพรรณบุรี

รูปแบบหรือระบบการเลี้ยงปลาสลิดโดยส่วนใหญ่จะเป็นระบบการเลี้ยงแบบธรรมชาติ (extensive system) โดยเป็นการเลี้ยงแบบอาศัยอาหารธรรมชาติ ได้แก่ พวกแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ และพืชน้ำ เป็นหลัก โดยเกษตรกรใช้วิธีการตัดหญ้าข้าง ๆ บ่อไปหมักเพื่อให้เกิดการเน่าสลายและความอุดมสมบูรณ์ ต่อมารูปแบบการเลี้ยงได้มีการพัฒนาเป็นระบบการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา (semi-intensive system) กล่าวคือ มีการให้อาหารสมทบในช่วงท้ายของการเลี้ยงเพื่อขุนปลาให้โตเร็วขึ้น พื้นที่ที่ใช้เลี้ยงปลาสลิดมักจะเป็นบ่อที่มีพื้นที่ขนาดใหญ่ตั้งแต่ 10 ไร่ขึ้นไป ถึง มากกว่า 100 ไร่ จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงปลาสลิดต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่ ซึ่งพื้นที่ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงปลาสลิดในเขตจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาครนั้น ได้เปลี่ยนไปเป็นพื้นที่สำหรับตั้งโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้การขยายตัวของกรุงเทพมหานคร ทำให้พื้นที่ในจังหวัดดังกล่าวเปลี่ยนเป็นพื้นที่บ้านจัดสรรสำหรับอยู่อาศัย และทำเป็นสนามบินของประเทศ จึงทำให้แนวโน้มของพื้นที่ที่ใช้ในการผลิตปลาสลิดลดลงอย่างต่อเนื่อง

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าต่อหน่วยน้ำหนัก ของปริมาณผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด 5 อันดับแรกของประเทศ ปี 2548

อันดับ ของผลผลิต	ปริมาณสัตว์น้ำจืด จากการเพาะเลี้ยง (1,000 ตัน)	มูลค่าผลผลิต การเลี้ยงสัตว์น้ำ (พันบาท)	มูลค่าผลผลิต ต่อหน่วยน้ำหนัก (บาท/กิโลกรัม)
1. ปลานิล	203.7	5,883,668	28.9
2. ปลาดุก	142.2	4,616,267	32.5
3. ปลาตะเพียน	60.6	1,776,610	29.3
4. ปลาสลิด	35.9	1,431,951	39.9
5. ปลาสวาย	27.3	564,383	20.7

ที่มา : กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง (รวบรวมข้อมูลจากกรมศุลกากร)

รูปแบบการผลิตปลาสลิดที่เป็นแบบระบบการเลี้ยงแบบธรรมชาติ และกึ่งพัฒนาทำให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ต่ำ ในการเลี้ยงปลาสลิดโดยทั่วไปจะได้ผลผลิตประมาณ 200-500 กิโลกรัมต่อไร่ ระยะเวลาการเลี้ยงนาน 10-12 เดือน จะเห็นได้ว่ารอบของการเลี้ยงปลาสลิดใช้ระยะเวลานานมากเมื่อเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ประกอบกับการขยายตัวของสังคมเมืองทำให้มีการเปลี่ยนพื้นที่ของการเลี้ยงปลาสลิดไปเป็นพื้นที่อุตสาหกรรมและที่อยู่อาศัยมากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้พื้นที่เลี้ยงปลาสลิดมีแนวโน้มที่จะลดลง ถึงแม้ว่าปลาสลิดจะเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงและการเพาะพันธุ์ปลาสลิดมาอย่างต่อเนื่อง แต่การศึกษาทางด้านพันธุกรรมปลาสลิด เพื่อนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตและการคัดเลือกพันธุ์ปลายังมีอยู่น้อยมาก

การพัฒนาเทคโนโลยีทางอณูพันธุวิทยาทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจการศึกษาทางด้านยีนที่เกี่ยวข้องกับ พฤติกรรมการกิน (feeding behavior) ดุลยภาพของพลังงาน (energy homeostasis) การการกินได้ (feed intake) การควบคุมน้ำหนักตัว (body weight regulation) ในสัตว์เศรษฐกิจ เพราะการเพิ่มอัตราการกินได้ในสัตว์และการควบคุมดุลยภาพของพลังงานที่เหมาะสมจะส่งผลให้สัตว์ที่เลี้ยงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น ลดระยะเวลาการเลี้ยงสัตว์ให้สั้นลงได้ จนถึงปัจจุบันนี้ได้มีข้อมูลการศึกษาแสดงการค้นพบ neuropeptides จำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการกินได้และสมดุลพลังงานในสัตว์ (Baile and Della-Fera, 2009) ยีนหนึ่งที่ได้มีการรายงานว่าแสดงผล

เด่นชัดต่อการควบคุมการกินได้คือ เมลาโนคอติน 4 รีเซปเตอร์ (melanocortin 4 receptor; MC4R) เมื่อยีน *MC4R* มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) เป็นผลให้สุกรมีการเพิ่มการกินได้ (Kim et al., 2000; Kim et al., 2004) และยังมีรายงานการศึกษาถึงการพัฒนาการใช้ยีน *MC4R* เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกพันธุ์สุกร (marker-assisted selection) (Kim et al., 2006) นอกจากนี้ได้มีรายงานการศึกษาการสังเคราะห์ non-peptide antagonists ของยีน *MC4R* โดยทดลองฉีดสารเข้าไปในปากเพื่อให้หนูกิน ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการกินได้ในหนู (Tucci et al., 2005) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะใช้เทคนิคทางอณูพันธุวิทยาเพื่อนำมาโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ในปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*) (ซึ่งจะใช้คำว่า TpMC4R) และทำการศึกษาผลของการทำหน้าที่ของยีน *MC4R* โดยการฉีด MC4R antagonist เพื่อยับยั้งการทำงานของยีน *TpMC4R* ต่อการเพิ่มอัตราการกินได้ของปลาสลิด

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1.2.1 เพื่อโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* รวมทั้งการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนและการเปรียบเทียบความเหมือนกันของยีนกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ

1.2.2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน (embryo)

1.2.3 เพื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่างๆ

1.2.4 เพื่อศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารและในสภาวะการอดอาหาร

1.2.5 เพื่อศึกษาผลของการทำหน้าที่ของยีน *MC4R* โดยการฉีด MC4R antagonist เพื่อยับยั้งการทำงานของยีน *TpMC4R* ต่อการเพิ่มอัตราการกินได้ของปลา

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

โปรตีน TpMC4R มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโปรตีน MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน มีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ในระดับที่แตกต่างกัน การแสดงออกของยีน *TpMC4R* มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างมื้ออาหารและในสภาวะการอดอาหาร ยีน *MC4R* มีความสำคัญในการควบคุมการกินได้ของปลาสลิด และเมื่อมีการยับยั้งการทำงานโดยการฉีด MC4R antagonist จะสามารถเพิ่มการกินได้ของปลาสลิด

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* รวมทั้งการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนและการเปรียบเทียบความเหมือนกันของโปรตีน MC4R กับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน, ในอวัยวะต่าง ๆ และในระหว่างมื้ออาหารและในสภาวะการอดอาหารของปลาสลิด ทำการศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist ต่อการเพิ่มอัตราการกินได้ของปลาสลิด

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลงานวิจัยนี้จะทำให้ได้ข้อมูลเชิงวิชาการและการนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำดังนี้

1.5.1 ทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R*

1.5.2 ทราบการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน, ในอวัยวะต่าง ๆ และในระหว่างมื้ออาหารและในสภาวะการอดอาหารของปลาสลิด

1.5.3 ทราบผลของการทำหน้าที่ของยีน *MC4R* ต่อการเพิ่มการกินได้ของปลาสลิด

1.5.4 สามารถนำข้อมูลจากการศึกษาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยในอนาคตได้ ซึ่งสามารถศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *MC4R* ในปลาชนิดอื่น ๆ เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิต และสามารถทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ในปลาชนิดอื่น ๆ ได้ อีกทั้งยังสามารถใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ไปใช้เป็นส่วนหนึ่ง ในการศึกษา polymorphism ของยีน *MC4R* ในปลาสลิด ซึ่ง polymorphism นั้นมีหน้าที่ต่อการกินได้ในปลาสลิด ซึ่งอาจจะพัฒนาในการใช้ยีน *MC4R* เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ปลาสลิดได้

บทที่ 2
วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของปลาสลิด

ปลาสลิด (Snakeskin gourami) หรือปลาใบไม้ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichogaster pectoralis* เป็นปลาน้ำจืด

ภาพที่ 2.1 ปลาสลิด

2.1.1 ลักษณะทางด้านอนุกรมวิธาน

ปลาสลิดจัดอยู่ใน ไฟลัม (Phylum) *Chordata*
ชั้น (Class) *Actinopterygii*
อันดับ (Order) *Labyrinthici*
วงศ์ (Family) *Anabantidae*
สกุล (Genus) *Trichogaster*
สปีชีส์ (Species) *Trichogaster pectoralis*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.1.2 ลักษณะรูปร่างทั่วไป

ปลาสลิดเป็นปลาน้ำจืด มีรูปร่างแบนข้างคล้ายใบไม้ความลึกลำตัว (body depth) เป็น 2.2-2.5 เท่าของความยาวมาตรฐาน (standard length) ครีบหลัง (dorsal fin) มีก้านครีบแข็ง 7 อันและก้านครีบอ่อน 10-11 อัน ครีบก้น (anal fin) มีก้านครีบแข็ง 9-11 อันและมีก้านครีบอ่อน 36-38 อัน ครีบอก (pectoral fin) ยาวกว่าความยาวของหัวและมีก้านครีบอ่อน 11 อัน ครีบอันแรกของครีบท้อง (pelvic fin) เปลี่ยนไปเป็นลักษณะเส้นยาว (simple filament) จำนวนเกล็ดตามเส้นข้างตัว (lateral line scales) มีจำนวน 55-63 เกล็ด มีลายพาดขวางตามบริเวณลำตัว และลำตัวตัดกับลายดำเป็นแถบ

ยาวจากหัวถึงโคนหาง มีเกล็ดเป็นแบบปลายหยัก (ctenoidscaks) หลายหยัก มีเกล็ดที่หัว ตาโต ปากเล็กอยู่หน้าสุดยืดหดได้เล็กน้อย (บุญยรัตน์ จันทร์สว่าง, 2523)

2.1.3 ที่อยู่อาศัย

ปลาสลิดมีอวัยวะพิเศษช่วยหายใจเรียกว่า Labyrinth organ ช่วยให้ปลาสลิดใช้ออกซิเจนจากอากาศได้โดยตรงจึงทำให้ปลาสลิดมีความทนทานต่อสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยได้ ปลาสลิดเป็นปลาที่ชอบอาศัยอยู่ในน้ำนิ่ง เช่น ตามท้องนา ร่องน้ำ คูน้ำ แอ่งน้ำ หนอง และบึง มักชอบอาศัยอยู่ตามบริเวณที่มีพรรณไม้น้ำ เช่น ผักและสาหร่าย เพื่อใช้เป็นที่พักอาศัย กำบังตัว และอาจจะใช้เป็นแหล่งก่อหวอดวางไข่นอกจากนี้ยังพบว่าปลาสลิดเป็นปลาที่ชอบอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 23-25^{o}C และเจริญเติบโตอยู่ในน้ำที่มีความเป็นกรดถึง pH 5.6-6 และเป็นด่างได้ถึง pH 9

2.1.4 การสืบพันธุ์

ปลาสลิดเป็นปลาที่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้กับเพศเมียอย่างเด่นชัดโดยสังเกตจากลักษณะภายนอกได้ชัดเจน ตัวผู้มีลำตัวยาวเรียว สันหลังและสันท้องเกือบเป็นเส้นตรงขนานกัน มีครีบหลังยาวจรดหรือเลยโคนหาง ลำตัวมีสีเข้มกว่าตัวเมีย ส่วนตัวเมียมีสันท้องยาวมนไม่ขนานกับสันหลัง และครีบหลังมนไม่ยาวจรดถึงโคนหาง สีจางกว่าตัวผู้ ในฤดูวางไข่ท้องจะอูมเป่งออกมาทั้งสองข้างอย่างเห็นได้ชัด ปลาที่พบตามธรรมชาติจะมีขนาดเล็กกว่าปลาที่เลี้ยง และมีอายุประมาณ 6-8 เดือนเป็นส่วนใหญ่ ปลาสลิดขนาด 8-10 ซม. ก็สามารถสืบพันธุ์ได้ ปลาสลิดจะเติบโตถึงขั้นสืบพันธุ์ได้ภายในเวลา 7-12 เดือน ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมและปริมาณอาหารเป็นสำคัญ (สุปราณี ชินบุตร, 2515-2516)

2.1.5 การเจริญเติบโต

ไข่ปลาสลิดจะเริ่มฟักเป็นตัวภายในระยะ 24 ชั่วโมง ฟักโดยทยอยออกมาเป็นตัวเรื่อย ๆ และจะฟักเป็นตัวหมดภายใน 48 ชั่วโมง ลูกปลาที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ มีถุงอาหารติดอยู่ที่ท้อง ยังไม่กินอาหารจนกว่าจะพ้น 7 วันไปแล้ว การเจริญเติบโตของปลาสลิดที่เลี้ยงในบ่อดินและในแปลงข้าวโดยเฉลี่ยทั่ว ๆ ไปแล้วใช้เวลา 3 เดือน ปลาจะมีความยาว 7-9 ซม. 6 เดือน ยาว 10-12 ซม. และต้องทำการเลี้ยง 8-10 เดือนจึงจะมีขนาด 14-22 ซม. มีน้ำหนัก 50-150 กรัม ที่จะสามารถจับขายได้ (ประเทือง เชาว์วันกลาง, 2536)

ตารางที่ 2.1 สรุปการเพาะพันธุ์ และการเจริญเติบโตของปลาสลิด

ระยะปลาสลิด	ระยะเวลาเลี้ยง	กินอาหาร	สถานที่	ที่มา
ไข่ปลาสลิดฟักเป็นตัว	ประมาณ 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้น 3-4 ชั่วโมง ลูกปลาจะลอยขึ้นเหนือน้ำ	ลูกปลาจะดูดซึมไข่แดง (yolk sac) ตรงหน้าท้องเป็นอาหาร	บ่อฟัก เช่น บ่อซีเมนต์ ถังพลาสติก	อาคม ชุ่มธิ (2548)
การอนุบาลลูกปลาสลิดวัยอ่อน ถึงขนาดความยาว 2-3 ซม.	ประมาณ 1 เดือน	หลังจากฟักออกเป็นตัว 7 วัน เริ่มกินอาหารตามธรรมชาติ ที่เกิดจากการใส่ปุ๋ยและฟันหญ้า ได้แก่แพลงก์ตอนสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ไรแดง โรติเฟอร์ หรืออาจให้อาหารสมทบ เช่นรำละเอียด	บ่ออนุบาล เช่น บ่อดิน หรือแปลงนา	
การเลี้ยงปลาสลิด	ประมาณ 8-10 เดือน มีขนาด 14-22 ซม. มีน้ำหนัก 50-150 กรัม ที่จะสามารถจับขายได้	ใส่ปุ๋ย ฟันหญ้า และให้อาหารสมทบ	บ่อเลี้ยง เช่น บ่อดิน แปลงนา	ประเทือง เชาว์วันกลาง (2536)
	ประมาณ 7-12 เดือน ปลาสลิดจะเติบโตถึงขั้นสืบพันธุ์ได้	ใส่ปุ๋ย ฟันหญ้า และให้อาหารสมทบ	บ่อเลี้ยง เช่น บ่อดิน แปลงนา	

2.1.6 การให้อาหาร

ในธรรมชาติปลาสลิดจะกินแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะกินตัวอ่อนของแพลงก์ตอนสัตว์ที่เกาะติดพันธุ์ไม้น้ำ หรือหญ้าที่เน่าเปื่อย ตัวอ่อนแมลงน้ำและตะไคร่น้ำ สำหรับอาหารที่เหมาะสมสำหรับปลาวัยอ่อนซึ่งมีอายุตั้งแต่ 7 วัน ถึง 1 เดือน ควรเป็นตะไคร่น้ำและไรน้ำ และเมื่อปลามีอายุมากขึ้นควรให้อาหารผงสำเร็จรูปที่มีคุณค่าอาหารและวิตามินครบถ้วนเป็นอาหารเสริม ต่อจากนั้นก็ลองให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นอาหารต่อไป สำหรับอาหารเสริมที่นิยมใช้เลี้ยงปลาสลิด คือ รำละเอียด ปลายข้าว ต้มปนกับผักบุ้งที่หั่นแล้วเคล้ากับรำนั้นปั้นเป็นก้อน หรืออาจใช้อาหารเม็ดเช่นเดียวกับที่ใช้เลี้ยงปลานิลเป็นอาหารประจำวัน โดยมีส่วนผสมดังนี้ ผัก 2 ส่วน ต่อ รำ 1 ส่วน ต่อปลายข้าว 1 ส่วน (อาคม ชุมธิ, 2548)

การเพาะเลี้ยงปลาสลิดในอดีตเป็นการเลี้ยงในนาปลา ซึ่งแต่เดิมคือนาข้าวเป็นการเลี้ยงแบบธรรมชาติ โดยอาศัยอาหารจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว ทำให้ไม่สามารถคาดคะเนผลผลิตที่แน่นอนได้ ต่อมาได้มีการพัฒนาการเลี้ยงมาเป็นแบบกึ่งพัฒนา โดยมีการเพิ่มอาหารธรรมชาติในนาปลา โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ได้แก่ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการให้อาหารสมทบ ได้แก่ รำละเอียด ปลาป่น เศษอาหาร และอาหารสำเร็จรูป เป็นต้น ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นและมีความแน่นอนมากขึ้น (อาคม ชุมธิ, 2548) และนอกจากนี้ยังมีการพยายามหาวิธีการเพิ่มการผลิตปลาสลิด โดยการขยายพื้นที่การเพาะเลี้ยงไปยังพื้นที่ใกล้เคียง และการเพาะเลี้ยงพันธุ์ปลาสลิดโดยการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (เช่น suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ (เช่น Motilium M) แต่อย่างไรก็ตามการเพาะพันธุ์ปลาสลิดก็ยังมีปัญหาอยู่ เนื่องจากปลาสลิดจะใช้ระยะเวลานานในการเจริญเติบโต ซึ่งต้องทำการเลี้ยง 8-10 เดือน จึงจะมีขนาด 14-22 เซนติเมตร มีน้ำหนัก 50-150 กรัม ที่จะสามารถจับขายได้ (ประเทือง เชาว์วันกลาง, 2536) ดังนั้นถ้าสามารถเร่งการเจริญ เติบโตของปลาสลิดให้เร็วขึ้นได้ก็จะสามารถทำให้ลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงปลาสลิดซึ่งก็จะเป็นการเพิ่มผลผลิตได้

การพัฒนาเทคโนโลยีทางอณูพันธุวิทยาทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจการศึกษาทางด้านยีนที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการกิน (feeding behavior) ดุลยภาพของพลังงาน (energy homeostasis) การการกินได้ (feed intake) การควบคุมน้ำหนักตัว (body weight regulation) ในสัตว์เศรษฐกิจ เพราะการเพิ่มอัตราการกินได้ในสัตว์และการควบคุมดุลยภาพของพลังงานที่เหมาะสมจะส่งผลให้สัตว์ที่เลี้ยงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น ลดระยะเวลาการเลี้ยงสัตว์ให้สั้นลงได้ จนถึงปัจจุบันนี้ได้มีข้อมูลการศึกษาแสดงการค้นพบ neuropeptides จำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการกินได้และสมดุลพลังงานในสัตว์ (Baile and Della-Fera, 2009) ยีนหนึ่งที่ได้มีการรายงานว่าแสดงผลเด่นชัดต่อการควบคุมการกินได้คือ เมลาโนคอติน 4 รีเซปเตอร์ (melanocortin 4 receptor; MC4R) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อยีน MC4R มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) ในตำแหน่งที่ 298 ที่ทำ

ให้ aspartic acid ถูกเปลี่ยนเป็น asparagine ซึ่งส่งผลให้สุกรมีการเพิ่มการกินได้ และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต (Kim, Larsen, Short, Plastow and Rothschild, 2000; Kim, Reecy, Hsu, Anderson and Rothschild, 2004) ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีน *MC4R* มีส่วนในการควบคุมการกินได้ และ single nucleotide polymorphism (SNP) ในยีน *MC4R* ที่มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะทางเศรษฐกิจ ได้แก่ ความหนาของไขมันสันหลัง การกินได้ และอัตราการเจริญเติบโตในสุกร ส่วนในโคมีการศึกษา polymorphism ของยีน *MC4R* พบว่าลำดับเบสในตำแหน่งที่ 1069 (G/C) มีผลเกี่ยวข้องกับไขมันสันหลังในโค (Huang, Gao, Li, Ren, Chen and Xu, 2010) การศึกษาการเกิด mutation ใน 5' regulation region และ coding region ของยีน *MC4R* ในไก่มีผลต่อความหลากหลายของการเจริญเติบโตและคุณภาพซากในไก่ (Xuemei, Ning, Xuemei, Xingbo, Qingyong and Xiuli, 2006) และมีรายงานการศึกษายีน *MC4R* ใน Landes geese ซึ่งมีการวิเคราะห์เกี่ยวกับ 2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) ได้แก่ จีโนไทป์ c.108G →A และ จีโนไทป์ c.627C →T ซึ่งจีโนไทป์ทั้งสองมีผลต่อคุณภาพซาก เช่น น้ำหนักซาก เปอร์เซ็นต์กล้ามหน้าอก เปอร์เซ็นต์กล้ามเนื้อขา และน้ำหนักเครื่องในเป็นต้น (Huang, Wang, He and Liu, 2010) ต่อมาได้มีรายงานการศึกษาถึงการพัฒนาการใช้ยีน *MC4R* เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกพันธุ์สุกร (marker-assisted selection) (Kim et al., 2006) นอกจากนี้ได้มีรายงานการศึกษาการสังเคราะห์ non-peptide antagonists ของยีน MC4R โดยทดลองฉีดสารเข้าไปในปากเพื่อให้หนูกิน ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการกินได้ในหนู (Tucci et al., 2005) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะใช้เทคนิคทางอณูพันธุวิทยามาโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ของปลาสลิด (*Trichogaster pectoralis*) (ซึ่งจะใช้คำว่า TpMC4R) และทำการศึกษาผลของการทำหน้าที่ของยีน *MC4R* โดยการฉีด MC4R antagonist เพื่อยับยั้งการทำงานของยีน *TpMC4R* ต่อการเพิ่มอัตราการกินได้ของปลาสลิด

MC4R เป็นสมาชิกตัวหนึ่งใน melanocortin receptor (MCRs) หรือเรียกอีกชื่อว่า 7-transmembrane G-protein-coupled receptor โดยมีสมาชิกทั้งหมด 5 ตัว คือ MC1R, MC2R, MC3R, MC4R และ MC5R ซึ่ง MCRs จะทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของ melanocortin peptide ซึ่ง melanocortin peptide ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสร้างเม็ดสี (pigmentation), การสร้าง steroid hormone (steroidogenesis), การตอบสนองต่อความเครียด, การควบคุมสมดุลของพลังงาน (energy homeostasis), การกินได้ (feed intake), การทำหน้าที่เกี่ยวกับเพศ (sexual function) และการควบคุม exocrine glands (Cerda-Reverter, Ringholm, Schioth and Peter, 2003)

2.2 ระบบเมลาโนคอติน (Melanocotin system)

Melanocortin system ประกอบไปด้วย เมลาโนคอติน (Melanocortin peptide) ซึ่งเป็นสาร agonist ต่อ melanocortin receptor, เมลาโนคอตินรีเซปเตอร์ (Melanocortin receptors : MCRs) และสาร endogenous melanocortin antagonists คือ Agouti signaling peptide (ASIP) และ Agouti-related protein (AgRP) (Bertile and Raclot, 2006) ซึ่งจะเข้าไปจับกับ MCRs ได้ โดย ASIP จะจับกับ MC1R มีผลต่อการควบคุมจำนวนเม็ดสีดำ (eumelanin) และสีแดง/เหลือง (phaemelanin) บนขนหรือผิวหนังในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Rees, 2003) และ AgRP จับกับ MC4R มีผลทำให้เพิ่มการกินได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด (Metz, Peters, and Flik, 2006; Lasaga, Debeljuk, Durand, Scimonelli and Caruso, 2008) ซึ่ง melanocortin system นั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่การควบคุมการให้สี (pigmentation), การสร้าง steroid hormone (steroidogenesis), การตอบสนองต่อความเครียด, การควบคุมสมดุลของพลังงาน (energy homeostasis), การกินได้ (feed intake), การทำหน้าที่เกี่ยวกับเพศ (sexual function) และการควบคุม exocrine glands

2.3 เมลาโนคอติน (Melanocortin peptide)

Melanocortin peptide คือ neuromodulatory peptide ถูกสร้างมาจากโปรตีนตั้งต้นคือ pro-opiomelanocortin (POMC) โดยผ่านกระบวนการ posttranslation ทำให้ผลผลิตเป็น melanocyte-stimulating hormone (α-, β- และ γ-MSH) และ adrenocorticotropic hormone (ACTH) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง melanocortin peptide จะถูกผลิตที่ต่อมใต้สมองและระบบประสาทส่วนกลางเป็นหลัก melanocortin peptide มีการแสดงออกในระบบประสาทของ arcuate nucleus ของสมองส่วน hypothalamus และระบบประสาทใน nucleus ของ salitary tract ใน brain stem ซึ่งจะครอบคลุมถึง paraventricular nucleus, lateral hypothalamus และส่วนต่าง ๆ ในสมอง เช่น amygdale, cortex, hip-pocampus, medulla, mesencephalon และ spinal cord และนอกจากนี้ยังสามารถพบการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่น ๆ ด้วย melanocortin peptide ทุกตัวจะประกอบไปด้วย 7 peptide เป็นหลัก (heptapeptide core) คือ Met^{4}-Glu^{5}-His^{6}-Phe^{7}-Arg^{8}-Trp^{9}-Gly^{10} แต่ใน γ-MSH ในตำแหน่ง Gly^{10} จะถูกแทนที่ด้วย Asp^{9} ซึ่งในตำแหน่งที่ 4-9 ของ α-MSH จะมีความจำเป็นต่อการจับกับ MC1R ดังนั้นหาก Glu^{5} ถูกแทนที่ด้วย Ala จะไม่มีผลทำให้ความสามารถในการจับ (affinity) กับรีเซปเตอร์ลดลง แต่เมื่อมีการแทนที่ Met^{4}, His^{6}, Phe^{7}, Arg^{8} และ Trp^{9} ด้วย Aln จะมีผลทำให้ความสามารถในการจับ (affinity) กับรีเซปเตอร์ลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่า His^{6} มีความจำเป็นต่อการจับกันของ peptide และ MCRs นอกจากนี้ peptide ในตำแหน่ง 4, 7, 8 และ 9 มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง melanocortin peptide กับ MCRs และหากมีการแทนที่ Gly^{10} ของ α-MSH ด้วย Asp และ Pro^{12} แทนด้วย Ala จะมีผลทำ

ให้ความสามารถในการจับของ peptide ลดลง (Sahm, Olivier, Branch, Moss and Pouton, 1994; Peng, Sahm, Doherty, Kinsman, Moss and Pouton, 1997)

2.4 เมลาโนคอตินรีเซปเตอร์ (Melanocortin receptors; MCRs)

Melanocortin receptors หรือเรียกอีกชื่อว่า 7-transmembrane G-protein-coupled receptor จัดอยู่ในโปรตีนกลุ่ม G-protein-coupled receptor (GPCRs) ใน rhodopsin family โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มนี้มีด้วยกัน 5 ชนิด ได้แก่ MC1R, MC2R, MC3R, MC4R และ MC5R โดย MCRs จะทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ของฮอร์โมน α, β และ γ-melanocyte stimulation hormone (α, β, และ γ- MSH) และฮอร์โมน ACTH โดย MCRs แต่ละตัวทำหน้าที่ทางสรีรวิทยาแตกต่างกันออกไป

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ มียีน *MCRs* ทั้งหมด 5 subtype ซึ่งยีน *MCRs* จะไม่มีส่วนของ intron และมีเพียง 1 exon อย่างไรก็ตามปลาในกลุ่ม puffer fish ยกเว้นในปลา zebrafish (*Danio rerio*) ที่มียีน *MC2R* และ *MC5R* ที่ประกอบด้วย 1 intron และ 3 intron ตามลำดับ ซึ่ง *MCR*s ของปลาในกลุ่ม puffer fish จะมีทั้งหมด 4 subtype ซึ่งประกอบไปด้วย *MC1R*, *MC2R*, *MC4R* และ *MC5R* ในปลา zebrafish มี *MCRs* ทั้งหมด 5 subtype ประกอบด้วย *MC1R*, *MC2R*, *MC4R*, *MC5Ra* และ *MC5Rb* (Logan, Bryson-Richardson, Taylor, Currie and Jackson, 2003)

Melanocortin 1 receptor (MC1R) เป็น receptor ซึ่งถูกโคลนมาจาก melanoma cells สามารถจับ α-MSH ได้อย่างมี affinity สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ MCRs ตัวอื่น ๆ หรืออาจเรียก MC1R ว่า α-MSH receptor ยีน *MC1R* จะทำหน้าที่ในการควบคุมการให้สี และจะมีการแสดงออกใน melanocytes ที่ผิวหนัง แต่ไม่มีการตรวจพบในเซลล์ภูมิคุ้มกันอันได้แก่ neutrophils, monocytes, dendritic cells, endothelial cells และ B lymphocytes นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบใน glioma cells, astrocytes และมีการตรวจพบเพียงเล็กน้อยในระบบประสาทของ periaqueductal gray (Metz et al., 2006) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม MC1R จะสามารถจับกับ ACTH ได้อย่างมี affinity ปานกลางเท่านั้น แต่สำหรับ MC1R ของปลา fugu (*Takifugu rubripes*) (Klovins et al., 2004) และปลา tilapia (*Oreochromis mossambicus*) สามารถจับกับ ACTH ได้อย่างมี affinity สูงที่สุด (Van der Salm, Metz, Wendelaar Bonga and Flik, 2005)

Melanocortin 2 receptor (MC2R) เป็น receptor ที่มีความเฉพาะเจาะจงสำหรับ ACTH ใน adrenal cortex หรืออาจเรียก MC2R ว่า ACTH receptor MC2R มีผลต่อการกระตุ้นการหลั่งของ adrenal steroid ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยีน *MC2R* จะมีการแสดงออกในบริเวณ adrenal gland เป็นหลัก และสามารถพบใน adipocyte (Metz et al., 2006) ในปลา fugu ยีน *MC2R* จะมีการแสดงออกในบริเวณสมองส่วนต่าง ๆ และในไตส่วนบน (head kidney) (Klovins et al., 2004) และสำหรับใน

ปลา carp ยีน *MC2R* จะมีการแสดงออกในบริเวณไตส่วนบน (head kidney) ในระดับสูง และมีการแสดงออกในม้าม (spleen) ในระดับต่ำ (Metz, Geven, vanden Burg and Flik, 2005)

Melanocortin 3 receptor (MC3R) เป็น receptor ของ γ-MSH ยีน *MC3R* จะมีการแสดงออกในสมองเพียงเล็กน้อย ได้แก่บริเวณ hypothalamus, septum, hippocampus, olfactory cortex, thalamus, และ amygdala นอกจากนี้ยีน *MC3R* มีการแสดงออกในหัวใจ, adrenal cortex, placental tissue และระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ กระเพาะอาหาร, สำไส้เล็กส่วน duodenum และตับอ่อน ซึ่งยีน *MC3R* มีความสัมพันธ์ต่อการควบคุมสมดุลของพลังงาน และมีหน้าที่ต่อการควบคุมการกินได้ (Metz et al., 2006)

Melanocortin 4 receptor (MC4R) เป็น receptor สำหรับ β-MSH หรืออาจเรียกว่า β-MSH receptor แต่จากรายงานการศึกษาของ Metz et al. (2006) เมื่อพิจารณาถึงค่าปฏิกิริยา (affinity) การจับกันของ ligand และ receptor พบว่า α-MSH เป็น natural ligand สำหรับ MC4R มากกว่า β-MSH แต่สำหรับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในปลา spiny dogfish (*Squalus acanthias*) MC4R จะสามารถจับ β-MSH ได้อย่างมี affinity สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ melanocortin peptide ตัวอื่น ๆ (Ringholm et al., 2003) อย่างไรก็ตามในปลา fugu และ ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) MC4R จะสามารถจับ α-MSH และβ-MSH ได้อย่างมี affinity สูงมากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Klovins et al., 2004; Haitina et al., 2004) ซึ่งโดยทั่วไป MC4R จะสามารถจับกับ α-MSH, β-MSH, ACTH ได้ดีกว่า γ-MSH ยีน *MC4R* มีการแสดงออกที่บริเวณสมองเป็นหลัก ได้แก่ สมองส่วน telencephalon, metencephalon, mesencephalon และ diencephalon ซึ่งยีน *MC4R* จะมีความสำคัญต่อการควบคุม neuroendocrine, erectile activity, การควบคุมสมดุลของพลังงาน และการกินได้

Melanocortin 5 receptor (MC5R) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม MC5R สามารถจับ α-MSH, β-MSH และ ACTH ได้อย่างมี affinity สูง (Haitina et al., 2004) เช่นเดียวกับในปลา zebrafish และปลา goldfish (*Carassius auratus*) (Ringholm et al., 2002; Cerda-Reverter et al., 2003) ส่วนในปลา cyprinid และปลา zebrafish (Ringholm et al., 2002) จะมี MC5R 2 form คือ MC5Ra และMC5Rb ยีน *MC5R* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการแสดงออกในสมองส่วน cortex, striatum, cerebellum, pituitary gland และสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ, ผิวหนัง, กล้ามเนื้อ, adrenocortical zona glomerulosa, thymus, leukocytes, ปอด, ม้าม, รังไข่ และอัณฑะ ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยีน *MC5R* มีความสำคัญในการควบคุม exocrine glands เช่น harderian gland, preputal gland, lacrimal gland และ sebaceous gland (Metz et al., 2006)

ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีน *MCRs* แต่ละตัวนั้นมีบทบาทหน้าที่ในการทำงานที่แตกต่างกันยีน *MCRs* 2 ตัว ที่มีความสำคัญต่อการควบคุมการกินได้ คือยีน MC3R และยีน *MC4R* การศึกษาวิจัยทางด้าน

เทคโนโลยีการผลิตสัตว์จึงให้ความสนใจกับยีน *MC4R* เพราะมีรายงานวิจัยบทบาทหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับอัตราการกินได้ (feed intake) และการควบคุมสมดุลของพลังงาน (energy homeostasis) ในสุกร (Barb, Robertson, Barrett, Kraeling and Houseknecht, 2004), หนู (Kask et al., 1998), นก ring drove (Strader, Schioth and Buntin, 2003) และ ปลา Brafin flounder (*Verasper moseri*) (Kobayashi, Tsuchiya, Yamanome, Schioth, Kawauchi and Takahasi, 2008) และได้มีรายงานการศึกษาทางด้านอณูพันธุศาสตร์ของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ที่มีความความสำคัญทางเศรษฐกิจ แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ความยาวของโปรตีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ

GenBank accession no.	ชนิดสัตว์	จำนวนกรดอะมิโน
EF 080880	คน (Human)	332
NM_013099	หนู (Rat)	332
NM_174110	วัว (Cattle)	332
EU 622853	แกะ (Sheep)	332
DQ 084210	สุนัข (Dog)	332
AB 021664	สุกร (Pig)	332
AY 545057	ไก่ (Chicken)	331
AY 16850	ปลาม้าลาย (Zebrafish)	326
AY 161856	ปลาฟุกุ (Fugu)	322
AY534915	ปลาเทร้า (Trout)	339
AJ 534337	ปลาทอง (Goldfish)	326

2.5 Melanocortin 4 receptor (MC4R)

2.5.1 โครงสร้างของ MC4R

โครงสร้างของ MC4R ประกอบด้วยส่วนของ N-terminal domains, cysteines residues, C-terminal domain, N-link glycosilation sites, transmembrane domain (TM) 7 domain, protein kinase C of phosphorylation site, PMY motif, DRY motif และ DPIIY (NPXXY) motif ซึ่งบริเวณ N-terminal domain ไม่มีความสำคัญต่อการจับและการทำปฏิกิริยาของ MCR กับ MSH (Srinivasan et al., 2004) ยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่จะมี N-linked glycosylation site และ protein kinase C of phosphorylation site อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน โดยตำแหน่งของ phosphorylation ที่อยู่ในบริเวณ intracellular loop (ICL) ที่ 2 จะมีความสำคัญต่อการกำหนดการจับของ G-protein ซึ่งมีความเกี่ยวข้องต่อการควบคุมระดับของปฏิกิริยา (Shinyama, Masuzaki, Fang and Flier, 2003) TM domain จะมีความสำคัญต่อการจับและการทำปฏิกิริยาของ MC4R (Lagerstrom et al., 2003; Oosterom et al., 1999) ยีน *MC4R* ในคน, ไก่, ปลา Brafin flounder, ปลา Saebass (*Dicentrarchus labrax*), ปลา Fugu , ปลา Rainbow trout, ปลา Goldfish และปลา Zebrafish มี cysteine 15 residues (Tan et al., 2009; Takeuchi and Takahashi, 1998; Kobayashi et al., 2008; Sanchez et al., 2009; Klovins et al., 2004a; Haitina et al., 2004; Cerda-Reverter et al., 2003a; Ringholm et al., 2002) ซึ่ง cysteine residues มีความสำคัญต่อโครงสร้างทุติยภูมิในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) เพื่อเชื่อมโยงระหว่าง extracellular loop (ECL) ในแต่ละตำแหน่ง (Tarnow, Schoneberg, Krude, Gruters, and Biebermann, 2003) นอกจากนี้ PMY motif, DRY motif และ DPIIY (NPXXY) motif ของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่จะมีความตรงกันสูง DRY motift สามารถพบใน GPCRs ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ซึ่ง DRY motift มีความสำคัญต่อการรักษาสภาพรูปร่างของ MCR เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่สามารถจับ ligand ได้ (Schioth, Haitina, Fridmanis and Klovins, 2005)

ตำแหน่งของกรดอะมิโนในโครงสร้างของโปรตีน MC4R มีความสำคัญในการจับกันระหว่าง MSH peptide และ MC4R ซึ่งโครงสร้างโปรตีน MC4R ของคน มี acidic residues คือ Asp ในตำแหน่ง 122 และ 126 (ซึ่งอยู่ใน transmembrane domain ที่ 3) และ basic residues คือ His ในตำแหน่ง 264 (อยู่ใน transmembrane domain ที่ 4) กรดอะมิโนทั้งสองตำแหน่งเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญต่อการจับกับ ligand ส่วน Glu^{100}, Met^{200}, Trp^{258} และ Phe^{261} เป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับกับ α-MSH และนอกจากนี้ Ser^{127}, Tyr^{187}, Ala^{192} และ Phe^{267} ก็มีส่วนช่วยในการจับกับ ligand (Lee et al., 2001) ซึ่งโปรตีน MC4R ของปลา brafin flounder, ปลา saebass, ปลา fugu, ปลา rainbow trout, ปลา goldfish, ปลา zebrafish และ ปลา spiny dogfish ต่างก็มีกรดอะมิโนดังกล่าวแต่ตำแหน่งของกรดอะมิโนจะไม่ตรงกัน (Kobayashi et al., 2008; Sanchez et al., 2009;

Klovins et al., 2004; Haitina et al., 2004; Cerda-Reverter et al., 2003; Ringholm et al., 2002; Ringholm et al., 2003) ซึ่งโปรตีน MC4R ของปลาจะมีการแทนที่กรดอะมิโน Ala^{192} และ Phe^{267} ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามในการจับของ MC4R จะสามารถจับกับ cyclic peptide ได้ดีกว่า non cyclic peptide เนื่องจาก cyclic peptide มี affinity ต่อการจับกับ MC4R ที่สูงกว่า ซึ่งโปรตีน MC4R ของคนมีกรดอะมิโน Try^{268} จะทำให้ MC4R ขาดความสามารถในการจับกับ non cyclic peptide เมื่อมีการแทนที่ Try^{268} ด้วย Ile จะมีผลทำให้เพิ่มความสามารถของ MC4R ต่อการจับกับ γ-MSH ซึ่งเป็น non cyclic peptide (Adan and Gispen, 2000) โปรตีน MC4R ของปลามีการแทนที่ Try^{268} ด้วย Met ซึ่งมีผลทำให้ MC4R มี affinity ต่อการจับกับ α-MSH ที่สูงกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2.5.2 การแสดงออกของ MC4R

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่บริเวณสมองเป็นหลัก ได้แก่ สมองส่วน telencephalon, metencephalon, mesencephalon และ diencephalon นอกจากนี้ยีน *MC4R* มีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ในไก่มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในไต, ม้าม, กล้ามเนื้อ, รังไข่ และอัณฑะ และในปลาชนิดต่าง ๆ เช่น ปลา brafin flounder มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในตับ, รังไข่ และอัณฑะ ปลา seabass มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในตับ, กล้ามเนื้อ และอัณฑะ ปลา fugu มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในไตส่วนบนและกระเพาะอาหาร ปลา rainbow trout มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในไตส่วนบน ปลา goldfish มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในเหงือก, ม้าม และรังไข่ ปลา zebrafish มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในระบบทางเดินอาหารและรังไข่ และในปลา lamprey มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ในตับ และกล้ามเนื้อ ซึ่งจะเห็นได้ว่าปลาชนิดต่าง ๆ มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 5.1) (Takeuchi and Takahashi, 1998; Kobayashi et al., 2008; Sanchez et al.,2009; Klovins et al., 2004; Haitina et al., 2004; Cerda-Reverter et al., 2003; Ringholm et al., 2002; Haitina et al., 2004)

2.6 บทบาทของ MC4R

2.6.1 บทบาทของ MC4R ต่อระบบสืบพันธุ์

ในหนูปกติที่มีการฉีด ACTH และ α-MSH เข้าไปจะมีผลทำให้เกิดการแข็งตัวของอวัยวะเพศ (Argiolas, Melis, Murgia and Schioth, 2000) และเมื่อมีการฉีด selective MC4R agonist จะมีผลทำให้เกิดการเพิ่มปฏิกิริยาการแข็งตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้ และมีอัตราการร่วม

เพศมากเพิ่มขึ้น หนูที่มีการ knock out ยีน *MC4R* จะมีอาการผิดปกติเกี่ยวกับพฤติกรรมทางเพศ และอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้จะมีการแข็งตัวที่ผิดปกติ (Van der Ploeg et al., 2002) ดังนั้นยีน *MC4R* จึงมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแข็งตัวของอวัยวะสืบพันธ์เพศผู้

2.6.2 บทบาทของ MC4R ต่อความเครียด

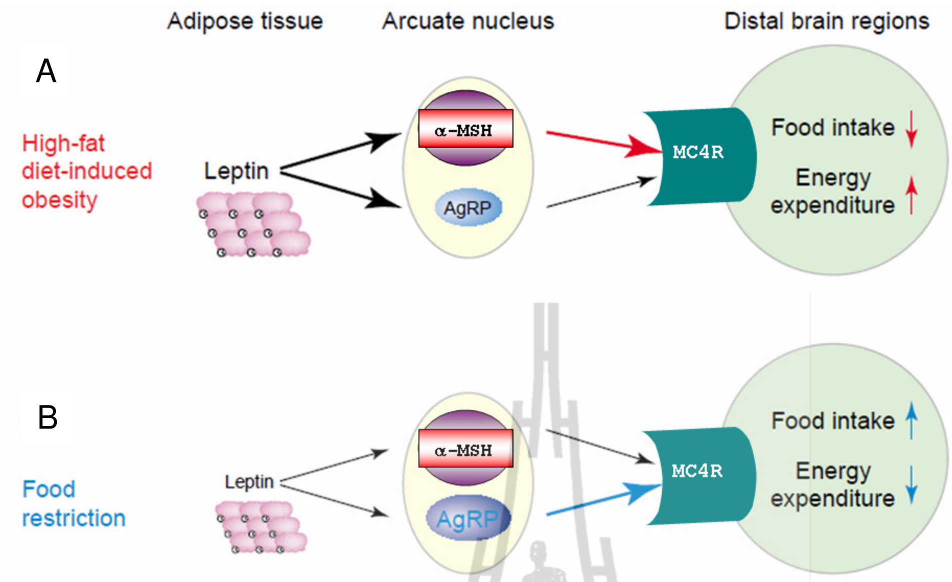
การทำงานของ POMC และ MC4R จะมีผลต่อการควบคุมปฏิกิริยาของ hypothalamic pituitary adrenal axis (HPA axis) ซึ่งในสภาวะปกติ POMC จะถูกสังเคราะห์หลักในสมองบริเวณ arcuate nucleus และถูกส่งต่อไปจับกับ MC4R ในสมองบริเวณ paraventricular nucleus (PVN) ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการสังคราะห์ corticotrophin releasing factor (CRF) และ arginine vasopressin system (AVP) ที่อยู่ใน pavocellular ของสมองบริเวณ PVN และหลั่งออกมาจับกับ CRF1 receptor และ V1b receptor ที่อยู่ใน anterior pituitary gland ต่อจากนั้นจะเกิดการกระตุ้นให้ POMC สังเคราะห์ ACTH และหลั่งสาร ACTH ออกมาจาก corticotrophs ที่อยู่ใน anterior pituitary gland ซึ่งถูกส่งไปยัง adrenal gland และมีการหลั่งสาร glucocorticoid ออกมาเพื่อไปจับกับ glucocorticoid receptor (GR) และเมื่อเกิดสภาวะความเครียดจะมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ mRNA ของยีน *POMC* และ mRNA ของยีน *MC4R* ในบริเวณ arcuate nucleus เพิ่มขึ้น และจากกระบวนการสังเคราะห์ mRNA ของยีน *POMC* และ mRNA ของยีน *MC4R* ที่เพิ่มขึ้นจึงมีผลต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์ mRNA ของยีน *CRF* และ mRNA ของยีน *AVP* เพิ่มขึ้น มีการหลั่งสาร ACTH เพิ่มขึ้น และมีฮอร์โมน glucocorticoid เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (Chaki and Okuyama, 2005) และเมื่อมีการฉีด MC4R antagonist เข้าในสมองของหนู พบว่าหนูที่มีการฉีด MC4R antagonist จะมีอาการกระวนกระวายและก้าวร้าวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่มีการฉีด

