รหัสโครงการ [SUT3-303-48-12-90]

รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนถ่ายยีนในปลาม้าลาย

(Transgenic Zebrafish)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ [SUT3-303-48-12-90]

รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนถ่ายยีนในปลาม้าลาย

(Transgenic Zebrafish)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2551

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยเรื่องการถ่ายยีนในปลานี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548 การทำการวิจัยในครั้งนี้ได้รับการเอื้อเฟื้อพื้นที่และอุปกรณ์พื้นฐานทางด้านวิทยาศาสตร์ในการทำการวิจัยจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F 3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี

การทำงานวิจัยในครั้งนี้ได้รับการร่วมมือในด้านการเลี้ยงปลาจากนักศึกษาบัณฑิตศึกษา ได้แก่ นางนงลักษณ์ พุ่มอยู่, นางสาวนฤมล ศรีดี, นางสาวคีญาภัทร กองร้อย และนางสาวอารยา แจ้งไพร

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้าแผนกประมง ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ให้การช่วยเหลือในการช่วยจัด ติดตั้งระบบอากาศในน้ำในตู้ปลา ทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวศิริวรรณ เพชรสมบัติ หัวหน้างานกลุ่มห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และ นายมานะ ชาญเวช พนักงานวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการ เทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรสถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร และคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของสาขาวิชาเทคโนลีการผลิตสัตว์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือ และสนับสนุนด้านต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้

บทคัดย่อ

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

Abstract

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

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ .....ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....ค
สารบัญ .....ง
สารบัญภาพ .....จ
สารบัญตาราง .....ฉ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....5
ขอบเขตของการวิจัย.....5
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....6
บทที่ 3 ผลการวิจัย
ผลการศึกษา.....17
อภิปรายผลการศึกษา 31
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย.....34
ปัญหาและอุปสรรค.....35
บรรณานุกรม.....37
ภาคผนวก.....41
ประวัติผู้วิจัย 48

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 การถ่ายยีนเข้าสู่ไข่ของปลาม้าลายที่ได้รับการผสมแล้วด้วยวิธี Microinjection.....9
ภาพที่ 2.2 ลำดับเบสของยีน GFP cDNA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....10
ภาพที่ 2.3 แผนภาพของ expression vector pAG.....11
ภาพที่ 2.4 สภาวะในการทำ Polymerase Chain Reaction เพื่อตรวจหา
ยีนโปรตีนสีเขียว (GFP gene).....13
ภาพที่ 2.5 สภาวะในการทำ Polymerase Chain Reaction เพื่อตรวจหา
ยีนแอคติน (actin cDNA).....15
ภาพที่ 3.1 การตรวจผลการเตรียม pAG และการวิเคราะห์ restriction enzyme map.....19
ภาพที่ 3.2 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งจะทำให้เห็นนิวเคลียส
ของเซลล์เป็นสีเขียวเข้ม.....20
ภาพที่ 3.3 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) แบบชั่วคราว
(transient GFP gene expression) ในปลาม้าลายที่อายุประมาณ 48 ชั่วโมง
หลังจากไข่ปลาได้รับการผสม.....21
ภาพที่ 3.4 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนหัว
ของลูกปลาม้าลาย.....22
ภาพที่ 3.5 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งเกิดขึ้นที่บริเวณลำตัวและ
ผิวหนังของ yolk sac ของลูกปลาม้าลายที่ระยะ 48 ชั่วโมงหลังจากไข่ปลา
ได้รับการผสม.....23
ภาพที่ 3.6 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งเกิดขึ้นที่บริเวณลำตัว
ส่วนหาง และครีบของลูกปลาม้าลายที่ระยะ 48 ชั่วโมงหลังจากไข่ปลา
ได้รับการผสม.....24
ภาพที่ 3.7 การตรวจผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR.....26
ภาพที่ 3.8 การตรวจผลการแสดงออกของ actin cDNA โดยวิธี reverse transcription PCR.....28
ภาพที่ 3.9 การตรวจผลการแสดงออกของ GFP cDNA โดยวิธี reverse transcription PCR.....29
ภาพที่ 3.10 การตรวจคุณภาพของการสกัด Gnomic DNA โดยการทำ PCR เพิ่มปริมาณยีน
แอคติน (ก) และการตรวจผลการถ่ายทอดยีน GFP สู่ลูกปลารุ่น F2
โดยวิธี PCR (ข).....30

สารบัญภาพ

หน้า

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบอัตราการฟักของไข่ปลาและอัตราการรอดของ
ปลาที่ได้รับการถ่ายยีน.....17

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การพัฒนาในด้านเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลามีมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ในปัจจุบันเกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงปลาได้ครบวงจร ตั้งแต่การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาเพื่อการผลิตลูกปลาโดยไม่ต้องอาศัยการรวบรวมพันธุ์จากธรรมชาติต่อไป การพัฒนาทางด้านการผลิตอาหารปลาที่มีคุณภาพทำให้ปลามีการเจริญเติบโตเร็ว การปรับปรุงหรือการคัดเลือกพันธุ์ปลาให้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง การพัฒนาดังกล่าวส่งผลให้เราสามารถเพาะเลี้ยงปลาในเชิงอุตสาหกรรมทั้งขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามการพัฒนาดังกล่าวเน้นไปทางด้านเทคโนโลยีการผลิต ในขณะที่การพัฒนาทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ปลายังพัฒนาไปได้น้อยมาก เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ปลาโดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลามากในการเลี้ยงปลาหลายรุ่น เพื่อที่จะสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ปลาที่มีลักษณะที่ดีและมีประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้การวิจัยทางด้านการคัดเลือกพันธุ์ปลายังต้องการสถานที่สำหรับเลี้ยงปลาจำนวนมาก รวมทั้งแรงงานในการเลี้ยงปลาจำนวนมากเพื่อให้การคัดเลือกพันธุ์ได้พันธุ์ที่ดีและมีความสม่ำเสมอตามที่ต้องการ

ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลาส่วนใหญ่เป็นสัตว์ที่ผสมภายนอกร่างกาย (external fertilization) ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วสามารถเจริญได้ภายนอก และปลาหลาย ๆ ชนิดยังให้ลูกปลาได้จำนวนมากในแต่ละครั้ง ทำให้มีความได้เปรียบในการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพในการสร้างพันธุ์ปลาที่ให้ลักษณะที่ดีทางเศรษฐกิจมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาเชิงพาณิชย์ เช่น เทคโนโลยีการแปลงเพศปลาเพื่อการเพาะเลี้ยงปลาเพศเดียวทำให้เราสามารถเลือกเลี้ยงปลาเพศเพียงเพศเดียวที่เจริญเติบโตเร็ว เทคนิคการจัดการจำนวนชุดของโครโมโซมปลาทำให้เราสามารถทำให้ปลามีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นหรือน้อยลงกว่าปกติ เพื่อประโยชน์ในเชิงการศึกษาวิจัยและการเพาะเลี้ยงเชิงเศรษฐกิจได้ แต่เทคโนโลยีที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ ถึงแม้ว่าจะทำให้ได้พันธุ์ปลาที่มีลักษณะที่ได้เปรียบกว่าปกติแต่ไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้

เทคโนโลยีการถ่ายยีนในสิ่งมีชีวิต (Gene transfer) หรือการสร้างสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ใหม่ เป็นการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมโดยการถ่ายยีนหรือการตัดต่อยีน หรือที่เรียกว่า Genetic modified organism (GMO) ได้มีการพัฒนาขึ้น โดยการศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ตัวสัตว์ได้ริเริ่มทำครั้งแรกในหนู (Gordon et al., 1980) พบว่าได้รับความสนใจอย่างมาก เพราะว่าการถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโต (Growth Hormone gene; GH gene) เข้าสู่ตัวอ่อนหนูแล้ว มีผลเร่งการเจริญเติบโตในหนูที่ได้รับการถ่ายยีน GH gene อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

(Palmiter et al., 1982) ต่อจากนั้นเทคนิคการถ่ายยีนจึงได้รับความสนใจที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด เช่น สุกร (Hammers et al., 1985) สัตว์ปีก (Salter and Crittenden, 1991) วัว (Bondioli et al., 1991) รวมทั้งในปลาทอง (Yoon et al., 1989) ปลาเรนโบว์เทร้า (Yoshizaki et al., 1991) การศึกษาวิจัยในยุคแรก ๆ จะเป็นการถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโตเป็นส่วนใหญ่ เช่น การถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโต เพื่อให้ปลามีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น ได้แก่ การทดลองในปลาคาร์พ (Zhang et al., 1990) ปลาทอง (Zhang et al., 1993) ปลาเรนโบว์เทร้า (Innoue et al., 1993)

ต่อมาเทคนิคการถ่ายยีนได้ถูกนำมาใช้เพื่อประโยชน์ด้านอื่น ๆ นอกจากจะเพื่อเร่งการเจริญเติบโตเพียงอย่างเดียว กอปรกับได้มีกระแสการต่อต้านเทคนิคการสร้างสัตว์จีเอ็มโอดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาที่ใช้เป็นอาหาร จึงทำให้การใช้เทคนิคดังกล่าวไม่สามารถนำไปใช้กับการเพาะเลี้ยงปลาเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารของมนุษย์ อย่างไรก็ตามนอกจากเราจะใช้ประโยชน์จากปลาสำหรับเป็นอาหารของมนุษย์แล้ว เรายังนิยมใช้ปลาเป็นสัตว์ทดลองสำหรับเป็นโมเดลในการศึกษาในหลาย ๆ ด้าน โดยเฉพาะปลาม้าลายเป็นที่นิยมใช้เป็นโมเดลของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ในการศึกษาด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ปลาม้าลายเป็นโมเดลในการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Mumm et al., 2006) การใช้ปลาม้าลายเป็นสัตว์ทดลองในการศึกษาการควบคุมและการแสดงออกของยีนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Zou et al., 2006) และโรคทางพันธุกรรมของมนุษย์ และการใช้สัตว์จีเอ็มโอเพื่อการผลิตยา (Hunterr et al., 2005) ดังนั้นเทคนิคการปรับแต่งพันธุกรรมในปลานั้นแม้จะยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตปลาเชิงพาณิชย์ได้แต่ก็มีประโยชน์อย่างยิ่งในทางการศึกษาวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปลาม้าลายเป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก วงจรชีวิตสั้น สืบพันธุ์ได้เร็ว การผสมพันธุ์เกิดขึ้นภายนอก และตัวอ่อนพัฒนาการภายนอก ไข่ปลาใสและโปร่งแสง ทำให้การสังเกตการพัฒนาการของไข่ปลาทำได้ง่าย ปัจจุบันได้มีการทำการถ่ายยีนในปลาม้าลายจำนวนมาก เพื่อเป็นการริเริ่มและการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในปลาม้าลายสำหรับงานวิจัยในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในอนาคต โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในปลาม้าลาย เพื่อใช้เป็นแนวทางการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนสำหรับงานวิจัย และการเรียนการสอนทั้งในระดับปริญญาตรีและระดับบัณฑิตศึกษาต่อไป

การตรวจเอกสาร

สัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีน หรือสัตว์จีเอ็มโอ (Transgenic animal หรือ Genetically modified organism) คือสัตว์ที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายยีนหรือดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะใดลักษณะหนึ่งเข้าไปในจีโนมของสัตว์ ทำให้ยีนที่ถ่ายเข้าไปนั้น เข้าไปรวมกับโครโมโซม สัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีนจึงสามารถถ่ายทอดลักษณะที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายไปสู่รุ่นลูก และรุ่นต่อไปได้ (Lewin,1994; Guise et al., 1991) การถ่ายยีนในปลาได้มีการริเริ่มมาตั้งแต่ประมาณปี 1990 และได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง โดยในระยะแรกเป็นการถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโต (Growth hormone gene) เข้าสู่ไข่ของปลาที่ได้รับการผสมแล้ว เพื่อวัตถุประสงค์ในการทำให้ปลามีการเจริญเติบโตสูงขึ้น เช่น Zhang และ คณะ (1990) ได้ทำการทดลองการฉีดยีนเร่งการเจริญเติบโตที่ได้จากปลาเรนโบว์เทร้า (*Onchorhynchus mykiss*) ซึ่งได้ตัดต่อเข้ากับ Rous sarcoma virus virus-long term repeat promoter (RSV-LTR) โดยฉีดเข้าสู่ไข่ของปลาไน (*Cyprinus carpio* Linnaeus) ต่อมามีการรายงานการสร้างสายพันธุ์ปลานิลจีเอ็มโอโดยการถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโตเข้าไปในจีโนมของปลานิล พบว่าปลานิลที่การเจริญเติบโตเร็วกว่าปลาปกติถึง 3 เท่า (Rahman and Maclean, 1999) การสร้างปลาจีเอ็มโอเป็นการสร้างปลาสายพันธุ์ใหม่ ที่ให้ผลรวดเร็วกว่าการคัดเลือกพันธุ์แบบดั้งเดิม เนื่องจากโดยทั่วไปแล้ว ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง จะถูกสร้างจากต่อมใต้สมอง และมีผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโต แต่การถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโตเข้าไปในตัวปลา เป็นการเพิ่มจำนวนยีนให้กับตัวปลา แล้วยังมีผลให้การสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเกิดขึ้นที่อวัยวะอื่น ๆ นอกจากที่บริเวณต่อมใต้สมองเพียงอย่างเดียว จึงเป็นผลทำให้ระดับของฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในปลาจีเอ็มโอสูงกว่าปกติ (Mori and Devlin, 1999)

นอกจากการถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโตเพื่อวัตถุประสงค์ของการเร่งการเจริญเติบโตแล้ว เนื่องจากในปลาสองน้ำนั้น ยีนเร่งการเจริญเติบโตนอกจากจะทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลย์ของปลาเมื่อปลามีการอพยพจากน้ำหนึ่งไปยังอีกน้ำหนึ่ง ดังนั้นการถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโตจึงมีผลต่อระบบสรีรวิทยาในการปรับสมดุลย์ของปลาได้ ยกตัวอย่างเช่น ปลาซาลมอน (Atlantic salmon) นั้นจะเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศทางแถบหนาว วงจรชีวิตการสืบพันธุ์ของปลานั้นเป็นปลาสองน้ำ กล่าวคือ เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ปลาซาลมอนจะอพยพมาผสมพันธุ์และวางไข่ในน้ำจืด จากนั้นลูกปลาจะมีการพัฒนาการในน้ำจืด จนเจริญเติบโตจนระยะที่เรียกว่า salmon smolts ก่อนจะเริ่มอพยพลงสู่น้ำกร่อยเพื่อปรับตัวและลงสู่ทะเลในที่สุด ในการเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้ การศึกษาเพื่อปรับสภาวะแวดล้อม การพัฒนาคุณค่าทางอาหาร เพื่อทำให้ปลาซาลมอนปรับตัวให้เข้ากับน้ำเค็มได้เร็วจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง และสามารถลดต้นทุนในการเลี้ยงได้ Saunders และคณะ (1998) ได้สร้างปลา transgenic salmon โดยการ