2.6.3 บทบาทของ MC4R ต่อการควบคุมสมดุลของพลังงาน

การควบคุมสมดุลของพลังงานมี 2 แบบ คือ แบบ positive energy balance และแบบ negative energy balance ซึ่งการควบคุมสมดุลของพลังงานแบบ positive energy balance ในสภาวะปกติจะมีการเพิ่มการใช้พลังงาน (energy expenditure) และลดการกินได้ ซึ่งเป็นผลจากการที่ α-MSH จับกับ MC4R ทำให้มีการยับยั้งการกินได้ และจะมีการใช้พลังงานเพิ่มขึ้น หากในสภาวะที่มีการเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มีไขมันสูง จะมีผลทำให้มีการเพิ่มน้ำหนักของ adipose tissue ซึ่งจะมีผลทำให้ระดับ leptin ในพลาสม่าเพิ่มขึ้น มีผลทำให้มีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *POMC* เพิ่มขึ้น (เนื่องจาก leptin จะเป็นตัวส่งสัญญาณไปที่สมองบริเวณ arcuate nucleus เพื่อกระตุ้น POMC มีการสังเคราะห์ α-MSH) และ AgRP ในบริเวณ arcuate nucleus ของสมองส่วน hypothalamus มี

ระดับการแสดงออกของ mRNA ยีน *AgRP* ลดลง และ MC4R ในบริเวณ ventromedial ของสมองส่วน hypothalamus มีจำนวนในการจับกับ ligand น้อยลง การควบคุมสมดุลของพลังงานแบบ negative energy balance ในสภาวะปกติจะมีการเพิ่มการกินได้และลดการใช้พลังงาน ซึ่งเป็นผลจากการ AgRP ไปจับกับ MC4R ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการกินได้จึงทำให้มีการใช้พลังงานน้อยลง ซึ่งในสภาวะที่ได้รับอาหารอย่างจำกัดจะมีการลดการกินและมีการเพิ่มการใช้พลังงาน ซึ่งเป็นผลจากการเผาผลาญไขมันจาก adipose tissue ทำให้ระดับ leptin ในพลาสม่าลดลง ในขณะเดียวกันระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *AgRP* เพิ่มขึ้น และ POMC ในบริเวณ arcuate nucleus ของสมองส่วน hypothalamus จะมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *POMC* ลดลงทำให้มีการสังเคราะห์ α-MSH ลดลงด้วย และ MC4R ในสมองส่วน hypothalamic nuclei จะมีจำนวนที่เพิ่มขึ้น (Schwartz, Woods, Porte, Jr, Seeley and Baskin, 2000; Adan and Kas, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อมีการได้รับอาหารอย่างจำกัดหรือมีการอดอาหารจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมในร่างกาย ซึ่งมีผลในทางตรงหรือทางอ้อมต่อการทำงานของร่างกายต่อกระบวนการสลายไกลโคเจน การสังเคราะห์กลูโคส และการสลายไขมัน และจากกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิซึมส่วนหนึ่งจะถูกควบคุมโดยการทำงานร่วมกันระหว่างยีน *leptin* และการส่งสัญญาณของ melanocortin system (Bertile and Raclot, 2006) leptin จะถูกผลิตมาจาก adipose tissue เป็นหลัก ซึ่งมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของพลังงานซึ่งมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น ยีน *POMC* ในระบบประสาท (Schartz et al., 1997) และยีน *MC4R* (Dridi, Swennen, Decuypere, and Buyse, 2005)

จากการศึกษาของ Balthasar et al. (2005) เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ MC4R โดยการ knockdown ยีน *MC4R* ในหนู พบว่าหนูที่ถูก knockdown ยีน *MC4R* มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้น และมีน้ำหนักไขมันเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ (wild type) เนื่องจากมีการลดการทำงานของยีน *MC4R* ก็จะมีผลต่อการเพิ่มการกินได้จึงทำให้มีการใช้พลังงานน้อยลงจึงทำให้เกิดการสะสมเนื้อเยื่อของไขมัน และมีการศึกษาผลของการฉีดสารกระตุ้นการทำงานของ MC4R (MC4R agonist เช่น MTII) ในหนู knockdown ยีน *MC4R* และหนูปกติ ซึ่ง agonist MC4R MTII เป็นสารสังเคราะห์ MSH analogs โดยจะเข้าจับกับ MC4R จึงทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ ซึ่งพบว่าหนูปกติ (wild type) มีการกินได้ที่ลดลงและมีการใช้ออกซิเจน (oxygen consumption) เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนู knockdown ยีน *MC4R* เนื่องจากในหนูปกตินั้นมีการทำงานของ MC4R ที่เป็นปกติจึงทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ และเมื่อหนูมีการกินอาหารน้อยลงจึงมีการนำไขมันที่สะสมมาเผาพลาญเป็นพลังงานสำหรับการดำรงชีวิต ซึ่งในหนูปกติที่มีการใช้ออกซิเจนที่มากขึ้นก็จะบ่งบอกถึงการเผาพลาญไขมันมาใช้



ภาพที่ 2.2 ระบบ melanocortin ในสมองต่อการรักษาสมดุลพลังงาน เมื่อมีการกินอาหารที่มีไขมันสูง (A) และเมื่อมีการกินอาหารอย่างจำกัด (B)

ที่มา : Adan and Kas (2003)

2.6.4 บทบาทของ MC4R ต่อการควบคุมการกิน

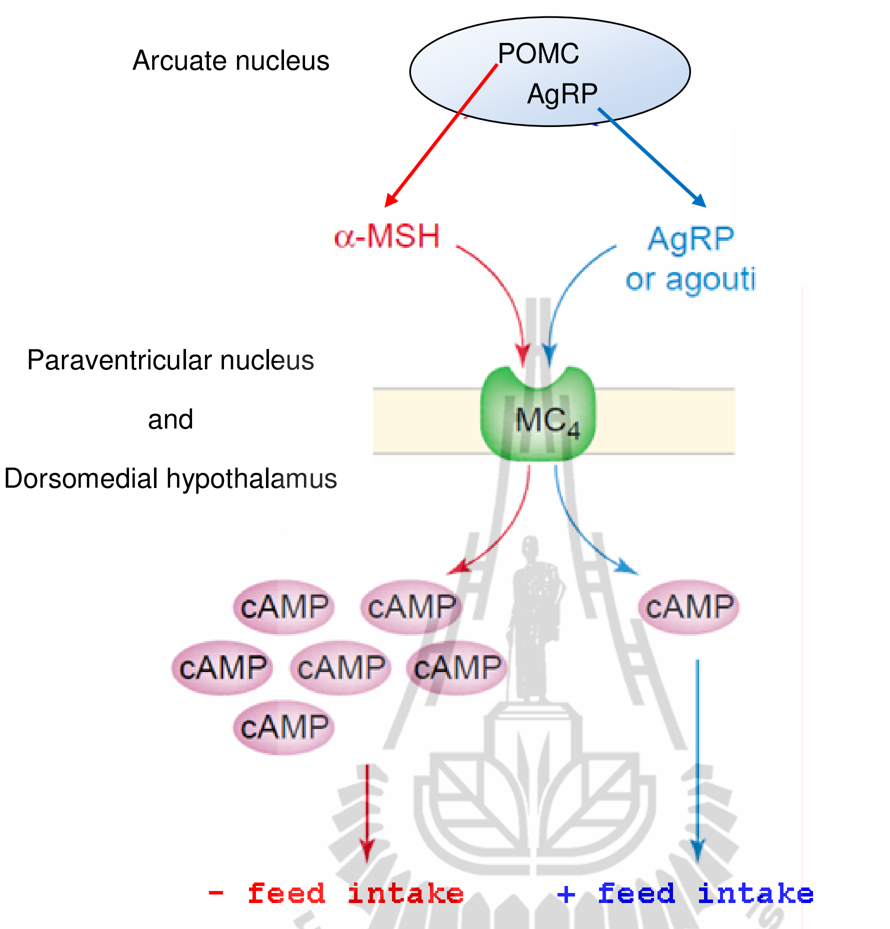
ในการควบคุมการกินได้ เกิดจากการที่ POMC ที่อยู่ในสมองบริเวณ arcuate nucleus (ARC) ทำการสังเคราะห์ α-MSH แล้วหลั่งออกมา ซึ่ง α-MSH จะถูกส่งมาที่สมองบริเวณ paraventricular nucleus (PVN) และ dorsomedial hypothalamus (DMH) เพื่อมาจับกับ MC4R ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ (Irani and Haskell-Luevano, 2005) ส่วน AgRP ก็ถูกหลั่งมาจากสมองบริเวณ ARC เพื่อเข้ามาจับ MC4R ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการกินได้ในสัตว์ เมื่อ α-MSH มาจับกับ MC4R จะมีการส่งสัญญาณมากระตุ้นให้เอนไซม์ adenylyl cyclase ให้มีการเพิ่ม cyclic adenosine monophosphate production (cAMP) ภายในเซลล์ ซึ่ง cAMP จะไปกระตุ้นให้ protein kinase A (PKA) ทำงาน โดย PKA จะเร่งการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของ gene regulartory protein ในการทำงานดังกล่าวจะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ และในทางตรงกันข้ามเมื่อ AgRP เข้ามาจับ MC4R จะเหนี่ยวนำให้ MC4R มีการเปลี่ยนโครงสร้าง ซึ่งจะทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ phosphodiesterase และทำให้มีการลดระดับ cAMP ภายในเซลล์ จึงมีผลทำให้ลดการทำงานของ PKA ในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของ gene regulartory protein ในการทำงานดังกล่าวจะมีผลทำให้เพิ่มการกินได้ (Sanchez et al., 2009) ดังแสดงในภาพที่ 2.3

ในบริเวณสมองส่วน hypothalamus มีการแสดงออกของยีน *MC4R*, *AgRP*, *Cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART), Leptin receptor (LR), Melanin concentrating hormone (MCH), Neuropeptide Y (NPY), Orexin* และ *POMC* ซึ่งในปัจจุบันได้มีรายงานการศึกษารูปแบบของการแสดงออกของยีน neuropeptide ในสมองส่วน hypothalamus ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรชีวิตที่เกิดขึ้นเป็นช่วง ๆ ช่วงละ 24 ชั่วโมง (circadian rhythm) และมีความเกี่ยวข้องกับสภาวะของการได้รับอาหารได้แก่ ยีน *AgRP, CART, LR, MCH, NPY, Orexin* และ *POMC* (Saper, Lu, Chou, and Gooley, 2005; Stutz, Staszkiewicz and Ptitsyn, 2007) ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *MC4R* ในช่วงวงรอบของการกินต่อวันยังมีการศึกษาอยู่น้อย

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MC4R* ในสภาวะการอดอาหารหรือการได้รับอาหารอย่างจำกัด จากรายงานการศึกษาในหนูที่มีการให้อาหารอย่างจำกัดหรือการให้อาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการในระยะเวลา 10 วัน พบว่าหนูมีน้ำหนักของ epididymal ลดลง, มีระดับ leptin ในพลาสม่าลดลง ในสมองบริเวณ acuate nucleus มีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *α-MSH* ลดลง และมีผลทำให้เพิ่มจำนวน MC4R ในการจับกับ ligand ในบริเวณ ventromedial ของสมองส่วน hypothalamus (เพิ่มพื้นที่ในการที่ MC4R จะสามารถจับกับ ligand อื่น ๆ) และเมื่อหนูได้รับอาหารจำนวนมากหรืออาหารที่ไขมันสูงเป็นระยะ 10 วัน ก็จะมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *α-MSH*

เพิ่มขึ้น และมีผลทำให้ลดจำนวน MC4R ในการจับกับ ligand ในบริเวณ ventromedial ของสมองส่วน hypothalamus (Harrold, Widdowson and Williams, 1999) จากรายงานของ Kas, Dijk, Scheurink and Adan (2003) ทำการศึกษาในหนูสภาวะการได้รับอาหารอย่างจำกัด พบว่าจากการทำ *In situ hybridization* ในสมองส่วนต่าง ๆ ของหนู สมองในบริเวณ acuate nucleus มีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *α-MSH* ลดลง และในบริเวณ ventromedial ของสมองส่วน hypothalamus มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *MC4R* เพิ่มขึ้น การศึกษาของ Higgins et al. (2010) ที่ได้มีการศึกษาผลการแสดงออกของยีน *MC4R* ในไก่ที่อยู่ในสภาวะการอดอาหาร ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีน *MC4R* เพิ่มขึ้นเมื่อมีช่วงเวลาการอดอาหารที่เพิ่มขึ้นถึง 48 ชั่วโมง ส่วนในปลา brafin flounder ในสภาวะการอดอาหารไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *MC4R* ในสมอง แต่มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน *MC4R* ในตับ (Kobayashi et el., 2008) ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่มีความสัมพันธ์กับสภาวะของการได้รับอาหาร การรักษาสมดุลของพลังงาน และการแสดงออกของยีน *MC4R* ในช่วงวงรอบของการกินต่อวันยังมีการศึกษาอยู่น้อย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่มีความสัมพันธ์กับสภาวะของการได้รับอาหาร และการรักษาสมดุลของพลังงานต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.3 การทำงานของ MC4R ต่อการควบคุมการกินได้

2.7 การยับยั้งการทำงานของยีน MC4R ต่อการควบคุมการกินได้

เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ MC4R โดยสารสังเคราะห์ melanocyte stimulating hormone (MSH) analogs ซึ่งจะมีการไปขัดขวางการเข้าจับกันระหว่าง α-MSH และ MC4R จึงมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการกินได้ (Kawauchi and Baker, 2004) สารสังเคราะห์ MSH analogs หรือ MC4R antagonists ซึ่งได้แก่ SHU9119, HS014 และ HS024 จะทำหน้าที่ในการเข้าไปแย่งการจับของ α-MSH ต่อ MC4R ซึ่ง MC4R antagonist มี 2 แบบ คือแบบ nonselective antagonist (SHU9119) ซึ่งจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับกับ MC3R และ MC4R ทำให้ลักษณะการจับจึงเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งส่วนมาก SHU9119 จะถูกนำมาใช้เมื่อต้องการศึกษาการทำหน้าที่ของ MC3R และ MC4R แบบ selective antagonist (HS131, HS014, HS024) ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับกับ MC4R ทำให้ลักษณะการจับจึงเป็นแบบจำเพาะเจาะจงต่อ MC4R แต่อย่างไรก็ตาม HS024 จะมีความสามารถในการจับกับ receptor ได้สูงกว่า (high affinity) HS131 และ HS014 (Kask et al., 1998) (ดังตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบสารสังเคราะห์ α-MSH, MC4R antagonists (SH9119, HS131, HS014, HS024) และ MC4R agonist (MTII)

กรดอะมิโน	ตำแหน่งของกรดอะมิโน														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
α-MSH	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val		
MTII				Nle	*Asp*	His	D-Phe	Arg	Trp	*Lys*					
SHU9119				Nle	*Asp*	His	D-Nal	Arg	Trp	*Lys*					
HS131					*Cry*	Gly	D-Nal	Arg	Trp	*Cry*					
HS014				*Cys*	Glu	His	D-Nal	Arg	Trp	Gly	*Cys*	Pro	pro	Lys	Asp
HS024			*Cys*	Nle	Arg	His	D-Nal	Arg	Trp	Gly	*Cys*				

หมายเหตุ : Nle = Norleucine, D-Nal = b-(2-naphthyl)-D-alanine,

ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้และเป็นตัวเอน = กรดอะมิโนที่เป็น cyclic peptide

ที่มา : Kask et al. (1998)

จากการศึกษาของ Cerda-Reverter et al. (2003) ในปลา goldfish เมื่อมีการฉีด MC4R antagonist (HS024) เข้าทางสมอง cerebroventricular injection (ICV) ที่ระดับ 0.8, 1.6 และ 3.2 nmol พบว่าในช่วงระยะเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากการฉีดที่ระดับ 1.6 และ 3.2 nmol ปลา goldfish มีการกินได้สะสมเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลา goldfish ที่ฉีดด้วย saline แต่การฉีด HS024 ในระดับต่าง ๆ ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาในปลา rainbow trout ที่ระดับการฉีด HS024 3.0 nmol มีระดับการกินมากที่สุด แต่ไม่มีผลแตกต่างจากการฉีดที่ระดับ 0.3 nmol และ 1.0 nmol และเมื่อฉีด SHU9119 ที่ระดับ 0.3, 1.0 และ 3.0 nmol ไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากการที่ HS024 มีประสิทธิภาพต่อการเพิ่มการกินได้มากกว่า SHU9119 เพราะ HS024 มีความสามารถในการจับกับ MC4R ของปลา rainbow trout ได้สูง (high affinity) กว่า SHU9119 (Schjolden, Schioth, Larhammar, Winbreg, Larson, 2008) ซึ่งในการศึกษาบทบาทการทำงานของยีน MC4R ต่อการควบคุมการกินได้ของปลายังมีการศึกษาน้อย ดังนั้นจึงค่อนข้างมีข้อจำกัดในการหาระดับของการฉีด MC4R antagonist ที่จะฉีดเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน MC4R ในปลาได้ ดังนั้นจึงได้ทำการรวบรวมระดับของการฉีด MC4R antagonist ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการหาระดับที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาทดลองในปลาสลิด (ดังแสดงในตารางที่ 2.4) และนอกจากนี้มีรายงานการศึกษาของผลของการยับยั้งการทำงานของ MC4R ในระยะยาวในหนู โดยมีการฉีด HS014 ที่ระดับ 1 nmol เป็นระยะเวลา 6 วัน วันละ 2 ครั้ง พบว่าหนูที่ถูกฉีดด้วย HS014 มีการการกินได้ที่เพิ่มตั้งแต่ในวันที่ 1-6 และมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 4-6 เมื่อมีการหยุดฉีด HS014 หนูจะมีการกินได้ลดลง (Kask, Pahkla, Lrs, Rago, Wikberg and Schioth, 1999) และมีรายงานการศึกษาของ Jonsson, Skarphedinsson, Skuladottir, Watanobe and Schioth, (2002) ในหนูเมื่อมีการฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1 nmol ต่อชั่วโมง โดยฉีดทาง ICV พบว่าหลังจากการฉีดตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์ หนูที่ได้รับการฉีด HS024 มีการเพิ่มการกินได้และมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2.4 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์

ชนิด	**Antagonist**	**ระดับ (หน่วย / g BW)**	**วิธีการ**	**ระยะเวลา (หลังจากการฉีด)**	**ผลการทดลอง**	**ที่มา**
Goldfish	HS024	0.8 nmol 1.6 nmol 3.2 nmol	ICV	4 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 1.6 และ 3.2 nmol ปลามีระดับการกินมากกว่าในกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างจากระดับ 0.8 nmol อย่างมีนัยสำคัญ	Cerda-Reverter et al. (2003)
Rainbow trout	HS024	0.3 nmol 1.0 nmol 3.0 nmol	ICV	1 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 3.0 nmol ปลามีระดับการกินมากที่สุด แต่การฉีด HS024 ในระดับต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างจากอย่างมีนัยสำคัญ	Schjolden et al. (2008)
	SHU9119	0.3 nmol 1.0 nmol 3.0 nmol	ICV	1 ชั่วโมง	ไม่มีผลต่อการกินได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	

หมายเหตุ : BW =body weight, ICV = Intracerebroventricular injection (ฉีดเข้าในสมองส่วน cerebroventricular)

ตารางที่ 2.4 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์ (ต่อ)

ชนิด	Antagonist	ระดับ (หน่วย /g BW)	วิธีการ	ระยะเวลา (หลังจากการฉีด)	ผลการทดลอง	ที่มา
Ring dove (*Columba palumbus*)	AgRP	1 nmol	ICV	10-12 ชั่วโมง	มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	Strader et al. (2003)
	HS014	0.02 nmol 0.2 nmol 2.0 nmol	ICV	4 ชั่วโมง	ทุกระดับการฉีด HS014 มีผลต่อการเพิ่มการกินได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	
				8 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด HS014 2.0 nmol มีผลต่อการเพิ่มระดับการกินได้	
	SHU9119	0.02 nmol 0.2 nmol 2.0 nmol	ICV	8-24 ชั่วโมง	ทุกระดับการฉีด HS014 มีผลต่อการเพิ่มการกินได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	
หนู (Rat)	SHU9119	10 pmol 50 pmol	PVN	2-24 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 50 pmol มีระดับการกินได้สูงกว่าที่ระดับการฉีด10 pmol และทั้งสองระดับมีผลต่อการเพิ่มการกินได้สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ	Giraudo, Billington and Levine (1998)

หมายเหตุ : BW =body weight, ICV = Intracerebroventricular injection (ฉีดเข้าในสมองส่วน cerebroventricular), PVN = Paraventricular nucleus injection (ฉีดเข้าในสมอง paraventricular)

ตารางที่ 2.4 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์ (ต่อ)

ชนิด	**Antagonist**	**ระดับ (หน่วย/ g BW)**	**วิธีการ**	**ระยะเวลา (หลังจากการฉีด)**	**ผลการทดลอง**	**ที่มา**
หนู (Rat)	SHU9119	0.3 nmol 1.0 nmol 3.0 nmol 6 nmol	ICV	1-4 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 1.0 nmol มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	Kask et al. (1998)
				3-4 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 0.3 nmol มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	
	HS014	0.1 nmol 0.33 nmol 1.0 nmol 3.3 nmol 10.0 nmol	ICV	1-4 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 1.0 nmol มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ และมีการกินได้ลดลงเมื่อมีระดับการฉีดที่สูงขึ้น	
	HS024	0.1 nmol 0.33 nmol 1.0 nmol	ICV	2-4 ชั่วโมง	การฉีดที่ระดับ 1.0 nmol มีผลต่อการเพิ่มระดับการกินได้	

หมายเหตุ : BW =body weight, ICV = Intracerebroventricular injection (ฉีดเข้าในสมองส่วน cerebroventricular)

ตารางที่ 2.4 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์ (ต่อ)

ชนิด	Antagonist	ระดับ (หน่วย/ g BW)	วิธีการ	ระยะเวลา (หลังจากการฉีด)	ผลการทดลอง	ที่มา
หนู(Rat)	HS131	0.01 mg/kg 0.1 mg/kg 1.0 mg/kg	IP	4 ชั่วโมง	ไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	Schioth et al. (2003)
		0.01 mg/kg 0.1 mg/kg 1.0 mg/kg	SC	2 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 1.0 mg/kg มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	
		0.025 µg 0.1 µg 0.4 µg 1.6 µg	ICV	2 ชั่วโมง	การฉีดที่ระดับ 0.1, 0.4 และ 1.6 µg มีผลต่อการเพิ่มระดับการกินได้	

หมายเหตุ : BW =body weight, IP = Intraperitoneal injection (ฉีดเข้าช่องท้อง), SC = Subcutaneous injection (ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง),

ICV = Intracerebroventricular injection (ฉีดเข้าในสมองส่วน cerebroventricular)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 แผนการดำเนินงานดังนี้

แผนการดำเนินงานที่ 1 การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* และการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนและในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด

แผนการดำเนินงานที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติ และผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในปลาสลิด

แผนการดำเนินงานที่ 3 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด และผลของ MC4R antagonist ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง

3.1 ปลาสลิดที่ใช้ในการศึกษา

นำปลาสลิดมาจากฟาร์มในเขตจังหวัดนครราชสีมา มาพักเลี้ยงที่ฟาร์มประมงของมทส. โดยทำการเลี้ยงปลาในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 5x10x1 ลูกบาศก์เมตร ทำการฝึกปลาสลิดให้กินอาหารสำเร็จรูปทางการค้า (โปรตีน 40 %, ไขมัน 6%) โดยให้กินอาหารวันละ 2 ครั้ง ที่เวลา 10.00 น. และ 16.00 น.

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

อาคารเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และฟาร์มประมงมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส.)

3.3 อุปกรณ์และสารเคมี

1. กรรไกรตัดกะโหลก
2. มีดผ่าตัด
3. คีมปลายแหลม (Forceps)

4. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 1000, 200, 100, 10 ไมโครลิตร (μl)
5. ไมโครทิป (Microtip)
6. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube 1.5 ml)
7. หลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 200 μl
8. ถาดหลุมสำหรับทำ Real time PCR 96 หลุม (Plate 96 well)
9. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
10. เครื่องเซนทริฟิวจ์แบบควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge)
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Dry bath)
12. เครื่องวัดความเข้มข้นของ RNA (Nanodrop)
13. ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (^{o}C)
14. ตู้เย็นอุณหภูมิ -20^{o}C
15. เครื่องปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction: PCR)
16. เครื่องเรียลไทม์ พีซีอาร์ (LightCycler® 480 Real-Time PCR System: Roche Applied Science)
17. เจลแชมเบอร์ (Gel chamber)
18. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power supply)
19. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator, Biorad)
20. กระดาษพาราฟิล์ม (Para film paper)
21. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
22. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
23. ไม้จิ้มฟัน
24. แท่งแก้วสำหรับเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
25. ตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)
26. จานเลี้ยงเชื้อ (Petridis)
27. หลอดทดลองสำหรับเลี้ยงเชื้อขนาด 3 ml
28. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
29. Measuring pipette
30. 2-phenoxyethanol
31. ชุดสารเคมีสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA (SMART™ RACE cDNA amplification kit, Clontech, Palo Alto, CA)

32. ชุดสารเคมี ImProm-II™ Reverse Transcription system kit (Promega, Madison, WI, USA)
33. ชุดสารเคมีสำหรับสังเคราะห์ First Strand cDNA Synthesis Kit (GE healthcare, Buckinghamshire, UK)
34. ชุดสารเคมี PCR LA Taq kit (Takara)
35. ชุดสารเคมี PCR EX Taq kit (Takara)
36. ชุดสารเคมี LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)
37. ชุดสารเคมี PCR GoTaq® DNA polymerase (Promega)
38. ชุดสารเคมีทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen)
39. พลาสมิด pGEM® T-Easy vector system I (Promega)
40. เอนไซม์ DNase I
41. เอนไซม์ *Eco*R I
42. เอนไซม์ RNase
43. Trizol reagent
44. Isopropanol
45. Ethanol
46. Phenol
47. Chloroform
48. Sodium acetate
49. Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)
50. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.4 แผนการดำเนินงานที่ 1 การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* และการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนและ ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด

3.4.1 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* และยีน *β-actin* ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) amplification

การเก็บตัวอย่างสมองปลาสลิด

นำปลาสลิดที่มีสุขภาพดีที่มีน้ำหนักประมาณ 60 กรัม มาทำการเก็บสมอง โดยนำปลาสลิดไปแช่ใน 300 ppm 2-phenoxyethanol เพื่อทำการสลบปลาสลิด หลังจากนั้นทำการเปิดกะโหลกปลาและใช้คีมปลายแหลมดึงสมองออกมาจากโพรงกะโหลกใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ml นำตัวอย่างสมองไปแช่ -80^{o}C ส่วนเก็บตัวอย่างตับปลาสลิดใช้มีดผ่าตัดผ่าหน้าท้องปลา แล้วใช้คีมคีบตับใส่หลอดและนำไปแช่ -80^{o}C

การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลาสลิดที่เก็บใน -80^{o}C มาพักในถังน้ำแข็ง โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อต้องมีน้ำหนักประมาณ 50-100 มิลลิกรัม (mg) และใส่สาร Trizol 500-1000 µl แล้วทำการบดตัวอย่างให้ละเอียด และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หลังจากนั้นใส่ chloroform 1 ส่วนต่อ 5 ส่วนของสารละลายในหลอด ทำการผสม (vortex) และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้นโดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropanol โดยใส่สาร isopropanol เท่ากับสารละลายอาร์เอ็นเอที่ย้ายมา ทำการ vortex สารละลาย และวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ ต่อมาทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำ DEPC 225 µl ทำการผสมเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ DNase I (5U/µl) 1 µl และสาร RQ 1 DNase 10x buffer 25 µl เพื่อกำจัดดีเอ็นเอให้เหลือไว้แต่อาร์เอ็นเอ นำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 30 นาที และทำลายเอนไซม์ DNase I ด้วยอุณหภูมิ 70^{o}C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใส่ phenol ต่อสาร chloroform (1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารละลายที่มี

อยู่) ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้นโดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย 3 M sodium acetate pH 5.2 ใส่ 1 ส่วนต่อ 10 ส่วนของสารละลายที่อยู่ในหลอด และสาร absolute ethanol โดยใส่ 3 เท่าของสารในหลอด และทำการ vortex สารละลาย นำหลอดไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ เมื่อครบเวลานำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ และทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ในน้ำ DEPC 30 µl และเก็บ total RNA ในตู้เย็น -80°C โดยทำการแบ่ง total RNA ออกเป็นส่วน ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและละลายหลาย ๆ ครั้ง

3.4.1.1 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ ด้วยเทคนิค 3’RACE

การสังเคราะห์ First strand cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’

นำ total RNA ของสมองที่ได้ส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยใช้ SMART™ RACE cDNA amplification kit โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA 3’ RACE ดังนี้ Total RNA ความเข้มข้น 1-5 µg/µl ใส่ 1-3 µl, 3’-CDS primer A ที่มีความเข้มข้น 12 µM ใส่ 1 µl, SMART II A Oligonucleotide ที่มีความเข้มข้น 12 µM ใส่ 1 µl และน้ำ Deionized เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายทั้งหมดเท่ากับ 5 µl ทำการผสมสารละลายในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ให้เข้ากันและทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 นาที และแช่ลงในถังน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดดังกล่าวมาใส่สารละลายผสม (premixture) 5 µl (premixture ประกอบด้วย 5x First-Strand buffer 2 µl, 20 mM DTT 1 µl, 10 mM dNTP Mix 1 µl และ MMLV Reverse Transcriptase 1 µl) ซึ่งสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 µl หลังจากนั้นผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากัน และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที และนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สาร Tricine-EDTA buffer 100 µl

และนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา และเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการรวบรวมข้อมูลของยีน *MC4R* ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะในปลาที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความตรงกัน (alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC4R* (ดังภาพที่ 3.1) โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) และทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาใช้ในการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ (ดังตารางที่ 3.1)

```
Goldfish   ---ATGAACACCTCACATCACCATGGACCGCATCATTCATACCGAAATCACAGCCAGGGGGCTTTG------ 63
Zebrafish  ---ATGAACACCTCACATCATCATGGACTGCATCATTCATTTCGGAACCACAGCCAAGGAGCTCTG------ 63
Karasu     ---ATGAACGCCACCGATCCCCCTGGGAGGGTGCAGGACTTCAGCAACGGGAGCCAAACCCCGG-------- 61
Flounder   ---ATGAACACGACAGAACATCCTGGTCTGAGCCAAGGCTTCCACAACTGGAGCCAAACCGCG--------- 60
Saebass    ---ATGAACACCACAGAGGCTCATGGATTGATCCATGGCTACCATAACCGGAGCCAAACCTCGGGC------ 63
Trout      ATGATGAATTCCACAGACCACCAAGGGTTGATCTCTGTGGGCTATACCAGGAACCTCAGCACTGCTGGGACT 72
Dogfish    ---ATGAACTCCTCGTTTCATCACAGGCTGCCGGAGACCCCGCAGCTCAGAAACCACAGCGTGGCG------ 63
Human      ---ATGGTGAACTCCACCCACCGTGGGATGCACACTTCTCTGCACCTCTGGAACCGCAGCAGTTACAGACTG 69
Chicken    ---ATGAATTTCACCCAGCATCGTGGGACACTCCAGCCTCTCCATTTCTGGAACCAGAGCA---ACGGACTG 66
              ***       *       *   *                          * **

Goldfish   -----------CCAGTGGGAAAGCCTGATCAAGGTG-AGAGAGGATCAACCTCTGGATGTTACGAGCAGCTA 123
Zebrafish  -----------CCGGTGGGAAAGCCCTCTCATGGTG-ACAGAGGATCAGCTTCTGGATGCTACGAGCAGTTG 123
Karasu     -------------AGACGGACTTTCCAAACGAGGAG---AAGGAATCGTCTACGGGATGCTACGAGCAGATG 117
Flounder   ---TCGCCACTGAACGAGGACTTTTCAGCCCAGGAC---AAGGACTCGTCGGCCGGATGTTACGAGCAGCTG 126
Saebass    ATTTTGCCACTTAACAAAGACTTATCAGCAGAGGAG---AAGGACTCGTCCACAGGATGCTATGAACAGCTG 132
Trout      CTGGGAACCCTCAACAAAGACTCAGAGGGCGTTGGTATCAAGGACTCCTCAACAGGATGTTACGAGCAGCTC 144
Dogfish    -------AGATTCGCCAGCGCCAACGGCTCGCGCAG--TGACGGCTTCTCTTCGGGATGCTACGAGCAACTC 126
Human      ---------CACAGCAATGCCAGTGAGTCCCTTGGAAAAGGCTACTCTGATGGAGGGTGCTACGAGCAACTT 132
Chicken    ---------CACAGGGGTGCCAGCGAGCCCAGTGCGAAGGGCCACTCCTCGGGAGGCTGCTATGAACAACTC 129
                                                      *      ** ** ** ** **   *

               Primer MC4R-F1 -->                     Primer MC4R-F2 -->
               TCTCCACGGAGGTSTTCCTSAC          TCAGCCTSYTGGAGAACATCCT
Goldfish   CTCATCTCCACAGAGGTCTTCCTCACACTCGGGCTCGTCAGTCTCCTGGAGAACATTTTAGTGATTGCTGCT 195
Zebrafish  CTGATCTCCACGGAGGTCTTCCTCACGCTCGGCCTGGTCAGCCTCCTGGAGAACATCCTTGTGATTGCAGCC 195
Karasu     CTGATCTCCACGGAGGTGTTCCTGACTCTGGGAATCATCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTGGTCGCCGCT 189
Flounder   CTGATCTCCACCGAGGTGTTCCTCACTCTGGGCATCGTCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTGGTCGCTGCT 198
Saebass    CTGATTTCCCCAGAGGTTTTCCTCACTCTGGGCATTGTCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTTGTTGCTGCT 204
Trout      CTCATCTCTACCGAGGTCTTTCTCACACTGGGGATAGTCAGTTTATTAGAGAACATCCTGGTGATTGCTGCC 216
Dogfish    TGGATCTCGACGGAGGTCTTCCTCACGCTGGGCATCTTCAGCCTCTTGGCAAATATTTTGGTCATTGCAGCT 198
Human      TTTGTCTCTCCTGAGGTGTTTGTGACTCTGGGTGTCATCAGCTTGTTGGAGAATATCTTAGTGATTGTGGCA 204
Chicken    TTTGTATCCCCTGAAGTGTTTGTGACTCTGGGCATCATCAGCTTGCTGGAAAACGTCTTGGTCATTGTGGCA 201
               * **  * ** ** **  * ** ** **  *  ****  *  * *  **  *  * **  * *  **

                                        Primer MC4R-F3 -->
                                     ATGTACTTYTTCATCTGCAGCY
Goldfish   ATTATCAAGAACAAGAACCTTCATTCTCCCATGTACTTCTTTATCTGCAGTTTAGCTGTAGCAGACTTGTTG 267
Zebrafish  ATCGTCAAAAACAAGAACCTACATTCCCCTATGTACTTCTTCATCTGCAGCTTGGCTGTAGCAGACTTGTTA 267
Karasu     ATAGTGAAGAACAAGAATCTCCACTCGCCCATGTACTTTTTCATCTGCAGCCTGGCCGTGGCCGACATGCTC 261
Flounder   ATAATCAAGAACAAGAACCTTCACTCGCCGATGTACTTCTTCATCTGCAGCCTTGCCGTCGCTGACATGCTC 270
Saebass    ATCATCAAAAACAAGAACCTTCACTCACCTATGTACTTCTTCATCTGTAGCCTCGCTGTTGCTGACATGCTC 276
Trout      ATCATCAAGAATAAGAATCTTCACTCTCCCATGTACTTATTCATCTGTTCTTTGGCTGTGGCAGACATGCTG 288
Dogfish    ATTGTCAAAAACAAGAACCTGCACTCGCCGATGTATTTTTTCATCTGCAGCTTGGCAGTGGCTGACATGCTG 270
Human      ATAGCCAAGAACAAGAATCTGCATTCACCCATGTACTTTTTCATCTGCAGCTTGGCTGTGGCTGATATGCTG 276
Chicken    ATAGCCAAGAACAAGAACCTCCATTCGCCCATGTACTTCTTCATCTGTAGCTTGGCAGTGGCTGACATGCTA 273
           **    ** ** ***** ** ** ** ** ******** ** *****     * ** *** * **  ** *

Goldfish   GTCAGTGTCTCAAATGCCTCCGAAACGGTAGTGATGGCACTCATCACGGGGGGCAACCTAACTTATCGCGAG 339
Zebrafish  GTGAGTGTCTCCAATGCTTCGGAAACAGTTGTGATGGCGCTCATCACTGGAGGCAACCTGACCAACCGTGAG 339
Karasu     GTGAGCGTCTCCAACGCCTCCGAGACGATCGTCATAGCGCTCATCAACAGCGGCACGCTGACCATCCCCGCC 333
Flounder   GTCAGCGTCTCCAACGCCTCTGAGACCATCGTCATCGCGCTCATCAATGGAGGCAACCTGACCATCCCCGTC 342
Saebass    GTCAGTGTCTCCAATGCCTCTGAGACTATTGTCATAGCGCTCATCAACGGAGGCAAGCTGACCATCCCCGTC 348
Trout      GTCAGCGTCTCCAACGCCTCCGAGACCATCGTCATCGCCCTGATCAACGGCGGCAACTTGACCATCTCCGGG 360
Dogfish    GTTAGCGTGTCCAACGCGTGGGAGACGATCTTCATTGCCATGTTAAAAAGCAGGCACTTAACGGCCCCGGAA 342
Human      GTGAGCGTTTCAAATGGATCAGAAACCATTGTCATCACCCTATTAAACAG---TACAGATACGGATGCACAG 345
Chicken    GTGAGTGTATCTAATGGATCAGAAACTATTGTCATCACGCTTCTAAACAA---TATAGATACAGACGCACAG 342
           ** ** ** ** ** *  ** ** **  *  * **  *  *  * *                **
```

ภาพที่ 3.1 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’

```
Goldfish   AGCATCATCAAGAACATGGACAACATTTTTGACTCGATGATCTGCAGCTCACTGTTGGCCTCCATTTGGAGT 411
Zebrafish  AGCATCATTAAGAACATGGACAACGTGTTTGACTCTATGATCTGCAGCTCTCTGTTGGCCTCCATTTGGAGT 411
Karasu     ACGCTGATCAAGAGCATGGACAACGTGTTTGACTCCATGATCTGCAGCTCTTTGCTGGCGTCCATCTGCAGC 405
Flounder   ACGTTGATTAAAAGCATGGACAACGTGTTTGACTCTATGATCTGCAGCTCCCTGCTGGCGTCCATCTGCAGC 414
Saebass    CAGTTGATCAAAAGCATGGACAATGTGTTTGACTCTATGATCTGTAGTTCTCTGTTAGCATCCATCTGCAGC 420
Trout      TCGCTCATAAAGAGCATGGACAACGTGTTCGACTCCATGATCTGTAGCTCACTGCTGGCGTCAATCTGTAGT 432
Dogfish    AATTTAATCAAGAACATGGACAACGTGTTTGACTCGATGATCTGCAGCTCTCTTCTGGCTTCCATTTGCAGC 414
Human      AGTTTCACAGTGAATATTGATAATGTCATTGACTCGGTGATCTGTAGCTCCTTGCTTGCATCCATTTGCAGC 417
Chicken    AGCTTTACCATAAACATTGACAATGTCATTGACTCAGTGATTTGCAGTTCCCTGCTTGCATCAATTTGCAGT 414
               * *     *  ** ** **  *  *******  **** ** ** **  *  * ** ** ** ** **

Goldfish   TTGTTGGCCATAGCGGTGGACCGCTACATCACGATCTTCTACGCCTTGCGCTACCACAACATCATGACCCAA 483
Zebrafish  TTGTTGGCCATCGCGGTGGACCGCTACATCACAATCTTCTACGCTTTGCGCTACCACAACATCATGACCCAG 483
Karasu     CTGCTCGCCATCGCCGTCGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCCCTGCGCTACCACAACATCGTCACCCTG 477
Flounder   CTGCTCGCTATCGCAGTCGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCGCTGCGATACCACAACATCGTCACCCTG 486
Saebass    TTGCTGGCCATCGCGGTTGATCGTTACATCACTATCTTCTACGCACTGCGATACCACAACATTGGCACCCTG 492
Trout      CTCTTGGCCATCGCCATAGACCGCTACATCACCATATTCTACGCGCTGCGCTACCATAACATTGTGACGGTA 504
Dogfish    TTGCTGGCCATCGCTATTGACAGGTACATCACCATCTTCTACGCTCTGCGGTACCATAACATCGTGACAGTG 486
Human      CTGCTTTCAATTGCAGTGGACAGGTACTTTACTATCTTCTATGCTCTCCAGTACCATAACATTATGACAGTT 489
Chicken    CTCCTCTCAATAGCAGTGGACAGGTATTTTACTATCTTTTATGCCCTCCAGTACCATAATATCATGACGGTC 486
            *  *  * ** **  * **  * **  * ** ** ** ** **  * *  ***** ** **    **

Goldfish   CGGCGGGCGGGCACCATCATCACCTGCATCTGGACCTTGTGTACGGTCTCTGGCGTGCTCTTTATTGTGTAC 555
Zebrafish  CGGCGGGCGGGCACCATCATCACCTGCATCTGGACCTTCTGCACAGTCTCCGGCGTACTCTTTATCGTGTAT 555
Karasu     CGGAGAGCCTCGCTGGTCATCAGCAGCATCTGGACGTGCTGCACCGTGTCCGGCGTGCTCTTCATCGTCTAC 549
Flounder   CGGCGGGCGATGCTGGTCATCACCAGCATCTGGACGTGCTGCATCGTGTCTGGCATCCTCTTCATCATCTAC 558
Saebass    CGGAGAGCAATGTTGGTCATCAGCAGCATCTGGACATGCTGCATTGTGTCCGGCATCCTGTTTATCATCTAC 564
Trout      AAGCGAGCGATGGCGGTAATCGCGTGCATCTGGTCGTGTTGTGTGGCATCGGGCGTGCTCTTCATTATCTAC 576
Dogfish    CGGAGGGCCCTGATGATTATCGCCGCCATCTGGGCAGCCTGCACGGGCTCAGGGATCCTCTTCATCGTTTAT 558
Human      AAGCGGGTTGGGATCATCATAAGTTGTATCTGGGCAGCTTGCACGGTTTCAGGCATTTTGTTCATCATTTAC 561
Chicken    AAGCGTGTAGGGGTCATCATCACATGCATCTGGGCGCTTGCACTGTCTCAGGCATTTTGTTCATCATTTACT 558
             * * *         * **       ****** *                *   *    *      *

Goldfish   TCTGAGAGCACCACCGTTCTCATCTGCCTTATCAGCATGTTCTTCACCATGCTGGCGCTTATGGCCTCGCTC 627
Zebrafish  TCAGAAAGCACCACTGTTCTCATCTGCCTCATCAGCATGTTCTTCACCATGCTGGCGCTCATGGCCTCACTC 627
Karasu     TCGGAGAGCACCACCGTGCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGCCTCCCTC 621
Flounder   TCGGAGAGCACCACGGTGCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGTGTCGCTG 630
Saebass    TCAGAGAGCACCACAGTGCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGTTGGTGCTCATGGCGTCGCTG 636
Trout      TCTGAGAGCACCACGGTCCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGCGCTCATGGCCTCTCTC 648
Dogfish    TCCGAGAGCACCGCAGTCATCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCGCCATGCTCGCCCTCATGGCCTCGCTC 630
Human      TCAGATAGTAGTGCTGTCATCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGCTCTCATGGCTTCTCTC 633
Chicken    TCTGACAGCAGCGTTGTCATCATCTGCCTTATCAGCATGTTCTTCACCATGCTCATTCTCATGGCATCCCTT 630
           ** ** ** *     **  ********** **** ********** ***** *    ** ****  ** **

Goldfish   TACGTCCACATGTTTCTTCTAGCCCGGCTGCACATGAAGCGCATTGCCGCCCTCCCTGGCAACGGCCCTATC 699
Zebrafish  TACGTCCACATGTTCCTTCTAGCCCGGCTGCACATGAAACGGATCGCCGCCTTACCTGGAAACGGCCCGATA 699
Karasu     TACGTCCACATGTTCCTGCTGGCGCGCCTGCACATGAAGCGGATCGCGGCGATGCCGGGCAACGCGCCCATC 693
Flounder   TACGTGCACATGTTCCTGCTGGCGCGCTTGCACACGAAGCGTATCGCGGCGCTGCCGGGCAACGCGCCCATC 702
Saebass    TACGTCCACATGTTCCTGCTGGCCCGTTTGCACATGAAGCGCATCGCAGCATTGCCAGGGAACGCGCCCATC 708
Trout      TACGTCCACATGTTCATGCTGGCCCGCCTGCACATAAAGAGGATTGCCGTGCTGCCCGGGAACGTTCCCATC 720
Dogfish    TACGTGCACATGTTCATGCTGGCCCGCTTGCACGTCAAGCGCATCGCCGCCCTGCCCGGCAACGGCGCCGTC 702
Human      TATGTCCACATGTTCCTGATGGCCAGGCTTCACATTAAGAGGATTGCTGTCCTCCCCGGCACTGGTGCCATC 705
Chicken    TATGTTCACATGTTCATGATGGCTCGAATGCATATCAAGAAGATAGCAGTTCTTCCAGGGACTGGCCCCATT 702
           ** ** ********  *  * **  *    **    **    ** ** *   * ** ** *  *   * **
```