ถ่ายยีนเร่งการเจริญเติบโตเข้าสู่ไข่ปลา และพบว่าปลาที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถปรับตัวเข้าสู่น้ำทะเลได้ดีกว่า ปลาในกลุ่มปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และขนาดของปลาที่ได้รับการถ่ายยีนที่ระยะ smolt ก็มีขนาดใหญ่กว่าปลาในกลุ่มปกติ

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางชีวภาพก้าวหน้าเป็นอย่างมาก ทำให้การศึกษาทางด้านโครงสร้างทางลำดับเบสของยีนก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว มีผลให้การแยกยีน และข้อมูลทางลำดับเบสของยีนในสัตว์น้ำ พัฒนาไปได้อย่างไม่จำกัด แต่การศึกษาหน้าที่ของยีนและการนำเอาผลการศึกษาทางด้านยีนของสัตว์น้ำไปใช้ยังจำกัดอยู่ในวงแคบคืออยู่ในปลาทดลองเป็นส่วนใหญ่ มีเพียงส่วนน้อยที่ดำเนินการในปลาเศรษฐกิจ ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีลักษณะทางชีววิทยาที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีน และการใช้ประโยชน์ได้ของยีน รวมทั้งปลายังเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่จะทำให้การศึกษาดังกล่าวขยายประโยชน์มากกว่าการพัฒนาแต่องค์ความรู้ใหม่ แต่ยังได้ประโยชน์ในการนำไปใช้ในทางเทคโนโลยีการเกษตรอีกด้วย

นอกจากการใช้ประโยชน์ของปลาในด้านการเป็นอาหารของมนุษย์และการใช้เป็นสัตว์ทดลองแล้ว ปลาหลายชนิดยังเป็นสัตว์เลี้ยงสวยงามที่สำคัญ ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีการอนุญาตให้ใช้ปลาจีเอ็มโอเป็นอาหาร แต่การสร้างปลาจีเอ็มโอสำหรับเป็นปลาสวยงามได้รับการยกเว้น โดยเฉพาะการสร้างปลาม้าลายจีเอ็มโอโดยการการถ่ายยีนเรืองแสงสีต่าง ๆ สำหรับเป็นปลาที่เลี้ยงเพื่อความสวยงามนั้น ไม่ได้ถูกห้ามจากหลาย ๆ องค์กรที่เกี่ยวข้องได้แก่ FDA (Food and Drug Agency), USDA (United States Department of Agriculture) หรือ EPA (Environmental Protection Agency) ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการสร้างปลาม้าลายจีเอ็มโอ โดยการถ่ายยีนที่สร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein gene; GFP cDNA) เข้าสู่ไข่ของปลาม้าลาย เพื่อประโยชน์ในด้านการใช้เป็นตัวอย่างการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ และเป็นการพัฒนาเทคนิคเบื้องต้น สำหรับการนำไปใช้ในการผลิตปลาสวยงามพันธุ์ใหม่ต่อไป

ยีนแสดงลักษณะโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein; GFP) เป็น cDNA ที่แยกได้จากแมงกระพรุน (*Aequorea victoria*) สร้างโปรตีนที่ทำให้เกิดเรืองแสง โดยรับพลังงานจากปฏิกิริยาการเรืองแสง และปลดปล่อยพลังงานเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นมากกว่าเดิม เป็นโปรตีนที่มีประโยชน์อย่างมากทางพันธุวิศวกรรม และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เพราะมักจะถูกใช้เป็นโปรตีนรายงานหรือโปรตีนเครื่องหมาย (Reporter protein) เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเรืองแสงโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารตั้งต้นหรือโคแฟกเตอร์ใด ๆ นิยมใช้เป็นโปรตีนบ่งชี้สภาวะต่าง ๆ ของเซลล์ ในงานศึกษาวิจัยทางด้านการแสดงออกของยีน (Chalfie et al., 1994; Wang and Hazelrigg, 1994; Ikawa et al., 1995; Tannahill et al., 1995) เช่น มีการใช้ยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเป็นโปรตีนเครื่องหมายในปลาม้าลาย (Amsterdam et al., 1995; Amsterdam et al., 1996;

Moss et al., 1996; Higashijima et al., 1997; Long et al., 1997; Meng et al., 1997) ในปลาเมดากะ (Hamada et al., 1998) และในปลาเรนโบว์เทร้า (Takeuchi et al., 1999)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในปลาม้าลาย สำหรับใช้เป็นตัวอย่างปลาในการเรียนการสอนทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์
2. เพื่อพัฒนาเครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ไข่ปลาโดยวิธีไมโครอินเจคชัน
2. เพื่อผลิตปลาม้าลายที่สามารถเรืองแสงสีเขียวได้

ขอบเขตของการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ ใช้ปลาม้าลายเป็นปลาทดลอง ใช้วิธีการถ่ายยีนโดยการพัฒนาเครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์สำหรับการไมโครอินเจคชันเข้าสู่ไข่ของปลาม้าลาย ยีนที่ใช้ในการถ่ายยีนเป็นยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein; GFP cDNA) และใช้โปรโมเตอร์ของเบต้าแอคตินยีน (β-actin promoter) ที่ได้จากปลาเมดากะ (*Oryzias latipes*) เลี้ยงไข่ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนจนฟักเป็นตัวและทำการตรวจการแสดงออกของยีนด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ และทำการตรวจหายีนที่ไมโครอินเจคชันเข้าสู่ไข่ปลาโดยการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction จากนั้นทำการตรวจหาอัตราการถ่ายทอดของยีนดังกล่าวในลูกปลารุ่น F1 เพื่อทำการผลิตปลารุ่น F2 ต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้พัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในปลาม้าลาย เพื่อเป็นแนวทางสำหรับนักศึกษาระดับปริญญาตรี ในการศึกษาหลักการถ่ายยีนในปลา และงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในปลาต่อไป
2. ได้ตัวอย่างปลาม้าลายที่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อใช้เป็นตัวอย่างการศึกษาทางด้านเทคนิคการจตรวจหายีนในปลา โดยวิธี PCR สำหรับใช้เป็นตัวอย่างปลาในการเรียนการสอนทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์
3. ได้ปลาม้าลายที่มีการเรืองแสงสีเขียวเป็นปลาสวยงาม

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ปลาที่ใช้ในการทดลอง

ปลาที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาม้าลาย (*Danio rerio*) รวบรวมพันธุ์จากแหล่งเลี้ยงปลาสวยงาม สวนจตุจักร กรุงเทพมหานคร จำนวน 500 ตัว ที่อายุประมาณ 1.5 – 2 เดือน นำมาเลี้ยงที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยให้ไรน้ำเค็ม (Artemia) 2-3 ครั้งต่อวันเป็นอาหาร จนมีอายุประมาณ 3 เดือน จึงใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ปลา