ภาพที่ 3.1 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ (ต่อ)

```
Goldfish   TGGCAGGCGGCAAATATGAAAGGGGCCATCACTATCACTATCCTGCTGGGAGTATTCGTGGTGTGCTGGGCT 771
Zebrafish  TGGCAGGCGGCGAATATGAAGGGCGCCATTACCATTACTATACTACTGGGGGTGTTTGTGGTGTGCTGGGCG 771
Karasu     CACCAGAGAGCCAACCTGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCCTGGGAGTGTTTGTGGTCTGCTGGGCG 765
Flounder   CTTCAGCGAGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCCTCGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCG 774
Saebass    CATCAGCGGGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCATCGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCG 780
Trout      CGCCAGCGTGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCCTGGGTGTGTTCGTAGTGTGCTGGGCT 792
Dogfish    CGCCAAGCGGCGAACATGAAAGGGGCGATCACGCTGACCATCCTGCTGGGGGTCTTTGTCGTCTGCTGGGCG 774
Human      CGCCAAGGTGCCAATATGAAGGGAGCGATTACCTTGACCATCCTGATTGGCGTCTTTGTTGTCTGCTGGGCC 777
Chicken    CGCCAAGGGGCCAACATGAAAGGGGCCATCACTCTCACTATACTGATTGGAGTTTTTGTTGTGTGCTGGGCC 774
              **    ** **  **** ** ** ** **  * ** ** **  * ** ** ** ** ** ********
Goldfish   CCCTTTTTTTGCACCTCATCCTCATGATTTCTTGCCCCCGGAATCCCTATTGCATCTGTTTCATGTCCCAC 843
Zebrafish  CCCTTTTTCTTGCACCTCATCCTCATGATCTCCTGCCCGCGGAATCCTTATTGTGTCTGCTTCATGTCACAC 843
Karasu     CCTTTCTTCCTTCACCTCATCCTCATGATCACCTGCCCCAAGAACCCATACTGCACGTGCTTCATGTCCCAC 837
Flounder   CCGTTCTTCCTCCACCTCATCCTCATGATCACGTGCCCGAGGAACCCGTACTGCACCTGCTTCATGTCCCAC 846
Saebass    CCCTTTTTCCTCCACCTCATCCTCATGATCACTTGCCCCAGGAACCCCTATTGCACCTGCTTCATGTCCCAA 852
Trout      CCCTTTTTCCTCCACCTCATCCTCATGATATCATGCCCCAGGAACCCCTACTGTGCCTGCTTCATGTCACAC 864
Dogfish    CCTTTCTTCATGCACCTCATTCTCATGATCTCCTGCCCGCAGAACCCGTACTGTGTCTGCTTCATGTCGCAC 846
Human      CCATTCTTCCTCCACTTAATATTCTACATCTCTTGTCCTCAGAATCCATATTGTGTGTGCTTCATGTCTCAC 849
Chicken    CCATTTTTTCTGCACCTCATTTTCTACATCTCCTGCCCCTACAATCCTTACTGTGTGTGCTTCATGTCTCAC 846
           ** ** **  * *** * **  **   **  * ** **     ** ** ** **    ** ********  *
Goldfish   TTCAACATGTATCTGATCCTCATTATGTGCAACTCGGTCATAGACCCTCTCATCTACGCATTCAGGAGCCAA 915
Zebrafish  TTCAACATGTATCTGATCCTCATTATGTGCAACTCGGTCATAGACCCGCTCATATATGCCTTCAGAAGCCAA 915
Karasu     TTCAACATGTACCTCATCCTCATCATGTGCAACTCCGTCATCGACCCCATCATCTACGCCTTTCGCAGCCAG 909
Flounder   TTCAACATGTACCTCATTCTCATCATGTGCAACTCCGTCATCGACCCCATCATCTACGCCTTCCGCAGCCAG 918
Saebass    TTCAACATGTACCTCATCCTTATCATGTGCAACTCTGTCATTGACCCCATCATCTACGCGTTTCGCAGCCAA 924
Trout      TTCAACATGTACCTCATCCTCATCATGTGTAACTCTGTCATCGACCCACTGATCTACGCCTTCAGGAGCCAA 936
Dogfish    TTCAACATGTACTTAATCCTCATCATGTGCAACTCGGTCATCGACCCCCTCATCTACGCTTTCCGCAGTCAA 918
Human      TTTAACTTGTATCTCATACTGATCATGTGTAATTCAATCATCGATCCTCTGATTTATGCACTCCGGAGTCAA 921
Chicken    TTTAACTTCTACCTCATCCTCATCATGTGTAATTCCATCATTGATCCACTTATCTATGCATTTCGGAGTCAG 918
           ** *** * **  * ** ** ** ***** ** **  **** ** **  * ** ** **  *  * ** **

Goldfish   GAGATGAGGAAAACCTTCAAGGAGATCTGCTGCTGCTGGTATGGACTGGCGTCTCTGTGTGTATGA------ 981
Zebrafish  GAAATGAGGAAGACCTTCAAGGAGATCTGCTGCTGCTGGTATGGACTTGCATCTCTGTGTGTATAA------ 981
Karasu     GAGATGAGAAAAACCTTCAAGGAGATCTTCTGCTG------CTCCCAAATGCTGGTGTGCATGTGA------ 969
Flounder   GAAATGAGGAAAACCTTCAAAGAGATTTTCTGCTG------CTCTCACGCTCTGCTGTGTGTGTGA------ 978
Saebass    GAGATGAGAAAAACCTTCAAAGAGATTTTCTGCTG------CTCACACGCTCTCTTGTGCGTGTGA------ 984
Trout      GAGATGAGGAAGACCTTTAAGGAAATCTTCTGCTGGT---ACAGTCTGCCAAACCTGTGTGTGTGCGAGCTG 1005
Dogfish    GAAATGCGGAAGACCTTCAAAGAAATAATCTGCTGCT---ACAGTCTGCCGGGGCTGTGTGACCTG------ 981
Human      GAACTGAGGAAAACCTTCAAAGAGATCATCTGTTGCT---ATCCCCTGGGAGGCCTTTGTGACTTG------ 984
Chicken    GAGCTCAGGAAAACATTCAAAGAAATTATATGCTGCT---GTAACTTGAGAGGGCTTTGTGATTTA------ 981
           **  *  * ** ** ** ** ** **    ** **                    * **
Goldfish   ---------------
Zebrafish  ---------------
Karasu     ---------------
Flounder   ---------------
Saebass    ---------------
Trout      CCAGGGAAATATTGA 1020
Dogfish    ACAAGTGAATATTAA 996
Human      TCTAGCAGATATTAA 999
Chicken    CCTGGCAAATATTAG 996
```

ภาพที่ 3.1 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ (ต่อ)

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer	**Sequence**	**PCR**	**Primer order**
MC4R-F1	5’-TCTCCACGGAGGTSTTCCTSAC-3’	3’RACE	Sense
MC4R-F2	5’-TCAGCCTSYTGGAGAACATCCT-3’	3’RACE	Sense(nested)
MC4R-F3	5’-ATGTACTTYTTCATCTGCAGCY-3’	3’RACE	Sense(nested)
MC4R-R1	5’-GTGCAGGCGCGCCAGCAGGAACATG-3’	5’RACE	Antisense
MC4R-R2	5’-CCAGCGTGGCCCTGCGCAACGTCAC-3’	5’RACE	Antisense(nested)
MC4R-R3	5’-GGGGATGCTCAGCGTGCCTCCATTG-3’	5’RACE	Antisense(nested)
Actin-F	5’-ACTACCTCATCAAGATCCTG-3’	Actin 3’RACE	Sense
Actin-R	5’-TTGCTGATCCACATC TGCTG-3’	Actin 500 bp	Antisence
Actin-RT-F	5’-TGGCAATGAGAGGTTCCG-3’	Real-time RT-PCR	Sense
Actin-RT-R	5’-TGCTGTTGTAGGTGGTTTCG-3’	Real-time RT-PCR	Antisense
MC4R-RT-F	5’-GCATCCTCTTCATCATCTACTCGGA-3’	Real-time RT-PCR	Sense
MC4R-RT-R	5’-GCAGTAGGGGTTCCGGGGGCAGGTG-3’	Real-time RT-PCR	Antisense

Primary PCR และ Nested PCR

นำ primer ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ PCR โดยในการทำ PCR รอบที่ 1 ใช้ primer forward MC4R-F1 คู่ primer reverse UPM-L การทำ PCR ในรอบที่ 2 ได้แบ่งการใช้ primer ออกเป็น 2 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 (primer forward MC4R-F2 คู่ primer reverse NUP) คู่ที่ 2 (primer forward MC4R-F3 คู่ primer reverse NUP) ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR โดยใช้ LA Taq kit (Takara) โดยให้มีปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 10 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 10x buffer LA Taq, 25 mM $MgCl_2$, 2.5 mM dNTP Mix, 10 µM primer forward, 10 µM primer reverse, 5 U/µl LA Taq โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เป็น first strand cDNA 3' RACE จากสมองของปลาสลิด สำหรับการทำ PCR รอบที่ 1 และมีการใช้ผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ในรอบที่ 1 (PCR product) มาทำการเจือจาง (dilute) ในอัตราส่วน 1: 50 เท่า ในการทำ PCR รอบที่ 2 โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 53°C เป็นเวลา 45 วินาที และ72°C เป็นเวลา 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 35 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

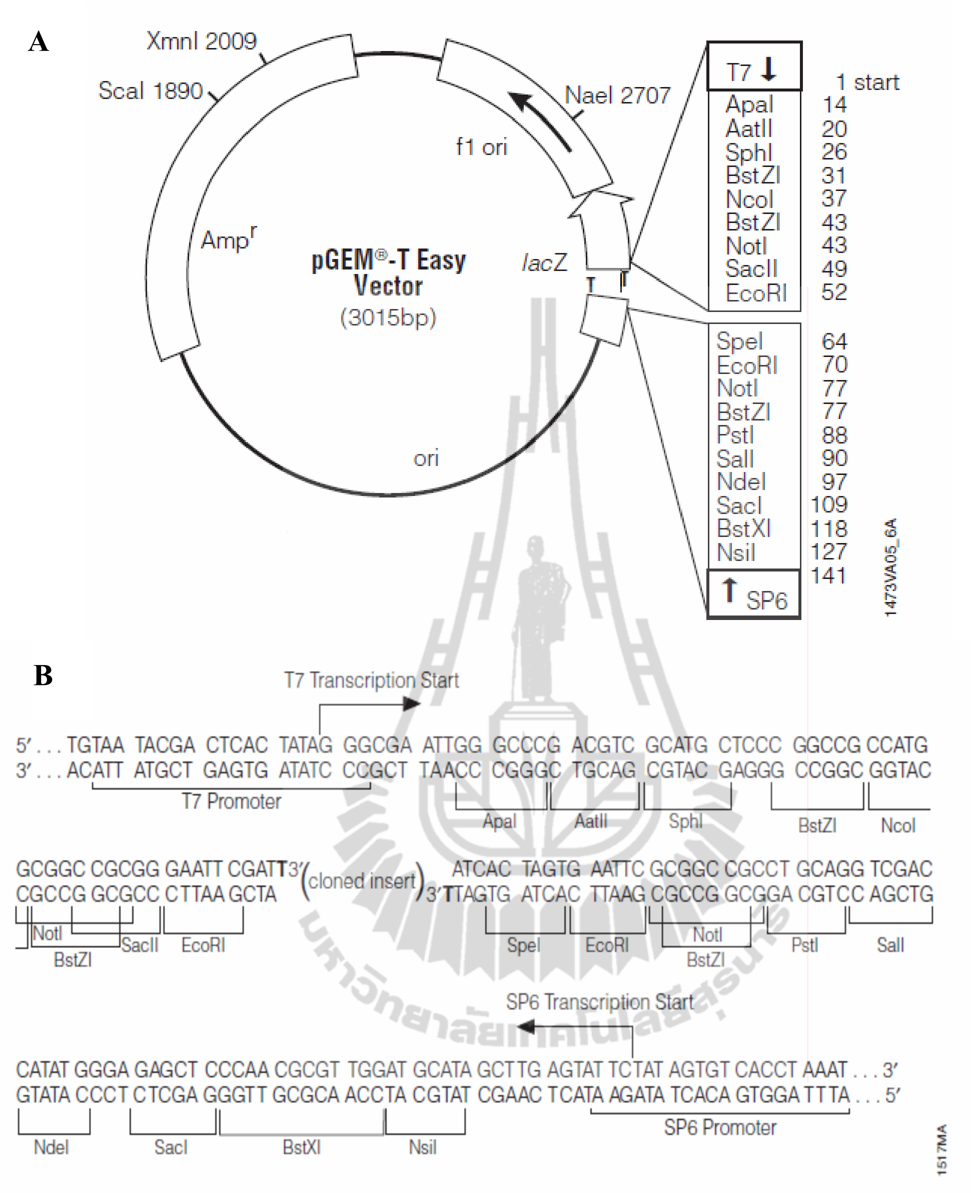
การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis และการทำชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้บริสุทธิ์

ทำการเตรียม agarose gel ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้วเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล โดยตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างต่ำ 1 ชั่วโมงก่อนใช้ หลังจากนั้นเท 0.5X TBE buffer ลงในอ่างสำหรับ run gel (chamber) วางเจลที่แข็งตัวแล้วลงใน chamber และเท 0.5X TBE buffer ลงไปจนท่วมเจล โดยมีระดับสูงกว่าเจลประมาณ 1-3 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ผสมกับสีติดตาม (tracking dye หรือ loading dye) ให้มีปริมาตรเป็นอัตราส่วน 3:1 บนกระดาษพาราฟิล์มจากนั้นจึงหยอดลงในหลุม (well) บนอะกาโรสเจล (agarose gel) ด้วยไมโครปิเปตต์ โดยจะต้องมีการโหลด DNA maker ที่ well ที่ 1 ของเจลทุกครั้งในกรณีที่ต้องการทราบขนาดของ PCR product เมื่อโหลดตัวอย่างเสร็จแล้วจึงทำการต่อขั้วไฟฟ้ากับเครื่องกำเนิดไฟ (power supply) โดยตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ 100 โวลต์ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือ 1 ชั่วโมง หรือจนสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาใกล้ถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง หลังจากนั้นปิดกระแสไฟฟ้า และตักอะกาโรสเจลออกมาเพื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ หลังจากนั้นทำชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้บริสุทธิ์โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูง เช่น

2% agarose gel เพื่อที่จะทำให้สามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอได้ดีและชัดเจนยิ่งขึ้นและเมื่อทราบขนาดของดีเอ็นเอเป็นไปตามที่คาดการณ์แล้ว จึงทำการตัดเจลตรงบริเวณของดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่ต้องการ ทำการแยกดีเอ็นเอจาก agarose gel ด้วย QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen) ชั่งน้ำหนักเจลที่อยู่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สาร buffer QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำหลอดไปตั้งที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเขย่า (vortex) หลอดเป็นครั้งคราว หลังจากเจลละลายหมดแล้ว สีของสารละลายควรเป็นสีเหลืองเหมือนเดิม (ถ้าสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีม่วงให้ใส่ 3M NaOAc pH 5.0 10 µl) หลังจากนั้นเตรียมวาง column ใน collection tube และทำการย้ายตัวอย่างที่ละลายหมดแล้วไปใส่ใน column ที่เตรียมไว้ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเทสารที่ตกลงมาอยู่ในส่วนของ collection tube ทิ้ง หลังจากเททิ้งใส่ column ลงใน collection tube เหมือนเดิม ต่อมาใส่สาร buffer QG 500 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที ทำการเทสารที่ตกลงมาอยู่ในส่วนของ collection tube ทิ้ง หลังจากเททิ้งใส่ column ลงใน collection tube เหมือนเดิม แล้วใส่สาร buffer PE 750 µl ตั้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที ทำการเทสารที่ตกลงมาอยู่ในส่วนของ collection tube ทิ้ง หลังจากเททิ้งทำการใส่ column ลงใน collection tube เหมือนเดิม และทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นทิ้ง collection tube และย้าย column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ ทำการเปิดฝา column ไว้ประมาณ 3 นาที หลังจากนั้นใส่น้ำ DI 30 µl วางไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที และนำดีเอ็นที่ได้ไปตรวจสอบผลการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Agarose gel electrophoresis

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM-T Easy

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ มีปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 50 ng/µl pGEM®-T Easy vector, 2X Rapid ligation buffer, 3 U/µl T4 DNA ligase และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) โดยให้สารละลายทั้งหมดเท่ากับ 11 µl หลังจากนั้นผสมเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงให้สารตกลงมาที่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำหลอดไปตั้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.2 แผนภาพพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy (A) และลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multi Cloning site ของพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy (B) (Promega)

การสร้างคอมพีเทนท์เซลล์ (Competent cell)

นำเชื้อ *E. coli* JM109 (Promega) มา streak บน LB plate และนำไปบ่มเชื้อในตู้อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วันต่อมานำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ที่เตรียมอยู่ในหลอดเลี้ยงเชื้อ และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) ที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วันต่อมานำเชื้อแบคทีเรียจากหลอดทดลองมา 100 µl ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ที่เตรียมอยู่ในขวดรูปชมพู่ 30 ml และนำขวดรูปชมพู่ไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 5-7 ชั่วโมง ซึ่งจะเป็นเวลาที่เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตถึงระยะ log phase หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงเทใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 ml และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย จากนั้นใส่สาร transformation buffer 1 ส่วนต่อ 3 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของสารละลายทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย และใส่สาร transformation buffer 1 ส่วนต่อ 12.5 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาใส่สาร DMSO 168 µl เพื่อรักษาสภาพของเซลล์แบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษา โดยทำทำการหยดที่ละหยดและทำการเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 µl เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและการละลายหลาย ๆ ครั้ง และเก็บ competent cell ในตู้เย็น -80°C (ในแต่ละขั้นตอนทำความสะอาดในบริเวณโต๊ะทดลองด้วย 80% alcohol หลังจากนั้นจุดไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ โดยมีการปฏิบัติแบบป้องกันการปนเปื้อน (aceptic technique))

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน

นำ competent cell 100 µl ออกจากตู้เย็น -80°C วางในถังน้ำแข็ง และใส่ดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ (recombinant DNA) ลงในหลอดที่มี competent cell แล้วใช้มือเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ และนำหลอดไปตั้งในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที และเมื่อครบเวลารีบนำหลอดไปวางในน้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว SOC 900 µl ลงในหลอด และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยภายในตู้มีอุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในหลอดออกมา 500 µl ใส่ลงในจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น 2XYT ที่เป็น selective media (ที่มี X-gal, IPTG และ ampicillin) แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำการแยกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่พลาสมิดมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (insert) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และจากการที่ spread เชื้อลงบน plate ที่มี amplicilin, IPTG และ X-gal จะทำให้สามารถคัดโคลนที่ต้องการได้ ซึ่งโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะเป็นโคโลนีสีฟ้า ส่วนโคโลนีสีขาว นั่นแสดงว่าเซลล์แบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ วันต่อมาทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ 1-2 โคโลนี และเลือกโคโลนีที่คาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำเป็นplate ต้นฉบับไว้ (master plate)

การวิเคราะห์ Recombinant DNA ด้วยวิธีการอย่างง่าย (Cracking)

ทำการปฏิบัติการแบบป้องกันการปนเปื้อน ซึ่งจะทำใกล้ไฟตลอด จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) มาลนไฟแบบผ่านไม่ร้อนมาก แล้วนำไม้จิ้มฟันไปเขี่ยเชื้อใน master plate นำไปใส่ที่ก้นหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สาร C. B. และสาร 10 mM EDTA ในอัตรา 1 ต่อ 1 ส่วนโดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 15 µl และหยดสาร L. B. ลงบนฝาหลอดประมาณ 1 µl จากนั้นนำหลอดไป vortex และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยง (spin down) เพื่อให้สาร L. B. ตกลงมาที่ก้นหลอด หลังจากนั้นนำหลอดไป vortex และวางหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 5 นาที ภายในหลอดจะมีส่วนของตะกอนเซลล์แบคทีเรียและ recombinant DNA ที่อยู่ในส่วนของสารละลาย โดยนำสารละลายในหลอด 10 µl มาตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis

การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

เมื่อทราบว่าโคโลนีของแบคทีเรียใดมีชิ้นส่วนของ recombinant DNA แล้ว จึงนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อขยายจำนวนแบคทีเรีย โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 2XYT 3 ml ใส่ลงในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อ และใช้ loop มาลนไฟแบบผ่านไม่ร้อนมาก แล้วนำไปเขี่ยเชื้อใน master plate และนำไปใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ หลังจากนั้นนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) ที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาข้ามคืนหรือ 16-18 ชั่วโมง โดยภายในตู้มีอุณหภูมิ 37^{o}C เมื่อครบจำนวนชั่วโมงทำการเก็บเซลล์โดยแบ่งเซลล์เป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งเก็บในส่วนของ glycerol stock และอีกส่วนเพื่อนำไปสกัดพลาสมิด การเก็บในส่วนของ glycerol stock โดยนำเซลล์

ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 µl ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สาร 30% glycerol 700 µl แล้วทำการ vortex และเก็บรักษาเซลล์ในตู้เย็น -80°C (โดยจะทำการทดลองแบบป้องกันการปนเปื้อน (aceptic technique) ซึ่งในการเลี้ยงเชื้อจะทำใกล้ไฟตลอด) หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนที่เหลือใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนลอย (supernatant) ทิ้ง จากนั้นใส่สาร solution I 200 µl แล้วนำไป vortex ให้ตะกอนละลายจะได้สารละลายสีขุ่น ต่อมาใส่สาร solution II 200 µl ทำการผสมโดยการเอียงหลอดเบาๆ (invert) ไปมาประมาณ 5-10 ครั้ง จะได้สารละลายสีใสและหนืด และใส่สาร solution III 200 µl ทำการผสมโดยการเอียงหลอดเบาๆ (invert) ไปมาประมาณ 5-10 ครั้ง จะได้สารละลายสีใสและมีตะกอนขาวขุ่น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการย้ายส่วนของ supernatant ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการย้ายส่วนของ supernatant ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่อีกครั้ง หลังจากนั้นใส่ isoprpanol 1 เท่าของสารละลายในหลอด และนำไป vortex วางตั้งในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของดีเอ็นเอ และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ isopropanol ระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1 X TE buffer ใส่ 1 ส่วนต่อ 2 ส่วนของสารละลายและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยในระหว่างนี้ทำการผสม (mix) เบาๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ RNase (10 mg/ml) 3 µl (ใส่ RNase 1 µl: สารลายในหลอด 100 µl) และนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที โดยในระหว่างนี้ทำการผสม (mix) เบาๆ ทุก 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดมาตั้งที่อุณหภูมิห้องแล้วใส่ phenol และสาร chloroform ในอัตรา 0.5 ส่วนต่อ 0.5 ส่วนของสารละลายที่มีอยู่ในหลอด ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้น โดยส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอจะอยู่ชั้นบนทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 3 M sodium acetate pH 4.8 ใส่ 1 ส่วนต่อ 10 ส่วนของสารที่อยู่ในหลอด และสาร absolute ethanol โดยใส่ 3 เท่าของสารในหลอด ทำการ vortex สารละลาย และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรืออุณหภูมิ -20°C ข้ามคืนหรือเป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อครบเวลาจึงทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของดีเอ็นเอ ทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 1 ml

หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป ทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำ DI 30 µl นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis และนำพลาสมิดดีเอ็นเอส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ DNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) โดยใช้เครื่องนาโนดรอป (nanodrop)

การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งถ้าต้องการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ผลด้วย Agarose gel electrophoresis ให้ใช้ปริมาตรน้อยที่สุด เพื่อให้หยอดใน well ของอะกาโรสเจลได้ทั้งหมด ซึ่งกรณีนี้ใช้ 10-20 µl ปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X buffer RE® act, 4U/µl *Eco*R I enzyme, 1.5 µg Plasmid DNA และน้ำ DI 5 µl เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายเท่ากับ 10 µl หลังจากนั้นทำการผสมสาร (mix) ด้วยมือเบาๆ แล้ววางหลอดในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์มาตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis หลังจากที่ทราบผลว่าพลาสมิดใดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA แล้วจึงทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม BlastN และ BlastX และทำการเปรียบเทียบความตรงกัน (alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน Tp*MC4R* โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

3.4.1.2 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ด้วยเทคนิค 5’RACE

การสังเคราะห์ First strand cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’

นำ total RNA ของสมองไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยใช้ SMART™ RACE cDNA amplification kit โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ first

strand cDNA 5’ RACE ดังนี้ Total RNA ความเข้มข้น 1-5 µg/µl ใส่ 1-3 µl, 5’-CDS primer A ที่มีความเข้มข้น 12 µM ใส่ 1 µl, SMART II A Oligonucleotide ที่มีความเข้มข้น 12 µM ใส่ 1 µl และน้ำ Deionized เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายทั้งหมดเท่ากับ 5 µl ทำการผสมสารละลายในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ให้เข้ากันและทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 นาที และแช่ลงในถังน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดดังกล่าวมาใส่สารละลายผสม (premixture) 5 µl (premixture ประกอบไปด้วย 5x First-Strand buffer 2 µl, 20 mM DTT 1 µl, 10 mM dNTP Mix 1 µl และ MMLV Reverse Transcriptase 1 µl) ซึ่งสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 µl หลังจากนั้นทำการผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที และนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สาร Tricine-EDTA buffer 100 µl และนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา และเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การออกแบบไพรเมอร์

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้าน 3’ RACE ดังนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้าน 5’ RACE (ดังภาพที่ 3.3 และตารางที่ 3.1)

```
TpMC4R 3'RACE   ------------------------------------------------------------------------
Goldfish        ---ATGAACACCTCACATCACCATGGACCGCATCATTCATACCGAAATCACAGCCAGGGGGCTTTG------ 63
Zebrafish       ---ATGAACACCTCACATCATCATGGACTGCATCATTCATTTCGGAACCACAGCCAAGGAGCTCTG------ 63
Karasu          ---ATGAACGCCACCGATCCCCCTGGGAGGGTGCAGGACTTCAGCAACGGGAGCCAAACCCCGG-------- 61
Flounder        ---ATGAACACGACAGAACATCCTGGTCTGAGCCAAGGCTTCCACAACTGGAGCCAAACCGCG--------- 60
Saebass         ---ATGAACACCACAGAGGCTCATGGATTGATCCATGGCTACCATAACCGGAGCCAAACCTCGGGC------ 63
Trout           ATGATGAATTCCACAGACCACCAAGGGTTGATCTCTGTGGGCTATACCAGGAACCTCAGCACTGCTGGGACT 72
Dogfish         ---ATGAACTCCTCGTTTCATCACAGGCTGCCGGAGACCCCGCAGCTCAGAAACCACAGCGTGGCG------ 63
Human           ---ATGGTGAACTCCACCCACCGTGGGATGCACACTTCTCTGCACCTCTGGAACCGCAGCAGTTACAGACTG 69
Chicken         ---ATGAATTTCACCCAGCATCGTGGGACACTCCAGCCTCTCCATTTCTGGAACCAGAGCA---ACGGACTG 66

TpMC4R 3'RACE   ------------------------------------------------------------------------
Goldfish        -----------CCAGTGGGAAAGCCTGATCAAGGTG-AGAGAGGATCAACCTCTGGATGTTACGAGCAGCTA 123
Zebrafish       -----------CCGGTGGGAAAGCCCTCTCATGGTG-ACAGAGGATCAGCTTCTGGATGCTACGAGCAGTTG 123
Karasu          -------------AGACGGACTTTCCAAACGAGGAG---AAGGAATCGTCTACGGGATGCTACGAGCAGATG 117
Flounder        ---TCGCCACTGAACGAGGACTTTTCAGCCCAGGAC---AAGGACTCGTCGGCCGGATGTTACGAGCAGCTG 126
Saebass         ATTTTGCCACTTAACAAAGACTTATCAGCAGAGGAG---AAGGACTCGTCCACAGGATGCTATGAACAGCTG 132
Trout           CTGGGAACCCTCAACAAAGACTCAGAGGGCGTTGGTATCAAGGACTCCTCAACAGGATGTTACGAGCAGCTC 144
Dogfish         -------AGATTCGCCAGCGCCAACGGCTCGCGCAG--TGACGGCTTCTCTTCGGGATGCTACGAGCAACTC 126
Human           ---------CACAGCAATGCCAGTGAGTCCCTTGGAAAAGGCTACTCTGATGGAGGGTGCTACGAGCAACTT 132
Chicken         ---------CACAGGGGTGCCAGCGAGCCCAGTGCGAAGGGCCACTCCTCGGGAGGCTGCTATGAACAACTC 129

TpMC4R 3'RACE   ------------------------------------------------------------------------
Goldfish        CTCATCTCCACAGAGGTCTTCCTCACACTCGGGCTCGTCAGTCTCCTGGAGAACATTTTAGTGATTGCTGCT 195
Zebrafish       CTGATCTCCACGGAGGTCTTCCTCACGCTCGGCCTGGTCAGCCTCCTGGAGAACATCCTTGTGATTGCAGCC 195
Karasu          CTGATCTCCACGGAGGTGTTCCTGACTCTGGGAATCATCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTGGTCGCCGCT 189
Flounder        CTGATCTCCACCGAGGTGTTCCTCACTCTGGGCATCGTCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTGGTCGCTGCT 198
Saebass         CTGATTTCCCCAGAGGTTTTCCTCACTCTGGGCATTGTCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTTGTTGCTGCT 204
Trout           CTCATCTCTACCGAGGTCTTTCTCACACTGGGGATAGTCAGTTTATTAGAGAACATCCTGGTGATTGCTGCC 216
Dogfish         TGGATCTCGACGGAGGTCTTCCTCACGCTGGGCATCTTCAGCCTCTTGGCAAATATTTTGGTCATTGCAGCT 198
Human           TTTGTCTCTCCTGAGGTGTTTGTGACTCTGGGTGTCATCAGCTTGTTGGAGAATATCTTAGTGATTGTGGCA 204
Chicken         TTTGTATCCCCTGAAGTGTTTGTGACTCTGGGCATCATCAGCTTGCTGGAAAACGTCTTGGTCATTGTGGCA 201

TpMC4R 3'RACE   ------------------------------ATGTACTTTTTCATCTGCAGCCTGGCGGTCGCCGACATGCTG 42
Goldfish        ATTATCAAGAACAAGAACCTTCATTCTCCCATGTACTTCTTTATCTGCAGTTTAGCTGTAGCAGACTTGTTG 267
Zebrafish       ATCGTCAAAAACAAGAACCTACATTCCCCTATGTACTTCTTCATCTGCAGCTTGGCTGTAGCAGACTTGTTA 267
Karasu          ATAGTGAAGAACAAGAATCTCCACTCGCCCATGTACTTTTTCATCTGCAGCCTGGCCGTGGCCGACATGCTC 261
Flounder        ATAATCAAGAACAAGAACCTTCACTCGCCGATGTACTTCTTCATCTGCAGCCTTGCCGTCGCTGACATGCTC 270
Saebass         ATCATCAAAAACAAGAACCTTCACTCACCTATGTACTTCTTCATCTGTAGCCTCGCTGTTGCTGACATGCTC 276
Trout           ATCATCAAGAATAAGAATCTTCACTCTCCCATGTACTTATTCATCTGTTCTTTGGCTGTGGCAGACATGCTG 288
Dogfish         ATTGTCAAAAACAAGAACCTGCACTCGCCGATGTATTTTTTCATCTGCAGCTTGGCAGTGGCTGACATGCTG 270
Human           ATAGCCAAGAACAAGAATCTGCATTCACCCATGTACTTTTTCATCTGCAGCTTGGCTGTGGCTGATATGCTG 276
Chicken         ATAGCCAAGAACAAGAACCTCCATTCGCCCATGTACTTCTTCATCTGTAGCTTGGCAGTGGCTGACATGCTA 273
                                              ******** ** *****     * ** *** * **  ** *
```

ภาพที่ 3.3 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ กับยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’

```
                                                                Primer MC4R-R3
                                                              <-------------------
TpMC4R 3'RACE     GTGAGCGTCTCAAATGCCTCTGAGACCATTGTCATCGAGCTCATCAATGGAGGCACGCTGAGCATCCCCATC 114
Goldfish          GTCAGTGTCTCAAATGCCTCCGAAACGGTAGTGATGGCACTCATCACGGGGGCAACCTAACTTATCGCGAG 339
Zebrafish         GTGAGTGTCTCCAATGCTTCGGAAACAGTTGTGATGGCGCTCATCACTGGAGGCAACCTGACCAACCGTGAG 339
Karasu            GTGAGCGTCTCCAACGCCTCCGAGACGATCGTCATAGCGCTCATCAACAGCGGCACGCTGACCATCCCCGCC 333
Flounder          GTCAGCGTCTCCAACGCCTCTGAGACCATCGTCATCGCGCTCATCAATGGAGGCAACCTGACCATCCCCGTC 342
Saebass           GTCAGTGTCTCCAATGCCTCTGAGACTATTGTCATAGCGCTCATCAACGGAGGCAAGCTGACCATCCCCGTC 348
Trout             GTCAGCGTCTCCAACGCCTCCGAGACCATCGTCATCGCCCTGATCAACGGCGGCAACTTGACCATCTCCGGG 360
Dogfish           GTTAGCGTGTCCAACGCGTGGGAGACGATCTTCATTGCCATGTTAAAAAGCAGGCACTTAACGGCCCCGGAA 342
Human             GTGAGCGTTTCAAATGGATCAGAAACCATTGTCATCACCCTATTAAACAG---TACAGATACGGATGCACAG 345
Chicken           GTGAGTGTATCTAATGGATCAGAAACTATTGTCATCACGCTTCTAAACAA---TATAGATACAGACGCACAG 342
                  ** ** ** ** ** *  ** ** **  *  * **  *  *  * *              **

TpMC4R 3'RACE     ACACTCATCAAGAGCATGGACAACGTGTTCGACTCCATGATCTGCAGCTCTCTGCTGGCCTCCATCTGCAGC 186
Goldfish          AGCATCATCAAGAACATGGACAACATTTTTGACTCGATGATCTGCAGCTCACTGTTGGCCTCCATTTGGAGT 411
Zebrafish         AGCATCATTAAGAACATGGACAACGTGTTTGACTCTATGATCTGCAGCTCTCTGTTGGCCTCCATTTGGAGT 411
Karasu            ACGCTGATCAAGAGCATGGACAACGTGTTTGACTCCATGATCTGCAGCTCTTTGCTGGCGTCCATCTGCAGC 405
Flounder          ACGTTGATTAAAAGCATGGACAACGTGTTTGACTCTATGATCTGCAGCTCCCTGCTGGCGTCCATCTGCAGC 414
Saebass           CAGTTGATCAAAAGCATGGACAATGTGTTTGACTCTATGATCTGTAGTTCTCTGTTAGCATCCATCTGCAGC 420
Trout             TCGCTCATAAAGAGCATGGACAACGTGTTCGACTCCATGATCTGTAGCTCACTGCTGGCGTCAATCTGTAGT 432
Dogfish           AATTTAATCAAGAACATGGACAACGTGTTTGACTCGATGATCTGCAGCTCTCTTCTGGCTTCCATTTGCAGC 414
Human             AGTTTCACAGTGAATATTGATAATGTCATTGACTCGGTGATCTGTAGCTCCTTGCTTGCATCCATTTGCAGC 417
Chicken           AGCTTTACCATAAACATTGACAATGTCATTGACTCAGTGATTTGCAGTTCCCTGCTTGCATCAATTTGCAGT 414
                  * *     *  ** ** **  *  *******  **** ** ** **  *  * ** ** ** ** **
                                                                              Primer MC4R-R2
                                                                              <---------
TpMC4R 3'RACE     TTGCTGGCTATCGCTGTGGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCGCTGCGTTACCACAACATCGTGACGTTG 258
Goldfish          TTGTTGGCCATAGCGGTGGACCGCTACATCACGATCTTCTACGCCTTGCGCTACCACAACATCATGACCCAA 483
Zebrafish         TTGTTGGCCATCGCGGTGGACCGCTACATCACAATCTTCTACGCTTTGCGCTACCACAACATCATGACCCAG 483
Karasu            CTGCTCGCCATCGCCGTCGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCCCTGCGCTACCACAACATCGTCACCCTG 477
Flounder          CTGCTCGCTATCGCAGTCGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCGCTGCGATACCACAACATCGTCACCCTG 486
Saebass           TTGCTGGCCATCGCGGTTGATCGTTACATCACTATCTTCTACGCACTGCGATACCACAACATTGGCACCCTG 492
Trout             CTCTTGGCCATCGCCATAGACCGCTACATCACCATATTCTACGCGCTGCGCTACCATAACATTGTGACGGTA 504
Dogfish           TTGCTGGCCATCGCTATTGACAGGTACATCACCATCTTCTACGCTCTGCGGTACCATAACATCGTGACAGTG 486
Human             CTGCTTTCAATTGCAGTGGACAGGTACTTTACTATCTTCTATGCTCTCCAGTACCATAACATTATGACAGTT 489
Chicken           CTCCTCTCAATAGCAGTGGACAGGTATTTTACTATCTTTTATGCCCTCCAGTACCATAATATCATGACGGTC 486
                   *  *  * ** **  * **  * **  * ** ** ** ** **  * *  ***** ** **    **

                    Primer MC4R-R2
                  <----------------
TpMC4R 3'RACE     CGCAGGGCCACGCTGGTCATCAGCACCATCTGGACGTGCTGCACGGTGTCCGGCATCCTCTTCATCATCTAC 330
Goldfish          CGGCGGGCGGGCACCATCATCACCTGCATCTGGACCTTGTGTACGGTCTCTGGCGTGCTCTTTATTGTGTAC 555
Zebrafish         CGGCGGGCGGGCACCATCATCACCTGCATCTGGACCTTCTGCACAGTCTCCGGCGTACTCTTTATCGTGTAT 555
Karasu            CGGAGAGCCTCGCTGGTCATCAGCAGCATCTGGACGTGCTGCACCGTGTCCGGCGTGCTCTTCATCGTCTAC 549
Flounder          CGGCGGGCGATGCTGGTCATCACCAGCATCTGGACGTGCTGCATCGTGTCTGGCATCCTCTTCATCATCTAC 558
Saebass           CGGAGAGCAATGTTGGTCATCAGCAGCATCTGGACATGCTGCATTGTGTCCGGCATCCTGTTTATCATCTAC 564
Trout             AAGCGAGCGATGGCGGTAATCGCGTGCATCTGGTCGTGTTGTGTGGCATCGGGCGTGCTCTTCATTATCTAC 576
Dogfish           CGGAGGGCCCTGATGATTATCGCCGCCATCTGGGCAGCCTGCACGGGCTCAGGGATCCTCTTCATCGTTTAT 558
Human             AAGCGGGTTGGGATCATCATAAGTTGTATCTGGGCAGCTTGCACGGTTTCAGGCATTTTGTTCATCATTTAC 561
Chicken           AAGCGTGTAGGGGTCATCATCACATGCATCTGGGCGCTTGCACTGTCTCAGGCATTTTGTTCATCATTTACT 558
                    * * *         * **       ****** *                *   *    *      *
```

ภาพที่ 3.3 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ กับยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ (ต่อ)

```
                          Primer MC4R-R1
                  <────────────────────────
TpMC4R 3'RACE  TCGGAGAGCACCACGGTGCTCATCTGCCTCATTACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGCGTCGCTC 402
Goldfish       TCTGAGAGCACCACCGTTCTCATCTGCCTTATCAGCATGTTCTTCACCATGCTGGCGCTTATGGCCTCGCTC 627
Zebrafish      TCAGAAAGCACCACTGTTCTCATCTGCCTCATCAGCATGTTCTTCACCATGCTGGCGCTCATGGCCTCACTC 627
Karasu         TCGGAGAGCACCACCGTGCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGCCTCCCTC 621
Flounder       TCGGAGAGCACCACGGTGCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGTGTCGCTG 630
Saebass        TCAGAGAGCACCACAGTGCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGTTGGTGCTCATGGCGTCGCTG 636
Trout          TCTGAGAGCACCACGGTCCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGCGCTCATGGCCTCTCTC 648
Dogfish        TCCGAGAGCACCGCAGTCATCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCGCCATGCTCGCCCTCATGGCCTCGCTC 630
Human          TCAGATAGTAGTGCTGTCATCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTCACCATGCTGGCTCTCATGGCTTCTCTC 633
Chicken        TCTGACAGCAGCGTTGTCATCATCTGCCTTATCAGCATGTTCTTCACCATGCTCATTCTCATGGCATCCCTT 630
               ** ** ** *     **  ********** **** ********** ***** *    ** ****  ** **
```

```
                          Primer MC4R-R1
                  <────────────────────────
TpMC4R 3'RACE  TACGTGCACATGTTCCTGCTGGCGCGCCTGCACATGAAGCGGATCGCAGCGCTGCCGGGCAACGCGCCCATC 474
Goldfish       TACGTCCACATGTTTCTTCTAGCCCGGCTGCACATGAAGCGCATTGCCGCCCTCCCTGGCAACGGCCCTATC 699
Zebrafish      TACGTCCACATGTTCCTTCTAGCCCGGCTGCACATGAAACGGATCGCCGCCTTACCTGGAAACGGCCCGATA 699
Karasu         TACGTCCACATGTTCCTGCTGGCGCGCCTGCACATGAAGCGGATCGCGGCGATGCCGGGCAACGCGCCCATC 693
Flounder       TACGTGCACATGTTCCTGCTGGCGCGCTTGCACACGAAGCGTATCGCGGCGCTGCCGGGCAACGCGCCCATC 702
Saebass        TACGTCCACATGTTCCTGCTGGCCCGTTTGCACATGAAGCGCATCGCAGCATTGCCAGGGAACGCGCCCATC 708
Trout          TACGTCCACATGTTCATGCTGGCCCGCCTGCACATAAAGAGGATTGCCGTGCTGCCCGGGAACGTTCCCATC 720
Dogfish        TACGTGCACATGTTCATGCTGGCCCGCTTGCACGTCAAGCGCATCGCCGCCCTGCCCGGCAACGGCGCCGTC 702
Human          TATGTCCACATGTTCCTGATGGCCAGGCTTCACATTAAGAGGATTGCTGTCCTCCCCGGCACTGGTGCCATC 705
Chicken        TATGTTCACATGTTCATGATGGCTCGAATGCATATCAAGAAGATAGCAGTTCTTCCAGGGACTGGCCCCATT 702
               ** ** ********  *  * **  *    **    **    ** ** *    * ** ** *  *   * **
```

```
TpMC4R 3'RACE  CAGCAGCGCGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTGCTCGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCG 546
Goldfish       TGGCAGGCGGCAAATATGAAAGGGGCCATCACTATCACTATCCTGCTGGGAGTATTCGTGGTGTGCTGGGCT 771
Zebrafish      TGGCAGGCGGCGAATATGAAGGGCGCCATTACCATTACTATACTACTGGGGGTGTTTGTGGTGTGCTGGGCG 771
Karasu         CACCAGAGAGCCAACCTGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCCTGGGAGTGTTTGTGGTCTGCTGGGCG 765
Flounder       CTTCAGCGAGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCCTCGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCG 774
Saebass        CATCAGCGGGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCATCGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCG 780
Trout          CGCCAGCGTGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTCCTGGGTGTGTTCGTAGTGTGCTGGGCT 792
Dogfish        CGCCAAGCGGCGAACATGAAAGGGGCGATCACGCTGACCATCCTGCTGGGGGTCTTTGTCGTCTGCTGGGCG 774
Human          CGCCAAGGTGCCAATATGAAGGGAGCGATTACCTTGACCATCCTGATTGGCGTCTTTGTTGTCTGCTGGGCC 777
Chicken        CGCCAAGGGGCCAACATGAAAGGGGCCATCACTCTCACTATACTGATTGGAGTTTTTGTTGTGTGCTGGGCC 774
                  **    ** **  **** ** ** ** **  * ** ** **  * ** ** ** ** ** ********
```

```
TpMC4R 3'RACE  CCGTTCTTCCTCCACCTCATCCTGATGATCACCTGCCCCCGGAACCCCTACTGCACCTGCTTCATGTCCCAC 618
Goldfish       CCCTTTTTTTTGCACCTCATCCTCATGATTTCTTGCCCCCGGAATCCCTATTGCATCTGTTTCATGTCCCAC 843
Zebrafish      CCCTTTTTCTTGCACCTCATCCTCATGATCTCCTGCCCGCGGAATCCTTATTGTGTCTGCTTCATGTCACAC 843
Karasu         CCTTTCTTCCTTCACCTCATCCTCATGATCACCTGCCCCAAGAACCCATACTGCACGTGCTTCATGTCCCAC 837
Flounder       CCGTTCTTCCTCCACCTCATCCTCATGATCACGTGCCCGAGGAACCCGTACTGCACCTGCTTCATGTCCCAC 846
Saebass        CCCTTTTTCCTCCACCTCATCCTCATGATCACTTGCCCCAGGAACCCCTATTGCACCTGCTTCATGTCCCAA 852
Trout          CCCTTTTTCCTCCACCTCATCCTCATGATATCATGCCCCAGGAACCCCTACTGTGCCTGCTTCATGTCACAC 864
Dogfish        CCTTTCTTCATGCACCTCATTCTCATGATCTCCTGCCCGCAGAACCCGTACTGTGTCTGCTTCATGTCGCAC 846
Human          CCATTCTTCCTCCACTTAATATTCTACATCTCTTGTCCTCAGAATCCATATTGTGTGTGCTTCATGTCTCAC 849
Chicken        CCATTTTTTCTGCACCTCATTTTCTACATCTCCTGCCCCTACAATCCTTACTGTGTGTGCTTCATGTCTCAC 846
               ** ** **  * *** * **  **    **  * ** **    ** ** ** **    ** ********  *
```

```
TpMC4R 3'RACE  TTCAACATGTACCTGATCCTCATCATGTGCAACTCCATCATCGATCCCATCATCTACGCCTTTCGCAGCCAG 690
Goldfish       TTCAACATGTATCTGATCCTCATTATGTGCAACTCGGTCATAGACCCTCTCATCTACGCATTCAGGAGCCAA 915
Zebrafish      TTCAACATGTATCTGATCCTCATTATGTGCAACTCGGTCATAGACCCGCTCATATATGCCTTCAGAAGCCAA 915
Karasu         TTCAACATGTACCTCATCCTCATCATGTGCAACTCCGTCATCGACCCCATCATCTACGCCTTTCGCAGCCAG 909
Flounder       TTCAACATGTACCTCATTCTCATCATGTGCAACTCCGTCATCGACCCCATCATCTACGCCTTCCGCAGCCAG 918
Saebass        TTCAACATGTACCTCATCCTTATCATGTGCAACTCTGTCATTGACCCCATCATCTACGCGTTTCGCAGCCAA 924
Trout          TTCAACATGTACCTCATCCTCATCATGTGTAACTCTGTCATCGACCCACTGATCTACGCCTTCAGGAGCCAA 936
Dogfish        TTCAACATGTACTTAATCCTCATCATGTGCAACTCGGTCATCGACCCCCTCATCTACGCTTTCCGCAGTCAA 918
Human          TTTAACTTGTATCTCATACTGATCATGTGTAATTCAATCATCGATCCTCTGATTTATGCACTCCGGAGTCAA 921
Chicken        TTTAACTTCTACCTCATCCTCATCATGTGTAATTCCATCATTGATCCACTTATCTATGCATTTCGGAGTCAG 918
               ** *** * **  * ** ** ** ***** ** **  **** ** **  * ** ** **  *  * ** **
```