2. การเตรียมตู้ปลา ระบบน้ำ และการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาม้าลาย

ใช้ตู้ปลาขนาดความจุ (24 * 10 * 12 นิ้ว) น้ำที่ใช้เป็นน้ำประปาปราศจากคลอรีน ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้คงที่ ที่อุณหภูมิประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส ระบบน้ำในการเลี้ยงจัดให้มีระบบการกรองภายในตู้ปลา โดยมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ สัปดาห์ และล้างระบบกรองทุกสัปดาห์ จัดทำระบบไฟฟ้าเปิดปิดอัตโนมัติ โดยให้ระยะเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมงสว่างและ 12 ชั่วโมงมืด

3. การเตรียมไข่ปลาสำหรับการทดลอง

ทำการเพาะพันธุ์ปลาม้าลายด้วยวิธีการผสมพันธุ์แบบธรรมชาติ **(Westerfield, 1993)** โดยในแต่ละวันก่อนที่จะเข้าสู่ช่วงเวลาสว่างในตู้เลี้ยงปลาม้าลาย ประมาณ 15-30 นาที จะทำการคัดเลือกแม่พันธุ์ปลาม้าลาย โดยดูจากลักษณะท้องที่อูมเป่ง สุขภาพแข็งแรง ว่ายน้ำเป็นปกติ และเลือกพ่อพันธุ์ปลาโดยดูจาก ลำตัวยาวและรูปร่างเพรียวยาว มีสีเหลืองอ่อน ๆ ระหว่างลายแถบสีดำ ลักษณะการว่ายน้ำปราดเปรียว สุขภาพแข็งแรง ใส่พ่อแม่พันธุ์ปลาม้าลายในอัตราส่วนตัวผู้ 2 ตัวต่อ ตัวเมีย 1 ตัว ลงในกล่อง พลาสติด (กล่องที่ใช้เลี้ยงหนูทดลอง) ที่มีตะแกรงแยกไข่ จากนั้นเปิดไฟเพื่อให้ปลาได้รับแสง ปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ปลาผสมพันธุ์และวางไข่โดยวิธีธรรมชาติ โดยการเฝ้าดูตลอด เมื่อพ่อแม่ปลามีการผสมพันธุ์วางไข่แล้ว แยกพ่อแม่ปลาออกมาจากกล่อง จากนั้นทำการรวบรวมไข่ปลาที่ได้รับการผสมพันธุ์ใส่ใน Petri disc ที่ใส่น้ำสะอาดปราศจากคลอรีน ประมาณ 15 นาที ไข่ปลาที่ได้รับการผสมจะมีการพัฒนาการทำให้เห็นเซลล์ของไข่ปลาชัดเจน

4. การเตรียม expression vector และการแยกยีนให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้สำหรับการไมโครอินเจคชัน

ยีนที่ใช้ในการไมโครอินเจคชันในครั้งนี้ได้รับจาก Dr. Goro Yoshizaki (Tokyo University of marine science and technology) เป็นยีนสร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP cDNA) ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาพที่ 2.2 โดยมีโปรโมเตอร์ของยีนเบต้าแอคติน ที่ได้จากปลาเมดากะ (Hamada et al., 1998) เป็นโปรโมเตอร์ ซึ่งบรรจุอยู่ใน Expression vector ที่มีชื่อว่า pAG ดังแสดงแผนที่ของ expression vector ในภาพที่ 2.3

การเตรียมพลาสมิด expression vector ประกอบด้วยขั้นตอน การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านให้เป็น competent cell การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน การแยกและการทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านให้เป็น competent cell

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α บนอาหารวุ้น LB agar (1 % bacto-tryptone, 0.5 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 1.5 % agar) ที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมา 1 โคโลนีลงเลี้ยงใน SOB (2.0 % bacto-tryptone, 0.5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$) 2 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 250 µl ของแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ลงใน SOB 60 มิลลิลิตร เขย่าที่ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-7 ชั่วโมง (OD_{550} ~ 03-0.4) นำแบคทีเรียที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนของตะกอนแบคทีเรีย แล้วเติม 10 มิลลิลิตรของ TFB (10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2.2H_2O$, 25 mM KCl, 55 mM $MnCl_2.4H_2O$) เขย่าแบคทีเรียให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนของตะกอนแบคทีเรีย แล้วเติม 2.4 มิลลิลิตรของ TFB เขย่าแบคทีเรียให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที แล้วติม DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 7 % เขย่าให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที เก็บ competent cell ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4.2 การนำพลาสมิดเข้าสู่ competent cell

เติมพลาสมิด pAG 10 นาโนกรัม ลงใน 100 µl ของ competent cell เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 45 วินาที แล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันที แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม SOC (SOB + 20 mM glucose) 900 µl เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่ได้มา plate บน 2 XYT-ampicillin agar (1.6 % bacto-tryptone, 1.0 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 1.5 % agar, 50 µg/ml ampicillin) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

4.3 การสกัด pAG จากเซลล์แบคทีเรีย

นำโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pAG อยู่มาเลี้ยงขยายใน 1.5 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 2 XYT-ampicilin (1.6 % bacto-tryptone, 1.0 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 50 µg/ml ampicillin) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิด pAG ด้วย Flexi-Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech) โดยทำการปั่นเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงได้ที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm นาน 30 วินาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนแบคทีเรีย จากนั้นเติมสารละลาย solution I 200 µl เขย่าแบคทีเรียให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย solution II 200 µl เขย่าให้เข้ากันอย่างเบา ๆ แล้วเติมสารละลาย solution III 200 µl เขย่าให้เข้ากันอย่างเบา ๆ จนเห็นตะกอนสีขาวขุ่น นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เก็บส่วนสารละลายใสไปสู่หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol 420 µl เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm นาน 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนของพลาสมิด แล้วเติมสารละลาย sephaglass 150 µl ลงไปละลายตะกอน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm นาน 15 วินาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย wash buffer 200 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm นาน 15 วินาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย 70 % ethanol 300 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm นาน 15 วินาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน ตากส่วนที่เป็นตะกอนที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 10 นาที แล้วจึงละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0 และ 0.1 mM EDTA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไปสู่หลอดใหม่ แล้วทำการตรวจสอบขนาดของพลาสมิด pAG โดย 0.7 % agarose gel electrophoresis ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันตำแหน่งตัดจำเพาะของพลาสมิด pAG ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และวัดความเข้มข้นของ พลาสมิด pAG โดยนำไปเจือจางและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ได้ จะคำนวณได้ดังนี้

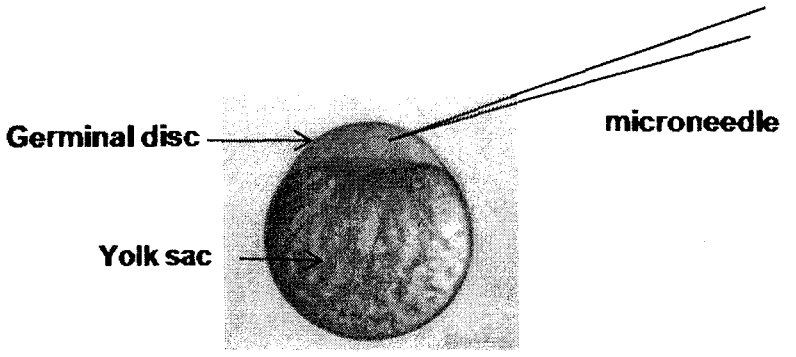
1 OD at 260 nm = 50 µg/ml of double-stranded DNA