ภาพที่ 3.3 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ กับยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ (ต่อ)

```
TpMC4R 3'RACE   GAGATGCGGAAAACCTTCAAGGAGTTTTTCTGCTG---CTCGCAGCCTCTCCTGTGCGTCTGAGTTTGTGTT 759
Goldfish        GAGATGAGGAAAACCTTCAAGGAGATCTGCTGCTGCTGGTATGGACTGGCGTCTCTGTGTGTATGA------ 981
Zebrafish       GAAATGAGGAAGACCTTCAAGGAGATCTGCTGCTGCTGGTATGGACTTGCATCTCTGTGTGTATAA------ 981
Karasu          GAGATGAGAAAAACCTTCAAGGAGATCTTCTGCTG------CTCCCAAATGCTGGTGTGCATGTGA------ 969
Flounder        GAAATGAGGAAAACCTTCAAAGAGATTTTCTGCTG------CTCTCACGCTCTGCTGTGTGTGTGA------ 978
Saebass         GAGATGAGAAAAACCTTCAAAGAGATTTTCTGCTG------CTCACACGCTCTCTTGTGCGTGTGA------ 984
Trout           GAGATGAGGAAGACCTTTAAGGAAATCTTCTGCTGGT---ACAGTCTGCCAAACCTGTGTGTGTGCG----- 1005
Dogfish         GAAATGCGGAAGACCTTCAAAGAAATAATCTGCTGCT---ACAGTCTGCCGGGGCTGTGTGACCTG------ 981
Human           GAACTGAGGAAAACCTTCAAAGAGATCATCTGTTGCT---ATCCCCTGGGAGGCCTTTGTGACTTG------ 984
Chicken         GAGCTCAGGAAAACATTCAAAGAAATTATATGCTGCT---GTAACTTGAGAGGGCTTTGTGATTTA------ 981
                **  *  * ** ** ** ** ** **    ** **                    * **

TpMC4R 3'RACE   TTGAGTAATTTAAACCCGCGGGTCACACTGTACTATTTAAGTGAAACCTGGTCAACAGGGAGTTTCAGAACT 831
Goldfish        ------------------------------------------------------------------------ 981
Zebrafish       ------------------------------------------------------------------------ 981
Karasu          ------------------------------------------------------------------------ 969
Flounder        ------------------------------------------------------------------------ 978
Saebass         ------------------------------------------------------------------------ 984
Trout           ---------------------------------------------AGCTG----CCAGGGAAATATTGA--- 1020
Dogfish         ------------------------------------------------------ACAAGTGAATATTAA--- 996
Human           ------------------------------------------------------TCTAGCAGATATTAA--- 999
Chicken         ------------------------------------------------------CCTGGCAAATATTAG--- 996

TpMC4R 3’RACE   CTCATCACTGTGGACAGATGTGGTTCTGTTGTGCTCCCTTGCTGGGCTGTAAAACTCTTAATGATGTAGGCG 903
Goldfish        ------------------------------------------------------------------------
Zebrafish       ------------------------------------------------------------------------
Karagu          ------------------------------------------------------------------------
Flounder        ------------------------------------------------------------------------
Saebass         ------------------------------------------------------------------------
Trout           ------------------------------------------------------------------------
Dogfish         ------------------------------------------------------------------------
Human           ------------------------------------------------------------------------
Chicken         ------------------------------------------------------------------------

TpMC4R 3’RACE   CCTGCCTCGGGTTTTGTAAAGACGTAGCTTTGTGATCACCGTGTATCACAGAGCATCACCGTGGAGACGAAC 975
Goldfish        ------------------------------------------------------------------------
Zebrafish       ------------------------------------------------------------------------
Karagu          ------------------------------------------------------------------------
Flounder        ------------------------------------------------------------------------
Saebass         ------------------------------------------------------------------------
Trout           ------------------------------------------------------------------------
Dogfish         ------------------------------------------------------------------------
Human           ------------------------------------------------------------------------
Chicken         ------------------------------------------------------------------------
```

ภาพที่ 3.3 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ กับยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ (ต่อ)

```
TpMC4R 3’RACE GCAGCTTTTGTTTGTTCAGTGAAGCTTGTTGAAATGCAACTTAAGTAAATGTCGCCAGTAAAAAAAAAAAAAA 1047
Goldfish       ------------------------------------------------------------------------
Zebrafish      ------------------------------------------------------------------------
Karagu         ------------------------------------------------------------------------
Flounder       ------------------------------------------------------------------------
Saebass        ------------------------------------------------------------------------
Trout          ------------------------------------------------------------------------
Dogfish        ------------------------------------------------------------------------
Human          ------------------------------------------------------------------------
Chicken        ------------------------------------------------------------------------

TpMC4R 3’RACE  AAAAAAAAAAAAA 1060
Goldfish       -------------
Zebrafish      -------------
Karagu         -------------
Flounder       -------------
Saebass        -------------
Trout          -------------
Dogfish        -------------
Human          -------------
Chicken        -------------
```

ภาพที่ 3.3 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ กับยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ (ต่อ)

Primary PCR และ Nested PCR

นำ primer ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ PCR โดยในการทำ PCR รอบที่ 1 ใช้ primer forward UPM-L คู่ primer reverse MC4R-R1 การทำ PCR ในรอบที่ 2 ใช้ primer forward UPM-S คู่ primer reverse MC4R-R2 การทำ PCR ในรอบที่ 3 ใช้ primer forward NUP คู่ primer reverse MC4R-R3 ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR โดยใช้ EX Taq kit (Takara) โดยให้มีปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 10 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 10x buffer EX Taq (with $MgCl_2$), 2.5 mM dNTP Mix, 10 µM primer forward, 10 µM primer reverse, 5 U/µl EX Taq โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เป็น first strand cDNA 5’ RACE จากสมองของปลาสลิด สำหรับการทำ PCR รอบที่ 1 ต่อมาในการทำ PCR รอบที่ 2 มีการใช้ผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ในรอบที่ 1 (PCR product) มาทำการเจือจาง (dilute) ในอัตราส่วน 1 : 50 เท่า เพื่อนำมาเป็น DNA template สำหรับการทำ PCR รอบที่ 2 หลังจากนั้นมีการใช้ผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR รอบที่ 2 มาทำการเจือจางในอัตราส่วน 1 : 50 เท่า เพื่อใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR รอบที่ 3 โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 60°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis ต่อจากนั้นมีขั้นตอนเช่นเดียวกันกับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ และ ด้านปลาย 5’ มาต่อกัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนโดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะในปลาชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม BlastN และBlastX และทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MC4R* โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) เพื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนยีน *MC4R* ระหว่างปลาสลิด, คน, ไก่ และปลาชนิดต่าง ๆ หลังจากนั้นทำการศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของลำดับกรดอะมิโนของยีน *TpMC4R* ซึ่งจะทำการทำนายตำแหน่ง seven transmembrane (TM) domain โดยใช้โปรแกรม Split 4.0 server

(http://split.pmsft.hr/split/4/) และทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *TpMC4R* โดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธีการของ Neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.66 (http://evolution.genetics.washinton.edu/phylip.html) ที่กำหนดค่า Bootstrep เท่ากับ 1000

3.4.1.3 การโคลน cDNA ของยีน β-actin ในปลาสลิด

การสังเคราะห์ first strand cDNA ของยีน β-actin ในปลาสลิด

นำ total RNA ของสมองที่ได้ส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยใช้ SMART™ RACE cDNA amplification kit โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA 3' RACE ดังนี้ total RNA ความเข้มข้น 1-5 μg/μl ใส่ 1-3 μl, 3'-CDS primer A ที่มีความเข้มข้น 12 μM ใส่ 1 μl, SMART II A Oligonucleotide ที่มีความเข้มข้น 12 μM ใส่ 1 μl และน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายทั้งหมดเท่ากับ 5 μl ทำการผสมสารละลายในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ให้เข้ากันและทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 70^{o}C เป็นเวลา 2 นาที และแช่ลงในถังน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดดังกล่าวมาใส่สารละลายผสม (premixture) 5 μl (premixture ประกอบด้วย 5x First-Strand buffer 2 μl, 20 mM DTT 1 μl, 10 mM dNTP Mix 1 μl และ MMLV Reverse Transcriptase 1 μl) ซึ่งสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 μl หลังจากนั้นผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 1 นาที และนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 42^{o}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สาร Tricine-EDTA buffer 100 μl และนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 72^{o}C เป็นเวลา 7 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา และเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20^{o}C

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการรวบรวมข้อมูลของยีน *β-actin* ในปลาชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) จากนั้นทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *β-actin* (ดังภาพที่ 3.4) โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 และทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาใช้ในการโคลน cDNA ของยีน *β-actin* ของปลาสลิด (ดังตารางที่ 3.1)

```
Flounder  ATGGAAGATGAAATCGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCCGGATTCGCCGGAGA 71
Grouper   ATGGAAGATGAAATCGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCCGGATTCGCCGGAGA 71
Saebass   ATGGAAGATGAAATCGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCCGGATTCGCCGGAGA 71
Tilapia   ATGGAAGATGAAATCGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAGGCCGGATTCGCCGGAGA 71
Sillago   ATGGAAGATGAAATCGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCCGGATTCGCCGGAGA 71
Perch     ATGGATGACGAAATCGCCGCCCTCGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCTGGCTTTGCAGGAGA 71
          ***** ** *********** ** ***************************** ** ** ** ** *****

Flounder  CGACGCCCCTCGTGCTGTCTTTCCCTCCATTGTTGGTCGCCCCAGGCATCAGGGAGTGATGGTGGGTATGG 142
Grouper   CGACGCCCCTCGTGCTGTCTTTCCCTCCATCGTCGGTCGCCCCAGGCATCAGGGAGTGATGGTGGGTATGG 142
Saebass   CGACGCCCCTCGTGCTGTCTTCCCCTCCATCGTCGGTCGCCCCAGGCATCAGGGTGTGATGGTGGGTATGG 142
Tilapia   CGACGCCCCTCGTGCTGTCTTCCCCTCCATCGTCGGTCGCCCCAGGCATCAGGGTGTGATGGTGGGTATGG 142
Sillago   CGACGCCCCTCGTGCTGTCTTCCCCTCCATCGTTGGTCGCCCCAGACATCAGGGTGTGATGGTGGGTATGG 142
Perch     TGATGCTCCGCGTGCTGTGTTCCCCTCCATTGTTGGACGTCCAAGACATCAGGGTGTGATGGTTGGCATGG 142
           ** ** ** ******** ** ******** ** ** ** ** ** ******** ******** ** ****

Flounder  GCCAGAAGGACAGCTACGTAGGTGATGAAGCCCAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATC 213
Grouper   GCCAGAAGGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCCCAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATT 213
Saebass   GCCAGAAGGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCCCAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACCCTGAACTACCCCATC 213
Tilapia   GTCAGAAAGACAGCTACGTTGGTGATGAGGCCCAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATT 213
Sillago   GCCAGAAAGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCCCAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATT 213
Perch     GCCAGAAAGATAGCTATGTTGGTGATGAGGCACAGAGCAAAAGGGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATT 213
          * ******** ***** ** ******** ** ******** ** ***************** ********

Flounder  GAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGAG 284
Grouper   GAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGAG 284
Saebass   GAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGAG 284
Tilapia   GAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGAG 284
Sillago   GAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGAG 284
Perch     GAGCATGGTATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGAG 284
          ***** ***** ** *********** ********************************************

Flounder  AGTCGCCCCAGAGGAGCACCCTGTCCTGCTCACAGAGGCCCCCCTGAACCCTAAAGCCAACAGGGAGAAGA 355
Grouper   AGTTGCCCCTGAGGAGCACCCTGTCCTGCTCACAGAGGCCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGA 355
Saebass   AGTTGCCCCTGAGGAGCACCCAGTCCTGCTCACAGAGGCCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGA 355
Tilapia   AGTTGCCCCTGAGGAGCACCCCGTCCTGCTCACAGAGGCTCCCCTGAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGA 355
Sillago   AGTTGCCCCTGAGGAGCACCCTGTCCTGCTCACAGAGGCCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGA 355
Perch     AGTTGCGCCCGAGGAGCACCCCGTCCTGCTCACAGAGGCTCCCCTGAACCCCAAGGCCAACAGGGAAAAGA 355
          *************************************************** ************** ****

Flounder  TGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCCGCCATGTACGTTGCCATCCAAGCTGTGCTGTCCCTG 426
Grouper   TGACCCAGATCATGTTCGAGACCTTCAACACCCCCGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTG 426
Saebass   TGACCCAGATCATGTTCGAGACCTTCAACACCCCCGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCCGTGCTGTCCCTG 426
Tilapia   TGACCCAGATCATGTTCGAGACCTTCAACACCCCCGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTG 426
Sillago   TGACCCAGATCATGTTCGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTG 426
Perch     TGACCCAGATCATGTTCGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCCGTGCTGTCCCTG 426
          ********************************** *********************** ************

Flounder  TACGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGATGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTA 497
Grouper   TATGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATTGTCATGGACTCCGGTGATGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTA 497
Saebass   TATGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATTGTCATGGACTCCGGTGATGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTA 497
Tilapia   TACGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGATGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTA 497
Sillago   TATGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGATGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTA 497
Perch     TATGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGATGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTA 497
          ** *********************** ********************************************
```

ภาพที่ 3.4 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β-*actin* ของปลาชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ของปลาสลิด

```
                                                                       Primer Actin-F →
Flounder  CGAGGGCTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCCGGCCGCGACCTCACAGACTACCTCA 568
Grouper   CGAGGGCTATGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCCGGCCGCGACCTCACAGACTACCTCA 568
Saebass   TGAAGGCTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCTGGCCGCGACCTCACAGACTACCTCA 568
Tilapia   CGAGGGTTATGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGTGACCTCACAGACTACCTCA 568
Sillago   CGAGGGCTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCCGGCCGCGACCTCACAGACTACCTCA 568
Perch     TGAGGGCTATGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCTGGCCGTGACCTCACAGACTACCTCA 568
           ** ** ** *********************************** ***** *******************

     Primer Actin-F →
Flounder  TGAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCCTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATTAAG 639
Grouper   TGAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCCTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAG 639
Saebass   TGAAGATCCTGACAGAACGTGGCTACTCCTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAG 639
Tilapia   TGAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCCTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAA 639
Sillago   TGAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCCTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAG 639
Perch     TGAAGATCCTGACAGAGCGTGGGTACTCATTCACCACCACAGCTGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAG 639
          **************** ***** ***** ************** **************************

Flounder  GAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACTGCTGCCTCCTCCTCCTCCCTGGA 710
Grouper   GAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACTGCTGCCTCCTCCTCCTCCCTGGA 710
Saebass   GAGAAACTGTGCTATGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAAATGGGCACTGCTGCCTCCTCCTCCTCCCTGGA 710
Tilapia   GAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCCTGGA 710
Sillago   GAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCCTGGA 710
Perch     GAGAAGCTGTGCTATGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACTGCTGCCTCCTCTTCCTCCCTGGA 710
          ***** ******** ******************************** *********** ***********

Flounder  GAAGAGCTATGAGCTGCCTGACGGACAGGTCATCACCATCGGCAATGAGAGGTTCCGTTGTCCAGAGGCCC 781
Grouper   GAAGAGCTACGAGCTGCCTGACGGACAGGTCATCACCATCGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCCAGAGGCCC 781
Saebass   GAAGAGCTACGAGCTGCCTGACGGACAGGTCATCACCATCGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCCAGAGGCCC 781
Tilapia   GAAGAGTTACGAGCTGCCTGACGGACAGGTCATCACCATTGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCCCGAGGCCC 781
Sillago   GAAGAGCTACGAGCTGCCTGACGGACAGGTCATCACCATCGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCCAGAGGCCC 781
Perch     GAAGAGCTACGAGCTGCCCGACGGACAGGTCATCACCATCGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCCAGAGGCCC 781
          ****** ** ******** ******************** ******************** ** *******

Flounder  TCTTCCAGCCTTCCTTCCTCGGTATGGAGTCCTGTGGAATCCACGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAG 852
Grouper   TCTTCCAGCCTTCCTTCCTTGGTATGGAGTCCTGCGGAATCCACGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAG 852
Saebass   TTTTCCAGCCTTCCTTCCTCGGTATGGANTCCTGCGGAATCCACGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAG 852
Tilapia   TCTTCCAGCCTTCCTTCCTTGGTATGGAATCCTGCGGAATCCACGAAACCACCTACAACAGCATCATGAAG 852
Sillago   TCTTCCAGCCTTCCTTCCTCGGTATGGAGTCCTGCGGAATCCACGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAG 852
Perch     TCTTCCAGCCTTCCTTCCTCGGTATGGAGTCCTGCGGAATCCATGAGACCACCTACAACAGCATTATGAAG 852
          * ***************** ******** ***** ******** ** ***************** ******

Flounder  TGTGACGTCGACATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACACTGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCCGG 923
Grouper   TGCGACGTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCAGG 923
Saebass   TGCGACGTTGACATCCGTAAGGACCTGTATGCCAACACTGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCCGG 923
Tilapia   TGCGACGTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCTGG 923
Sillago   TGCGACGTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCCGG 923
Perch     TGTGATGTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCCGG 923
          ** ** ** ******************** ******** ***************************** **

Flounder  CATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGATCAAGATCATTGCCC 994
Grouper   CATCGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGATCAAGATCATTGCCC 994
Saebass   CATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGATCAAGATCATTGCCC 994
Tilapia   CCATCGTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGATCAAGATCATTGCCC 994
Sillago   CATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGATCAAGATCATTGCCC 994
Perch     CATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAAATCAAGATTATTGCCC 994
          *      ******************************************************** *******
```

ภาพที่ 3.4 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β-*actin* ของปลาชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ของปลาสลิด (ต่อ)

```
                                                                          <Primer Actin-R
Flounder   CACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTGGCTTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATG 1065
Grouper    CACCAGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATTGGAGGCTCCATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATG 1065
Saebass    CACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTTCCAGCAGATG 1065
Tilapia    CACCTGAGCGTAAATACTCCGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATG 1065
Sillago    CACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTTCCAGCAGATG 1065
Perch      CACCAGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTTCCAGCAGATG 1065
           **** *********************** ******************** *********************

          <Primer Actin-R
Flounder   TGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAA 1128
Grouper    TGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAA 1128
Saebass    TGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAA 1128
Tilapia    TGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAA 1128
Sillago    TGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCTGGCCCATCCATCGTCCACCGTAAATGCTTCTAA 1128
Perch      TGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGTAAATGCTTCTAA 1128
           ***************************** ***** ************** ** *********
```

ภาพที่ 3.4 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β-*actin* ของปลาชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ของปลาสลิด (ต่อ)

Primery PCR และ Nested PCR

นำ primer ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ PCR โดยในการทำ PCR รอบที่ 1 ใช้ primer forward Actin-F คู่ primer reverse UPM-L การทำ PCR ในรอบที่ 2 ได้แบ่งการใช้ primer ออกเป็น 2 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 (primer forward Actin-F คู่ primer reverse NUP) คู่ที่ 2 (primer forward Actin-F คู่ primer reverse Actin-R) ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR โดยใช้ EX Taq kit (Takara) โดยให้มีปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 10 μl ซึ่งประกอบไปด้วย 10x buffer EX Taq (with $MgCl_2$), 2.5 mM dNTP Mix, 10 μM primer forward, 10 μM primer reverse, 5 U/μl EX Taq โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เป็น first strand cDNA 3’ RACE จากตับของปลาสลิดสำหรับการทำ PCR รอบที่ 1 และมีการใช้ผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ในรอบที่ 1 (PCR product) มาทำการเจือจาง (dilute) ในอัตราส่วน 1 : 50 เท่า ในการทำ PCR รอบที่ 2 โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 55°C เป็นเวลา 30 วินาที และ72°C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis ต่อจากนั้นมีขั้นตอนเช่นเดียวกันกับการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน β*-actin* ของปลาสลิดกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน β*-actin* ในปลาชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม BlastN และ BlastX และทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน β*-actin* โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) เพื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโนยีน β*-actin* ระหว่างปลาสลิดและปลาชนิดต่าง ๆ

3.4.2 การวิเคราะห์การแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของปลาสลิด โดยใช้เทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR)

3.4.2.1 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ และการเก็บตัวอย่างของตัวอ่อนปลาสลิด

นำปลาสลิดที่มีสุขภาพที่ดีและมีความสมบูรณ์พันธุ์จากที่พักเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ มาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 2x2.5x0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีพืชน้ำเช่นผักบุ้งที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วลอยไว้ในบ่อ โดยเตรียมไว้สำหรับให้ปลาสลิดผสมพันธุ์และก่อหวอด ซึ่งมีอัตราการปล่อยคือ ปลาสลิดเพศผู้ 2 ตัว ต่อ ปลาสลิดเพศเมีย 4 ตัว สำหรับการผสมพันธุ์จะทำการฉีดฮอร์โมนผสมระหว่าง Suprefact และ Motiliun M ตรงบริเวณโคนครีบหลังของปลาสลิด โดยปลาสลิดเพศผู้ ฉีด 1 เข็ม มีความเข้มข้นของ Suprefact 10 μg/kg และMotiliun M 5 μg/kg หลังจากการฉีดฮอร์โมนปล่อยปลาสลิดลงบ่อเพาะพันธุ์ ส่วนปลาสลิดเพศเมียฉีด 2 เข็ม โดยเข็มที่ 1 มีความเข้มข้นของ Suprefact 10 μg/kg และ Motiliun M 10 μg/kg หลังจากการฉีดเข็มที่ 1 แล้ว 12 ชั่วโมง จึงทำการฉีดเข็มที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Suprefact 20 μg/kg และ Motiliun M 10 μg/kg หลังจากฉีดเข็มที่ 2 จึงทำการปล่อยปลาสลิดเพศเมียลงในบ่อเพาะพันธุ์ที่มีปลาสลิดเพศผู้อยู่ หลังจากการปล่อยให้ปลาผสมพันธุ์กันประมาณ 14 ชั่วโมง ปลาจะเริ่มก่อหวอด หลังจากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนของปลาที่ได้มีการวางไข่แล้ว 5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 ชั่วโมง (hours post spawning : hps) และทำการเก็บตัวอย่างรังไข่จากแม่พันธุ์ปลาสลิดที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งก็คือไข่ปลาที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg) หลังจากนั้นนำตัวอย่างตัวอ่อนของปลาสลิดไปสกัด total RNA และนำไปวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปสังเคราะห์ first stand cDNA

3.4.2.2 การสังเคราะห์ First stand cDNA ของยีน *TpMC4R* ของตัวอ่อนปลาสลิดในระยะต่าง ๆ

นำ total RNA ของตัวอ่อนปลาสลิดในระหว่างการพัฒนาการระยะต่าง ๆ ไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยใช้ ImProm-II^{TM} Reverse Transcription system kit ซึ่งมีการเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยาในปริมาตร 10 μl ซึ่งประกอบด้วย total RNA ความเข้มข้น 0.25 μg/μl, primer Oligo (dT) ความเข้มข้น 0.5 μg/reaction และใช้ DEPC water ในการปรับปริมาตร หลังจากนั้นทำการผสมเบาๆ และนำไปตั้งที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการย้ายหลอดไปตั้งในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที ในระหว่างรอเวลาจึงทำการเตรียม

สารละลายผสม (master mix) ซึ่งประกอบด้วย ImProm-II^{TM} 5X reaction buffer, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 40 U/µl RNase inhibitor, 1 U/µl ImProm-II^{TM} Reverse Transcriptase และน้ำ DI ปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดให้เท่ากับ 15 µl ทำการผสมสารละลายในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ให้เข้ากันและทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสาร master mix ด้วยไมโครปิเปตต์มา 15 µl ใส่ลงในหลอดที่ได้เตรียม total RNA ไว้ทำการผสมสารละลายในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ให้เข้ากัน หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการ anneal โดยนำหลอดไปตั้งตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่มีอุณหภูมิ 25^{o}C เป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Extend โดยนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่มีอุณหภูมิ 42^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการ Inactivation โดยนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่มีอุณหภูมิ 72^{o}C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาและเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20^{o}C

3.4.2.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ด้วยวิธีการ Reverse transcription PCR (RT-PCR)

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับ MC4R และ β-actin โดยมีการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA เส้นสมบูรณ์ ยีน *TpMC4R* และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน *β-actin* ด้านปลาย 3’ จากการศึกษาในข้างต้น (ดังภาพที่ 3.5 และ 3.6)

1 GCAACGAAGGAGGCATAATGAACACCACAGATCCCAGTGGATTAAGCCCGGGCTACCACAACCGAAGCCAAACCACAGCCACG 83

84 CTGCCCACTAACAAGGACCTCCCCTCTGAGGAGAAGGACTCGTCTGCAGGGTGTTACGGCCAGCTGCTGATCTCCACTGAGGTT 167

168 TTCCTCACTCTGGGCATCGTCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTTGTGGCTGCCATAGTGAAAAACAAGAACCTCCACTCTCCC 251

252 ATGTACTTTTTCATCTGTAGCCTGGCGGTCGCCGACATGCTGGTGAGCGTCTCAAATGCCTCTGAGACCATTGTCATCGAGCTC 335

336 ATCAATGGAGGCACGCTGAGCATCCCCATCACACTCATCAAGAGCATGGACAACGTGTTCGACTCCATGATCTGCAGCTCTCTG 419

420 CTGGCCTCCATCTGCAGCTTGCTGGCTATCGCTGTGGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCGCTGCGTTACCACAACATCGTG 503

Primer MC4R-RT-F

504 ACGTTGCGCAGGGCCACGCTGGTCATCAGCACCATCTGGACGTGCTGCACGGTGTCCG**GCATCCTCTTCATCATCTACTCGGA**G 587

588 AGCACCACGGTGCTCATCTGCCTCATTACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGCGTCGCTCTACGTGCACATGTTCCTG 671

672 CTGGCGCGCCTGCACATGAAGCGGATCGCAGCGCTGCCGGGCAACGCGCCCATCCAGCAGCGCGCCAACATGAAGGGCGCCATC 755

Primer MC4R-RT-R

756 ACCCTCACCATCCTGCTCGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCGCCGTTCTTCCTCCACCTCATCCTGATGAT**CACCTGCCCCCGG** 839

Primer MC4R-RT-R

840 **AACCCCTACTGC**ACCTGCTTCATGTCCCACTTCAACATGTACCTGATCCTCATCATGTGCAACTCCATCATCGATCCCATCATC 923

924 TACGCCTTTCGCAGCCAGGAGATGCGGAAAACCTTCAAGGAGTTTTTCTGCTGCTCGCAGCCTCTCCTGTGCGTCTGAGTTTGT 1007
1008 GTTTTGAGTAATTTAAACCCGCGGGTCACACTGTACTATTTAAGTGAAACCTGGTCAACAGGGAGTTTCAGAACTCTCATCACT 1091
1092 GTGGACAGATGTGGTTCTGTTGTGCTCCCTTGCTGGGCTGTAAAACTCTTAATGATGTAGGCGCCTGCCTCGGGTTTTGTAAAG 1175
1176 ACGTAGCTTTGTGATCACCGTGTATCACAGAGCATCACCGTGGAGACGAACGCAGCTTTTGTTTGTTCAGTGAAGCTTGTTGAA 1259
1260 ATGCAACTTAAGTAAATGTCGCCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1311

ภาพที่ 3.5 การออกแบบไพร์เมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA เส้นสมบูรณ์ ยีน *TpMC4R* ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวอักษรหนาและขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นขนาด 289 bp

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1 ACTACCTCATCAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCTTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAGGAGA 84

85 AGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACTGCAGCCTCCTCCTCTTCTCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGC 168

Primer Actin-RT-F →

169 CCGACGGACAGGTCATCACCAT**TGGTAATGAGAGGTTCCG**TTGCCCAGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTCCTTGGTATGGAGT 252

← Primer Actin-RT-R

253 CCTGCGGAATCCA**TGAGACCACCTACAATAGTA**TCATGAAGTGCGACGTTGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGC 336

337 TGTCTGGTGGTACCACCATGTACCCCGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGA 420

421 TCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATTGGAGGCTCCATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGA 504
505 TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATTGTCCACCGCAAATGCTTCTAAACGGACTGTTCCTTCTCCC 588
589 TTCTCCCCAACCAAACACCCAACAACTTCAGCTCTGTGCAACGACCACAACACATTTATCATACACACTCGGGCGCAGAGCCTA 672
673 GATGACCAACTCATTGGCATGGCTTCAGTTATTTTTGGCGCTTGACTCAGGATTTTAAAAAACTGGAACGATGAAGGATACAGT 756
756 AATGTTTTTGGCTAGGTATAAAAGCACCCTAAGATTCTGCACCTGGGGTCTTAAAAAAAAAATGTACATTTTTTTTTTTTTTTTT 840
841 GAGTCATTCCAAATGTTTGTTAACTGCATTGTTCAGACACATGATTCCAAATGTTAACTGCATTGTTCAGACACGTATTTGCCT 924
924 CTGTGAAGGCTCCCCAGTGGTTGGCGCATACTTAAACATTGTTGTAGTATCGCTTGTATGTAAATTATGTGTGGGTTTTTTGTA 1008
1009 CTTTCAGCCTTAAAAATCTTGGTCCTGTTTAATTTTTTTTTTGTTTTTGTTATGCAAAACCCAATTGTGACCTCTCCTTCCCCCT 1092
1093 GTTCAACCTGGGGCAGTGGGGAAAAGGGGTCTCAAAGTGAAGGGGTAACAAGGGGTGCCAGACCGGTGGGGCCAACCTGTACAC 1176
1177 TGAATGAAACAATCCCAATAAAGTGCACATGTGTTCCGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1224

ภาพที่ 3.6 การออกแบบไพร์เมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวอักษรหนาและขีดเส้นใต้ คือไพรเมอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นขนาด 95 bp

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *β-actin* เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลาสลิด จากนั้นทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ MC4R-RT-F คู่ MC4R-RT-R สำหรับยีน *MC4R* และ Actin-RT-F คู่ Actin-RT-R สำหรับยีน *β-actin* ทำการเตรียมสารละลายผสมสำหรับการทำ PCR ประกอบด้วย 5X GoTaq® Flexi Buffer, 25 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP Mix, 10 μM primer forward, 10 μM primer reverse, 5 U/μl GoTaq® DNA polymerase, DNA template เป็น cDNA ตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลาสลิด และน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 μl โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 20 วินาที, 60°C เป็นเวลา 20 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 20 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

3.4.3 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด ด้วยวิธี Real time reverse transcription PCR (Real time RT-PCR)

3.4.3.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อต่างๆ

นำปลาสลิดที่มีสุขภาพที่ดีจากที่พักเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ โดยเป็นปลาสลิดที่โตเต็มวัย ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 60 กรัม จำนวน 4 ตัว มาทำการวางยาสลบด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บเนื้อเยื่อของอวัยวะ ได้แก่สมอง 4 ส่วน (สมองส่วน telencephalon, ส่วน mesencephalon, ส่วน metencephalon และส่วน diencephalon รวมถึง pituitary gland), เหงือก (gill), ตับ (liver), ไตส่วนบน (head kidney), ไตส่วนล่าง (trunk kidney), กระเพาะอาหาร (stomach), ลำไส้ (intestine), ม้าม (spleen), กล้ามเนื้อ (muscle), รังไข่ (ovary) และอัณฑะ (testis) จากนั้นนำไปสกัด total RNA และนำไปวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปสังเคราะห์ first stand cDNA

3.4.3.2 การสังเคราะห์ First stand cDNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ

นำ total RNA ของอวัยวะต่าง ๆ ในปลาสลิดที่ได้ส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยใช้ First Strand cDNA Synthesis Kit (GE healthcare) ซึ่งมีการเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยาในปริมาตร 10 μl ซึ่งประกอบด้วย total RNA ให้มีความเข้มข้น 1-5 μg/μl

และใช้ DEPC water ในการปรับปริมาตร ผสมเบาๆ หลังจากนั้นนำไปตั้งที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที ในระหว่างรอเวลาจึงทำการเตรียมสารละลายผสม (master mix) ที่มีปริมาตร 7 µl ซึ่งประกอบด้วย 5X Bulk 1st cDNA reaction mix, 200 mM DTT และ 0.5 µg/3 µl Oligo d (T) ทำการผสมสารละลายในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ให้เข้ากันและทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสาร total RNA ที่มีความเข้มข้น 1-5 µg/µl ที่เตรียมไว้มา 8 µl ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ และดูดสาร master mix ด้วยไมโครปิเปตต์มา 7 µl ใส่ลงในหลอดด้วยเช่นกัน ทำการผสมสารละลายในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.4.3.3 Real time reverse transcription PCR (Real time RT-PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *β-actin* เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งมีการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ (p3-TpMC4R) และพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *β-actin* ด้านปลาย 3’ ของปลาสลิด (p-Actin) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ในการทำ real time RT-PCR มีการใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ MC4R-RT-F คู่ MC4R-RT-R สำหรับยีน *MC4R* และ Actin-RT-F คู่ Actin-RT-R สำหรับยีน *β-actin* (ดังตารางที่ 3.1) ซึ่งมีการใช้สารละลายของ LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) โดยทำการเตรียมสารละลายผสมสำหรับการทำ real time RT-PCR ประกอบด้วย 2X LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 5 µM primer forward, 5 µM primer reverse (สำหรับปฏิกิริยาของ MC4R ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer เท่ากับ 0.1 µM และสำหรับปฏิกิริยาของ actin ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer เท่ากับ 0.15 µM), DNA template 1 µl และน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 µl โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ (PCR condition) ได้แก่ predenature คือ 95°C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมาเข้าสู่กระบวนการ amplification คือ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที, 60°C เป็นเวลา 15 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 20 วินาที ติดต่อกันจำนวน 50 รอบ และเข้าสู่กระบวนการ melting คือ 95°C เป็นเวลา 5 วินาที, 60°C เป็นเวลา 10 วินาที และ 95°C เป็นเวลา 0 วินาที จำนวน 1 รอบ และขั้นสุดท้าย cool คือ 40°C เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นทำการบันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ Melting curve ของ PCR products ซึ่งนำค่า melting temperature (Tm) มาจำแนก specific

PCR และ non-specific PCR product ออกจากกัน เพื่อยืนยันว่าเป็น product ที่ต้องการ (ดังแสดงในภาคผนวก) หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบค่า Cycle threshold method (CT method) ซึ่งค่า CT คือจำนวน cycle ที่แสงฟลูออเรสเซนต์ส่องผ่านที่ค่าเริ่มต้น (threshold value) ซึ่งสามารถทราบการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ได้จากการคำนวณ copy ของดีเอ็นเอมาตรฐานจากการสร้างกราฟมาตรฐาน (External standard) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ได้จากการเตรียม p3-TpMC4R และ p-Actin ซึ่งจะสามารถทำให้ทราบจำนวน copy ของทั้ง mRNA ของยีน *TpMC4R* และ mRNA ของยีน β*-actin* ได้ หลังจากนั้นทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป log 10 และทำการ Normalization ซึ่งเป็นการเทียบ target template กับ reference gene ในระบบ ซึ่งจะเรียกว่าเป็น Internal control โดยทั่วไปจะใช้ housekeeping gene ที่มีมากและสม่ำเสมอ

$$\text{Normalizaed mRNA ของยีน } \textit{TpMC4R}/\text{mRNA ของยีน } \beta\textit{-actin} = \frac{\text{log 10 mRNA ของยีน } \textit{TpMC4R}}{\text{log10 mRNA ของยีน } \beta\textit{-actin}}$$

หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis เพื่อเป็นการยืนยันขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ real time RT-PCR

3.4.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้างต้น มาทำการวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL) ซึ่งวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's multiple range test และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05 (P <0.05)

3.5 แผนการดำเนินงานที่ 2 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติ และผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

3.5.1 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหาร (Daily feeding) ของการกินอาหารปกติ

3.5.1.1 การเตรียมปลาสลิดสำหรับทดลอง

นำปลาสลิดที่มีสุขภาพที่ดีจากที่พักเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ ซึ่งปลาสลิดมีน้ำหนักประมาณ 60-65 กรัม ทำการสุ่มสมบูรณ์และย้ายปลาสลิดลงตู้สำหรับเลี้ยงปลาที่มีขนาด 60x30x45 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 21 ตู้ โดยในการเลี้ยงปลามีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง $28^{o}C$-$29^{o}C$ และมีการควบคุมช่วงแสง 12 ชั่วโมง และช่วงมืด 12 ชั่วโมง (โดยช่วงแสงระหว่าง 8.00-20.00 น.) การให้อาหารปลาสลิดให้วันละสองมื้อ โดยมื้อเช้าจะให้เวลา 10.00 น. และมื้อเย็นให้เวลา 16.00 น. ซึ่งในการให้อาหารและการกินอาหารของปลาสลิดในแต่ละมื้อใช้เวลาประมาณ 30 นาที อาหารที่ให้ปลาสลิดเป็นอาหารสำเร็จรูป (มีโปรตีนประมาณ 40%, ไขมัน 6%) ทำการเลี้ยงในตู้ปลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้ปลาสลิดปรับสภาพให้เข้ากับช่วงแสงและการกินอาหารสำเร็จรูป

3.5.1.2 การเก็บตัวอย่างสมองของปลาสลิด และการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหาร (Daily feeding) ของการกินอาหารปกติ

เนื่องจากปลาสลิดถูกฝึกให้กินอาหารวันละ 2 มื้อ คือในมื้อเช้าเวลา 10.00 น. และมื้อเย็นเวลา 16.00 น. ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของปลาสลิด โดยเก็บตัวอย่างสมองของปลาสลิดก่อนอาหารมื้อเช้า 1 ชั่วโมง (9.00 น.) หลังมื้ออาหาร 1 ชั่วโมง (11.00 น.), หลังมื้ออาหาร 3 ชั่วโมง (13.00 น.) และก่อนอาหารมื้อเย็น 1 ชั่วโมง (15.00 น.) ซึ่งนำปลาสลิดจากตู้ปลาที่เตรียมไว้จำนวน 5 ตัวต่อการเก็บหนึ่งช่วงเวลามาทำการวางยาสลบด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บเนื้อเยื่อสมอง 4 ส่วน ประกอบด้วยสมองส่วน telencephalon, ส่วน mesencephalon, ส่วน metencephalon และส่วน diencephalon หลังจากนั้นนำไปสกัด total RNA วัดความเข้มข้นเพื่อนำไปสังเคราะห์ first stand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription system kit และนำไปหาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค real time RT-PCR เช่นเดียวกับการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด

3.5.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหาร (Fasting period)

ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารของปลาสลิด โดยเก็บตัวอย่างหลังจากมีการอดอาหาร 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งนำปลาสลิดจากตู้ปลาที่เตรียมไว้ จำนวน 5 ตัว ต่อการเก็บหนึ่งช่วงเวลา มาทำการวางยาสลบด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บเนื้อเยื่อสมอง 4 ส่วน ประกอบด้วยสมองส่วน telencephalon, ส่วน mesencephalon, ส่วน metencephalon และส่วน diencephalon หลังจากนั้นนำไปสกัด total RNA วัดความเข้มข้นเพื่อนำไปสังเคราะห์ first stand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription system kit และนำไปหาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค real time RT-PCR เช่นเดียวกับการหาปริมาณการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ

3.6 แผนการดำเนินงานที่ 3 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด และผลของ MC4R antagonist ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

3.6.1 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด

3.6.1.1 การเตรียมปลาสลิดสำหรับทดลอง

นำปลาสลิดที่มีสุขภาพที่ดีจากที่พักเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ ซึ่งปลาสลิดมีน้ำหนักประมาณ 80-90 กรัม ทำการสุ่มสมบูรณ์และย้ายปลาสลิดลงตู้สำหรับเลี้ยงปลาที่มีขนาด 60x30x45 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 7 ตัว โดยในการเลี้ยงปลามีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28^{o}C-29^{o}C และมีการควบคุมช่วงแสง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง (โดยช่วงแสงระหว่าง 8.00-20.00 น.) การให้อาหารปลาสลิดให้วันละสองมื้อ โดยมื้อเช้าจะให้เวลา 10.00 น. และมื้อเย็นให้เวลา 16.00 น. ซึ่งในการให้อาหารและการกินอาหารของปลาสลิดในแต่ละมื้อใช้เวลาประมาณ 30 นาที อาหารที่ให้ปลาสลิดเป็นอาหารสำเร็จรูป (มีโปรตีนประมาณ 40%, ไขมัน 6%) ทำการเลี้ยงในตู้ปลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้ปลาสลิดปรับสภาพให้เข้ากับช่วงแสงและการกินอาหารสำเร็จรูป

3.6.1.2 การฉีด MC4R antagonist (HS024)

จากการรวบรวมเอกสารรายงานการวิจัยในข้างต้นมีการศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของยีน *MC4R* ต่อการกินได้ในสัตว์ โดยการฉีด MC4R antagonist เข้าในสมอง cerebroventricular (ICV) ซึ่งในการศึกษาการวิจัยในครั้งนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของอุปกรณ์และความชำนาญในการเปิดสมองของปลาโดยไม่ทำให้ปลาสลิดมีการเสียชีวิต ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงใช้วิธีการฉีด MC4R antagonist (HS024) เข้าบริเวณโคนครีบหลังของปลาสลิด โดยอาศัยหลักการการออกฤทธิ์เช่นเดียว

กับการฉีดฮอร์โมนผสมระหว่าง Suprefact และ Motiliun M ซึ่งจะทำการฉีด MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่าง ๆ ตามกลุ่มการทดลองที่จัดไว้ (โดย HS024 ละลายในน้ำเกลือ 0.9% ที่ความเข้มข้น 5 nmol/μl)

3.6.1.3 การศึกษาผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด

การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิดจะต้องมีการศึกษาถึงระดับการฉีด MC4R antagonist ที่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ของปลาสลิดเสียก่อน ซึ่งในการหาระดับของ MC4R antagonist (HS024) โดยทำการฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อบริเวณโคนครีบหลังของปลาสลิดในระดับต่าง ๆ ตามกลุ่มการทดลองที่จัดไว้ โดยในการทดลองหาระดับของ HS024 ในแต่ละครั้งจะมีปลาสลิดในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการฉีดสาร (uninjection) และปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline ซึ่งจากการทดสอบสามารถสรุปได้ดังนี้ มีการทดสอบปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 และ 100 μg/kg พบว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 μg/kg มีผลการกินได้มากกว่าการฉีด HS024 ที่ระดับอื่น ๆ และมีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นหลังจากเวลาที่มีการฉีดเพิ่มขึ้นด้วย ในกลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1, 0.5, 10, 25, 50 และ 100 μg/kg มีผลการกินได้ที่น้อยกว่าปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม ปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1 μg/kg มีการกินได้ที่ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสลิดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ และปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 ที่ระดับ 5 μg/kg มีการกินได้ที่ไม่แตกต่างจากปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงทำให้ทราบว่าการฉีด HS024 ในระดับที่สูงเกินไปจะมีผลทำให้ปลาสลิดมีการกินได้ที่น้อยลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกระดับการฉีด MC4R antagonist คือ 1 μg/kg และ 3 μg/kg เพื่อศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของ MC4R ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิดโดยมีการแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

Treatment ที่ 1 ปลาสลิดที่ไม่ได้รับการฉีดน้ำเกลือ และ HS024

Treatment ที่ 2 ฉีด HS024 ที่ระดับ 0 μg/kg-fish (ฉีดน้ำเกลือ 0.9%)

Treatment ที่ 3 ฉีด HS024 ที่ระดับ 1 μg/kg-fish

Treatment ที่ 4 ฉีด HS024 ที่ระดับ 3 μg/kg-fish

การทดลองนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลองเพียง 1 ปัจจัย คือ ระดับการใช้ MC4R antagonist (HS024) ซึ่งมีทั้งหมด 4 ระดับ โดยแต่ละระดับการฉีด HS024 ใช้หน่วยทดลอง 9 ซ้ำ ทำการสุ่มปลาลงในตู้ปลาขนาด 60x30x45 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 7 ตัว มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และทำการเก็บข้อมูลการกินได้ของปลาสลิด

การกินได้ = น้ำหนักอาหารเริ่มต้น–น้ำหนักอาหารที่เหลือ

3.6.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 10 ซึ่งวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's multiple range test และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ ($P<0.05$)

3.6.2 การศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

3.6.2.1 การศึกษาผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออก mRNA ของยีน *TpMC4R*

ทำการศึกษาผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ดังนี้

Treatment ที่ 1 ปลาสลิดที่ไม่ได้รับการฉีดน้ำเกลือ และ HS024

Treatment ที่ 2 ฉีด HS024 ที่ระดับ 0 µg/kg-fish (ฉีดน้ำเกลือ 0.9%)

Treatment ที่ 3 ฉีด HS024 ที่ระดับ 1 µg/kg-fish

Treatment ที่ 4 ฉีด HS024 ที่ระดับ 3 µg/kg-fish

การทดลองนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลองเพียง 1 ปัจจัย คือ ระดับการใช้ MC4R antagonist (HS024) ซึ่งมีทั้งหมด 4 ระดับ โดยแต่ละระดับการฉีด HS024 ใช้หน่วยทดลอง 6 ซ้ำ ทำการสุ่มปลาลงในตู้ปลาขนาด 30x60x45 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 10 ตัว การให้อาหารปลาสลิดให้วันละสองมื้อ โดยมื้อเช้าจะให้เวลา 10.00 น. และมื้อเย็นให้เวลา 16.00 น. ซึ่งในการให้อาหารและการกินอาหารของปลาสลิดในแต่ละมื้อใช้เวลาประมาณ 30 นาที อาหารที่ให้ปลาสลิดเป็นอาหารสำเร็จรูป (มีโปรตีนประมาณ 40%, ไขมัน 6%) ทำการเลี้ยงในตู้ปลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้ปลาสลิดปรับสภาพให้เข้ากับช่วงแสงและการกินอาหารสำเร็จรูป

การฉีด MC4R antagonist (HS024)

ทำการฉีด HS024 บริเวณโคนครีบหลังของปลาสลิด ในระดับต่าง ๆ ตามกลุ่มการทดลองที่จัดไว้ (โดย HS024 ละลายในน้ำเกลือ 0.9% ที่ความเข้มข้น 5 nmol/µl) หลังจากการฉีด HS024 เป็นเวลา 4 , 8 และ 12 ชั่วโมง ทำการเก็บสมองของปลาสลิดในแต่ละช่วงเวลาเนื่องจากสมองเป็นบริเวณที่มีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* มากที่สุด นำปลาสลิดจากตู้ปลาที่เตรียมไว้จำนวน 6 ตัว ต่อการเก็บตัวอย่างสมองหนึ่งช่วงเวลา มาทำการวางยาสลบด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บเนื้อเยื่อสมอง หลังจากนั้นนำไปสกัด total RNA วัดความเข้มข้นเพื่อนำไปสังเคราะห์

first stand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription system kit และนำไปหาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค real time RT-PCR เช่นเดียวกับการหาปริมาณการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ

3.6.2.2 การศึกษาผลของการแช่ (incubate) สมองในสาร MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

โดยทดลองระดับความเข้มข้นของ MC4R antagonist (HS024) ดังนี้

Treatment ที่ 1 สมองปลาสลิดที่แช่ใน buffer (Holtfreter's solution)

Treatment ที่ 2 สมองปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 0.1 nmol

Treatment ที่ 3 สมองปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 1 nmol

Treatment ที่ 4 สมองปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 10 nmol

(หมายเหตุ : ระดับความเข้มข้นของ HS024 ถูกเจือจางด้วย Holtfreter's solution buffer)

การทดลองนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลองเพียง 1 ปัจจัย คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่แช่สมองปลาสลิดมีทั้งหมด 4 ระดับ โดยแต่ละระดับความเข้มข้นของสารละลายใช้หน่วยทดลอง 6 ซ้ำ ทำการสุ่มปลาลงในตู้ปลาขนาด 30x60x45 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ10 ตัว การให้อาหารปลาสลิดให้วันละสองมื้อ โดยมื้อเช้าจะให้เวลา 10.00 น. และมื้อเย็นให้เวลา 16.00 น. ซึ่งในการให้อาหารและการกินอาหารของปลาสลิดในแต่ละมื้อใช้เวลาประมาณ 30 นาที อาหารที่ให้ปลาสลิดเป็นอาหารสำเร็จรูป (มีโปรตีนประมาณ 40%, ไขมัน 6%) ทำการเลี้ยงในตู้ปลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้ปลาสลิดปรับสภาพให้เข้ากับช่วงแสงและการกินอาหารสำเร็จรูป

การเก็บตัวอย่างสมอง

นำปลาสลิดจากตู้ปลาที่เตรียมไว้ จำนวน 6 ตัว ต่อการเก็บหนึ่งช่วงเวลา มาทำการวางยาสลบด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บเนื้อเยื่อสมอง หลังจากนั้นนำสมองปลาสลิดไปแช่ในสารละลาย Holtfreter's solution และ HS024 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีระยะเวลาในการแช่ คือ 2 และ 4 ชั่วโมง เมื่อครบตามช่วงเวลาจึงทำการเก็บสมองของปลาสลิดในแต่ละช่วงเวลา หลังจากนั้นนำไปสกัด total RNA วัดความเข้มข้นเพื่อนำไปสังเคราะห์ first stand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription system kit และนำไปหาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค real time RT-PCR เช่นเดียวกับการหาปริมาณการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ

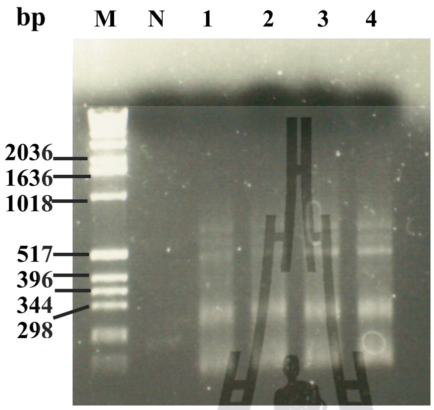
บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 แผนการดำเนินงานที่ 1 การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* และการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนและในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด

4.1.1 การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ ของยีน *TpMC4R* ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) amplification

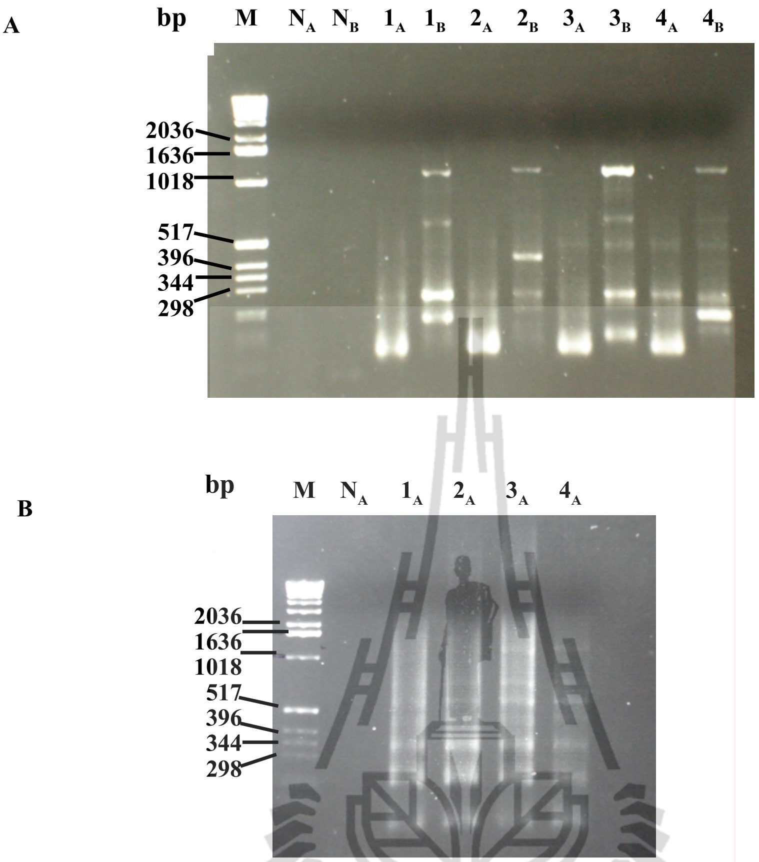
การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ จากสมองของปลาสลิด โดยวิธี nested PCR ในการทำ primary PCR ใช้ primer forward MC4R-F1 คู่กับ primer reverse UPM-L ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification) มีขนาดประมาณ 1211 bp ซึ่งยังไม่สามารถเห็นหรือจำแนกได้ว่าเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่ (ดังภาพที่ 4.1) ดังนั้นจึงทำ second PCR โดยใช้ผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ primary PCR (PCR product) มาทำการเจือจาง (dilute) ในอัตราส่วน 1 : 50 เท่า ซึ่งในการทำ second PCR มีการแบ่งเป็น 2 ชุด ซึ่งมีใช้ primer 2 คู่ คือ primer forward MC4R-F2 คู่กับ primer reverse NUP มีขนาดประมาณ 1181 bp และ primer forward MC4R-F3 คู่กับ primer reverse NUP มีขนาดประมาณ 1116 bp ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification) พบว่าผลของการทำ PCR โดยใช้ primer forward MC4R-F3 คู่กับ primer reverse NUP มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอปรากฏขึ้นซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้ซึ่งมีขนาดประมาณ 1116 bp ส่วนผลของการทำ PCR โดยใช้ primer forward MC4R-F2 คู่กับ primer reverse NUP นั้นไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ (ดังภาพที่ 4.2A) ดังนั้นจึงทำ PCR โดยใช้ primer forward MC4R-F2 คู่กับ primer reverse NUP ใหม่อีกครั้ง พบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอปรากฏขึ้นซึ่งมีขนาดประมาณ 1181 bp แต่ลักษณะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีลักษณะจาง (ดังภาพที่ 4.2B) ซึ่งอาจเกิดจากความสามารถของ primer forward MC4R-F2 ในการจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (template) และอุณหภูมิ annealing อาจไม่เหมาะสม เนื่องจาก primer forward MC4R-F2 มีค่า Tm เท่ากับ 61°C แต่ในการทำ PCR มีการใช้อุณหภูมิ annealing 55°C ดังนั้นจึงอาจทำให้ความสามารถในการทำงานของ primer forward MC4R-F2 ลดลง หลังจากนั้นนำ PCR product จากการทำ second PCR ของการใช้ primer ทั้งสองคู่มาทำการตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel โดยทำการย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องด้วยแสงอัตราไวโอเลตภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัตราไวโอเลต และ

ทำการตัดเจลบริเวณที่คาดการณ์ว่าเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ทั้งหมด 3 ชิ้น (ดังภาพที่ 4.3A) หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล ดังแสดงในภาพที่ 4.3B



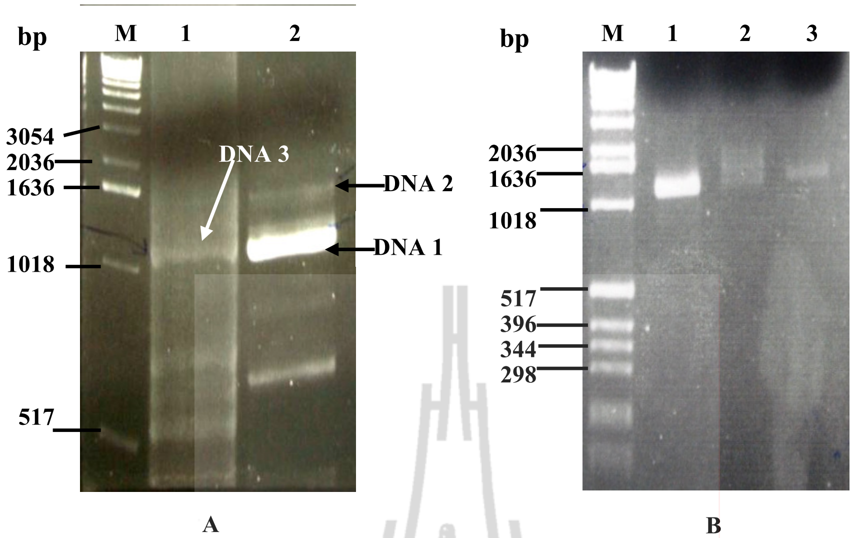
ภาพที่ 4.1 ผลของ Primary PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ ด้วยวิธี RACE

หมายเหตุ : M = DNA marker, N= negative control, 1 และ 2 = cDNA ที่ได้จากสมองปลาสลิดตัวที่ 1, 3 และ 4 = cDNA ที่ได้จากสมองปลาสลิดตัวที่ 2



ภาพที่ 4.2 ผลของ Second PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3' ด้วยวิธี RACE

หมายเหตุ : M = DNA marker, A = ทำ PCR โดยใช้ primer forward MC4R-F2 คู่กับ primer reverse NUP (N_A= negative control, 1_A = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 1 จาก 1^{st} round, 2_A = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 2 จาก 1^{st} round, 3_A = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 3 จาก 1^{st} round, 4_A = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 4 จาก 1^{st} round) และ B = ทำPCR โดยใช้ primer forward MC4R-F3 คู่กับ primer reverse NUP (N_B= negative control, 1_B = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 1 จาก 1^{st}round, 2_B = dilute 1 : 50 เท่าของPCR product 2 จาก 1^{st} round, 3_B = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 3 จาก 1^{st} round, 4_B = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 4 จาก 1^{st} round)



ภาพที่ 4.3 ผลการแยกขนาดและการทำให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของ second PCR

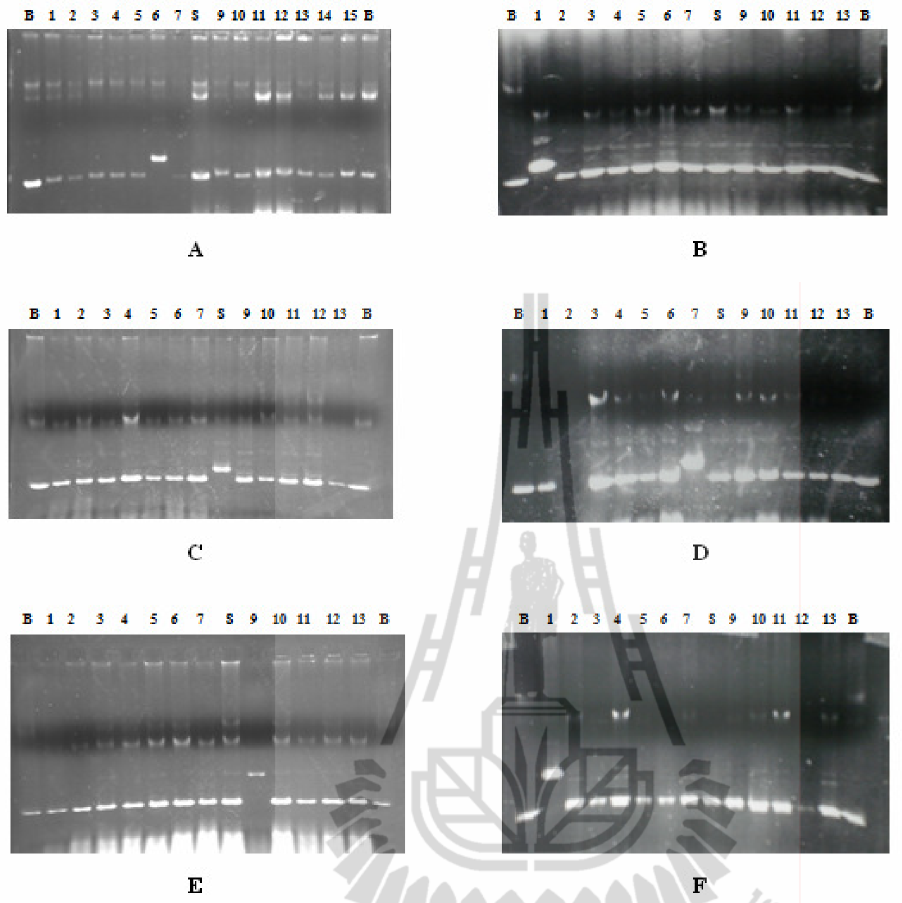
ภาพ A ผลการแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟริซิสเจลเพื่อทำการตัดเจล

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 = ดีเอ็นเอจาก PCR product 3_A และ 4_A, หมายเลข 2 = ดีเอ็นเอจาก PCR product 3_B

ภาพ B ผลการทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่ 1 (DNA 1), หมายเลข 2 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่ 2 (DNA 2), หมายเลข 3 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่ 3 (DNA 3)

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมต่อ (ligation) เข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T easy ซึ่งเรียกว่า รีคอมบิแนนดีเอ็นเอ (recombinant DNA) จากนั้นเคลื่อนย้าย recombinant DNA เข้าสู่ *E. coli* ที่มีคุณสมบัติเป็น competent cell หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective media ซึ่งจะทำให้สามารถคัดโคโลนีที่ต้องการได้ ซึ่งโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มี recombinant DNA จะเป็นโคโลนีสีฟ้า ส่วนโคโลนีสีขาวแสดงว่าเซลล์แบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่มี recombinant DNA และทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่ไม่มี recombinant DNA 1-2 โคโลนี เพื่อนำมาทำเป็นโคโลนีเปรียบเทียบกับโคโลนีที่พลาสมิดมี recombinant DNA และคัดเลือกโคโลนีที่คาดการณ์ว่าเป็นพลาสมิดที่มี recombinant DNA มาทำเป็น plate ต้นฉบับไว้ (master plate) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบหาพลาสมิดที่มี recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking) พบว่าโคโลนีที่พลาสมิดมี recombinant DNA จะมีชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่าโคโลนีที่พลาสมิดไม่มี recombinant DNA (ดังภาพที่ 4.4) ซึ่งพบว่าโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 1 มีทั้งหมด 6 โคลน (แสดงผลบางส่วน) (ดังภาพที่ 4.4A, 4.4B, 4.4C และ 4.4D) โคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 2 มีทั้งหมด 2 โคลน (ดังภาพที่ 4.4E และ 4.4F) และไม่พบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 3



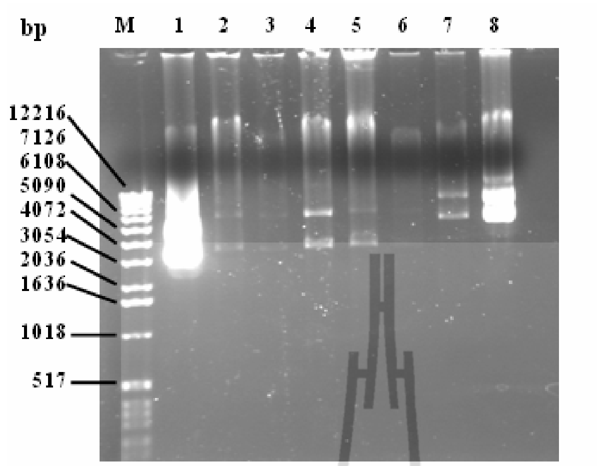
ภาพที่ 4.4 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking)

ภาพ A, B, C และ D คือ การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ชิ้นที่ 1

ภาพ E และ F คือ การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 2

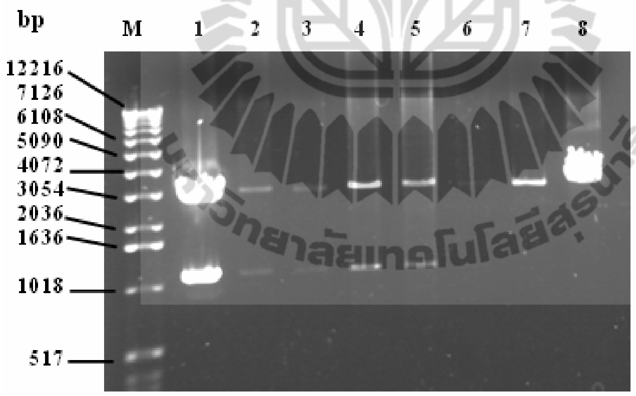
หมายเหตุ : B = โคโลนีสีฟ้า (blue colony), หมายเลข 1 ถึง 15 = โคโลนีสีขาว (white colony)

หลังจากนั้นนำโคโลนีของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นส่วนที่ 1 และ 2 ไปทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด recombinant DNA จากนั้นจึงนำไปสกัดพลาสมิดและนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis ซึ่งพบว่าพลาสมิดที่สกัดมาได้มีทั้งในส่วนที่เป็นลักษณะคลายเป็นเส้น (linear DNA) เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบน ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ล่างลงมาเป็นลักษณะขดเป็นวง (supercoiled DNA) (ดังภาพที่ 4.5) หลังจากนั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบพลาสมิดอีกครั้งว่าพลาสมิดมีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่ 1 และ 2 แน่นอนหรือไม่ โดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI* พบว่าพลาสมิดหมายเลข 1, 2, 3, 4 และ 5 ที่มี recombinant DNA ของชิ้นส่วนที่ 1 ซึ่งมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดประมาณ 3015 bp คือส่วนของเวคเตอร์ pGEM-T Easy และขนาดประมาณ 1116 bp คือส่วนของดีเอ็นเอที่คาดการณ์ว่าน่าจะเป็น ยีน TpMC4R ด้านปลาย 3’ (ดังภาพที่ 4.6) พลาสมิดหมายเลข 6 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดพลาสมิดมีความเข้มข้นน้อยดังนั้นจึงไม่สามารถเห็นผลได้ชัดเจน ส่วนพลาสมิดหมายเลข 7 และ 8 ที่มี recombinant DNAของชิ้นส่วนที่ 2 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวคือ ส่วนของเวคเตอร์ pGEM-T Easy ซึ่งมีขนาดประมาณ 3015 bp ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพลาสมิดหมายเลข 7 และ 8 นั้นไม่ได้มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA



ภาพที่ 4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3' ที่มีการเชื่อมต่อเวคเตอร์

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 6 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่ 1 และหมายเลข 7 และ 8 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่ 2



ภาพที่ 4.6 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มี cDNA ของยีน *TpMC4R* โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI*

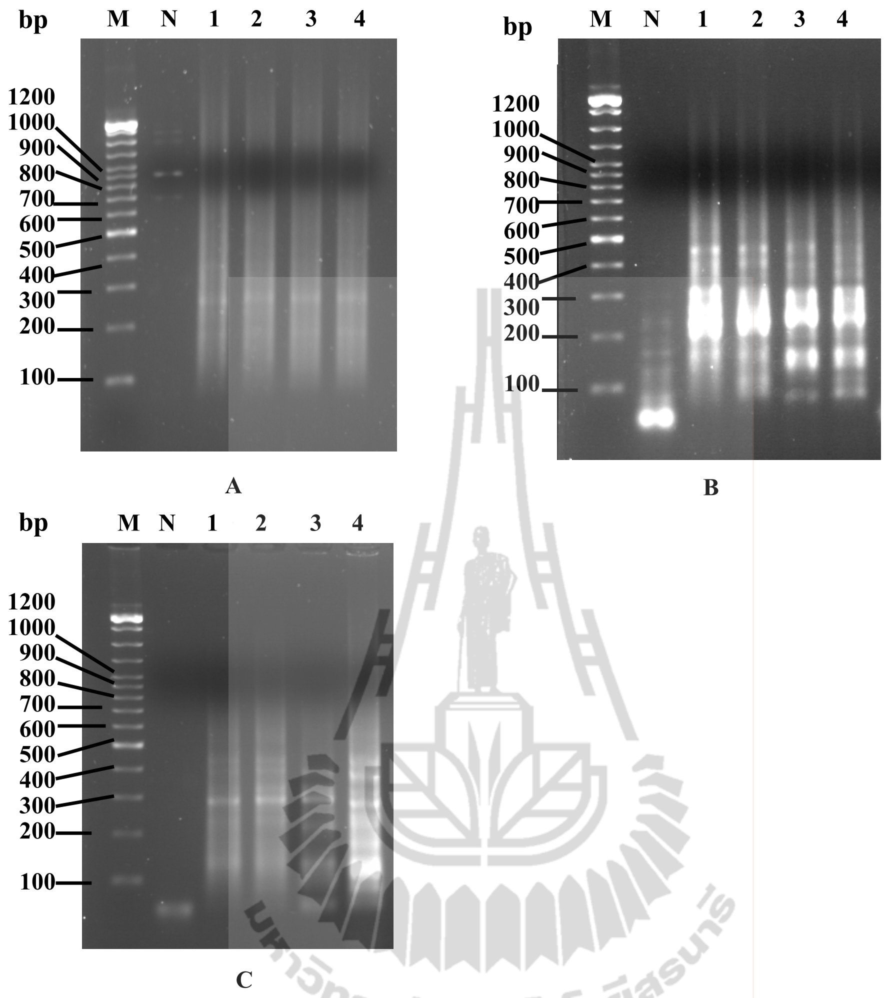
หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 6 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่ 1 และหมายเลข 7 และ 8 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่ 2

เมื่อทำการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดแล้ว จึงทำการส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ซึ่งพบว่ามีเพียงพลาสมิด 3 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่สมบูรณ์ ส่วนในพลาสมิดที่ 3, 5 และ 6 นั้นไม่สามารถทราบผลที่แน่นอนเนื่องจากไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ซึ่งอาจหมายถึงว่าตัวอย่างพลาสมิดดังกล่าวอาจมีการปนเปื้อนหรือมีความบริสุทธิ์น้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ พลาสมิดที่ 7 และ 8 เป็นพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนอื่น ๆ หลังจากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดในแต่ละโคลนโดยขั้นแรกเปรียบเทียบระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่มีการอ่านจากด้าน T7 promotor ไปยังด้าน SP6 promotor และด้าน SP6 promotor ไปยังด้าน T7 promotor โดยด้านนี้จะต้องมีการทำเป็น complementary ก่อน หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบความเหมือน (homology) ระหว่างทั้งสองด้าน เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละโคลนแล้ว จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดในแต่ละโคลนมาเปรียบเทียบกัน หลังจากนั้นทำการสรุปลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโน (ดังภาพที่ 4.7) และเมื่อสามารถสรุปลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน จึงทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ปลาและสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นการยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเป็นยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’

```
        10        20        30        40        50        60
ATGTACTTTTTCATCTGCAGCCTGGCGGTCGCCGACATGCTGGTGAGCGTCTCAAATGCC
M  Y  F  F  I  C  S  L  A  V  A  D  M  L  V  S  V  S  N  A
        70        80        90       100       110       120
TCTGAGACCATTGTCATCGAGCTCATCAATGGAGGCACGCTGAGCATCCCCATCACACTC
S  E  T  I  V  I  E  L  I  N  G  G  T  L  S  I  P  I  T  L
       130       140       150       160       170       180
ATCAAGAGCATGGACAACGTGTTCGACTCCATGATCTGCAGCTCTCTGCTGGCCTCCATC
I  K  S  M  D  N  V  F  D  S  M  I  C  S  S  L  L  A  S  I
       190       200       210       220       230       240
TGCAGCTTGCTGGCTATCGCTGTGGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCGCTGCGTTAC
C  S  L  L  A  I  A  V  D  R  Y  I  T  I  F  Y  A  L  R  Y
       250       260       270       280       290       300
CACAACATCGTGACGTTGCGCAGGGCCACGCTGGTCATCAGCACCATCTGGACGTGCTGC
H  N  I  V  T  L  R  R  A  T  L  V  I  S  T  I  W  T  C  C
       310       320       330       340       350       360
ACGGTGTCCGGCATCCTCTTCATCATCTACTCGGAGAGCACCACGGTGCTCATCTGCCTC
T  V  S  G  I  L  F  I  I  Y  S  E  S  T  T  V  L  I  C  L
       370       380       390       400       410       420
ATTACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGCGTCGCTCTACGTGCACATGTTCCTG
I  T  M  F  F  T  M  L  V  L  M  A  S  L  Y  V  H  M  F  L
       430       440       450       460       470       480
CTGGCGCGCCTGCACATGAAGCGGATCGCAGCGCTGCCGGGCAACGCGCCCATCCAGCAG
L  A  R  L  H  M  K  R  I  A  A  L  P  G  N  A  P  I  Q  Q
       490       500       510       520       530       540
CGCGCCAACATGAAGGGCGCCATCACCCTCACCATCCTGCTCGGGGTGTTCGTGGTGTGC
R  A  N  M  K  G  A  I  T  L  T  I  L  L  G  V  F  V  V  C
       550       560       570       580       590       600
TGGGCGCCGTTCTTCCTCCACCTCATCCTGATGATCACCTGCCCCCGGAACCCCTACTGC
W  A  P  F  F  L  H  L  I  L  M  I  T  C  P  R  N  P  Y  C
       610       620       630       640       650       660
ACCTGCTTCATGTCCCACTTCAACATGTACCTGATCCTCATCATGTGCAACTCCATCATC
T  C  F  M  S  H  F  N  M  Y  L  I  L  I  M  C  N  S  I  I
       670       680       690       700       710       720
GACCCCATCATTTACGCCTTTCGCAGCCAGGAGATGCGGAAAACCTTCAAGGAGTTTTTT
D  P  I  I  Y  A  F  R  S  Q  E  M  R  K  T  F  K  E  F  F
       730       740       750       760       770       780
TGCTGCTCGCAGCCTCTCCTGTGCGTCTGAGTTTGTGTTTGAGTAATTTAAACCGCGG
C  C  S  Q  P  L  L  C  V  *
       790       800       810       820       830       840
GTCACACTGTACTATTTAAGTGAAACCTGGTCAACAGGGAGTTTCAGAACTCTCATCACT
       850       860       870       880       890       900
GTGGACAGATGTGGTTCTGTTGTGCTCCCTTGCTGGGCTGTAAAACTCTTAATGATGTAG
       910       920       930       940       950       960
GCGCCTGCCTCGGGTTTTGTAAAGACGTAGCTTTGTGATCACCGTGTATCACAGAGCATC
       970       980       990      1000      1010      1020
ACCGTGGAGACGAACGCAGCTTTTGTTTGTTCAGTGAAGCTTGTTGAAATGCAACTTAAG
      1030      1040      1050      1060
TAAATGTCGCCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

ภาพที่ 4.7 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’

ในการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ จากสมองของปลาสลิด ต้องมีการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ หลังจากนั้นจึงทำการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ จาก first strand cDNA 5’ RACE ด้วยเทคนิค nested PCR ในการทำ primary PCR ใช้ primer forward UPM-L คู่กับ primer reverse MC4R-R1 ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification) มีขนาดประมาณ 718 bp ซึ่งยังไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่เนื่องจากดีเอ็นเอมีลักษณะเสมียร์ (smear) (ดังภาพที่ 4.8A) ดังนั้นจึงทำ second PCR โดยใช้ PCR product จากการทำ primary PCR มาทำการ dilute ในอัตราส่วน 1 : 50 เท่า และใช้ primer forward UPM-S คู่กับ primer reverse MC4R-R2 มีขนาดประมาณ 557 bp ซึ่งยังไม่สามารถเห็นหรือจำแนกได้ว่าเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่ (ดังภาพที่ 4.8B) ดังนั้นจึงทำ third PCR โดยใช้ PCR product จากการทำ second PCR มาทำการ dilute ในอัตราส่วน 1 : 50 เท่า และใช้ primer forward NUP คู่กับ primer reverse MC4R-R3 มีขนาดประมาณ 394 bp หลังจากการทำ PCR พบว่า PCR product มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับกับที่คาดการณ์ไว้ 2 ชิ้นส่วน ซึ่งมีขนาดประมาณ 400 bp และ 450 bp (ดังภาพที่ 4.8C) ดังนั้นจึงนำ PCR product มาโหลดลงในหลุมเจล (well) หลังจากนั้นทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอตามที่คาดการณ์ไว้ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ทำการตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต หลังจากที่ตรวจดูขนาดของดีเอ็นเอแล้วจึงทำการตัดเจลบริเวณที่คาดการณ์ว่าเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ทั้งหมด 2 ชิ้น (ดังภาพที่ 4.9A) หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล ดังแสดงในภาพที่ 4.9B



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.8 การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ด้วยวิธี RACE

ภาพ A ผลของ Primary PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ โดยใช้ primer forward UPM-L คู่กับ primer reverse MC4R-R1

หมายเหตุ : M = DNA marker, N= negative control, 1 และ 2 = cDNA ที่ได้จากสมองปลาสลิดตัวที่ 1, 3 และ 4 = cDNA ที่ได้จากสมองปลาสลิดตัวที่ 2

ภาพ B ผลของ Second PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ โดยใช้ primer UPM-S คู่กับ primer MC4R-R2

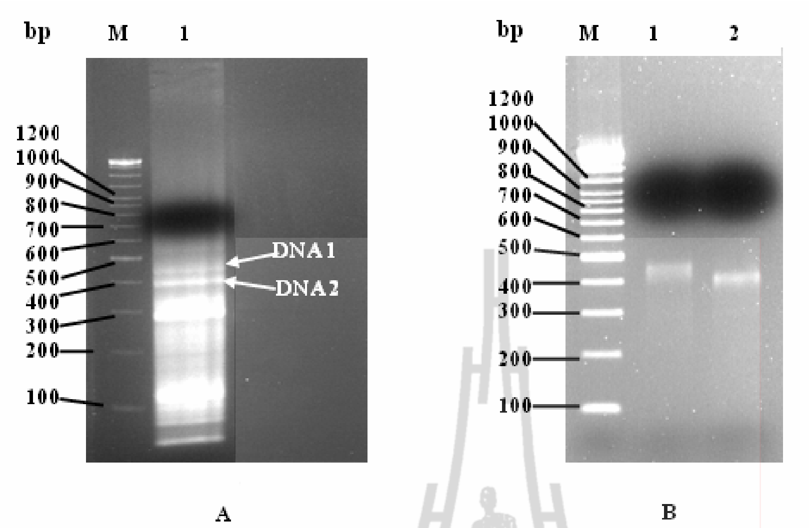
หมายเหตุ : M = DNA marker, N = negative control, 1 = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 1 จาก 1st round, 2 = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 2 จาก 1st round, 3 =

dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 3 จาก 1st round, 4 = dilute 1 :50 เท่าของ PCR product 4 จาก 1st round

ภาพ C ผล Third PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ โดยใช้ primer NUP คู่กับ primer MC4R-R3

หมายเหตุ : M = DNA marker, N = negative control, 1 = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 1 จาก 2ndround, 2 = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 2 จาก 2ndround, 3 = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 3 จาก 2ndround, 4 = dilute 1 : 50 เท่าของ PCR product 4 จาก 2ndround (ปริมาณสารหายครึ่งหนึ่งในขณะอยู่ในเครื่อง PCR)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.9 ผลการแยกขนาดและการทำให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของ Third PCR

ภาพ A ผลการแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟริซิสเจลเพื่อทำการตัดเจล

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 = ดีเอ็นเอจาก PCR product 1 และ 2 จาก Third PCR

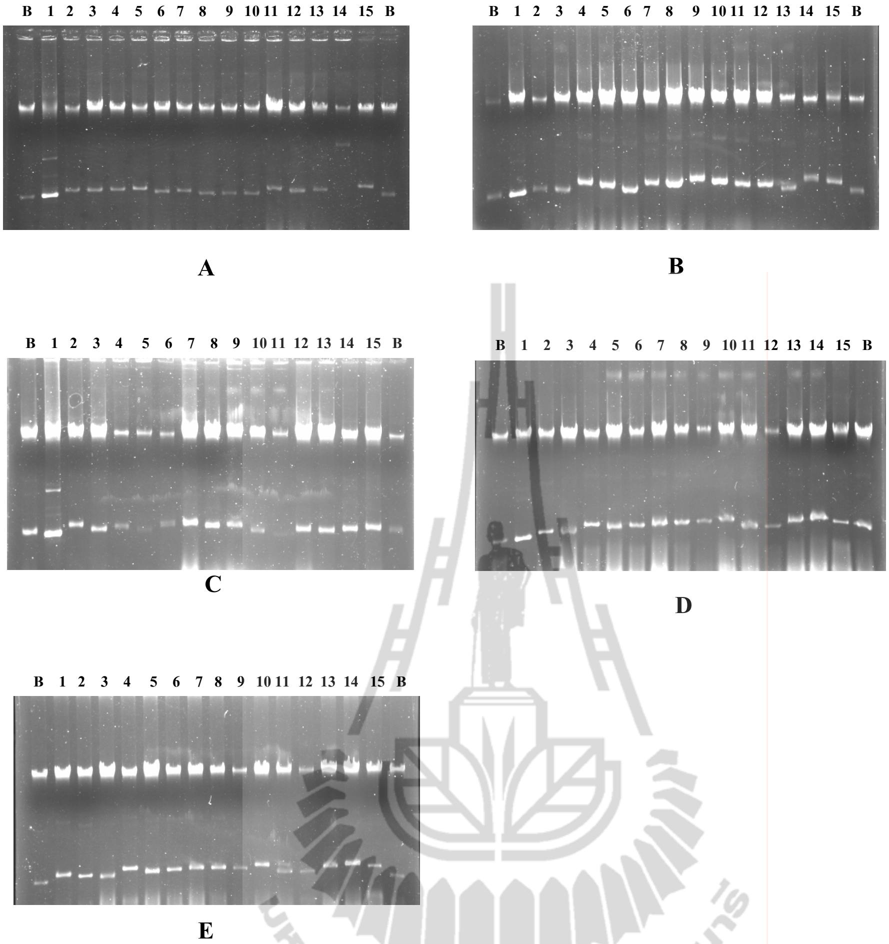
ภาพ B ผลการทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่ 1 (DNA 1), หมายเลข 2 = ดีเอ็นเอชิ้นชิ้นส่วนที่ 2 (DNA 2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมต่อ (ligation) เข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T easy ซึ่งจะได้ recombinant DNA 2 ชิ้น จากนั้นเคลื่อนย้าย recombinant DNA เข้าสู่ *E. coli* ที่มีคุณสมบัติเป็น competent cell และเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective media หลังจากนั้นทำการคัดโคโลนีที่มีพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ต้องการได้ คัดเลือกโคโลนีสีฟ้าซึ่งคาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่ไม่มี recombinant DNA 1-2 โคโลนี เพื่อนำมาทำเป็นโคโลนีเปรียบเทียบกับโคโลนีสีขาวซึ่งคาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่มี recombinant DNA และทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่มี recombinant DNA มาทำเป็น master plate หลังจากนั้นทำการตรวจสอบหาพลาสมิดที่มี recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking) พบว่าโคโลนีที่พลาสมิดมี recombinant DNA จะมีชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่าโคโลนีที่พลาสมิดไม่มี recombinant DNA (ดังภาพที่ 4.10) จากการตรวจสอบหาพลาสมิดที่มี recombinant DNA พบว่าโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 1 มีทั้งหมด 19 โคลน (ดังภาพที่ 4.10A และ 4.10B) และโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 2 มีทั้งหมด 27 โคลน (ดังภาพที่ 4.10C, 4.10D และ 4.10E)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



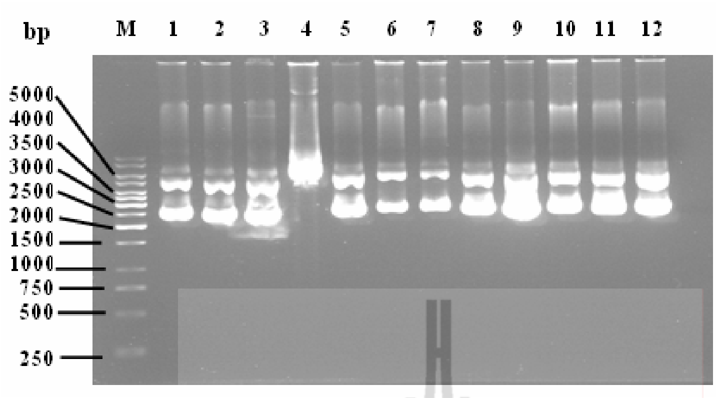
ภาพที่ 4.10 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking)

ภาพ A และ B คือ การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 1

ภาพ C, D และ E คือ การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 2

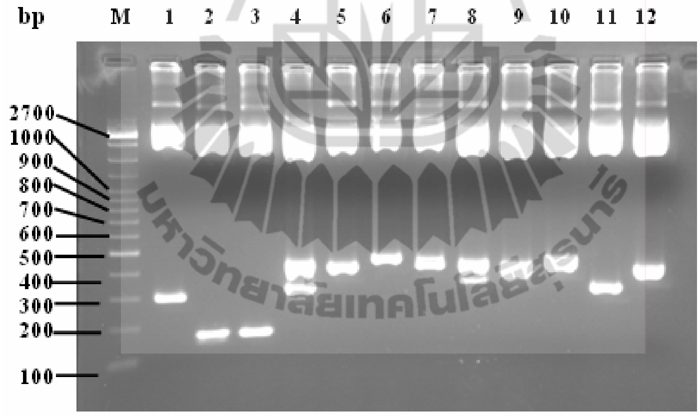
หมายเหตุ : B = โคโลนีสีฟ้า (blue colony), หมายเลข 1 ถึง 15 = โคโลนีสีขาว (white colony)

หลังจากนั้นทำการสุ่มโคโลนี *E. coli* ที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นส่วนที่ 1 จำนวน 7 โคลน และสุ่มโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นส่วนที่ 2 จำนวน 5 โคลน ไปทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT ที่มี ampicillin เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด recombinant DNA จากนั้นจึงนำไปสกัดพลาสมิดและทำการตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis ซึ่งพบว่าพลาสมิดที่สกัดมาได้มีทั้งในส่วนที่เป็นลักษณะคลายเป็นเส้น (linear DNA) เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบน ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ล่างลงมาเป็นลักษณะขดเป็นวง (supercoiled DNA) (ดังภาพที่ 4.11) หลังจากนั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบพลาสมิดอีกครั้งว่าพลาสมิดมีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่ 1 และ 2 แน่นอนหรือไม่ โดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *E.co RI* พบว่าพลาสมิดหมายเลข 1, 4, 5, 6 และ 7 ที่มี recombinant DNA ของชิ้นส่วนที่ 1 ซึ่งมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดประมาณ 3015 bp คือส่วนของเวคเตอร์ pGEM-T Easy และขนาดประมาณ 300-450 bp คือ ส่วนของดีเอ็นเอที่คาดการณ์ว่าน่าจะเป็น ยีน TpMC4R ด้าน 5'RACE ส่วนพลาสมิดมีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ที่ 2 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (ดังภาพที่ 4.12) ดังนั้นจึงทำการส่งตัวอย่างพลาสมิดที่มี recombinant DNA ที่ 1 ได้แก่ หมายเลข 1, 4, 5, 6 และ 7 และตัวอย่างพลาสมิดที่มี recombinant DNA ที่ 2 ได้แก่ หมายเลข 8, 9, 10, 11 และ 12 เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.11 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ที่มีการเชื่อมต่อเวคเตอร์

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 7 = พลาสมิดที่มี recombinant DNA ของชิ้นที่ 1 และหมายเลข 8 ถึง 12 = พลาสมิดที่มี recombinant DNA ชิ้นที่ 2



ภาพที่ 4.12 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มี cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI*

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 7 = พลาสมิดที่มี recombinant DNA ของชิ้นที่ 1 และหมายเลข 8 ถึง 12 = พลาสมิดที่มี recombinant DNA ชิ้นที่ 2

หลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าพลาสมิดเกือบทั้งหมดมีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ยกเว้นตัวอย่างพลาสมิดหมายเลข 1 ไม่สามารถทราบผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนหรือมีความบริสุทธิ์น้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ หลังจากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดในแต่ละโคลนโดยขั้นแรกเปรียบเทียบระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่มีการอ่านจากด้าน T7 promotor ไปยังด้าน SP6 promotor และด้าน SP6 promotor ไปยังด้าน T7 promotor โดยด้านนี้จะต้องมีการทำเป็น complementary ก่อน หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบความเหมือน (homology) ระหว่างทั้งสองด้าน เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละโคลนแล้ว จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดในแต่ละโคลนมาเปรียบเทียบกันและทำการสรุปลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3’ ที่มีความความยาวเท่ากับ 1060 bp มาเชื่อมต่อเข้ากับ cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5’ ที่มีความยาว 363 bp ดังนั้น cDNA ของยีน *TpMC4R* เส้นสมบูรณ์จึงมีความยาวเท่ากับ 1311 bp (ดังภาพที่ 4.13)

4.1.2 การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้างของ cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R*

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทป์ของ cDNA ของยีน *TpMC4R* เส้นสมบูรณ์ในปลาสลิดพบว่ามีความยาวเท่ากับ 1311 bp ประกอบไปด้วยส่วนของ open reading frame (ORF) 984 bp ซึ่งเมื่อทำการแปรรหัสเป็นกรดอะมิโนจะมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 327 residues และนอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยในส่วนของ 5’ untranslated region (UTR) มีนิวคลีโอไทป์เท่ากับ 17 bp และส่วนของ 3’ UTR มีนิวคลีโอไทป์เท่ากับ 310 bp (ดังภาพที่ 4.13) เมื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกัน (homology) ของลำดับกรดอะมิโน MC4R ระหว่างปลาสลิด, คน, ไก่ และปลาชนิดต่าง ๆ ซึ่งพบว่าลำดับกรดอะมิโน TpMC4R มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโน MC4R ของปลา Barfin flounder (*Verasper moseri*) 90%, ปลา European seabass (*Dicentrarchus labrax*) 90%, ปลา Fugu rubripes (*Takifugu rubripes*) 89%, ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 80%, ปลา Goldfish (*Carassius auratus*) 76%, ปลา Zebrafish (*Danio rerio*) 77%, ปลา Spiny dogfish (*Squalus acanthias*) 71%, ปลา European river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) 61%, ไก่ (*Gallus gallus*) 66% และคน (*Homo sapiens*) 67% ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนอยู่ในระดับที่สูงดังแสดงในตารางที่ 4.1 (ซึ่ง MC4R ของปลาสลิดจะใช้คำว่า TpMC4R) หลังจากนั้นทำการศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของลำดับกรดอะมิโน TpMC4R ซึ่งจะทำการทำนายตำแหน่ง seven transmembrane (TM) domain โดยใช้โปรแกรม Split 4.0 server (http://split.pmsft.hr/split/4/) ดังแสดงในภาพที่ 4.13 และ 4.14 และแสดงการเปรียบเทียบระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ใน

แต่ละ TM กับปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ในไก่ และคน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เมื่อพิจารณาโครงสร้างของกรดอะมิโนในส่วนของ ORF พบว่ากรดอะมิโนของ TpMC4R มีส่วนของ extracellular loop (ECL) จำนวน 3 loop และ intracellular loop (ICL) จำนวน 3 loop โดย ECL ที่ 1 มีกรดอะมิโน 30 residues มีตำแหน่งอยู่ที่กรดอะมิโนตัวที่ 97-126 ซึ่ง ECL ที่ 1 จะมี N-linked glycosylation site อยู่และเป็น ECL ที่ยาวที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ ECL ที่ 2 และ 3 ซึ่ง ECL ที่ 2 มีกรดอะมิโน 5 residues มีตำแหน่งอยู่ที่ 188-192 และ ECL ที่ 3 มีกรดอะมิโน 4 residues มีตำแหน่งอยู่ที่ 275-278 ส่วนของ ICL ที่ 1 มีกรดอะมิโน 4 residues มีตำแหน่งอยู่ที่ 188-192 ส่วน ICL ที่ 2 มีกรดอะมิโน 13 residues มีตำแหน่งอยู่ที่ 154-166 และในส่วน ICL ที่ 3 เป็นส่วนที่ยาวที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ ICL ที่ 1 และ ICL ที่ 2 ซึ่ง ICL ที่ 3 มีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 23 residues โดยอยู่ตรงตำแหน่งที่ 222-244 ลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ในส่วนของ N-terminal extracellular domain ของยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังแต่ละชนิดมีความเหมือนกันอยู่ในระดับต่ำ แต่ยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่จะมี N-linked glycosylation site อยู่ในตำแหน่งที่ 2 และ 15 เหมือนกัน โปรตีนของ TpMC4R มี cysteine 15 residues อยู่ในตำแหน่งที่ 40, 84, 131, 139, 177, 178, 197, 258, 272, 278, 280, 294, 319, 320 และ 326 แต่มี cysteine เพียง 10 residues ได้แก่ตำแหน่งที่ 84, 131, 178, 197, 258, 272, 278, 280, 319 และ 326 ที่โปรตีนของยีน MC4R ในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน มีความเหมือนกัน (ดังภาพที่ 4.14) นอกจากนี้โปรตีน TpMC4R ยังพบ protein kinase C of phosphorylation site อยู่ใน ICL ที่ 2 ตรงตำแหน่งที่ 163 และพบอยู่ในส่วนของ C-terminal domain ตรงตำแหน่งที่ 313 และโปรตีน TpMC4R มี PMY motif, DRY motif และ DPIIY (NPXXY) motif ในตำแหน่งเดียวกันกับ motif ดังกล่าวของโปรตีนยีน MC4R ในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน (ดังภาพที่ 4.14)

```
1     GCAACGAAGGAGGCATAATGAACACCACAGATCCAGTGGATTAAGCCCGGGCTACCACAACCGAAGCCAAACCACAGCCACG   83
1                       M  N  T  T  D  P  S  G  L  S  P  G  Y  H  N  R  S  Q  T  T  A  T   22

84    CTGCCCACTAACAAGGACCTCCCCTCTGAGGAGAAGGACTCGTCTGCAGGGTGTTACGGCCAGCTGCTGATCTCCACTGAGGTT   167
23    L  P  T  N  K  D  L  P  S  E  E  K  D  S  S  A  G  C  Y  G  Q  L  L  I  S  T  E  V   50
                                                                          TM1
168   TTCCTCACTCTGGGCATCGTCAGCCTGCTGGAGAACATCCTGGTTGTGGCTGCCATAGTGAAAAACAAGAACCTCCACTCTCCC   251
51    F  L  T  L  G  I  V  S  L  L  E  N  I  L  V  V  A  A  I  V  K  N  K  N  L  H  S  P   78
                                                                               TM2
252   ATGTACTTTTTCATCTGTAGCCTGGCGGTCGCCGACATGCTGGTGAGCGTCTCAAATGCCTCTGAGACCATTGTCATCGAGCTC   335
79    M  Y  F  F  I  C  S  L  A  V  A  D  M  L  V  S  V  S  N  A  S  E  T  I  V  I  E  L   106

336   ATCAATGGAGGCACGCTGAGCATCCCCATCACACTCATCAAGAGCATGGACAACGTGTTCGACTCCATGATCTGCAGCTCTCTG   419
107   I  N  G  G  T  L  S  I  P  I  T  L  I  K  S  M  D  N  V  F  D  S  M  I  C  S  S  L   134
                                                                          TM3
420   CTGGCCTCCATCTGCAGCTTGCTGGCTATCGCTGTGGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCGCTGCGTTACCACAACATCGTG   503
135   L  A  S  I  C  S  L  L  A  I  A  V  D  R  Y  I  T  I  F  Y  A  L  R  Y  H  N  I  V   162

504   ACGTTGCGCAGGGCCACGCTGGTCATCAGCACCATCTGGACGTGCTGCACGGTGTCCGGCATCCTCTTCATCATCTACTCGGAG   587
163   T  L  R  R  A  T  L  V  I  S  T  I  W  T  C  C  T  V  S  G  I  L  F  I  I  Y  S  E   190
                                       TM4
588   AGCACCACGGTGCTCATCTGCCTCATTACCATGTTCTTCACCATGCTGGTGCTCATGGCGTCGCTCTACGTGCACATGTTCCTG   671
191   S  T  T  V  L  I  C  L  I  T  M  F  F  T  M  L  V  L  M  A  S  L  Y  V  H  M  F  L   218
                                          TM5
672   CTGGCGCGCCTGCACATGAAGCGGATCGCAGCGCTGCCGGGCAACGCGCCCATCCAGCAGCGCGCCAACATGAAGGGCGCCATC   755
219   L  A  R  L  H  M  K  R  I  A  A  L  P  G  N  A  P  I  Q  Q  R  A  N  M  K  G  A  I   246
                                                                                  TM6
756   ACCCTCACCATCCTGCTCGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCGCCGTTCTTCCTCCACCTCATCCTGATGATCACCTGCCCCCGG   839
246   T  L  T  I  L  L  G  V  F  V  V  C  W  A  P  F  F  L  H  L  I  L  M  I  T  C  P  R   274

840   AACCCCTACTGCACCTGCTTCATGTCCCACTTCAACATGTACCTGATCCTCATCATGTGCAACTCCATCATCGATCCCATCATC   923
275   N  P  Y  C  T  C  F  M  S  H  F  N  M  Y  L  I  L  I  M  C  N  S  I  I  D  P  I  I   302
                                               TM7
924   TACGCCTTTCGCAGCCAGGAGATGCGGAAAACCTTCAAGGAGTTTTTCTGCTGCTCGCAGCCTCTCCTGTGCGTCTGAGTTTGT   1007
303   Y  A  F  R  S  Q  E  M  R  K  T  F  K  E  F  F  C  C  S  Q  P  L  L  C  V  *        327

1008  GTTTTGAGTAATTTAAACCCGCGGGTCACACTGTACTATTTAAGTGAAACCTGGTCAACAGGAGTTTCAGAACTCTCATCACT   1091
1092  GTGGACAGATGTGGTTCTGTTGTGCTCCCTTGCTGGCTGTAAAACTCTTAATGATGTAGGCGCCTGCCTCGGGTTTTGTAAAG   1175
1176  ACGTAGCTTTGTGATCACCGTGTATCACAGAGCATCACCGTGGAGACGAACGCAGCTTTTGTTTGTTCAGTGAAGCTTGTTGAA   1259
1260  ATGCAACTTAAGTAAATGTCGCCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                  1311
```

ภาพที่ 4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R

หมายเหตุ : กล่องสีเทา = Transmembrane (TM) domain โดยโปรแกรม Split 4.0 sever

(http : //split.pmsft.hr/split/4/),

กล่องสีดำ = N-linked glycosylation site

กล่องสีขาว = Protein kinase C of phosphorylation site

ตัวอักษรหนาและขีดเส้นใต้ = PMY motif, DRY motif และ DPIIY (NPXXY) motif

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่สมบูรณ์ และ Transmembrane (TM) domain ระหว่าง TpMC4R และ MC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน

Vertebrate species	Full-length	Transmembrane (TM) domain							References
		TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6	TM7	
Flounder	90	95	71	86	80	95	100	73	Kobayashi et al. (2008)
Seabass	90	91	100	100	85	100	96	91	Sanchez et al. (2009)
Fugu	89	95	76	62	80	100	92	87	Klovins et al. (2004)
Trout	80	95	71	65	61	95	88	83	Haitina et al. (2004)
Goldfish	76	92	71	62	57	90	88	83	Cerda-Reverter et al. (2003)
Zebrafish	77	96	71	62	57	90	88	83	Ringholm et al. (2002)
Dogfish	71	87	76	62	57	85	85	83	Ringholm et al. (2003)
Lamprey	61	71	71	66	38	95	92	63	Haitina et al. (2007)
Chicken	66	69	71	75	61	80	84	79	Takeuchi and Takahashi (1998)
Human	67	70	90	88	66	86	80	79	Tan et al. (2009)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

```
                                                         ▽                TM1
TpMC4R     -MNTTDP--SGLS-PGYH-NRSQTTATLPTNKDLPSE-EKDSSAG-CYGQLLISTEVFLTLGIVSLLENILVVAAIVKNKNLHS  77
Flounder   -MNTTEH--PGLS-QGFH-NWSQTA--SPLNEDFSAQ-DKDSSAG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLENILVVAAIIKNKNLHS  75
Seabass    -MNTTEA--HGLI-HGYH-NRSQTSGILPLNKDLSAE-EKDSSTG-CYEQLLISPEVFLTLGIVSLLENILVVAAIIKNKNLHS  77
Fugu       -MNATDP--PGRV-QDFS-NGSQTP-----ETDFPNE-EKESSTG-CYEQMLISTEVFLTLGIISLLENILVVAAIVKNKNLHS  72
Trout      MMNSTDH--QGLISVGYTRNLSTAGTLGTLNKDSEGVGIKDSSTG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLENILVIAAIIKNKNLHS  81
Goldfish   -MNTSHH--HGPH-HSYR-NHSQGA----LPVGKPDQGERGSTSG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLENILVIAAIIKNKNLHS  74
Zebrafish  -MNTSHH--HGLH-HSFR-NHSQGA----LPVGKPSHGDRGSASG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLENILVIAAIVKNKNLHS  74
Dogfish    -MNSSFH--HRLPETPQLRNHSVAR-----FASANGSRSDGFSSG-CYEQLWISTEVFLTLGIFSLLANILVIAAIVKNKNLHS  75
Lamprey    -MTFSAGGVGGVVNNHHHGANHQGG-----GNHSGHGNATGGGHGRPCEQVLIPIEVFLILGVISLLENILVITAILKNKNLHS  78
Chicken    -MNFTQH--RGTLQPLHFWNQS-NR----LHRGASEPSAKGHSSGGCYEQLFVSPEVFVTLGIISLLENVLVIVAIAKNKNLHS  76
Human      -MVNSTH--RGMHTSLHLWNRSSYR----RHSNASESLGKGYSDGGCYEQLFPEVFVTLGVISLLENILVIVAIAKAKNKNLHS  77
            *                                          *    *       *             *  *  *******

                  ▼   TM2                                         ▼  TM3 ▽
TpMC4R     PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIELINGGTLSIPITLIKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRYITIFYALRYHNI  161
Flounder   PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINGGNLTIPVTLIKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRYITIFYALRYHNI  159
Seabass    PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINGGKLTIPVQLIKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRYITIFYALRYHNI  161
Fugu       PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINSGTLTIPATLIKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRYITIFYALRYHNI  156
Trout      PMYLFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINGGNLTISGSLIKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAIDRYITIFYALRYHNI  165
Goldfish   PMYFFICSLAVADLLVSVSNASETVVMALITGGNLTYRESIIKNMDNIFDSMICSSLLASIWSLLAIAVDRYITIFYALRYHNI  158
Zebrafish  PMYFFICSLAVADLLVSVSNASETVVMALITGGNLTNRESIIKNMDNVFDSMICSSLLASIWSLLAIAVDRYITIFYALRYHNI  158
Dogfish    PMYFFICSLAVADMLVSVSNAWETIFIAMLKSRHLTAPENLIKNMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAIDRYITIFYALRYHNI  159
Lamprey    PMYYFICSLAVADMLVSVSNAWETIIMALLQNGSLAMQEDTLKQMDNIMDSMICTSVVASMCSLLAIAVDRYVTIFYALRYHNI  162
Chicken    PMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNN-TDTDAQSFTINIDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVDRYFTIFYALQYHNI  159
Human      PMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVIILLNS-TDTDAQSFTVNIDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVDRYFTIFYALQYHNI  160
           *** ********* ******  **                     **  ** ** *  **  *** ** *** ****** ****

                       TM4▽▼                  ▼        TM5
TpMC4R     VTLRRATLVISTIWTCCTVSGILFIIYSESTTVLICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIAALPGNAPIQQRANMKGA  245
Flounder   VTLRRAMLVITSIWTCCIVSGILFIIYSESTTVLICLITMFFTMLVLMVSLYVHMFLLARLHTKRIAALPGNAPILQRANMKGA  243
Seabass    GTLRRAMLVISSIWTCCIVSGILFIIYSESTTVLICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIAALPGNAPIHQRANMKGA  245
Fugu       VTLRRASLVISSIWTCCTVSGVLFIVYSESTTVLICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIAAMPGNAPIHQRANLKGA  240
Trout      VTVKRAMAVIACIWSCCVASGVLFIIYSESTTVLICLITMFFTMLALMASLYVHMFMLARLHIKRIAVLPGNVPIRQRANMKGA  249
Goldfish   MTQRRAGTIITCIWTLCTVSGVLFIVYSESTTVLICLISMFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIAALPGNGPIWQAANMKGA  242
Zebrafish  MTQRRAGTIITCIWTFCTVSGVLFIVYSESTTVLICLISMFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIAALPGNGPIWQAANMKGA  242
Dogfish    VTVRRALMIIAAIWAACTGSGILFIVYSESTAVIICLITMFFAMLALMASLYVHMFMLARLHVKRIAALPGNGAVRQAANMKGA  243
Lamprey    MTVRRAASIIGAIWGTCTLCGVIFIVYSDSTAVIICLITMFFTMLVLMASLYVHMFMLARLHAKRIAALPASGIIQHKTSMRGA  246
Chicken    MTVKRVGVIITCIWAACTVSGILFIIYSDSSVVIICLISMFFTMLILMASLYVHMFMMARMHIKKIAVLPGTGPIRQGANMKGA  243
Human      MTVKRVGIIISCIWAACTVSGILFIIYSDSSAVIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLMARLHIKRIAVLPGTGAIRQGANMKGA  244
            *  *    *  **  *   *  ** **  *  * **** *** ** ** *******  ** * * **  *            **

                   TM6 ▼             ▼     ▼ ▼      TM7 ▽                       ▼▽       ▼
TpMC4R     ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMITCPRNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSIIDPIIYAFRSQEMRKTFKEFFCC--SQPLLCV  327
Flounder   ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMITCPRNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFKEIFCC--SHALLCV  325
Seabass    ITLTILIGVFVVCWAPFFLHLILMITCPRNPYCTCFMSQFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFKEIFCC--SHALLCV  327
Fugu       ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMITCPKNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFKEIFCC--SQMLVCM  322
Trout      ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMISCPRNPYCACFMSHFNMYLILIMCNSVIDPLIYAFRSQEMRKTFKEIFCWY-SLPNLCV  332
Goldfish   ITITILLGVFVVCWAPFFLHLILMISCPRNPYCICFMSHFNMYLILIMCNSVIDPLIYAFRSQEMRKTFKEICCCWYGLASLCV  326
Zebrafish  ITITILLGVFVVCWAPFFLHLILMISCPRNPYCVCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPLIYAFRSQEMRKTFKEICCCWYGLASLCV  326
Dogfish    ITLTILLGVFVVCWAPFFMHLILMISCPQNPYCVCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPLIYAFRSQEMRKTFKEIICCY-SLPGLCD  326
Lamprey    ITLTILLGVFIVCWAPFFLHLILIVSCPRSPYCVCYMSHFNLYLVLIMLSSVIDPIIYAFRSHEMRHTFKEIVCCY-SGSLYCA  329
Chicken    ITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIFYISCPYNPYCVCFMSHFNFYLILIMCNSIIDPLIYAFRSQELRKTFKEIICCC-NLRGLCD  326
Human      ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLIFYISCPQNPYCVCFMSHFNLYLILIMCNSIIDPLIYALRSQELRKTFKEIICCY-PLGGLCD  327
           ** *** *** ******* ***    **  *** * ** ** ** ***  * *** *** ** * * ****  *        *

TpMC4R     ------- 327
Flounder   ------- 325
Seabass    ------- 327
Fugu       ------- 322
Trout      CELPGKY 339
Goldfish   ------- 326
Zebrafish  ------- 326
Dogfish    LTSEY-- 331
Lamprey    LPATWKY 336
Chicken    LPGKY-- 331
Human      LSSRY-- 332
```

ภาพที่ 4.14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง TpMC4R และMC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน

หมายเหตุ : การจัดเรียงเพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนใช้โปรแกรม Clustal W2 software

ดอกจัน = ลำดับกรดอะมิโนของยีน MC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน มีความเหมือนกัน

หัวลูกศรสีดำ = ความเหมือนกันของตำแหน่ง cysteine residues ในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ในไก่ และคน

หัวลูกศรสีขาว = ความเหมือนกันของตำแหน่ง cysteine residues ในสัตว์บางชนิด

กล่องสีเทา = Transmembrane (TM) domain โดยโปรแกรม Split 4.0 sever (http : //split.pmsft.hr/split/4/)

กล่องสีดำ = N-linked glycosylation site

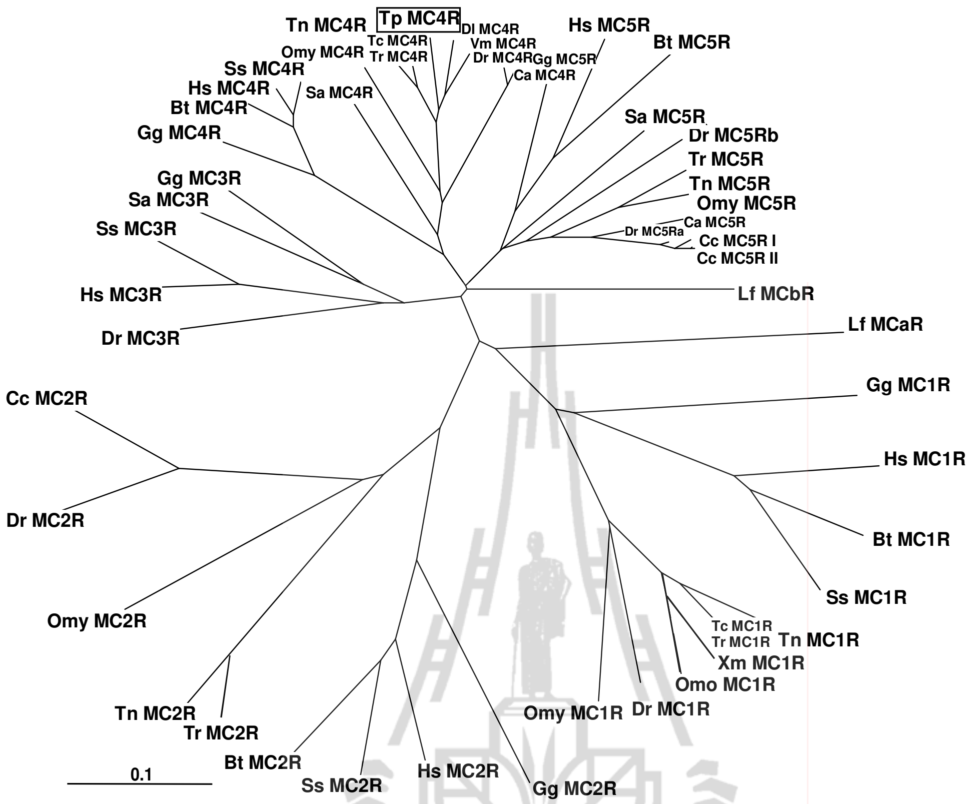
กล่องสีขาว = Protein kinase C of phosphorylation site

ตัวอักษรหนาและขีดเส้นใต้ = PMY motif, DRY motif และDPIIY (NPXXY) motif

ที่มา : Flounder (Kobayashi et al., 2008), Seabass (Sanchez et al., 2009), Fugu (Klovins et al., 2004), Trout (Haitina et al., 2004), Goldfish (Cerda-Reverter et al., 2003), Zebrafish (Ringholm et al., 2002), Dogfish (Ringholm et al., 2003), Lamprey (Haitina et al., 2007), Chicken (Takeuchi and Takahashi, 1998) และ Human (Tan et al., 2009)

4.1.3 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *MC4R* ของปลาสลิดและสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *TpMC4R* โดยการสร้าง phylogenetic tree ซึ่งทำการเปรียบเทียบระหว่างกรดอะมิโนของ TpMC4R กับกรดอะมิโนของ melanocortin receptor (MCR) ทั้ง 5 subtype ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบว่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกรดอะมิโน MCR ถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Malanocortin 1 receptor (MC1R) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Malanocortin 2 receptor (MC2R) กลุ่มที่ 3 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Malanocortin 3 receptor (MC3R) กลุ่มที่ 4 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Malanocortin 4 receptor (MC4R) และกลุ่มที่ 5 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Malanocortin 5 receptor (MC5R) ซึ่งกรดอะมิโนของ TpMC4R ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 4 ซึ่งเป็นการยืนยันว่า TpMC4R มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอยู่ในกลุ่มของยีน MC4R ร่วมกับ MC4R ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ (ดังภาพที่ 4.15) และผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน MC4R ระหว่างกรดอะมิโนของ TpMC4R ของปลาสลิดกับกรดอะมิโนของ MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบว่า TpMC4R มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับกรดอะมิโนของปลาโดยสังเกตเห็นจาก TpMC4R อยู่บนเส้นหรือแขนงเดียวกันกับ MC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ และนอกจากนี้ TpMC4R ยังมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสัตว์ปีกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ (ดังภาพที่ 4.16)

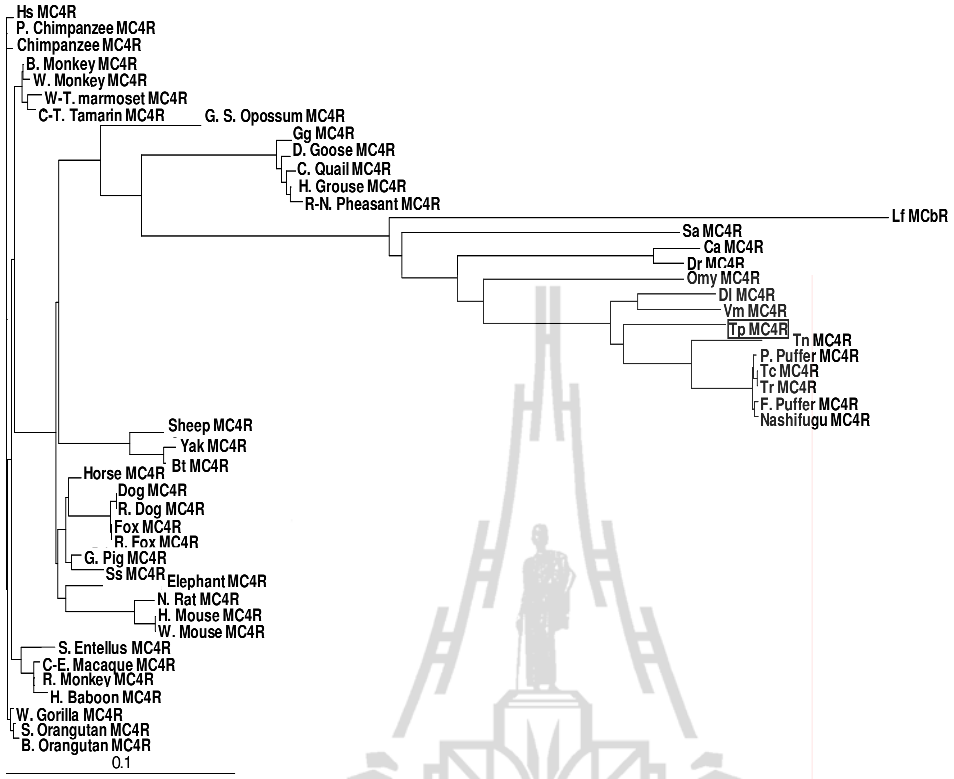


ภาพที่ 4.15 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin receptor ทั้ง 5 subtypes ของปลาสลิด และสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ โดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธีการของ Neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987)

หมายเหตุ : กรดอะมิโนของ MCR ทั้ง 5 subtype ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้ใน Genbank database ดังนี้ MC1Rs : Human (Hs MC1R) : AF 153431, Cattle (Bt MC1R) : AF 445641, Pig (Ss MC1R) : EU 604026, Chicken (Gg MC1R) : NM_001031462, Fugu rubripes (Tr MC1R) : AY 161854, Spotted green pufferfish (Tn MC1R) : AY 332238, Zebrafish (Dr MC1R) : AY 161847, Karasu (Tc MC1R) : AB 437784, Southern platyfish (Xm MC1R) : DQ 866828, Moszambique tilapia (Omo MC1R) : AJ 871147, Rainbow trout (Omy MC1R) : NM_001195178, MC2Rs : Human (Hs MC2R) : AY 225229, Cattle (Bt MC2R) : NM_174109, Chicken (Gg MC2R) : NM_001031515, Fugu rubripes (Tr MC2R) : AY 225229, Spotted green pufferfish (Tn MC2R) : AY 332239, Zebrafish (Dr MC2R) : AY 161848, Rainbow trout (Omy MC2R) : EU 119870, Common carp (Cc MC2R) : AJ

605725, MC3Rs : Human (Hs MC3R) : AY 227893, Pig (Ss MC3R) : FJ 185221, Chicken (Gg MC3R) : AB 017137, Zebrafish (Dr MC3R) : AY 161849, Spiny dogfish (Sa MC3R) : AY 560605, MC4Rs : Human (Hs MC4R) : EF 080880, Cattle (Bt MC4R) : NM_174110, Pig (Ss MC4R) : AB 021664, Chicken (Gg MC4R) : AY 545057, Fugu rubripes (Tr MC4R) : AY 161856, Spotted green pufferfish (Tn MC4R) : AY 332240, Zebrafish (Dr MC4R) : AY 161850, Karasu (Tc MC4R) : AB 073675, Rainbow trout (Omy MC4R) : AY 534915, Spiny dogfish (Sa MC4R) : AY 169401, European seabass (Dl MC4R) : FM 253127, Goldfish (Ca MC4R) : AJ 534337, Barfin flounder (Vm MC4R) : AB 287975, MC5Rs : Human (Hs MC5R) : EF 444993, Cattle (Bt MC5R) : NM_001015542, Chicken (Gg MC5R) : AB 012868, Fugu rubripes (Tr MC5R) : AY 161855, Spotted green pufferfish (Tn MC5R) : AY 332241, Zebrafish (Dr MC5Ra) : NM_173279, (Dr MC5Rb) : NM_173280, Rainbow trout (Omy MC5R) : AY 534916, Common carp (Cc MC5RI) : AJ 783917, (Cc MC5RII) : AJ 783918, Spiny dogfish (Sa MC5R) : AY 562212, Goldfish (Ca MC5R) : AJ 576322, European river lamprey (Lf MCaR) : DQ 213059, (Lf MCbR) : DQ 213060.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.16 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin 4 receptor ของปลาสลิดและสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ โดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธีการของ Neighbor-joining method (Saita to and Nei, 1987)

หมายเหตุ : กรดอะมิโนของ MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้ดังนี้ Human (Hs MC4R) : EF 080880, Cattle (Bt MC4R) : NM_174110, Pig (Ss MC4R) : AB 021664, Chicken (Gg MC4R) : AY 545057, Fugu rubripes (Tr MC4R) : AY 161856, Spotted green pufferfish (Tn MC4R) : AY 332240, Zebrafish (Dr MC4R) : AY 161850, Karasu (Tc MC4R) : AB 073675, Rainbow trout (Omy MC4R) : AY 534915, Spiny dogfish (Sa MC4R) : AY 169401, European seabass (Dl MC4R) : FM 253127, Goldfish (Ca MC4R) : AJ 534337, Barfin flounder (Vm MC4R) : AB 287975, Black howler monkey (B. Monkey MC4R) : FJ 373049, Domestic goose (D. Goose MC4R) : DQ 482582, White-bellied spider monkey (W. Monkey MC4R) : FJ 373048, Hazel grouse (H. Grouse MC4R) : EU 817502, Domestic yak (Yak MC4R) : HM 051376, White-tufted-ear marmoset (W.T.

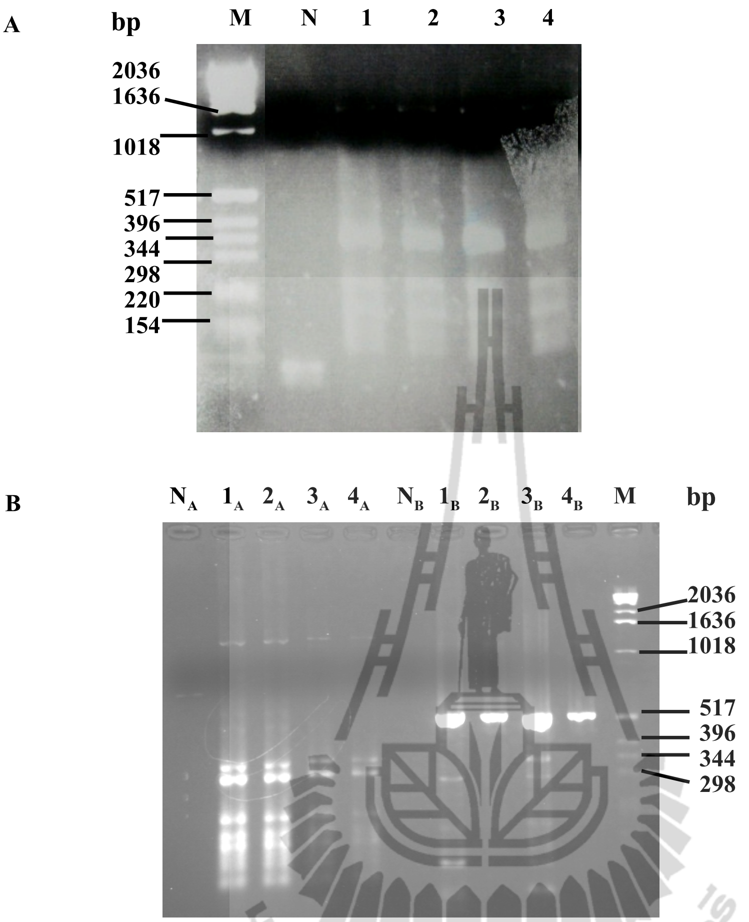
Marmoset MC4R) : FJ 373053, Dog (Dog MC4R) : DQ 084210, Domestic guinea pig (G. Pig MC4R) : EF 384234, Common quail (C. Quail MC4R) : GU 165835, Asiatic elephant (Elephant MC4R) : DQ 684863, Horse (Horse MC4R) : XM_001489656, Western Gorill (W. Gorilla MC4R) : FJ 373054, Crab-eating macaque (C-E. Macaque MC4R) : FJ 373055, Gray shorttailed opossum (G. S. Opossum MC4R) : EF 384264.1, House mouse (H. Mouse MC4R) : AY 684818, Western wild mouse (W. Mouse MC4R) : AY 684821, Raccoon dog (R. dog MC4R): EF 450124, Sheep (Sheep MC4R) : EU 622853, Pygmy chimpanzee (P. Chimpanzee MC4R) : FJ 373050, Chimpanzee (Chimpanzee MC4R) : FJ 373057, Ha madryas baboon (H. Baboon MC4R) : FJ 373056, Ring-necked pheasant (R-N. Pheasant MC4R) : EU 817503, Sumatran orangutan (S. Orangutan MC4R) : FJ 373047, Bornean orangutan (B. Orangutan MC4R) : FJ 373047, Norway rat (N. Rat MC4R) : NM_013099, Cotton-top tamarin (C-T. Tamarin MC4R) : FJ 373052, *Semnopithecus entellus* (S. entellus MC4R) : FJ 373051, Finepatterned puffer (F. puffer MC4R) : AB 073678, Purple puffer (P. puffer MC4R) : AB 073677, Nashifugu (Nashifugu MC4R) : AB 073676, Arctic fox (A. Fox MC4R) : EF 450125, Red fox (R. Fox MC4R) : DQ 663625, European river lamprey (Lf MCbR) : DQ 213060.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.1.4 การโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ในปลาสลิด

ในการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* จากสมองของปลาสลิด มีการโคลนทั้งในแบบวิธี 3’ RACE และแบบวิธี PCR โดยการใช้ gene specific primer ซึ่งจะต้องมีการรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β-*actin* ในปลาชนิดต่าง ๆ มา alignment เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR ในการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ด้วยวิธี 3’ RACE ซึ่ง primary PCR มีการใช้ primer forward Actin-F คู่กับ primer reverse UPM-L ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification) มีขนาดประมาณ 1265 bp ซึ่งยังไม่สามารถเห็นหรือจำแนกได้ชัดเจน (ดังภาพที่ 4.17A) ต่อมานำ PCR product จาก primary PCR มาทำการ dilute ในอัตราส่วน 1 : 50 เท่า เพื่อเป็น DNA template ในการทำ second PCR โดยมีการใช้ primer forward Actin-F คู่กับ primer reverse NUP มีขนาดประมาณ 1245 bp (ดังภาพที่ 4.17B) และสำหรับการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ gene specific primer (GSP) คือ primer forward Actin-F คู่กับ primer reverse Actin-R มีขนาดประมาณ 518 bp (ดังภาพที่ 4.17B) หลังจากนั้นนำ PCR product จากการทำ second PCR ของทั้ง 2 วิธี มาทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอตามที่คาดการณ์ไว้ด้วย Agarose gel electrophoresis และทำการตัดเจลบริเวณที่คาดการณ์ว่าเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน β-*actin* ทั้งหมด 3 ชิ้น (ดังภาพที่ 4.18A) หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 1 ที่มีขนาดประมาณ 1000 bp มีลักษณะค่อนข้างจางซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำ (ดังภาพที่ 4.18B) ดังนั้นจึงใช้เฉพาะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 2 ที่มีขนาดประมาณ 1000 bp และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 3 ที่มีขนาดประมาณ 500 bp ในการเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์เท่านั้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.17 ผลของ PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *β-actin*

ภาพ A ผลของ Primary PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *β-actin* ด้วยวิธี 3' RACE

หมายเหตุ : M = DNA marker, N= negative control, 1 และ 2 = cDNA จากสมองปลาสลิดตัวที่ 1, 3 และ 4 = cDNA ที่ได้จากสมองปลาสลิดตัวที่ 2

ภาพที่ B ผลการโคลน cDNA ของยีน *β-actin*

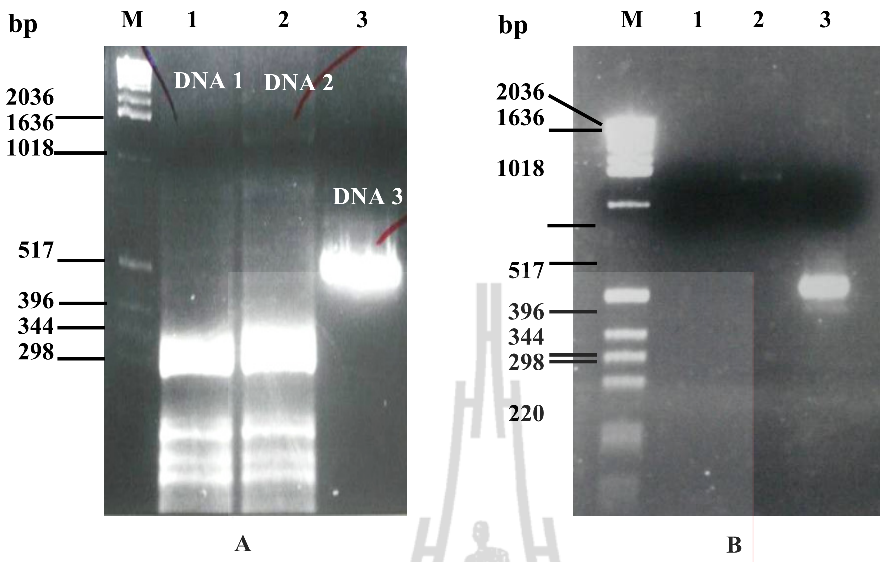
หมายเหตุ : M = DNA marker

A = ผลของ Second PCR ของการโคลน cDNA ของยีน *β-actin* ด้วยวิธี 3' RACE (N_A= negative control, 1_A = dilute 1 : 50 เท่า ของ PCR product 1 จาก 1^{st} round, 2_A = dilute 1 : 50 เท่า ของ PCR product 2 จาก 1^{st} round, 3_A = dilute 1 : 50 เท่า ของ PCR product 3 จาก 1^{st} round, 4_A = dilute 1 : 50

เท่า ของ PCR product 4 จาก 1st round)

B = ผลการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ gene specific primer (N_B= negative control, 1_B และ 2_B = cDNA ที่ได้จากสมองปลาสลิดตัวที่ 1, 3_B และ 4_B =3 และ 4 = cDNA ที่ได้จากสมองปลาสลิดตัวที่ 2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.18 ผลการแยกขนาดและการทำให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของ second PCR

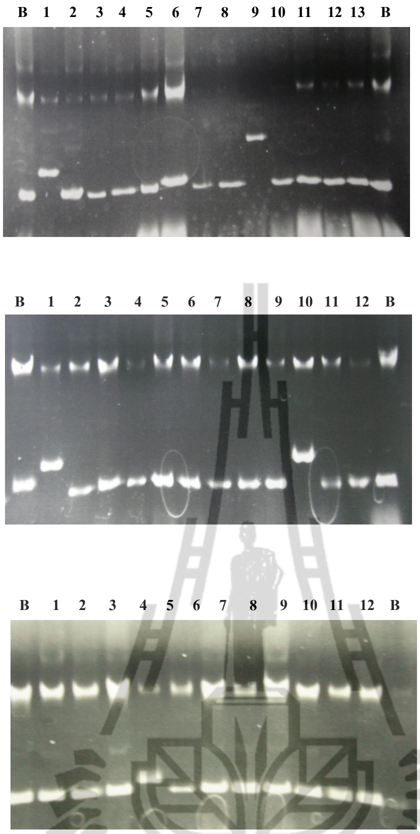
ภาพ A ผลการแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟริซิสเจลเพื่อทำการตัดเจล

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 = ดีเอ็นเอจาก PCR product 1_A และ 2_A, หมายเลข 2 = ดีเอ็นเอจาก PCR product 3_A และ 4_A, หมายเลข 3 = ดีเอ็นเอจาก PCR product 1_B และ 2_B

ภาพ B ผลการทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์

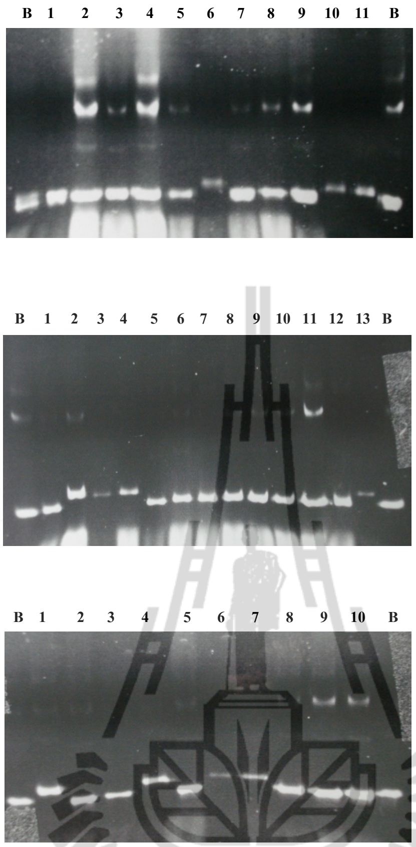
หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่ 1 (DNA 1), หมายเลข 2 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่ 2 (DNA 2), หมายเลข 3 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่ 3 (DNA 3)

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อ (ligation) เข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T easy และทำการเคลื่อนย้าย recombinant DNA เข้าสู่ *E. coli* ที่มีคุณสมบัติเป็น competent cell ด้วยวิธี heat shock หลังจากนั้นนำเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวมาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ selective media ซึ่งจะทำให้สามารถคัดโคโลนีที่ต้องการได้ ทำการเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่มี recombinant DNA และทำการคัดเลือกโคโลนีสีฟ้าที่คาดการณ์ว่ามีพลาสมิดที่ไม่มี recombinant DNA 1-2 โคโลนี เพื่อนำมาเป็นโคโลนีเปรียบเทียบกับโคโลนีที่พลาสมิดมี recombinant DNA และคัดเลือกโคโลนีที่คาดการณ์ว่าเป็นพลาสมิดที่มี recombinant DNA มาทำเป็น master plate หลังจากนั้นทำการตรวจสอบหาพลาสมิดที่มี recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking) พบว่าโคโลนีที่พลาสมิดมี recombinant DNA จะมีชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่าโคโลนีที่พลาสมิดไม่มี recombinant DNA (ดังภาพที่ 4.19 และ 4.20) จากการตรวจสอบหาพลาสมิดที่มี recombinant DNA พบว่าโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 2 ขนาดประมาณ 1000 bp มีทั้งหมด 6 โคลน (ดังภาพที่ 4.19) โคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของชิ้นที่ 3 ขนาดประมาณ 500 bp มีทั้งหมด 11 โคลน (ดังภาพที่ 4.20) หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวมาทำการเลี้ยงเชื้อและนำไปสกัดพลาสมิด แล้วทำการตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis และบันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ (ดังภาพที่ 4.21) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบพลาสมิดอีกครั้งโดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI* พบว่าพลาสมิดหมายเลข 1, 3, 6 มี recombinant DNA ที่ 2 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1000 bp คือส่วนของดีเอ็นเอที่คาดการณ์ว่าน่าจะเป็นยีน β-*actin* ด้าน 3'RACE และมีส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3015 bp คือส่วนของเวคเตอร์ pGEM-T Easy (ดังภาพที่ 4.22A) และพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนที่ 3 ขนาดประมาณ 500 bp ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน β-*actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP) ได้แก่ พลาสมิดหมายเลข 1, 3, 5 และ 9 (ดังภาพที่ 4.22B)



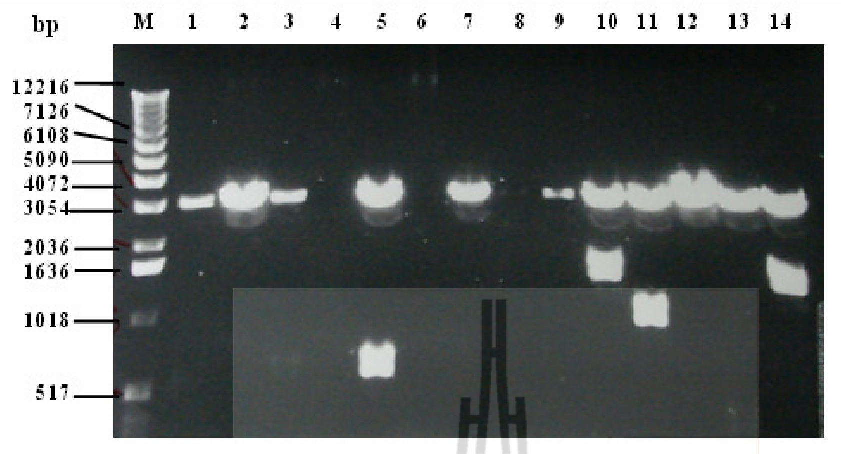
ภาพที่ 4.19 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking)

หมายเหตุ : B = โคโลนีสีฟ้า (blue colony), หมายเลข 1 ถึง 13 = โคโลนีสีขาว (white colony)



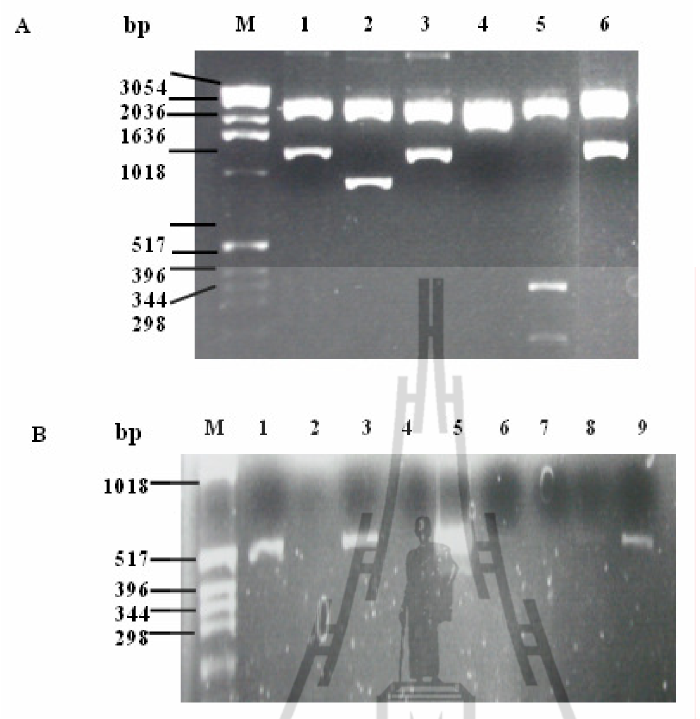
ภาพที่ 4.20 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ของยีน β-*actin* ที่มีขนาดประมาณ 500 bp จากการใช้ gene specific primer (GSP) ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking)

หมายเหตุ : B = โคโลนีสีฟ้า (blue colony), หมายเลข 1 ถึง 13 = โคโลนีสีขาว (white colony)



ภาพที่ 4.21 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน *β-actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP) และชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน *β-actin* ด้านปลาย 3’ ที่มีการเชื่อมต่อเวคเตอร์

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 9 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ของยีน *β-actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP) และหมายเลข 10 ถึง 14 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA DNA ของยีน *β-actin* ด้านปลาย 3’



ภาพที่ 4.22 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน β-*actin* โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI*

ภาพ A ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 6 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วงของ recombinant DNA ของ cDNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’

ภาพ B ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน β-*actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP)

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 9 = พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA ของ cDNA ของยีน β-*actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP)

เมื่อทำการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดแล้วจึงทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ จะส่งตัวอย่างพลาสมิดหมายเลข 1, 3 และ 6 ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอยีน β-*actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP) ทำการส่งตัวอย่าง พลาสมิดหมายเลข 1, 3 และ 5 พบว่าพลาสมิดดังกล่าวมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอยีน β-*actin* ซึ่งต้องทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดในแต่ละโคลนโดยขั้นแรกเปรียบเทียบระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่มีการอ่านจากด้าน T7 promotor ไปยังด้าน SP6 promotor และด้าน SP6 promotor ไปยังด้าน T7 promotor โดยด้านนี้จะต้องมีการทำเป็น complementary ก่อน หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบความเหมือน (homology) ระหว่างทั้งสองด้าน เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละโคลนแล้ว จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มีขนาดดีเอ็นเอของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ ในแต่ละโคลนมาเปรียบเทียบกัน หลังจากนั้นทำการสรุปลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโน (ดังภาพที่ 4.23) ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอของ cDNA ของยีน β-*actin* จากการใช้ gene specific primer (GSP) ก็ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน จากนั้นทำการสรุปลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโน (ดังภาพที่ 4.24) หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน β-*actin* ที่เป็นส่วนที่ได้จากการโคลน cDNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ ด้วยวิธี RACE และส่วนที่ได้จากการโคลนด้วยวิธี PCR โดยใช้ gene specific primer ในปลาสลิด (Tp actin 3’RACE และ Tp actin GSP ตามลำดับ) กับลำดับกรดอะมิโนของยีน β-*actin* ของปลาชนิดอื่น ๆ (ดังภาพที่ 4.25)