ทำการเจือจางพลาสมิด pAG ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ng/µl เก็บสารละลายพลาสมิด pAG ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทำไมโครอินเจคชัน

5. การไมโครอินเจคชัน

การไมโครอินเจคชัน จะเริ่มหลังจากไข่ปลาได้รับการผสมแล้วประมาณ 15 นาที และจะสามารถทำการไมโครอินเจคชันได้ต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งไข่ปลามีการพัฒนาการแบ่งเซลล์ไปไม่เกินระยะ 4 เซลล์ การไมโครอินเจคชันจะใช้เครื่อง

Micromanipulator 5171 และ Transjector 5246 โดยทำการฉีดสารละลายของดีเอ็นเอเข้าไปที่บริเวณ germinal disc ของไข่ปลาม้าลาย ดังแสดงในภาพที่ 2.1 การไมโครอินเจคชันจะฉีดสารละลาย pAG ประมาณ 2 nl เข้าสู่ germinal disc ของไข่ปลาม้าลาย



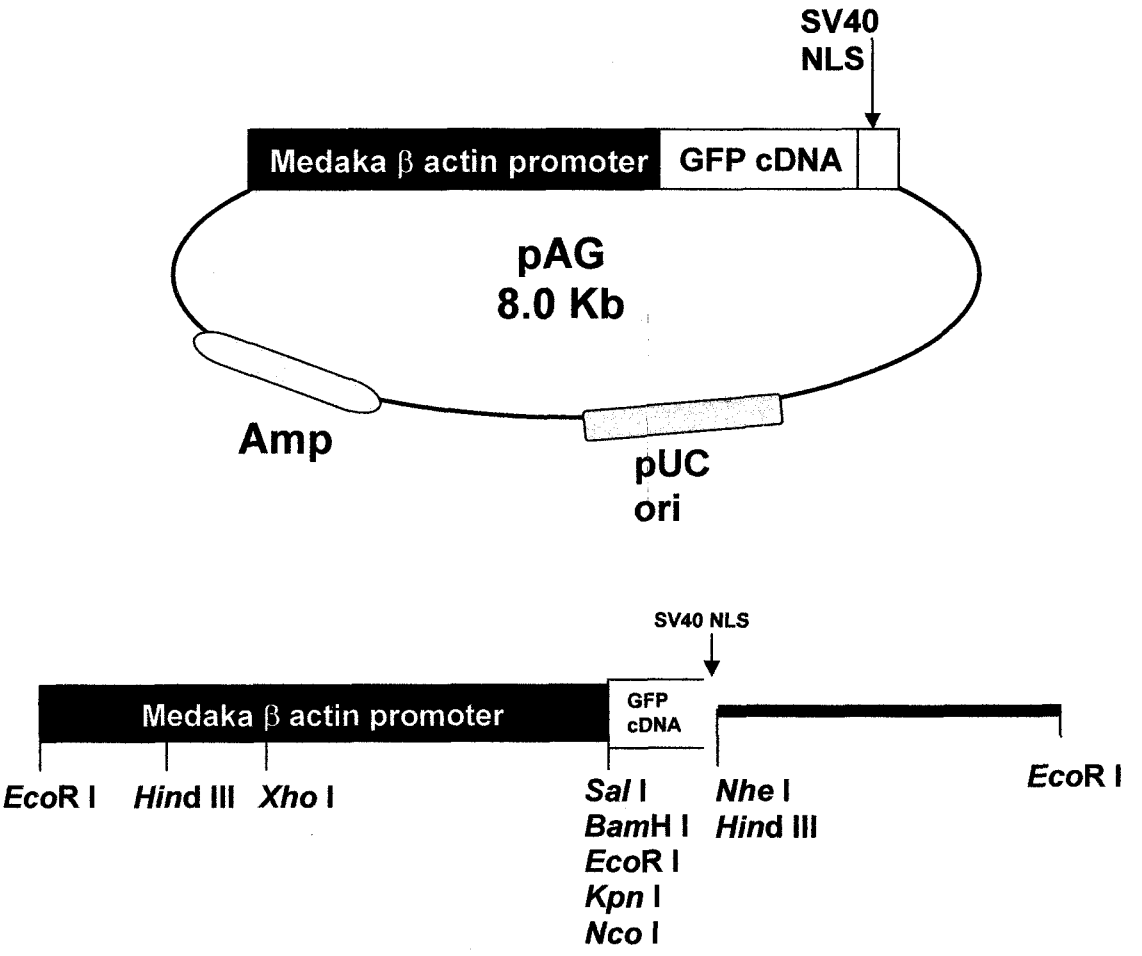
Fertilized egg

ภาพที่ 2.1 การถ่ายยีนเข้าสู่ไข่ของปลาม้าลายที่ได้รับการผสมแล้วด้วยวิธี microinjection

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC      60
M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D

GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC     120
G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G  E  G  D  A  T  Y

GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACA     180
G  K  L  T  L  K  F  I  C  T  T  G  K  L  P  V  P  W  P  T

CTAGTGACCACCTTCGCTTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG     240
L  V  T  T  F  A  Y  G  V  Q  C  F  S  R  Y  P  D  H  M  K

CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC     300
Q  H  D  F  F  K  S  A  M  P  E  G  Y  V  Q  E  R  T  I  F

TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG     360
F  K  D  D  G  N  Y  K  T  R  A  E  V  K  F  E  G  D  T  L

GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC     420
V  N  R  I  E  L  K  G  I  D  F  K  E  D  G  N  I  L  G  H

AAGCTGGAGTACAACTTCAACAGCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC     480
K  L  E  Y  N  F  N  S  H  N  V  Y  I  M  A  D  K  Q  K  N

GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC     540
G  I  K  V  N  F  K  I  R  H  N  I  E  D  G  S  V  Q  L  A

GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCAC     600
D  H  Y  Q  Q  N  T  P  I  G  D  G  P  V  L  L  P  D  N  H

TACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC     660
Y  L  S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V

CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCA     720
L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  H  G  M  D  E  L  Y  K  S

GGCGGCCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGGCTAGCTAG                             756
G  G  P  K  K  K  R  K  V  A  S  *
```

ภาพที่ 2.2 ลำดับเบสของยีน GFP cDNA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้แสดงลำดับเบสและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของ Nuclear localization signal (NLS)

* แสดง stop codon



ภาพที่ 2.3 แผนภาพของ expression vector pAG ขนาดประมาณ 8.0 กิโลเบส ประกอบด้วย GFP cDNA ซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์เบต้าแอคตินที่ได้จากปลาเมดากะ (Hamada et al., 1998) ที่บริเวณด้าน 3' ของยีน GFP จะมีการเพิ่มเติมนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของ Nuclear Localization Signal (NLS) ภายในพลาสมิดมียีนต้านยาแอมพิซิลิน และมีจุดเพิ่มขยายจำนวนยีนที่ได้จากพลาสมิด pUC ตำแหน่งต่าง ๆ ของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแสดงข้างใต้ภาพ

6. การดูแลตัวอ่อนปลาม้าลายและการให้อาหารปลา

ไข่ปลาที่ได้รับการไมโครอินเจคชัน จะถูกย้ายจากจานวุ้นด้วยความระมัดระวังไปยัง Petri disc ที่ใส่น้ำสะอาด จากนั้นนำไปเก็บที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส ทำการตรวจดูไข่ปลาทุก ๆ 12 ชั่วโมง ถ้าพบไข่เสียให้ดูดทิ้งไป ไข่ปลาจะฟักเป็นตัวภายใน 2-3 วัน เริ่มให้อาหารปลาครั้งแรกประมาณวันที่ 4-5 โดยนำเอาอาร์ทีเมียที่มีชีวิตมาบดให้ละเอียด แล้วละลายในน้ำให้ลูกปลากิน โดยให้วันละ 3-4 ครั้ง เมื่อลูกปลามีอายุได้ 9 วัน เริ่มให้อาร์ทีเมียที่พึ่งฟักออกจากไข่ผสมกับอาร์ทีเมียบด และเริ่มเปลี่ยนอาหารจากอาร์ทีเมียบดเป็นอาร์ทีเมียที่มีชีวิต จากนั้นจึงให้อาร์ทีเมียที่มีชีวิตเป็นอาหารตลอดการเลี้ยง วันละ 2-3 ครั้ง

7. การตรวจผลการถ่ายยีนเข้าสู่ปลา

7.1 การสกัด genomic DNA

นำลูกปลาที่พึ่งฟักออกเป็นตัว และเริ่มว่ายน้ำ (ระยะที่ถุงไข่แดงยุบแล้ว) และมีการแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว และลูกปลาที่ไม่ได้รับการไมโครอินเจคชันเป็นกลุ่มควบคุม (ลูกปลาที่ได้จากปลาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน) มาสกัด Genomic DNA โดยใช้ Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) โดยในขั้นแรกนำลูกปลาไปชั่งน้ำหนัก ให้ได้น้ำหนักประมาณ 10-20 มิลลิกรัม แล้วบดใน 600 µl ของสารละลาย Nucleic lysis solution ที่แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่ protienase K 100 µg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยให้มีการเขย่าหลอดเพื่อให้สารละลายมีการเคลื่อนไหวไปมาอย่างเบา ๆ ตลอดคืน จนได้สารละลายใส ใส่ RNase A solution 3 µl เขย่าหลอดเบา ๆ เพื่อให้สารสกัดผสมกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที นำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติมสารละลาย 200 µl protein precipitation solution นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายถ่ายไปสู่หลอดใหม่ เติม isopropanol 600 µl เขย่าเบาเพื่อให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน ล้างด้วย 70 % ethanol นำตะกอนมาตากไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง แล้วเติมน้ำสะอาด 30 µl เพื่อละลายตะกอน genomic DNA เพื่อนำไปตรวจการถ่ายยีนด้วยวิธีPCR ต่อไป

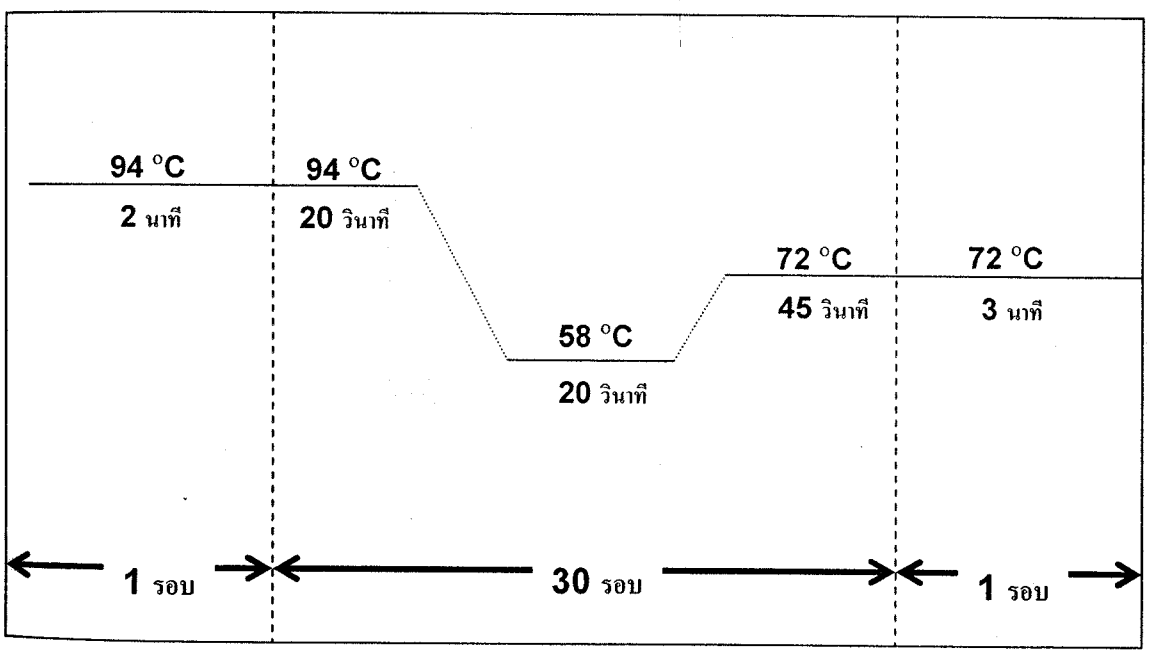
7.2 การตรวจการถ่ายยีน GFP โดย Polymerase Chain reaction

ทำการตรวจสอบการถ่ายยีนโดยการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย GFP specific primer (GFP-F: 5'-GACGTAAACGGCCACAAGT-3' และ GFP-R : 5'-TCCAGCAGGACCATGTGAT-3') ปฏิกิริยา PCR (10 µl) ประกอบด้วย

Genomic DNA	1	µl
Each dNTP	200	µM
Sense primer	1	pmol
Antisense primer	1	pmol

1 x *Ex Taq* buffer และ 0.25 U of *Ex Taq* (Takara)

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ดำเนินงานตาม Boonanuntanasarn et al. (2002) รายละเอียดดังภาพที่ 2.4 เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์ใน 2 % agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 2.4 สภาวะในการทำ Polymerase Chain Reaction เพื่อตรวจหายีนโปรตีนสีเขียว (GFP gene) ตามวิธีของ Boonanuntanasarn et al. (2002)

8. การตรวจการแสดงออกของยีน

8.1 การตรวจการแสดงออกของยีนโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรส เซ็นซ์

เมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่ปลา (ประมาณ 72 ชั่วโมง) ย้ายลูกปลาไปยังน้ำสะอาดที่ใส่สารละลาย 2-phenoxyethanol 300 ppm เพื่อให้ลูกปลาสลบ จากนั้นนำลูกปลาไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ เลือกลูกปลาที่มีการแสดงออกของโปรตีนสีเขียว เพื่อเลี้ยงเป็นพ่อแม่พันธุ์ปลาต่อไป

8.2 การตรวจการแสดงออกของยีนที่ระดับ transcription โดยวิธี reverse transcription PCR

นำลูกปลาม้าลายที่พึ่งฟักออกเป็นตัว และเริ่มว่ายน้ำ (ระยะที่ถุงไข่แดงยุบแล้ว) มาบดด้วยสารละลาย trizol (GIBCO BRL) 500 µl ในน้ำแข็ง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 200 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที ย้ายสารละลายชั้นบนไปสู่หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol 500 µl เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน แล้วล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ละลายตะกอนด้วยน้ำปราศจาก RNase จากนั้นนำมาสร้างสาย first strand cDNA โดยใช้ Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech) ด้วย oligo (dT) primer จากนั้นนำมาตรวจหา GFP cDNA โดยการนำมาทำ PCR ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่อธิบายไว้ในข้อ 6.2 แต่เปลี่ยนจากการใช้ genomic DNA เป็นการใช้ cDNA เป็น template

8.3 การทำพีซีอาร์ของยีนแอคติน

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจคุณภาพของ cDNA โดยการทำ reverse transcription PCR ของยีนแอคติน ใช้ไพรเมอร์ดังต่อไปนี้

actin-F (5'-ACCTCTCTGGCCCCCTCCAC-3')

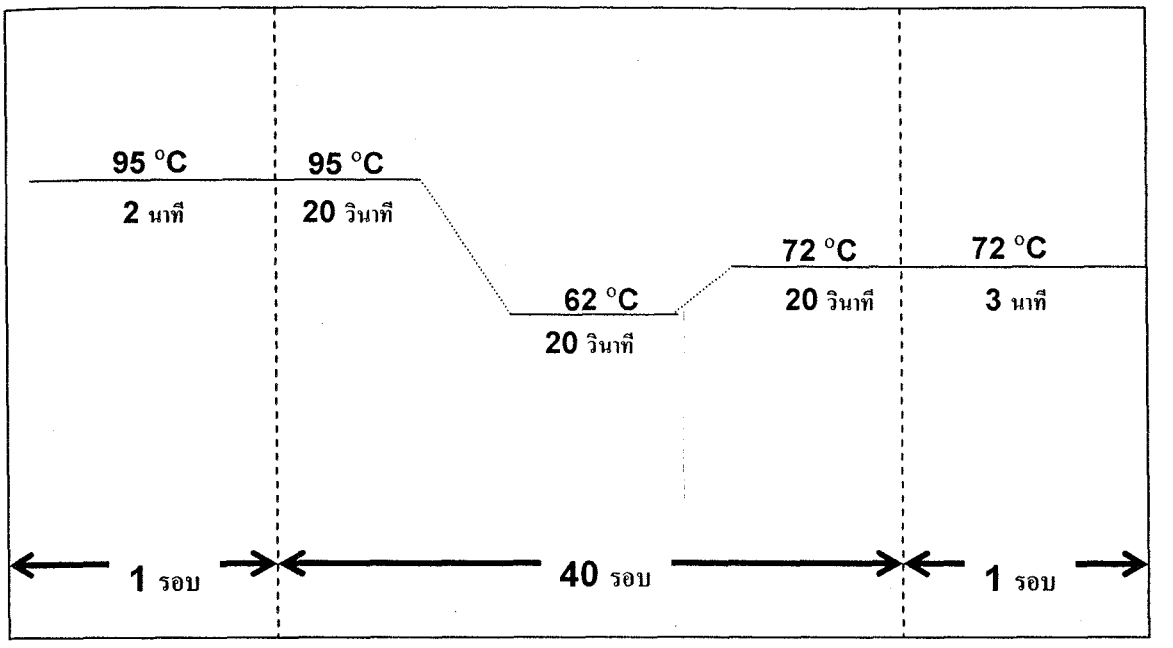
actin-R (5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3')

ปฏิกิริยา PCR (10 µl) ประกอบด้วย

Genomic DNA	1	µl
Each dNTP	200	µM
Sense primer	1	pmol
Antisense primer	1	pmol

1 x *Ex Taq* buffer และ 0.25 U of *Ex Taq* (Takara)

สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ตามวิธีของ Boonanuntanasarn et al. (2003) รายละเอียดดังภาพที่ 2.5 เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์ใน 2 % agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 2.5 สภาวะในการทำ Polymerase Chain Reaction เพื่อตรวจหายีนแอคติน (actin cDNA) ตามวิธีของ Boonanuntanasarn et al. (2003)

9. การวิเคราะห์การถ่ายทอดลักษณะการแสดงออกของโปรตีนสีเขียวไปยังรุ่นลูก

เลี้ยงลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีน จนปลามีอายุประมาณ 3 เดือนขึ้นไป (ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนมีทั้งปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย) ทำการผสมปลาที่ได้รับการถ่ายยีนกับปลาปกติ (ปลาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน) เมื่อไข่ปลาฟักเป็นตัว นำลูกปลาที่ระยะประมาณ 48 – 72 ชั่วโมงมาส่องดูการแสดงออกของโปรตีนสีเขียว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ เพื่อทำการแยกเอาลูกปลาที่ได้รับการถ่ายทอดยีน GFP จากพ่อหรือแม่ ทำการตรวจสอบอัตราการถ่ายทอดยีน GFP จากพ่อหรือแม่ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนในรุ่น F1 โดยการนำลูกปลาที่มีการแสดงออกของยีน GFP คือมีการเรืองแสงโปรตีนสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์มาสกัด genomic DNA และทำการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีน GFP ด้วยเทคนิค PCR ตามรายละเอียดที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 5.2

10. การผลิตลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น F2

นำปลารุ่น F1 ที่ได้รับการถ่ายยีน (ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนมีทั้งปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย) และมีการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว มาเลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นนำมาผสมพันธุ์กับปลาปกติ ตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3. เพื่อผลิตลูกปลารุ่น F2 ที่ได้รับการถ่ายยีน จากนั้นทำการตรวจหายีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว โดยการสกัด Genomic DNA และวิเคราะห์ยีนแอคติน และยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวด้วย PCR ตามวิธีการที่ได้อธิบายในข้อ 7.1-7.2 และ 8.3