```
        10        20        30        40        50        60
ACTACCTCATCAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCTTTCACCACCACAGCCGAGAGGG
 Y  L  I  K  I  L  T  E  R  G  Y  S  F  T  T  T  A  E  R  E
        70        80        90       100       110       120
AAATCGTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGA
 I  V  R  D  I  K  E  K  L  C  Y  V  A  L  D  F  E  Q  E  M
       130       140       150       160       170       180
TGGGCACTGCAGCCTCCTCCTCTTCTCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCCGACGGACAGG
 G  T  A  A  S  S  S  S  L  E  K  S  Y  E  L  P  D  G  Q  V
       190       200       210       220       230       240
TCATCACCATTGGTAATGAGAGGTTCCGTTGCCCAGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTCC
 I  T  I  G  N  E  R  F  R  C  P  E  A  L  F  Q  P  S  F  L
       250       260       270       280       290       300
TTGGTATGGAGTCCTGCGGAATCCATGAGACCACCTACAATAGTATCATGAAGTGCGACG
 G  M  E  S  C  G  I  H  E  T  T  Y  N  S  I  M  K  C  D  V
       310       320       330       340       350       360
TTGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGCTGTCTGGTGGTACCACCATGTACC
 D  I  R  K  D  L  Y  A  N  T  V  L  S  G  G  T  T  M  Y  P
       370       380       390       400       410       420
CCGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGA
 G  I  A  D  R  M  Q  K  E  I  T  A  L  A  P  S  T  M  K  I
       430       440       450       460       470       480
TCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATTGGAGGCTCCATCCTGG
 K  I  I  A  P  P  E  R  K  Y  S  V  W  I  G  G  S  I  L  A
       490       500       510       520       530       540
CCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCC
 S  L  S  T  F  Q  Q  M  W  I  S  K  Q  E  Y  D  E  S  G  P
       550       560       570       580       590       600
CCTCCATTGTCCACCGCAAATGCTTCTAAACGGACTGTTCCTTCTCCCTTCTCCCCAACC
 S  I  V  H  R  K  C  F  *
       610       620       630       640       650       660
AAACACCCAACAACTTCAGCTCTGTGCAACGACCACAACACATTTATCATACACACTCGG
       670       680       690       700       710       720
GCGCAGAGCCTAGATGACCAACTCATTGGCATGGCTTCAGTTATTTTTGGCGCTTGACTC
       730       740       750       760       770       780
AGGATTTTAAAAAACTGGAACGATGAAGGATACAGTAATGTTTTTGGCTAGGTATAAAAG
       790       800       810       820       830       840
CACCCTAAGATTCTGCACCTGGGGTCTTAAAAAAAAATGTACATTTTTTTTTTTTTTTTT
       850       860       870       880       890       900
GAGTCATTCCAAATGTTTGTTAACTGCATTGTTCAGACACATGATTCCAAATGTTAACTG
       910       920       930       940       950       960
CATTGTTCAGACACGTATTTGCCTCTGTGAAGGCTCCCCAGTGGTTGGCGCATACTTAAA
       970       980       990      1000      1010      1020
CATTGTTGTAGTATCGCTTGTATGTAAATTATGTGTGGGTTTTTTGTACTTTCAGCCTTA
```

ภาพที่ 4.23 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3’ ในปลาสลิดด้วยวิธี RACE (Tp actin 3’RACE)

```
       1030        1040        1050        1060        1070        1080
AAAATCTTGGTCCTGTTTAATTTTTTTTTGTTTTTGTTATGCAAAACCCAATTGTGACCT
       1090        1100        1110        1120        1130        1140
CTCCTTCCCCCTGTTCAACCTGGGGCAGTGGGGAAAAGGGGTCTCAAAGTGAAGGGGTAA
       1150        1160        1170        1180        1190        1200
CAAGGGGTGCCAGACCGGTGGGGCCAACCTGTACACTGAATGAAACAATCCCAATAAAGT
       1210        1220        1230        1240        1250
GCACATGTGTTCCGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

ภาพที่ 4.23 ผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน β-*actin* ด้านปลาย 3' ในปลาสลิดด้วยวิธี RACE (Tp actin 3'RACE) (ต่อ)

```
        10        20        30        40        50        60
ACTACCTCATCAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCTTTCACCACCACAGCCGAGAGGG
  Y  L  I  K  I  L  T  E  R  G  Y  S  F  T  T  T  A  E  R  E
        70        80        90       100       110       120
AAATCGTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGA
  I  V  R  D  I  K  E  K  L  C  Y  V  A  L  D  F  E  Q  E  M
       130       140       150       160       170       180
TGGGCACTGCAGCCTCCTCCTCTTCTCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCCGACGGACAGG
  G  T  A  A  S  S  S  S  L  E  K  S  Y  E  L  P  D  G  Q  V
       190       200       210       220       230       240
TCATCACCATTGGTAATGAGAGGTTCCGTTGCCCAGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTCC
  I  T  I  G  N  E  R  F  R  C  P  E  A  L  F  Q  P  S  F  L
       250       260       270       280       290       300
TTGGTATGGAGTCCTGCGGAATCCATGAGACCACCTACAATAGTATCATGAAGTGCGACG
  G  M  E  S  C  G  I  H  E  T  T  Y  N  S  I  M  K  C  D  V
       310       320       330       340       350       360
TTGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGCTGTCTGGTGGTACCACCATGTACC
  D  I  R  K  D  L  Y  A  N  T  V  L  S  G  G  T  T  M  Y  P
       370       380       390       400       410       420
CCGGCATCGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAGA
  G  I  A  D  R  M  Q  K  E  I  T  A  L  A  P  S  T  M  K  I
       430       440       450       460       470       480
TCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATTGGAGGCTCCATCCTGG
  K  I  I  A  P  P  E  R  K  Y  S  V  W  I  G  G  S  I  L  A
       490       500       510       520
CCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAA
  S  L  S  T  F  Q  Q  M  W  I  S  K
```

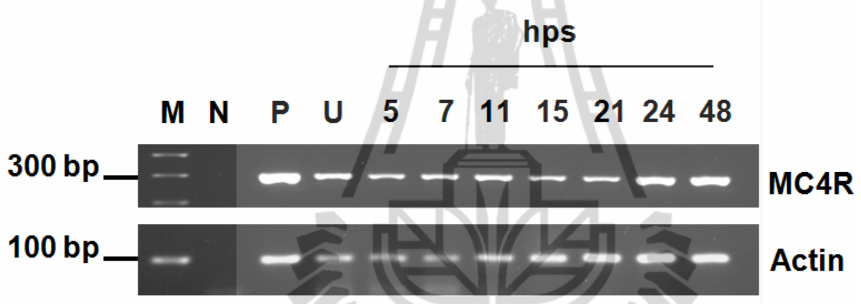
ภาพที่ 4.24 ผลการการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *β-actin* ในปลาสลิดด้วยวิธี PCR โดยใช้ gene specific primer (Tp actin GSP)

```
Saebass         MEDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLNYPIEHGI 75
Croaker         MEDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI 75
Grouper         MEDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI 75
Sculpin         MEDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI 75
Flounder        MEDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI 75
Tilapia         MEDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI 75
Sillago         MEDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI 75
Perch           MDDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGI 75
Tpactin 3'RACE  ---------------------------------------------------------------------------
Tpactin GSP     ---------------------------------------------------------------------------

Saebass         VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Croaker         VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Grouper         VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Sculpin         VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Flounder        VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Tilapia         VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Sillago         VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Perch           VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTG 150
Tpactin 3'RACE  ---------------------------------------------------------------------------
Tpactin GSP     ---------------------------------------------------------------------------

Saebass         IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Croaker         IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Grouper         IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Sculpin         IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Flounder        IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Tilapia         IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Sillago         IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Perch           IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 225
Tpactin 3'RACE  -------------------------------------YLIKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 38
Tpactin GSP     -------------------------------------YLIKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ 38
                                                     ** ***********************************

Saebass         EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMXSCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Croaker         EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Grouper         EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Sculpin         EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Flounder        EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Tilapia         EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Sillago         EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Perch           EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 300
Tpactin 3'RACE  EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 113
Tpactin GSP     EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLS 113
                ******************************************** ******************************

Saebass         GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Croaker         GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Grouper         GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Sculpin         GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Flounder        GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Tilapia         GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Sillago         GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Perch           GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 375
Tpactin 3'RACE  GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF 188
Tpactin GSP     GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK---------------- 172
                ***********************************************************
```

ภาพที่ 4.25 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน β-*actin* ของปลาสลิดและปลาชนิดต่าง ๆ

4.1.5 การศึกษาการแสดงของ mRNA *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการที่ระยะต่าง ๆ ของตัวอ่อนปลาสลิด โดยใช้เทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR)

การศึกษาการแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของปลาสลิดโดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งจะมีการใช้ยีน β-actin เป็นตัวทดสอบคุณภาพของ cDNA ที่ถูกสังเคราะห์มาจาก total RNA ของไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg) และการพัฒนาการของตัวอ่อนปลาสลิดในระยะ 5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการวางไข่ (hours post spawning: hps) และการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* จะมีการใช้ primer MC4R และ β-actin ที่มีความเฉพาะเจาะจง ซึ่งจะมีขนาดของ PCR product เท่ากับ 289 bp และ 95 bp ตามลำดับ พบว่า mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในทุกระยะของการพัฒนาการของตัวอ่อนในปลาสลิด รวมไปถึงไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิด้วย (ดังภาพที่ 4.26)



ภาพที่ 4.26 การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนที่ระยะต่าง ๆ ของปลาสลิดโดยใช้เทคนิค RT-PCR

หมายเหตุ : M = DNA marker

N = Negative control ซึ่งใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน (distilled water)

P = Positive control ซึ่งใช้พลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *TpMC4R* และ *β-actin* ของปลาสลิด

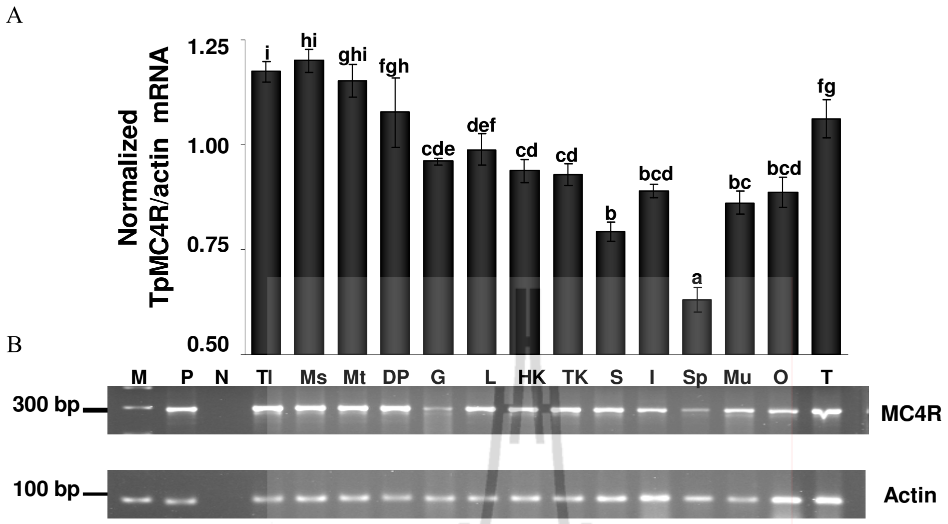
U = ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg)

5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 hours post spawning (hps) = ตัวอ่อนในระยะ 5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากการวางไข่

4.1.6 การศึกษาการแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Real time reverse transcription PCR (Real time RT-PCR)

การศึกษาระดับการแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิดทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยใช้เทคนิค Real time RT-PCR ซึ่งมีการใช้ยีน *β-actin* เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *MC4R* ในอวัยวะต่างๆ จาการศึกษาระดับการแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* พบว่า *TpMC4R* มีการแสดงออกในสมองทุกส่วนและในทุกอวัยวะของปลาสลิด ซึ่งอวัยวะที่มีการแสดงออกมากที่สุดคือ ในสมองทุกส่วนได้แก่ สมองส่วน telencephalon, สมองส่วน mesencephalon, สมองส่วน metencephalon และสมองส่วน diencephalon รวมไปถึง pituitary gland และในอัณฑะ (testis) อวัยวะที่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับปานกลาง คือ เหงือก (gill), ตับ (liver), ไตส่วนบน (head kidney), ไตส่วนล่าง (trunk kidney), ลำไส้ (intestine), กล้ามเนื้อ (muscle) และ รังไข่ (ovary) อวัยวะที่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำ คือ กระเพาะอาหาร (stomach) และอวัยวะที่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำที่สุด คือ ม้าม (spleen) (ดังภาพที่ 4.27A และ 4.27B)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.27 การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* โดยใช้เทคนิค Real time RT-PCR ในสมองส่วนต่าง ๆ ได้แก่ สมองส่วน telencephalon (Tl), สมองส่วน mesencephalon (Ms), สมองส่วน metencephalon (Mt), สมองส่วน diencephalon & pituitary (DP), อวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ gill (G), liver (L), head kidney (HK), trunk kidney (TK), stomach (S), intestine (I), spleen (Sp), muscle (Mu), ovary (O) และtestis (T) ของปลาสลิด

ภาพ A ผลของ Real-Time RT PCR ซึ่งวัดระดับการแสดงของ mRNA *MC4R* จากการวิเคราะห์ร่วมกับ mRNA ของยีน β*-actin* เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *MC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ หลังจากนั้นทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป log 10

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means ± SE (จำนวนตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอวัยวะด้วยวิธี Duncan's multiple range test ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ P<0.05

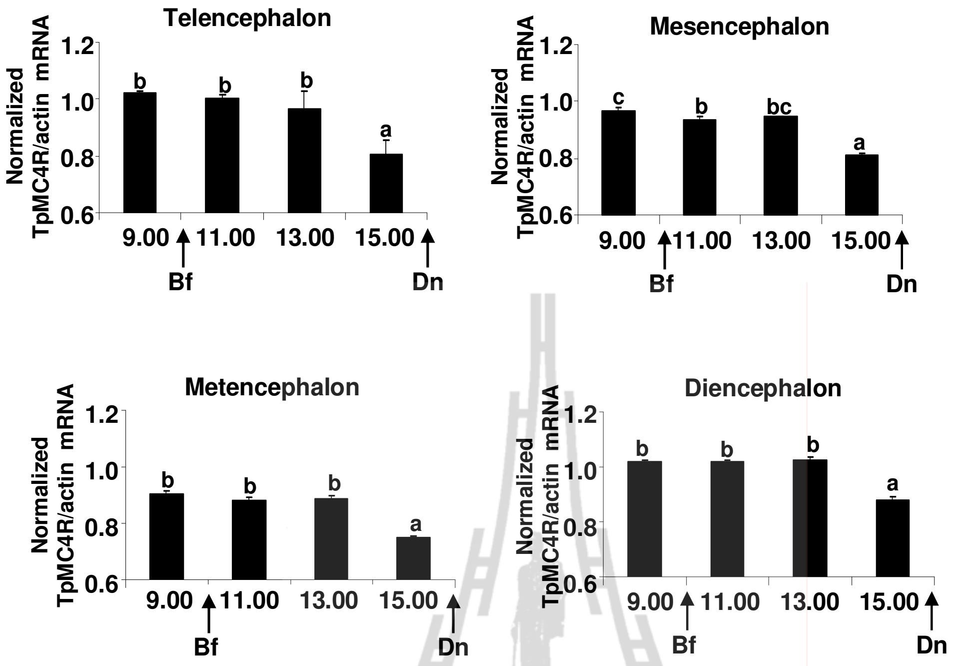
ภาพ B ผลการตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ : M = DNA marker, N = Negative control ซึ่งใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน (distilled water), P = Positive control ซึ่งใช้พลาสมิดดีเอ็นเอของ p3-TpMC4R และ pActin ของปลาสลิด

4.2 แผนการดำเนินงานที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติ และผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R*

4.2.1 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของการกินอาหารปกติ (daily feeding)

โดยปกติปลาสลิดกินอาหารในมื้อเช้าเวลา 10.00 น. และมื้อเย็นเวลา 16.00 น. ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของปลาสลิดด้วยเทคนิค Real-time RT PCR ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, สมองส่วน Mesencephalon, สมองส่วน Metencephalon และสมองส่วน Diencephalon ที่เวลาก่อนอาหารมื้อเช้า 1 ชั่วโมง (9.00 น.), หลังมื้ออาหาร 1 ชั่วโมง (11.00 น.), หลังมื้ออาหาร 3 ชั่วโมง (13.00 น.) และก่อนอาหารมื้อเย็น 1 ชั่วโมง (15.00 น.) การหาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* โดยจะวิเคราะห์ร่วมกับ mRNA ของยีน β-*actin* ซึ่งเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนและในแต่ละช่วงเวลา จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน โดยการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ที่เวลาก่อนอาหารเช้า 1 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่างจาก 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง หลังอาหารเช้า และที่ 5 ชั่วโมง หลังอาหารเช้าหรือ 1 ชั่วโมง ก่อนอาหารเย็นมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ดังภาพที่ 4.28)

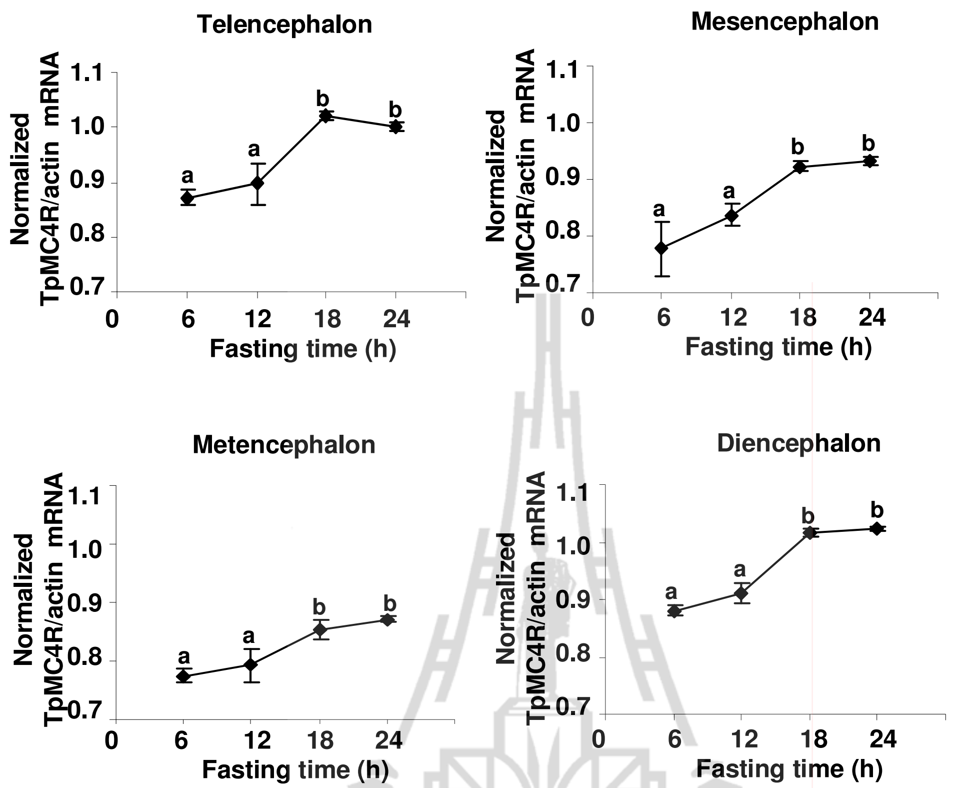


ภาพที่ 4.28 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค Real-Time RT-PCR ในระหว่างมื้ออาหาร (daily feeding) โดยปกติปลาสลิดกินอาหารในมื้อเช้าเวลา 10.00 น. (breakfast : Bf) และมื้อเย็นเวลา 16.00 น. (dinner : Dn) การศึกษาในครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, สมองส่วน Mesencephalon, สมองส่วน Metencephalonและสมองส่วน Diencephalon โดยใช้ mRNA ของยีน β*-actin* เป็น internal standard ปริมาณของ mRNA ของยีน *TpMC4R* และ β*-actin* วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบค่า Cp กับกราฟมาตรฐานค่า Cp ของพลาสมิดยีน *TpMC4R* (p3-TpMC4R) และพลาสมิดของยีน β*-actin* (pActin) ที่ทราบความเข้มข้น การคำนวณทำโดยการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป log 10

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means ± SE (จำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างช่วงเวลาด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

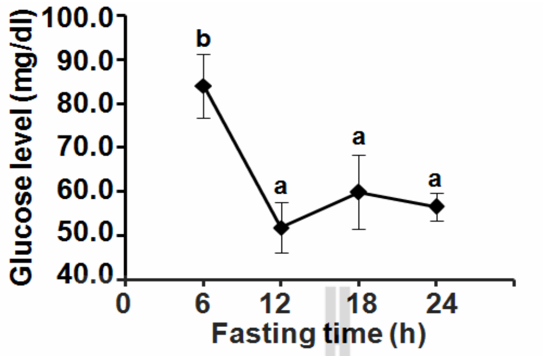
4.2.2 การศึกษาผลของการอดอาหาร (fasting period) ระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารระยะสั้นของปลาสลิด ด้วยเทคนิค Real-time RT PCR ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, สมองส่วน Mesencephalon, สมองส่วน Metencephalon และสมองส่วน Diencephalon ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างหลังจากการกินอาหารที่ 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง (การอดอาหาร 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง) พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่เวลาการอดอาหาร 6 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำและมีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาของการอดอาหารเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของช่วงเวลาการอดอาหารที่ 6 และ 12 ชั่วโมง ไม่มีผลแตกต่างกันในทางสถิติ และที่เวลาการอดอาหาร 18 ชั่วโมงมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ระดับการแสดงออกไม่มีผลแตกต่างในทางสถิติจากชั่วโมงการอดอาหารที่ 24 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 4.29) และพบว่าปลาสลิดที่มีการอดอาหารเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง มีระดับกลูโคสในเลือดสูง และเมื่อระยะเวลาการอดอาหารเพิ่มมากขึ้นก็จะมีผลทำให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ดังภาพที่ 4.30)



ภาพที่ 4.29 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค Real-Time RT-PCR ในสภาวะการอดอาหารระยะสั้น (short fasting period) การศึกษาในครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, สมองส่วน Mesencephalon, สมองส่วน Metencephalon และสมองส่วน Diencephalon โดยใช้ mRNA ของยีน β-*actin* เป็น internal standard ปริมาณของ mRNA ของยีน *TpMC4R* และ β-*actin* วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบค่า Cp กับกราฟมาตรฐานค่า Cp ของพลาสมิด *TpMC4R* (p3-TpMC4R) และพลาสมิด β-*actin* (pActin) ที่ทราบความเข้มข้น การคำนวณทำโดยการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป log 10

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means ± SE (จำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างระยะเวลาของการอดอาหารด้วยวิธี Duncan's multiple range test ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$



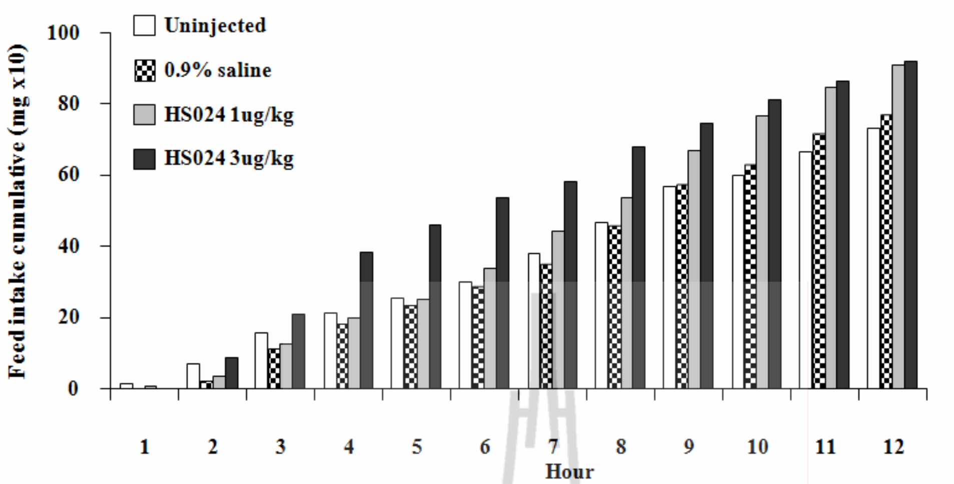
ภาพที่ 4.30 ระดับกลูโคสในเลือดของปลาสลิดที่มีการอดอาหารในระยะสั้น (short fasting period)

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means ± SE (จำนวนตัวอย่าง 7ตัวอย่าง) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างระยะเวลาของการอดอาหารด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

4.3 แผนการดำเนินงานที่ 3 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด และการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในสมองของปลาสลิด

4.3.1. การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด

จากการทดสอบระดับการฉีด MC4R antagonist (HS024) ที่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ของปลาสลิด พบว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 μg/kg มีผลการกินได้มากกว่าการฉีด HS024 ที่ระดับอื่น ๆและมีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นหลังจากเวลาที่มีการฉีดเพิ่มขึ้น ในกลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1 μg/kg, 0.5 μg/kg, 10 μg/kg, 25 μg/kg, 50 μg/kg และ 100 μg/kg มีผลการกินได้ที่น้อยกว่าปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม ส่วนปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 0.1 μg/kg มีการกินได้ที่ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสลิดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ และปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 5 μg/kg มีการกินได้ที่ไม่แตกต่างจากปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม ดั้งนั้นจึงทำให้ทราบว่าการฉีด HS024 ในระดับที่สูงเกินไปจะมีผลทำให้ปลาสลิดมีการกินได้ที่น้อยลง (ไม่มีการแสดงผล) ดังนั้นผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกระดับการฉีด MC4R antagonist (HS024) คือ 1 μg/kg และ 3 μg/kg เพื่อศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของ MC4R ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด โดยมีการแบ่งกลุ่มการทดลองทั้งหมด 4 กลุ่มการทดลอง คือ ปลาสลิดมีการฉีด HS024 1 μg/kg และ 3 μg/kg กลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม ซึ่งจากการทดลองพบว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 3 μg/kg มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสลิดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ และปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 μg/kg มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสลิดกลุ่มที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังภาพที่ 4.31)



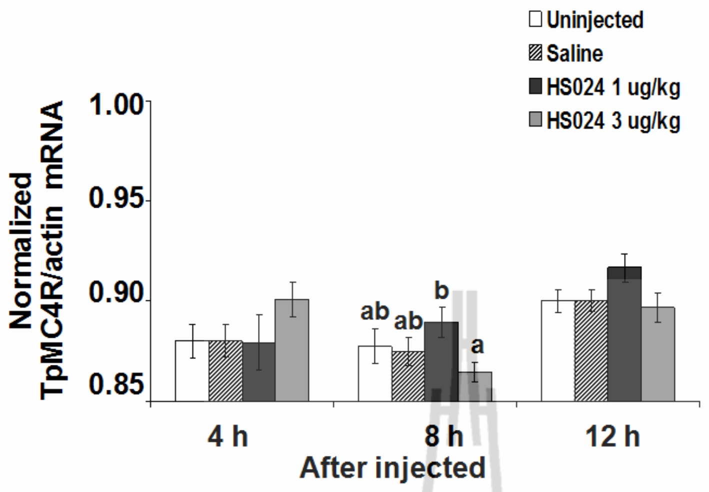
ภาพที่ 4.31 ผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ของปลาสลิด โดยทำการฉีด HS024 ที่ความเข้มข้น 1 µg/kg, 3 µg/kg ซึ่งเปรียบเทียบการฉีด 0.9% saline และกลุ่มปลาสลิดที่ไม่ได้รับการฉีด HS024 (uninjected)

จากการศึกษาผลของการฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อของปลาสลิด พบว่าการฉีด HS024 มีแนวโน้มต่อการเพิ่มการกินได้ในปลาสลิด ซึ่ง HS024 มีผลในการกระตุ้นการกินได้ตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 3 และ 6 หลังจากการฉีด HS024 แต่ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว HS024 มีผลต่อการกินได้ที่ไม่ชัดเจน ซึ่งในทั้งนี้อาจเกิดได้จาก 2 สาเหตุ คือ 1. HS024 ไม่สามารถจับกับ MC4R ในปลาสลิดได้ จึงมีผลทำให้ HS024 ไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ในปลาสลิด และ 2. จากการฉีด HS024 เข้าไปในกล้ามเนื้อของปลาสลิด มีผลทำให้ HS024 ไปจับกับ MC4R ที่อยู่ในอวัยวะต่าง ๆ จึงอาจมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบการทำงานต่างๆ ภายในร่างกายปลาสลิด ซึ่งอาจส่งผลต่อการกินได้ จึงมีผลทำให้การฉีด HS024 มีผลต่อการกินได้ที่ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาต่อไป คือการศึกษาผลของการใช้ HS024 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองของปลาสลิด โดยมีการตั้งสมมุติฐานว่า ถ้า HS024 สามารถจับกับ MC4R ในปลาสลิดได้ ก็น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองของปลาสลิด

4.3.2 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

4.3.2.1 การศึกษาผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

การศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง โดยทำการแบ่งกลุ่มการทดลองทั้งหมด 4 กลุ่มการทดลอง คือ ปลาสลิดในกลุ่มควบคุม (uninjected) กลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline ปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 µg/kg และ 3 µg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และทำการเก็บตัวอย่างสมองของปลาสลิดที่ 4, 8 และ 12 ชั่วโมงหลังจาการฉีด หลังจากนั้นนำไปสกัด total RNA และสังเคราะห์เป็น first stand cDNA และทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค Real-time RT PCR ซึ่งจากการศึกษาพบว่าหลังจากการฉีด 4 ชั่วโมง ปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 3 µg/kg มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของปลาสลิดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากการฉีด HS024 ในชั่วโมงที่ 8 พบว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 µg/kg มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงกว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 3 µg/kg แต่ไม่มีความแตกต่างจากการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในปลาสลิดกลุ่มควบคุม และปลาสลิดที่มีการฉีดด้วย 0.9% saline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากการฉีด HS024 ในชั่วโมงที่ 12 พบว่าไม่มีความแตกต่างของการแสดงออก mRNA ของยีน *TpMC4R* ของปลาสลิดในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ ซึ่งจากการศึกษาการฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อที่ระดับต่าง ๆ ไม่มีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่อระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการศึกษาไม่สามารถตอบข้อสมมุติฐานได้ ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาต่อไป คือ การศึกษาผลของการแช่สมองปลาสลิดในสาร MC4R antagonist ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

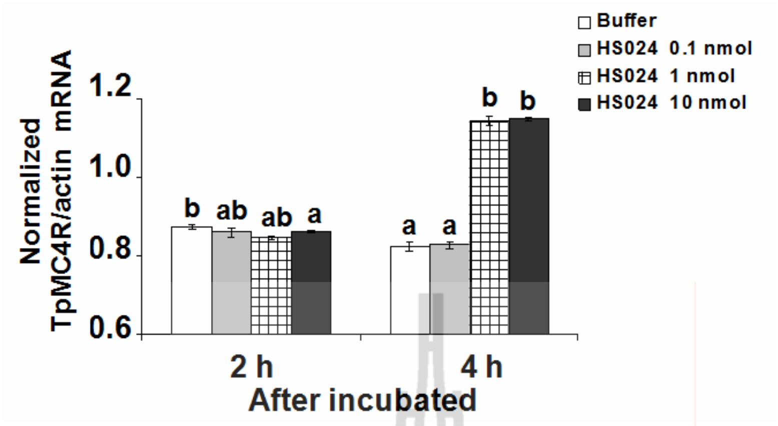


ภาพที่ 4.32 ผลของ HS024 ต่อระดับการแสดงออกของ mRNAของยีน *TpMC4R* ตัวอย่างที่ใช้เป็นสมองของปลาสลิดในกลุ่มควบคุม (uninjected) กลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และกลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 µg/kg และ 3 µg/kg โดยทำการศึกษาผลของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากมีการฉีด antagonist HS024 ที่ 4, 8 และ 12 ชั่วโมง ซึ่งมีการใช้เทคนิค Real-Time RT-PCR โดยใช้ mRNA ของยีน β*-actin* เป็น internal standard ปริมาณของ mRNA ของ *TpMC4R* และ β*-actin* วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบค่า Cp กับกราฟมาตรฐานค่า Cp ของพลาสมิดยีน *TpMC4R* (p3-TpMC4R) และพลาสมิดของยีน β*-actin* (pActin) ที่ทราบความเข้มข้น การคำนวณทำโดยการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป log 10

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means ± SE (จำนวนตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ของข้อมูลแบบ one way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างระยะเวลาด้วยวิธี Duncan's multiple range test ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

4.3.2.2 การศึกษาผลของการแช่ (incubate) สมอง ในสาร MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

การศึกษาผลของการแช่สมองปลาสลิดในสาร MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* โดยทำการแบ่งกลุ่มการทดลองทั้งหมด 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ สมองปลาสลิดที่แช่ใน buffer (Holtfreter's solution), สมองปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 0.1 nmol, สมองปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 1 nmol และสมองปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 10 nmol และทำการจับเวลาในการแช่ที่ 2 และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปสกัด total RNA และสังเคราะห์เป็น first stand cDNA และทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค Real-time RT PCR ซึ่งจากการศึกษาจากผลการศึกษาพบว่าหลังจากการแช่สมอง 2 h ไม่มีความแตกต่างกันต่อระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* และสมองของปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 1 nmol และ 10 nmol เป็นเวลา 4 ชั่วโมงมีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงกว่าการแสดงออก mRNA ของยีน *TpMC4R* ของสมองปลาสลิดที่แช่ใน buffer และสมองที่แช่ใน HS024 ความเข้มข้น 0.1 nmol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังภาพที่ 4.33) ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่า HS024 สามารถจับกับ MC4R ในปลาสลิดได้ ดังนั้นผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ของปลาสลิด อาจเกิดจาก HS024 ไปจับกับ MC4R ในอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกายของปลาสลิด จึงมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อการกินได้ ซึ่งทำให้การฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อมีผลต่อการกินได้ในปลาสลิดที่ไม่ชัดเจน



ภาพที่ 4.33 ผลของการแช่สมองปลาสลิดในสาร MC4R antagonist (HS024)ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* โดยทำการศึกษาผลของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สมองปลาสลิดที่แช่ใน buffer (Holtfreter's solution), HS024 ที่มีความเข้มข้น 0.1 nmol, 1 nmol และ 10 nmol เป็นเวลาที่ 2 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งมีการใช้เทคนิค Real-Time RT-PCR โดยใช้ mRNA ของยีน β*-actin* เป็น internal standard ปริมาณของ mRNA ของ *TpMC4R* และ β*-actin* วิเคราะห์โดยเปรียบเทียบค่า Cp กับกราฟมาตรฐานค่า Cp ของพลาสมิดยีน *TpMC4R* (p3-TpMC4R) และพลาสมิดยีน β*-actin* (pActin) ที่ทราบความเข้มข้น การคำนวณทำโดยการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป log 10

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means ± SE (จำนวนตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ของข้อมูลแบบ one way ANOVA ตามด้วยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างระยะเวลาการแช่สมองในสารละลายด้วยวิธี Duncan's multiple range test ตัวอักษรที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

บทที่ 5
การอภิปรายผล

5.1 การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* และการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนและในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสลิด

5.1.1 การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้าง cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R*

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทป์ของ cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* มีความยาวเท่ากับ 1311 bp ประกอบไปด้วยส่วนของ open reading frame (ORF) 984 bp ซึ่งเมื่อทำการแปรรหัสเป็นกรดอะมิโนจะมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 327 residues และนอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยในส่วนของ 5' untranslated region (UTR) มีนิวคลีโอไทป์เท่ากับ 17 bp และส่วนของ 3' UTR มีนิวคลีโอไทป์เท่ากับ 310 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ระหว่างปลาสลิด, คน, ไก่ และปลาชนิดต่าง ๆ ซึ่งพบว่าลำดับกรดอะมิโน TpMC4R ของปลาสลิดมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโน MC4R อยู่ในช่วง 61-90% จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของยีน *TpMC4R* ในปลาสลิดโดยทำการเปรียบเทียบกับลักษณะโครงสร้างของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานมาแล้วพบว่า TpMC4R มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ TM คล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ TM ของ MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ทำการเปรียบเทียบในระดับ 61-100% โดยตำแหน่งของ TM จะมีความสำคัญต่อการจับและการทำปฏิกิริยาของ MC4R (Lagerstrom et al., 2003; Oosterom et al., 1999) และจากการเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของกรดอะมิโนของ TpMC4R และยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบว่าในบริเวณ N-terminal domain และ ECL ในแต่ละตำแหน่งมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันอยู่ในระดับต่ำ เมื่อทำการพิจารณาพบว่าบริเวณ N-terminal domain ไม่มีความสำคัญต่อการจับและการทำปฏิกิริยาของ MCR กับ MSH (Srinivasan et al., 2004) นอกจากนี้โปรตีน TpMC4R ประกอบด้วย 15 cysteine residues ซึ่งจำนวนและตำแหน่งมีความเหมือนกับปลา fugu ปลา seabass และปลา brafin flounder ส่วนในคน ไก่ ปลา goldfish ปลา zebrafish ปลา rainbow trout ปลา dogfish และปลา lamprey มี cysteine บางตัวเท่านั้นที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (Cerda-Reverter et al., 2003; Haitina et al., 2004; Haitina et al., 2007; Klovins et al., 2004; Kobayashi et al., 2008; Ringholm et al., 2002; Sanchez et al., 2009; Takeuchi and Takahashi, 1998) ซึ่ง cysteine

residues มีความสำคัญต่อโครงสร้างทุติยภูมิในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) เพื่อเชื่อมโยงระหว่าง ECL ในแต่ละตำแหน่ง (Tarnow et al., 2003) DRY motift สามารถพบใน GPCRs ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ซึ่ง DRY motift มีความสำคัญต่อการรักษาสภาพรูปร่างของ MCR เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่สามารถจับ ligand ได้ (Schioth et al., 2005) ตำแหน่งของ N-glycosylation และตำแหน่ง phosphorylation ของโปรตีน TpMC4R และโปรตีน MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งตำแหน่ง phosphorylation ที่อยู่ในบริเวณ ICL ที่ 2 จะมีความสำคัญต่อการกำหนดการจับของ G-protein ซึ่งมีความเกี่ยวข้องต่อการควบคุมระดับของปฏิกิริยา (Shinyama et al., 2003) นอกจากนี้ตำแหน่ง PMY motif, DPIIY (NPXXY) motif และตำแหน่งของ phosphorylation ที่อยู่ในบริเวณ C-terminal intracellular ของโปรตีน TpMC4R และโปรตีน MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ก็อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน จากการพิจารณาถึงโครงสร้างความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R ในข้างต้นมีความสอดคล้องกันกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการสร้าง Phylogenetic tree ทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีน *TpMC4R* อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน *MC4R* ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และยีน *TpMC4R* มีค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับปลากระดูกแข็งมากที่สุด

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R พบว่าโปรตีน TpMC4R ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนในตำแหน่งต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนดังกล่าวมีความสำคัญต่อการจับของ ligand (Haitina et al., 2004; Klovins et al., 2004; Lagerstrom et al., 2003; Lee et al., 2001; Oosterom et al., 1999; Yang et al., 2000) โดยโปรตีน MC4R ในคนประกอบไปด้วยกรดอะมิโน Glu^{100}, Asp^{122}, Asp^{126}, Met^{200}, Trp^{258}, Phe^{261}และ His^{264} ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาร่วมกับ α-MSH (Adan et al., 2000; Lagerstrom et al., 2003; Lee et al., 2001; Yang et al., 2000) ซึ่งกรดอะมิโน Glu^{100}, Asp^{126}, Ser^{127}, Ala^{192}, Phe^{267}และ Tyr^{187} มีความสามารถในการกระตุ้นให้ MC4R สามามรถจับกับ α-MSH (Lagerstrom et al., 2003; Yang et al., 2000) จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีน TpMC4R ประกอบไปด้วย Glu^{100}, Asp^{123}, Asp^{127}, Ser^{128}, Try^{188}, Met^{201}, Trp^{259}, Phe^{262} และ His^{265} ซึ่งมีกรดอะมิโนที่เหมือนกันแต่ตำแหน่งของกรดอะมิโนจะไม่ตรงกันเช่นเดียวกับโปรตีน MC4R ของปลา brafin flounder, ปลา saebass, ปลา fugu, ปลา rainbow trout, ปลา goldfish, ปลา zebra fish และ ปลา spiny dogfish (Kobayashi et al., 2008; Sanchez et al., 2009; Klovins et al., 2004; Haitina et al., 2004; Cerda-Reverter et al., 2003; Ringholm et al., 2002; Ringholm et al., 2003) นอกจากนี้กรดอะมิโน Ala^{192} และ Phe^{267} ของโปรตีน MC4R ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Thr และ Leu ตามลำดับ ซึ่งจะมีผลทำให้ตำแหน่งของกรดอะมิโน

ดังกล่าวมีความตรงกันกับกรดอะมิโนของโปรตีน TpMC4R และโปรตีน MC4R ของปลากระดูกแข็ง โปรตีน MC4R ในคนจะมีกรดอะมิโน Tyr^{268} ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถในการจับของ MC4R กับ γ-MSH อยู่ในระดับต่ำ (Adan et al., 2000) โปรตีน MC4R ของปลาจะมีกรดอะมิโน Met ในตำแหน่งที่ 268 จึงมีผลให้ MC4R มีความสามารถในการจับกับ γ-MSH (Haitina et al., 2004; Klovins et al., 2004) โปรตีน TpMC4R ในปลาสลิดมีกรดอะมิโน Met ในตำแหน่งที่ 268 เช่นเดียวกันจึงทำให้ TpMC4R มีความสามารถในการจับกับ γ-MSH เช่นเดียวกัน ซึ่งเห็นได้ว่าโปรตีน TpMC4R มีกรดอะมิโนหลายตำแหน่งที่เป็นลักษณะสำคัญต่อการทำหน้าที่ของยีน *MC4R* โดย TpMC4R ก็จะมีความสามารถในการจับกับ MSH เช่นเดียวกับยีน *MC4R* ของปลากระดูกแข็ง

5.1.2 การศึกษาการแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ระหว่างการพัฒนาการในระยะต่าง ๆ ของตัวอ่อนปลาสลิด

การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของการพัฒนาการตัวอ่อนในระยะต่าง ๆ ของปลาสลิด ได้แก่ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg) และตัวอ่อนในระยะ 5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากได้ที่มีการวางไข่ (hours post spawning: hps) ซึ่งการพัฒนาการของตัวอ่อนในระยะ 5 ชั่วโมง คืออยู่ในระยะ mid blastula ตัวอ่อนในระยะ 7 ชั่วโมง คืออยู่ในระยะ gastrula ตัวอ่อนในระยะ 11-15 ชั่วโมง คือในระยะที่ตัวอ่อนมีการแบ่งตัวเป็นส่วน (body segment) และอยู่ในช่วงที่มีการสร้างเม็ดสี (pigmentation) ตัวอ่อนในระยะ 21 ชั่วโมง คืออยู่ในระยะการฟักเป็นตัว (hatching stage) ตัวอ่อนในระยะ 24 ชั่วโมง คือระยะที่ตามีการสร้างเม็ดสี และตัวอ่อนในระยะ 48 ชั่วโมง คือระยะที่ตัวอ่อนปลาสลิดจะได้รับอาหารเป็นมื้อแรก (first feeding) ซึ่งจากการสังเกตการณ์การพัฒนาการตัวอ่อนของปลาสลิดจะมีการดูดซึมถุงไข่แดง (yolk sack) จนเกือบหมดและปากของตัวอ่อนมีการเปิด ดังนั้นจึงเรียกระยะนี้ว่า first feeding ซึ่งจากการศึกษาพบว่ายีน *TpMC4R* การแสดงออกในทุกระยะของการพัฒนาการของตัวอ่อน รวมไปถึงไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิก็มีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ด้วยเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *TpMC4R* นั้นเป็นยีน maternal ที่มีการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก

5.1.3 การศึกษาการแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ

การแสดงของยีน *MC4R* ในเนื้อเยื่อมีความหลากหลายไปตามชนิดของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยีน *MC4R* จะมีการแสดงออกที่บริเวณสมองเป็นหลัก ซึ่งยีน *MC4R* มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมระบบประสาทส่วนกลาง และจากผลการศึกษาของ Haitina et al (2007) ในปลา lamprey ก็มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่บริเวณระบบประสาทส่วนกลางด้วยเช่นกัน ซึ่ง

จากการศึกษาการแสดงของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Real time RT-PCR พบว่า mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในสมองทุกส่วน ได้แก่ สมองส่วน telencephalon, สมองส่วน mesencephalon, สมองส่วน metencephalon และสมองส่วน diencephalon รวมไปถึง pituitary gland ซึ่งการแสดงออกของยีน *MC4R* ในสมองมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ตัวอย่างเช่น ปลา brafin flounder และปลา zebrafish (Kobayashi et al., 2008; Ringholm et al., 2002) และนอกจากนี้มีการศึกษาการแสดงออกของยีน *MC4R* ของสมองแต่ละส่วนที่แตกต่างกันในปลา goldfish ปลา rainbow trout ปลา fugu และปลา seabass (Cerda-Reverter et al., 2003; Haitina et al., 2004; Klovins et al., 2004; Sanchez et al., 2009) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกใน สมองส่วน telencephalon, สมองส่วน diencephalon และสมองส่วน mesencephalon ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *MC4R* ในปลา goldfish ปลา rainbow trout และปลา fugu (Cerda-Reverter et al., 2003; Haitina et al., 2004; Klovins et al., 2004) แต่การแสดงออกของ mRNA ของยีน *MC4R* ในสมองส่วน metencephalon และ pituitary gland มีผลที่ขัดแย้งกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *MC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีความแตกต่างกันตามชนิดของปลากระดูกแข็ง

จากผลการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ ยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ พบว่า mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในทุกอวัยวะของปลาสลิด ซึ่งจากการรวบรวมเอกสารพบว่าปลาแต่ละชนิดมีการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่อวัยวะแตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 5.1) ซึ่งในการศึกษานี้มีการนำปลาสลิดที่โตเต็มที่มาทำการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ จึงมีผลทำให้ mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในทุกอวัยวะของปลาสลิด และมีระดับการแสดงออกแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *MC4R* ในปลา zebrafish ที่โตเต็มวัยกลับให้ผลการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่ขัดแย้งกัน ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีน *MC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา rainbow trout ปลา fugu ปลา seabass ปลา goldfish และปลา lamprey (Cerda-Reverter et al., 2003; Haitina et al., 2004; Haitina et al., 2007; Klovins et al., 2004; Scnchez et al., 2009) ไม่มีการบ่งชี้ว่าปลาที่นำมาศึกษามีการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะใด ดังนั้นจึงมีหลักฐานไม่เพียงพอต่อการสรุปว่าความหลากหลายของการแสดงออกของ MC4R ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาเกิดจากปลาที่นำมาศึกษามีการเจริญเติบที่ระยะแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามถึงแม้ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *TpMC4R* มีความคล้ายคลึงกันและมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันกับยีน *MC4R* ของไก่ (Takeuchi and Takahashi, 1998) และปลาชนิดต่าง ๆ แต่จะมีการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่แตกต่างกันในอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งจากความหลากหลายของการ

แสดงออกของยีน *MC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ จะบ่งบอกถึงคุณลักษณะของความหลากหลายของการทำหน้าที่ทางกายภาพตามการแสดงออกของยีน *MC4R* ในอวัยวะที่แตกต่างกันไป

5.2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหาร (daily feeding) ของการกินอาหารปกติ และผลของการอดอาหาร (fasting period) ระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R*

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของสมองแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, สมองส่วน Mesencephalon, สมองส่วน Metencephalon และสมองส่วน Diencephalon ซึ่งพบว่าในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับสูงในช่วงเวลาต่าง ๆ และระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* จะลดลงเมื่อที่เวลา 1 ชั่วโมง ก่อนอาหารเย็น (15.00 น.) ซึ่งโดยปกติปลาสลิดกินอาหารในมื้อเช้าเวลา 10.00 น. และมื้อเย็นเวลา 16.00 น. ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *MC4R* ในช่วงวงรอบของการกินต่อวันยังมีการศึกษาอยู่น้อย แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีรายงานการศึกษารูปแบบของการแสดงออกของยีน neuropeptide ในสมองส่วน hypothalamus ได้แก่ ยีน *AgRP, Cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART), Leptin receptor (LR), Melanin concentrating hormone (MCH), Neuropeptide Y (NPY), Orexin* และ *POMC* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรหรือระบบที่เกิดขึ้นเป็นช่วง ๆ ช่วงละ 24 ชั่วโมง (circadian rhythm) และมีความเกี่ยวข้องกับสภาวะของการได้รับอาหาร (Saper, Lu, Chou, and Gooley, 2005; Stutz, Staszkiewicz and Ptitsyn, 2007) ซึ่งยีน *MC4R* มีการแสดงออกในสมองส่วน hypothalamus เป็นหลัก ดังนั้นยีน *TpMC4R* น่าจะมีความสัมพันธ์กับวงรอบของการกินอาหารในช่วงวันของปลา (circadian rhythm)

นอกจากนี้ลักษณะของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *MC4R* ยังมีความสัมพันธ์กับสภาวะของอาหาร ในการศึกษาครั้งนี้มีการศึกษาปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหาร 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ของสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, สมองส่วน Mesencephalon, สมองส่วน Metencephalon และสมองส่วน Diencephalon ซึ่งพบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน และที่เวลาการอดอาหาร 6 ชั่วโมงมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งเป็นช่วงเวลาอาหารเย็น (16.00 น.) ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีผลสอดคล้องกันกับระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ที่ลดลงในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนอาหารเย็น (15.00 น.) และมี

การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาของการอดอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลสอดคล้องกับผลงานการศึกษาของ Higgins et al. (2010) ที่ได้มีการศึกษาผลการแสดงออกของยีน *MC4R* ในไก่ที่อยู่ในสภาวะการอดอาหาร ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *MC4R* เพิ่มขึ้นเมื่อมีช่วงเวลาการอดอาหารที่เพิ่มขึ้นถึง 48 ชั่วโมง ในปลา brafin flounder ในสภาวะการอดอาหารไม่มีผลต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *MC4R* ในสมอง แต่มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ mRNA ของยีน *MC4R* ในตับ (Kobayashi et el., 2008) โดยทั่วไปปลาจะมีช่วงเวลาของการอดอาหารตามธรรมชาติ เช่นในช่วงฤดูการผสมพันธุ์ การอพยพย้ายถิ่น และในช่วงฤดูหนาว เมื่อปลามีการอดอาหารก็จะมีผลต่อการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของ เมตาบอลิซึมโดยลักษณะของการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมจะขึ้นอยู่กับชนิดของปลา จากการศึกษาผลการอดอาหารในปลาสลิด พบว่าปลาสลิดที่มีการอดอาหารเป็นระยะเวลานานจะมีระดับของกลูโคสในเลือดลดลงซึ่งชี้ให้เห็นว่าจากการที่ปลาสลิดมีการอดอาหารเป็นระยะเวลานานจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมในร่างกายของปลาสลิด สมองเป็นอวัยวะที่มีการใช้กลูโคสมากที่สุด ซึ่งในระหว่างการอดอาหารอาจมีผลในทางตรงหรือทางอ้อมต่อการทำงานของร่างกายปลาต่อกระบวนการสลายไกลโคเจน การสังเคราะห์กลูโคส และการสลายไขมัน นอกจากนี้สภาวะการอดอาหารที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *MC4R* อาจมีผลเชื่อมโยงต่อการแสดงออกของยีนหลายยีน ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงการรักษาสมดุลของพลังงานและการอยากอาหารนั้นจะถูกควบคุมโดยการทำงานร่วมกันระหว่างยีน *leptin* และการส่งสัญญาณของ melanocortin (Bertile and Raclot, 2006) ซึ่ง leptin จะถูกผลิตมาจาก adipose tissue เป็นหลัก ซึ่งมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของพลังงาน ซึ่งมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น ยีน *POMC* ในระบบประสาท (Schartz et al., 1997) และยีน *MC4R* (Dridi et al., 2005)

5.3 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด และการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

5.3.1 การศึกษาผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด

จากการทดสอบระดับการฉีด MC4R antagonist ที่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ของปลาสลิด พบว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 μg/kg มีผลการกินได้มากกว่าการฉีด HS024 ที่ระดับอื่น ๆ และมีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นหลังจากเวลาที่มีการฉีดเพิ่มขึ้น ในกลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1 μg/kg, 0.5 μg/kg, 10 μg/kg, 25 μg/kg, 50 μg/kg และ 100 μg/kg มีผลการกินได้ที่น้อยกว่าปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงทำให้ทราบว่าการฉีด MC4R antagonist ในระดับที่สูงเกินไปจะมีผลทำให้ปลาสลิดมีการกินได้สะสมที่ที่น้อยลง เช่นเดียวกับการ

ฉีด MC4R antagonist (HS014 และ SH9119) เข้าในสมองของหนู พบว่าเมื่อมีการเพิ่มระดับ (dose) การฉีดจะมีผลทำให้หนูมีการกินลดลง (Kash et al., 1998) ปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 0.1 μg/kg มีการกินได้ที่ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสลิดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ และปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 5 μg/kg มีการกินได้ที่ไม่แตกต่างจากปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และปลาสลิดในกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาบทบาทการทำหน้าที่ของ MC4R ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด โดยการฉีด HS024 1 μg/kg และ 3 μg/kg เข้าโคนครีบหลังของปลาสลิด พบว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 3 μg/kg มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสลิดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ และปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 μg/kg มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 6 ถึงแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะเห็นได้ว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 มีแนวโน้มต่อการเพิ่มการกินได้ ซึ่ง HS024 มีผลในการกระตุ้นการกินได้ตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 3 และ 4 หลังจากการฉีด MC4R antagonist เช่นเดียวกับรายงานการทดลองของ Cerda-Reverter et al. (2003) ในปลา goldfish ที่มีการฉีด MC4R antagonist (HS024) เข้าทางสมอง ที่ระดับ 1.6 nmol และ 3.2 nmol มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการฉีด 4 ชั่วโมง นอกจากนี้ในหนูที่มีการฉีด MC4R antagonist (HS014, HS024 และ SH9119) เข้าทางสมอง ทำให้หนูมีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการฉีด 3 และ 4 ชั่วโมง (Kash et al., 1998) และในนก ring dove ที่มีการฉีด MC4R antagonist (HS014) เข้าทางสมอง ทำให้นก ring dove มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ หลังจากการฉีด 4 ชั่วโมง (Strader et al., 2003) ซึ่งจากผลการศึกษา HS024 ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการกินได้ของปลาสลิด เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Schioth et al. (2003) ในหนูที่มีการฉีด MC4R antagonist (HS131) เข้าในช่องท้อง พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ นอกจากนี้ในหนูที่มีการฉีด MC4R antagonist เข้าใต้ผิวหนังที่ระดับ 1 mg/kg จะมีผลต่อการเพิ่มการกินได้หลังจากมีการฉีด 2 ชั่วโมง และมีผลการกินได้ที่ลดลงเมื่อมีระยะเวลาหลังจากการฉีดเพิ่มขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว HS024 มีผลต่อการกินได้ที่ไม่ชัดเจน ซึ่งในทั้งนี้อาจเกิดได้จาก 2 สาเหตุ คือ 1) HS024 ไม่สามารถจับกับ MC4R ในปลาสลิดได้ จึงมีผลทำให้ HS024 ไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ในปลาสลิด และ 2) จากการฉีด HS024 เข้าไปในกล้ามเนื้อของปลาสลิด มีผลทำให้ HS024 ไปจับกับ MC4R ที่อยู่ในอวัยวะต่าง ๆ จึงอาจมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบการทำงานต่างๆ ภายในร่างกายปลาสลิด ซึ่งอาจส่งผลต่อการกินได้ จึงมีผลทำให้การฉีด HS024 มีผลต่อการกินได้ที่ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาต่อไป คือการศึกษาผลของการใช้ HS024 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองของปลาสลิด โดยมีการตั้งสมมุติฐานว่า ถ้า HS024 สามารถจับกับ MC4R ในปลาสลิดได้ ก็น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองของปลาสลิด

5.3.2 การศึกษาผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

จากการศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง โดยวิธีการฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อ พบว่าหลังจากการฉีด HS024 4 ชั่วโมง ปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 3 μg/kg มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงที่สุด หลังจากการฉีด HS024 ในชั่วโมงที่ 8 พบว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 μg/kg มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงกว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 3 μg/kg แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของปลาสลิดในกลุ่มควบคุม และกลุ่มปลาสลิดที่มีการฉีด 0.9% saline และจากการศึกษาระดับของการใช้ HS024 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง โดยวิธีการแช่สมองในสาร HS024 ที่ระดับต่าง ๆ พบว่าสมองของปลาสลิดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 1 nmol และ 10 nmol เป็นเวลา 4 ชั่วโมงมีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงกว่าการแสดงออก mRNA ของยีน *TpMC4R* ของสมองปลาสลิดที่แช่ใน buffer และสมองที่แช่ใน HS024 ความเข้มข้น 0.1 nmol ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่า HS024 สามารถจับกับ MC4R ในปลาสลิดได้ ดังนั้นผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ของปลาสลิด อาจเกิดจาก HS024 ไปจับกับ MC4R ในอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกายของปลาสลิด จึงมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อการกินได้ ซึ่งทำให้การฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อมีผลต่อการกินได้ในปลาสลิดที่ไม่ชัดเจน

บทที่ 6
สรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุป

1. จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทป์ของ cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *TpMC4R* ในปลาสลิดมีความยาวเท่ากับ 1311 bp ประกอบไปด้วย ORF 984 bp กรดอะมิโนเท่ากับ 327 residues, 5’ UTR มีนิวคลีโอไทป์เท่ากับ 17 bp และ 3’ UTR เท่ากับ 310 bp ลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ อยู่ในช่วง 61-90% และมีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ TM ของ TpMC4R คล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ TM ของ MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังอยู่ในระดับ 61-100% จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของยีน TpMC4R ในปลาสลิด พบว่าโปรตีน TpMC4R มีกรดอะมิโนหลายตำแหน่งที่เป็นลักษณะสำคัญต่อการทำหน้าที่ของยีน *MC4R* ดังนั้นโปรตีน TpMC4R ก็จะมีความสามารถในการจับกับ MSH เช่นเดียวกับ MC4R ในปลามีกระดูกแข็ง เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่ายีน *TpMC4R* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และยีน *TpMC4R* มีค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับปลากระดูกแข็งมากที่สุด

ยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในทุกระยะของการพัฒนาการตัวอ่อนของปลาสลิด ได้แก่ ระยะ 5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากได้ที่มีการวางไข่ของปลาสลิด รวมไปถึงไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิก็มีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ด้วยเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *TpMC4R* นั้นเป็นยีน maternal ที่มีการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก และการแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในสมองทุกส่วนและในทุกอวัยวะของปลาสลิด ซึ่งอวัยวะที่มีการแสดงออกมากที่สุดคือในสมองทุกส่วนและในอัณฑะ (testis) อวัยวะที่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับปานกลาง คือ เหงือก (gill), ตับ (liver), ไตส่วนบน (head kidney), ไตส่วนล่าง (trunk kidney), ลำไส้ (intestine), กล้ามเนื้อ (muscle) และ รังไข่ (ovary) อวัยวะที่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำ คือ กระเพาะอาหาร (stomach) และอวัยวะที่มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำที่สุด คือ ม้าม (spleen)

2. จากการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของสมองในแต่ละส่วนของปลาสลิด ซึ่งโดยปกติปลาสลิดกินอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ 10.00 น. และ

16.00 น. พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่เวลา 1 ชั่วโมงก่อนอาหารเย็นมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *TpMC4R* มีการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน และจากการศึกษาผลของการอดอาหารระยะสั้นที่มีการอดอาหารปลาสลิดเป็นเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งเวลาการอดอาหาร 6 ชั่วโมงมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำและมีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาของการอดอาหารเพิ่มขึ้น

3. ปลาสลิดที่มีการฉีด MC4R antagonist (HS024) 3 μg/kg มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 3 หลังจากการฉีด HS024 และในปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 1 μg/kg มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 6 หลังจากมีการฉีด ถึงแม้จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะเห็นได้ว่าปลาสลิดที่มีการฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อมีแนวโน้มการกินได้ที่เพิ่มในปลาสลิด และHS024 มีผลต่อการกระตุ้นการกินได้ตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 3 และ 6

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในข้างต้นสามารถนำข้อมูลจากการศึกษานี้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยในอนาคตได้ ซึ่งสามารถศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *MC4R* ในปลาชนิดอื่น ๆ เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิต และสามารถทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ในปลาชนิดอื่น ๆ ได้ อีกทั้งยังสามารถใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน *TpMC4R* ไปใช้เป็นส่วนหนึ่ง ในการศึกษา polymorphism ของยีน *MC4R* ในปลาสลิด ซึ่ง polymorphism นั้นมีหน้าที่ต่อการกินได้ในปลาสลิด ซึ่งอาจจะพัฒนาในการใช้ยีน *MC4R* เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ปลาสลิดได้ แต่อย่างไรก็ตามในการควบคุมการกินและการรักษาสมดุลของพลังงานจะเกี่ยวข้องกับบทบาทการทำหน้าที่หลายยีน ยกตัวอย่างเช่น ยีน *POMC*, *leptin*, *AgRP* ซึ่งต่างก็มีบทบาทต่อการควบคุมการกินได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการทำหน้าที่และการแสดงออกของ mRNA ของยีน *POMC*, *leptin*, *AgR*P เพิ่มเติม เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์การทำหน้าที่ของยีน *MC4R* ร่วมกับยีนอื่น ๆ ต่อการควบคุมการกิน และการรักษาสมดุลของพลังงานในปลาหรือในสัตว์

รายการอ้างอิง

กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.fisheries.go.th/it-stat/

บุญยรัตน์ จันทร์สว่าง. (2523). ชีวประวัติของปลาสลิด. **สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติกรมประมง**. 8: 1-30.

ประเทือง เชาว์วันกลาง. (2536). การเลี้ยงปลาน้ำจืด. **กรุงเทพฯ ฟิสิกส์เซ็นเตอร์**.

สุปราณี ชินบุตร. (2515-2516). ชีววิทยาของปลาสลิด. **รายงานประกอบวิชา Zoology บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาเกษตรศาสตร์**. 1-35.

อาคม ชุ่มธิ. (2548). การเพาะเลี้ยงปลาสลิด. **กรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์**. 1-32.

Adan, R. A. H. and Gispen, W. H. (2000). Melanocortins and the brain: From effects via receptors to drug targets. **Eur. J. Pharmacol**. 405: 13-24.

Adan, R. A. H. and Kas, M. J. H. (2003). Inverse agonism gains weight. **Trends in pharmacological sciences**. 24: 315-320.

Argiolas, A., Melis, M. R., Murgia, S. and Schioth, H. B. (2000). ACTH- and α-MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. **Brain Res. Bull**. 51**:** 425–434.

Baile, C.A. and Della-Fera, M.A. (2009). The future of feed intake regulation research. **Journal of animal science**. 79: E171-E179.

Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R. A., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C., Mountjoy K., Kishi, T., Elmquist, J. K. and Lowell, B. B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. **Cell journal**. 123: 493–505.

Barb, C. R., Robertson, A. S., Barrett, J. B., Kraeling, R. R. and Houseknecht, K. L. (2004). The role of melanocortin-3 and-4 receptor in regulating appetite, energy homeostasis and neuroendocrine function in the pig. **J. Endocrinol**. 181: 39-52.

Bertile, F. and Raclot, T. (2006). The melanocortin system during fasting. **Peptides**. 27: 291-300.

Cerda-Reverter, J. M., Ringholm, A., Schioth, H. B. and Peter, R. E. (2003). Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: Involvement in the control of food intake. **Endocrinology**. 144(6): 2336-2349.

Chaki, S. and Okuyama, S. (2005). Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. **Peptides**. 26: 1952-1964.

Dridi, S., Swennen, Q., Decuypere, E. and Buyse, J. (2005). Mode of leptin action in chicken hypothalamus. **Brain Res**. 1047: 214-223.

Giraudo, S. Q., Billington, C. J. and Levine, A. S. (1998). Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. **Brain Reseaech**. 809: 302-306.

Haitina, T., Klovins, J., Andersson, J., Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Larhammar, D., Larson, E. T. and Schioth, H. B. (2004). Cloning, tissue distribution, pharmacology and three-dimensional modeling of melanocortin receptors 4 and 5 in rainbow trout suggest close evolutionary relationship of these subtypes. **Biochemical Jornal**. 380: 475-486.

Haitina, T., Klovins, J., Takahashi, A., Lowgren, M., Ringholm, A., Enberg, J., Kawauchi, H., Larson, E. T., Fredriksson, R. and Schioth, H. B. (2007). Functional characterization of two melanocortin (MC) receptors in lamprey showing orthology to the MC1 and MC4 receptor subtypes. **BMC Evol. Biol**. 7: 14 p.

Harrold, J. A., Widdowson, P. S. and Williams, G. (1999). Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4 (MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptor in specific hypothalamic regions further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhitor of feeding. **Diabetes**. 48: 267-271.

Higgins, S.E., Ellestad, L.E., Trakooljul, N., McCarthy, F., Saliba, J., Cogburn, L.A. and Porter, T. E. (2010). Transcriptional and pathway analysis in the hypothalamus of newly hatched chicks during fasting and delayed feeding. **BMC Genomics**. 11: 17 p.

Huang, M., Gao, X., Li, J. Y., Ren, H. Y., Chen, J. B. and Xu, S. Z. (2010). Polymorphisms in MC4R gene and correlations with economic traits in cattle. **Mol. Biol. Rep**. 37: 3941–3944.

Huang, Y., Wang, Y., He, D. and Liu, Y. (2010). Genetic diversity of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene and its association with slaughter traits in the Landes goose. **Biochem. Genet**. 48: 944–953.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Irani, B. G. and Haskell-Luevano, C. (2005). Review Feeding effects of melanocortin ligands-A historical perspective. **Peptides**. 26: 1788–1799.

Jonsson, L., Skarphedinsson, J. O., Skuladottir, G. V., Watanobe, H. and Schioth, H. B. (2002). Food conversion is transiently affected during 4-week chronic administration of melanocortin agonist and antagonist in rats. **J. Endocrinol**. 173: 517-523.

Kas, M. J. H., Dijk, G. V., Scheurink, A. J. W. and Adan, R. A. H. (2003). Agouti-related protein prevents self-starvation. **Molecular Psychiatry**. 8: 235–240.

Kask, A., Pahkla, R., Lrs, A., Rago, L., Wikberg, J. E. S. and Schioth, H. B. (1999). Long-term administration of MC4 receptor antagonist HS014 causes hyperphagia and obesity in rats. **Neuroreport**. 10: 707-711.

Kask, A., Mutulis, F., Muceniece, R., Pahkla, R., Mutule, I., Wikberg, J. E. S., Rago, L. and Schioth, H. B. (1998). Discovery of a novel superpotent and selective melanocortin 4 receptor antagonist (HS014): Evaluation *in Vitro* and *in Vitro*. **Endocrinology**. 139: 5006-5014.

Kawauchi, H. and Baker, B. I. (2004). Review Melanin-concentrating hormone signaling systems in fish. **Peptides**. 25: 1577-1584.

Kim, K. S., Larsen, N., Short, T., Plastow, G. and Rothschild, M. F. (2000). A missense variant of the procine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. **Mammalian genome**. 11: 131-135.

Kim, K. S., Reecy, J. M., Hsu, W. H., Anderson, L. L. and Rothschild, M. F. (2004). Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pig. **Domestic animal endocrinology**. 26: 75-86.

Kim, K. S., Lee, J .J., Shin, H. Y., Choi, B. H., Lee, C. K., Kim, J. J., Cho, B. W. and Kim, T.-H. (2006). Association of melanocortin 4 receptor (*MC4R*) and high mobility group AT-hook 1 (*HMGA1*) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits. **Animal genetic**. 37: 419-421.

Klovins, J., Haitina, T., Fridmanis, D., Kilianova, Z., Kapa, I., Fredriksson, R., Gallo-Payet, N. and Schioth, H. B. (2004). The melanocortin system in Fugu: determination of POMC/AGRP/ MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs. **Mol. Biol. Evol.** 21: 563–579.

Kobayashi, Y., Tsuchiya, K., Yamanome, T., Schiooth, H. B., Kawauchi, H. and Takahashi, A. (2008).

Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri*. **General and Comparative Endocrinology**. 155: 280-287.

Lagerstrom, M. C., Klovins, J., Fredriksson, R., Fridmanis, D., Haitina, T., Ling, M. K., Berglund, M. M. and Schioth, H. B. (2003). High affinity agonistic metal ion binding sites within the melanocortin 4 receptor illustrate conformational change of transmembrane region 3. **J. Biol. Chem.** 278: 51521-51526.

Lasaga, M., Debeljuk, L., Durand, D., Scimonelli, T. N. and Caruso, C. (2008). Review Role of α-melanocyte stimulating hormone and melanocortin 4 receptor in brain inflammation. **Peptides**. 29: 1825-1835.

Lee, E. J., Lee, S. H., Jung, J. W., Lee, W., Kim, B. J., Park, K.W., Lim, S. K., Yoon, C. J. and Baik, J. H. (2001). Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription and ligand selectivity by MC3R and MC4R melanocortin receptors. **Eur. J. Biochem**. 268: 582-591.

Logan, D. W., Bryson-Richardson, R. J., Taylor, M. S., Currie, P. and Jackson, I. J. (2003). Sequence characterization of teleost fish melanocortin receptors. **The melanocortin system**. 994: 319-330.

Metz, J. R., Peters, J. J. M. and Flik, G. (2006). Molecular biology and physiology of the melanocortin system in fish: A review. **General and Comparative Endocrinology**. 148: 150-162.

Metz, J. R., Geven, E. J. W., Vanden Burg, E. H. and Flik, G. (2005). ACTH, α-MSH and control of cortisol release: cloning, sequencing and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*. **Am. J. Physiol**. 289: R814–R826.

Oosterom, J., Nijenhuis, W. A. J., Schaaper, W. M. M., Slootstra, J., Meloen, R. H., Gispen, W. H. H., Burbach, J. P. H. and Adan, R. A. H. (1999). Conformation of the core sequence in melanocortin peptides directs selectivity for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. **J. Biol. Chem.** 274: 16853-16860.

Peng, P. J., Sahm, U.G., Doherty, R. V. M., Kinsman, R. G., Moss, S. H. and Pouton, C.W. (1997). Binding and biological activity of C-terminally modified melanocortin peptides: a comparison between their actions at rodent MC1 and MC3 receptors. **Peptides.** 18: 1001-1008.

Rees J. L. (2003). Genetics of hair and skin color. **Annu. Rev. Genet**. 37: 67-90.

Ringholm, A., Fredriksson, R., Poliakova, N., Yan, Y.-L., Postlethwait, J. H., Larhammar, D. and Schioth, H. B. (2002). One melanocortin 4 and two malanocortin 5 receptors from zebrafish

show remarkable conservation in structure and pharmacology. **Jornal of Neurochemistry**. 82: 6-18.

Ringholm, A., Klovins, J., Fredriksson, R., Poliakova, N., Larson, E.T., Kukkonen, J. P., Larhammar, D. and Schiöth, H. B. (2003). Presence of melanocortin (MC4) receptor in spiny dogfish suggests an ancient vertebrate origin of central melanocortin system. **Eur. J. Biochem**. 270: 213-221.

Sahm, U. G., Olivier, G. W. J., Branch, S. K., Moss, S. H. and Pouton, C.W. (1994). Synthesis and biological evaluation of alpha-MSH analogs substituted with alanine. **Peptides.** 15**:** 1297–1302.

Saito, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. **Mol Bio Evol**. 4: 406-425.

Sanchez, E., Rubio, V. C., Thompson, D., Metz, J., Flik, G., Millhauser, G. L. and Cerda-Reverter, J. M. (2009). Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass *(Dicentrarchus labrax*). **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. 296: R1293–R1306.

Saper, C. B., Lu, J., Chou, T. C. and Gooley, J. (2005). The hypothalamic integrator for circadian rhythms. **Trends Neurosci**. 28: 152-157.

Schioth, H. B., Haitina, T., Fridmanis, D. and Klovins, J. (2005). Unusual genomic structure: Melanocortin rceptors in *Fugu*. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 1040: 460–463.

Schioth, H. B., Kask, A., Mutulis, F., Muceniece, R., Mutule, Ilg., Mutule, Ilz., Mandrika, I. and Wikberg, J. E. S. (2003). Novel selective melanocortin 4 receptor antagonist induces food intake after peripheral administration. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 301: 399-405.

Schjolden, J., Schioth, H. B., Larhammar, D., Winberg, S. and Larson, E. T. (2008). Melanocortin peptides affect the motivation to feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Gen. Comp. Endocrinol**. 160: 134-138.

Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P. and Baskin, D. G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. **Diabetes**. 46: 2119-2123.

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Jr, D. P., Seeley, R. J. and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. **Nature.** 404: 661-671.

Shinyama, H., Masuzaki, H., Fang, H. and Flier, J. S. (2003). Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: Agonist-mediated desensitization and internalization. **Endocrinology**. 144: 1301-1314.

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: (ค่าเริ่มต้น) AngsanaUPC, 16 พ., ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: AngsanaUPC, 16 พ., ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: (ค่าเริ่มต้น) AngsanaUPC, 16 พ., แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: AngsanaUPC, 16 พ.

Srinivasan, S., Lubrano-Berthelier, C., Govaerts, C., Picard, F., Santiago, P., Conklin, B. R. and Vaisse, C. (2004). Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. **J. Clin. Invest**. 114: 1158-1164.

Strader, A. D., Schioth, H. B. and Buntin, J. D. (2003). The role of melanocortin system and the melanocortin-4 receptor in ring dove (*Streptopelia risoria*) feeding behavior. **Brain Research**. 960: 112-121.

Stutz, A. M., Staszkiewicz, J., Ptitsyn, A. and Argyropoulos, G. (2007). Circadian expression of genes regulating food intake. **Obesity**. 15: 607-615.

Takeuchi, S. and Takahashi, S. (1998). Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. **Gen. Comp. Endocrinol**. 112: 220-231.

Tan, K., Pogozheva, I. D., Yeo, G. S. H., Hadaschik, D., Keogh, J. M., Haskell-Leuvano, C., O'Rahilly, S., Mosberg, H. I. and Sadaf Farooqi, I. (2009). Functional characterization and structural modeling of obesity associated mutations in the melanocortin 4 receptor. **Endocrinology**. 150: 114-125.

Tarnow, P., Schoneberg, T., Krude, H., Gruters, A. and Biebermann, H. (2003). Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. **J. Biol. Chem**. 278: 48666-48673.

Tucci, F. C., White, N. S., Markison, S., Joppa, M., Tran, J. A., Fleck, B. A., Madan, A., Dyck, B. P., Parker, J., Pontillo, J., Arellano, M., Marinkovic, D., Jiang, W., Chen, C. W., Gogas, K. R., Goodfellow, V. S., Saunders, J., Foster, A. C. and Chen, C. (2005). Potent and orally active non-peptide antagonists of the human melanocortin-4 receptor based on a series of *trans*-2-disubstituted cyclohexylpiperazines. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. 15: 4389-4395.

Van der Ploeg, L. H. T., Martin, W. J., Howard, A. D., Nargund, R. P., Austin, C. P., Guan, X., Drisko, J., Cashen, D., Sebhat, I., Patchett, A. A., Figueroa, D. J., DiLella, A. G., Connolly, B. M., Weinberg, D. H., Tan, C. P., Palyha, O. C., Pong, S. S., MacNeil, T., Rosenblum, C., Vongs, A., Tang, R., Yu, H., Sailer, A.W., Fong, T. M., Huang, C., Tota, M. R., Chang, R. S., Stearns, R., Tamvakopoulos, C., Christ, G., Drazen, D. L., Spar, B. D., Nelson, R. J. and Maclntyre, D.E. (2002). A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 99: 11381-11386.

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: (ค่าเริ่มต้น) AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: (ค่าเริ่มต้น) AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: (ค่าเริ่มต้น) AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: (ค่าเริ่มต้น) AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ ตัวหนา

จัดรูปแบบ: แบบอักษร: (ค่าเริ่มต้น) AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ตัวหนา, แบบอักษรภาษาไทยและภาษาอื่นๆ: AngsanaUPC, 16 พ., ไม่ ตัวหนา

Van der Salm, A.L., Metz, J. R., Wendelaar Bonga, S. E. and Flik, G. (2005). Alpha-MSH, the melanocortin-1 receptor and background adaptation in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Gen. Comp. Endocrinol**. 144: 140–149.

Xuemei Q., Ning L., Xuemei D., Xingbo Z., Qingyong M. and Xiuli W. (2006). The single nucleotide polymorphisms of chicken melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene and their association analysis with carcass traits. **Life Sciences**. 49: 560-566.

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB plate (100 ml)

ประกอบด้วย	NaCl	1 g
	Tryptone	1 g
	Yeast extract	0.5 g
	Agar	1.5 g

ใส่น้ำ DI 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave จากนั้นทำการเท plate

2. 2XYT plate (100 ml)

ประกอบด้วย	NaCl	0.5 g
	Tryptone	1.6 g
	Yeast extract	1 g
	Agar	1.5 g

ใส่น้ำ DI 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave หลังจากนั้นวางรอให้อุ่น ๆ แล้วใส่ IPTG 100 µl, X-gal 100 µl และ ampicillin 100 µl ผสมสารละลายให้เข้ากันและทำการเท plate

3. SOB (60 ml)

ประกอบด้วย	NaCl	0.0351 g
	Tryptone	1.2 g
	Yeast extract	0.3 g
	KCl	0.0111 g

ใส่น้ำ DI 60 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave หลังจากนั้นวางรอให้อุ่น ๆ แล้วใส่ 1 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 600 µl, 1 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 600 µl ผสมสารละลายให้เข้ากัน (หากต้องการเตรียมสาร SOC มีกระบวนการและส่วนประกอบเหมือนกับ SOB ยกเว้นจะต้องมีการใส้สาร 2 M glucose 600 µl)

การเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์

1. การเตรียม Holtfreter's solution buffer (2 L)

ประกอบด้วย	NaCl	7.0 g
	Sodium bicarbonate	0.4 g
	$CaCl_2$ anhydrous	0.2 g
	หรือ $CaCl_2 \cdot H_2O$	0.24 g
	KCl	0.1 g

หลังจากนั้นทำการละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI) จำนวน 2 ลิตร

2. TE buffer (10 ml)

ประกอบด้วย	1 M Tris-HCl, pH 7.5	0.1 ml
	0.5 M EDTA	0.02 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 ml ด้วยน้ำ DI

3. สาร Solution I (2 ml)

ประกอบด้วย	25% sucrose	0.8 ml
	1 M Tris-HCl, pH 8	0.05 ml
	0.5 M EDTA	0.04 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 2 ml ด้วยน้ำ DI

4. สาร Solution II (2 ml)

ประกอบด้วย	25% sucrose	0.8 ml
	25% SDS	0.16 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 2 ml ด้วยน้ำ DI

5. สาร Solution III (สาร 3 M potassium acetate pH 5.2) (100 ml)

ชั่งสาร potaaium acetate 29.46 g ละลายในน้ำ DI 60 ml เติม glacial acetic acid 11.5 ml และใส่น้ำ DI 28.5 ml

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. สาร transformation buffer (100 ml)

ประกอบด้วย	PIPES	0.3 g
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.22 g
	KCl	1.86 g

ใส่น้ำ DI (ที่ผ่านการ autoclave ฆ่าเชื้อแล้ว) 80 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับ pH ให้เท่ากับ 6.7-6.8 ด้วย 5 N KOH และใส่ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.09 g หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 ml ด้วยน้ำ DI และทำการ sterilization ด้วยการกรอง

7. การเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ β-actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน MC4R ในอวัยวะต่างๆ ซึ่งมีการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ MC4R ด้าน 3' UTR ของปลาสลิด (p3-MC4R) และพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ β-actin ด้าน 3' UTR ของปลาสลิด (p-Actin) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและทำการเจือจางดีเอ็นเอ

<u>การเจือจางความเข้มข้น p3-MC4R</u>

p3-MC4R	มีความเข้มข้น	353.4 ng/μl
MC4R 3'UTR	มีขนาดเท่ากับ	1060 base pair (bp)
pGEM T easy vector	มีขนาดเท่ากับ	3015 bp
ดังนั้น p3-MC4R	มีขนาดเท่ากับ	<u>4075 bp</u>

ต้องการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 10^{10} copies/μl โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 10 เท่า สุดท้ายเมื่อเตรียมอยู่ในปริมาตร 100 μl สารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{10} copies/μl

ซึ่งดีเอ็นเอ 1 bp	มีน้ำหนักเท่ากับ	1.1×10^{-15} μg
ดังนั้น p3-MC4R	1 copies มีน้ำหนัก	$= 4075$ bp $\times 1.1 \times 10^{-15}$ μg
		$= 4.4825 \times 10^{-12}$ μg
ถ้า p3-MC4R	10^{10} copies มีน้ำหนัก	$= 4.4825 \times 10^{-12} \times 10^{10}$ μg
		=44.825 ng/μl

ดังนั้นถ้าต้องการเตรียม p3-MC4R มีความเข้มข้น 10^{10} copies/μl ปริมาตร 100 μl

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$353.4 \text{ ng/μl} \times V_1 = 44.825 \text{ ng/μl} \times 100 \text{ μl}$$

$= \quad 12.6839 \sim 12.684\ \mu l$

ใส่น้ำ DI 87.316 µl (เพื่อปรับปริมตรให้เท่ากับ 100 µl) แล้วผสมให้สารละลายให้เข้ากัน

ทำการเจือจางความเข้มข้นของ p3-MC4R ให้เป็นความเข้มข้น 10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 copies/µl ตามลำดับ

<u>การเจือจางความเข้มข้น P-Actin</u>

P-Actin	มีความเข้มข้น	3105.2 ng/µl
β-actin	มีขนาดเท่ากับ	505 bp
pGEM T easy vector	มีขนาดเท่ากับ	3015 bp
ดังนั้น P-Actin	มีขนาดเท่ากับ	<u>3520 bp</u>

ต้องการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 10^{10} copies/µl โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 10 เท่า สุดท้ายเมื่อเตรียมอยู่ในปริมาตร 100 µl สารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{10} copies/µl

ซึ่งดีเอ็นเอ 1 bp	มีน้ำหนักเท่ากับ	$1.1\text{x}10^{-15}\ \mu g$
ดังนั้น P-Actin	1 copies มีน้ำหนัก	$= 3520\ bp \times 1.1 \times 10^{-15}\ \mu g$
		$= 3.872 \times 10^{-12}\ \mu g$
ถ้า P-Actin	10^{10} copies มีน้ำหนัก	$= 3.872 \times 10^{-12} \times 10^{10}\ \mu g$
		$= 38.72\ ng/\mu l$

ดังนั้นถ้าต้องการเตรียม P-Actin มีความเข้มข้น 10^{10} copies/µl ปริมาตร 100 µl

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$3105.2\ ng/\mu l \times V_1 = 38.72\ ng/\mu l \times 100\ \mu l$$

$$= 1.2469 \sim 1.25\ \mu l$$

ใส่น้ำ DI 98.72 µl (เพื่อปรับปริมตรให้เท่ากับ 100 µl) แล้วผสมให้สารละลายให้เข้ากัน

ทำการเจือจางความเข้มข้นของ P-Actin ให้เป็นความเข้มข้น 10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 copies/µl ตามลำดับ

ภาคผนวก ข

ตารางการวิเคราะห์ Melting curve และ การวิเคราะห์วาเรียนส์

การวิเคราะห์ Melting temperature (TM) curve

ตารางที่ ข. 1 ค่า Melting temperature (TM) curve ของยีน *TpMC4R* และยีน *β-Actin* ในอวัยวะต่าง ๆ

อวัยวะ	TM (^{o}C)	
	TpMC4R	β-Actin
Telencephalon	89.73	83.81
Metencephalon	89.69	83.90
Mesencephalon	89.63	83.73
Diencephalon และ pituitary gland	89.92	83.28
Gill	90.02	83.73
Liver	89.86	83.81
Head kidney	89.89	83.64
Trunk kidney	89.55	83.54
Stomach	89.89	83.82
Intestine	89.95	83.82
Muscle	89.93	84.12
Spleen	90.00	83.74
Ovary	89.83	83.31
Testis	89.88	83.31

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข. 2 ค่า Melting temperature (TM) curve ของดีเอ็นมาตรฐานยีน *TpMC4R* (p3-MC4R)

Standard	Concentration	TM (°C)
water	0	0
MC4R 10(4)	10000	90.92
MC4R 10(5)	100000	90.92
MC4R 10(6)	1000000	90.89
MC4R 10(7)	10000000	90.9
MC4R 10(8)	1E+08	90.89
MC4R 10(9)	1E+09	91.62

ตารางที่ ข. 3 ค่า Melting temperature (TM) curve ของดีเอ็นมาตรฐานยีน β*-Actin* (P-Actin)

Standard	Concentration	TM (°C)
Water	0	0
Actin 10(2)	100	84
Actin 10(3)	1000	83.78
Actin 10(4)	10000	83.89
Actin 10(5)	100000	83.66
Actin 10(6)	1000000	83.71
Actin 10(7)	10000000	83.72
Actin 10(8)	1E+08	83.74
Actin 10(9)	1E+09	83.79

การวิเคราะห์วาเรียนส์

1. การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ

ตารางที่ ข. 4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของอวัยวะ)	1.292	13	.099	19.106	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.219	42	.005		
Total	1.511	55			

2. การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหาร (Daily feeding) ของการกินอาหารปกติ

ตารางที่ ข. 5 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของสมองส่วน Telencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาระหว่างมื้ออาหาร)	.084	3	.028	12.537	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.036	16	.002		
Total	.119	19			

ตารางที่ ข. 6 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของสมองส่วน Mesencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาระหว่างมื้ออาหาร)	.074	3	.025	73.294	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.005	16	.000		
Total	.080	19			

ตารางที่ ข. 7 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของสมองส่วน Metencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาระหว่างมื้ออาหาร)	.077	3	.026	39.935	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.010	16	.001		
Total	.088	19			

ตารางที่ ข. 8 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของสมองส่วน Diencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาระหว่างมื้ออาหาร)	.072	3	.024	41.359	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.009	15	.001		
Total	.080	18			

3. การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหาร (Fasting period)

ตารางที่ ข. 9 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารของสมองส่วน Telencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาของการอดอาหาร)	.145	3	.048	5.752	.007
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.135	16	.008		
Total	.280	19			

ตารางที่ ข. 10 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารของสมองส่วน Mecencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาของการอดอาหาร)	.082	3	.027	7.580	.002
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.057	16	.004		
Total	.139	19			

ตารางที่ ข. 11 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารของสมองส่วน Metencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาของการอดอาหาร)	.033	3	.011	7.481	.002
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.024	16	.001		
Total	.057	19			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข. 12 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารของสมองส่วน Diencephalon

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ช่วงเวลาของการอดอาหาร)	.081	3	.027	49.659	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.009	16	.001		
Total	.089	19			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. การศึกษาผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด

ตารางที่ ข. 13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด

Hour	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	6.873	3	2.291	.482	.698
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	114.071	24	4.753		
	Total	120.944	27			
2h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	437.203	3	145.734	.733	.543
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	4774.523	24	198.938		
	Total	5211.726	27			
3h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	871.417	3	290.472	.461	.712
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	15130.239	24	630.427		
	Total	16001.655	27			
4h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	4812.774	3	1604.258	1.221	.324
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	31542.338	24	1314.264		
	Total	36355.112	27			

ตารางที่ ข. 13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด (ต่อ)

Hour	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
5h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	6006.946	3	2002.315	1.325	.289
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	36270.263	24	1511.261		
	Total	42277.209	27			
6h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	6177.640	3	2059.213	1.225	.322
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	40351.444	24	1681.310		
	Total	46529.085	27			
7h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	5737.781	3	1912.594	1.019	.402
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	45062.183	24	1877.591		
	Total	50799.965	27			
8h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	4909.744	3	1636.581	.740	.539
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	53068.255	24	2211.177		
	Total	57977.999	27			
9h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	4581.469	3	1527.156	.735	.541
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	49861.378	24	2077.557		
	Total	54442.847	27			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข. 13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสลิด (ต่อ)

Hour	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
10h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	6408.630	3	2136.210	.914	.449
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	56123.428	24	2338.476		
	Total	62532.058	27			
11h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	7762.516	3	2587.505	.943	.435
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	65825.804	24	2742.742		
	Total	73588.320	27			
12h	Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	8273.520	3	2757.840	.974	.421
	Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	67942.723	24	2830.947		
	Total	76216.243	27			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. การศึกษาผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

ตารางที่ ข. 14 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากการฉีด 4 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	.002	3	.001	1.098	.373
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.012	20	.001		
Total	.014	23			

ตารางที่ ข. 15 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากการฉีด 8 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	.002	3	.001	1.998	.147
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.006	20	.000		
Total	.008	23			

ตารางที่ ข. 16 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากการฉีด 12 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ระดับการฉีด HS024)	.001	3	.000	1.915	.160
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.005	20	.000		
Total	.007	23			

6. การศึกษาผลของการแช่สมองในสาร MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

ตารางที่ ข. 17 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของการแช่สมองในสาร MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากการแช่ 2 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ระดับของการแช่ HS024)	.002	3	.001	2.486	.090
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.006	20	.000		
Total	.008	23			

ตารางที่ ข. 18 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของการแช่สมองในสาร MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากการแช่ 4 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ระดับของการแช่ HS024)	.617	3	.206	354.080	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	.012	20	.001		
Total	.629	23			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอารยา แจ้งไพร เกิดเมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดนครราชสีมา เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนบ้านวัดหลักร้อย และชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนโคราชพิทยาคม อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2549 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2550