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการเตรียมพลาสมิด pAG เพื่อใช้ในการทำไมโครอินเจคชัน โดยนำมา transform เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* แล้วทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด ทำการสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์ยืนยันพลาสมิด pAG โดยการนำเอา pAG มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ผลการตรวจแผนที่ของพลาสมิดและตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 3-1

ไข่ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีอัตราการฟักเป็นตัวต่ำกว่าไข่ปลาในกลุ่มควบคุม (ไข่ปลาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน) และมีอัตราการรอดในระยะการเลี้ยงในระยะประมาณ 2 สัปดาห์แรก และในระยะ 3 เดือน (ระยะที่พร้อมจะสืบพันธุ์) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบอัตราการฟักของไข่ปลาและอัตราการรอดของปลาที่ได้รับการถ่ายยีน

กลุ่มไข่ปลา	จำนวนไข่ปลาที่ทำการไมโคอินเจคชัน	จำนวนไข่ปลาที่ฟักเป็นตัว	จำนวนปลาที่มีชีวิต (อายุ 2 สัปดาห์)	จำนวนปลาที่มีชีวิต (อายุ 2 สัปดาห์
กลุ่มควบคุม[1]	100	72	53	29
ไข่ปลาที่ได้รับการถ่ายยีน	100	85	72	52

3.1 เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีการเรืองแสงสีเขียวเข้มที่นิวเคลียสของเซลล์

ปลาที่ได้รับการฉีดพลาสมิด pAG จะเกิดลักษณะ Mosaic กล่าวคือ เซลล์ปลาบางเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน เซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pAG จะมีการแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP gene) โดยจะเห็นการเรืองแสงสีเขียวเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจาก Expression vector ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการตัดต่อเอาส่วนของ nuclear localization signal ซึ่งได้จาก Simian Virus 40 ต่อเข้าไปที่ส่วนท้ายของ GFP gene จึงทำให้การเรืองแสงสีเขียวเข้มเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนที่เป็นนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพที่ 3.2) ซึ่งทำให้สามารถเห็นส่วนของนิวเคลียสภายในเซลล์ได้ชัดเจน

3.2 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเกิดขึ้นตลอดลำตัวปลา

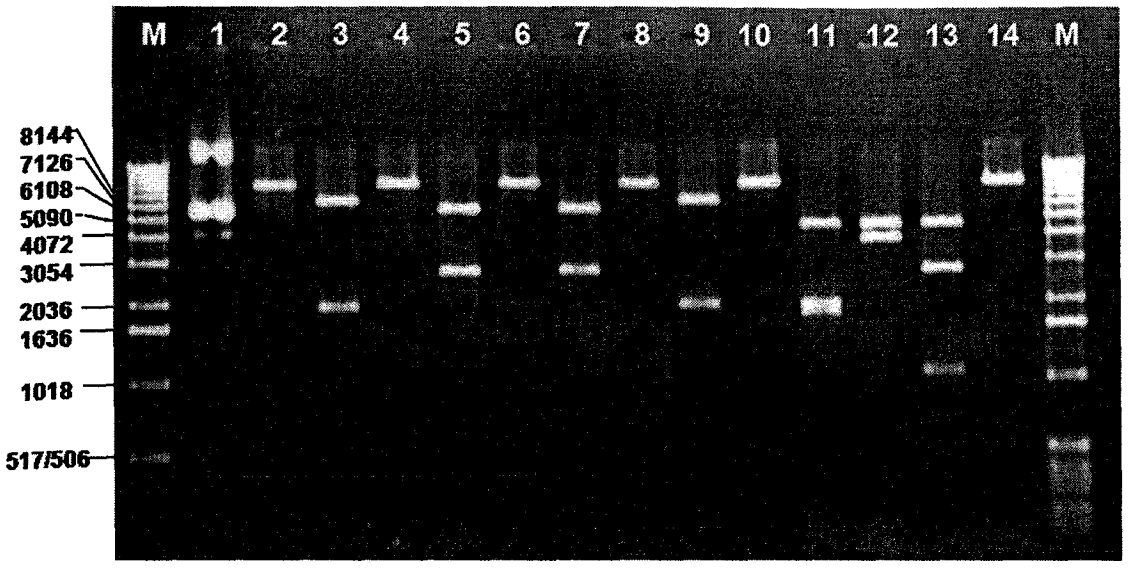
ทำการตรวจการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน ในลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีน pAG โดยนำลูกปลาที่ฟักออกจากไข่ปลา มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ ซึ่งจะเห็นแสงสีเขียวสว่างจ้าเป็นจุดตามลำตัวของลูกปลา (ภาพที่ 3.3 ก-ข) ในขณะที่ลูกปลาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่มีการเรืองแสงสีเขียว (ภาพที่ 3.3 ค) เนื่องจากยีนที่สร้างโปรตีนแสงสีเขียวถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ของแอคตินยีน ซึ่งเป็นยีนที่สามารถแสดงออกได้ในทุกเซลล์ของปลา จึงทำให้ยีน GFP สามารถแสดงออกได้ในทุก ๆ ส่วนทั่วลำตัวปลา

3.3 การแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณส่วนหัวของลูกปลา

จากการส่องดูลูกปลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้แสงฟลูออเรสเซ็นซ์ จะเห็นได้ว่าลูกปลาปกติ (ลูกปลาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน) ที่บริเวณหัวและลูกตาจะมีการเรืองแสงสีเขียวอ่อน ๆ ออกมา (ภาพที่ 3.4 ข) ซึ่งสีเขียวอ่อนที่เห็นดังกล่าวไม่ได้เกิดจากยีน GFP แต่อาจเกิดจากการเรืองแสงของโปรตีนอื่น ๆ ที่อยู่ในบริเวณส่วนของหัวปลาและลูกตา การเรืองแสงที่เกิดจากยีน GFP จะมีลักษณะเป็นสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 3.4 ก) ที่จะเกิดขึ้นที่บริเวณหัวและตาปลา เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจะเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน

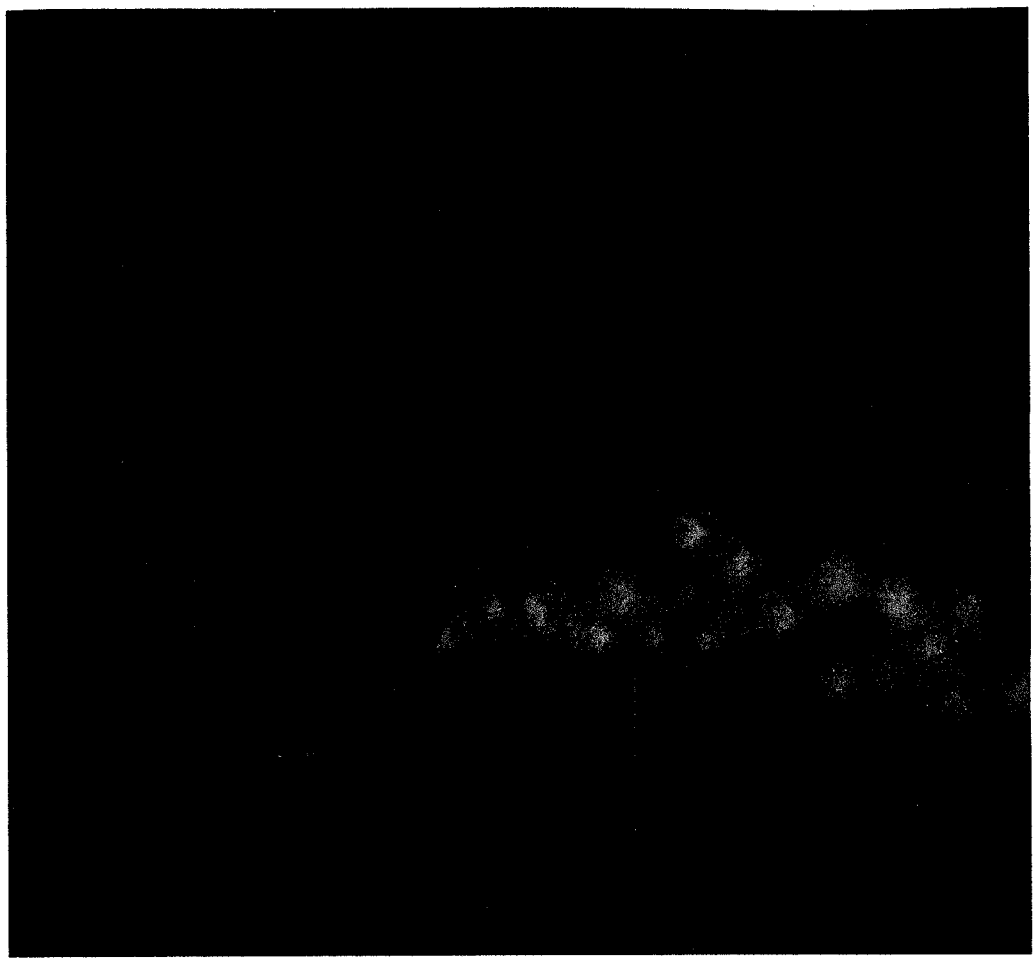
3.4 การแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณลำตัวและผนังเซลล์รอบถุงไข่แดงของลูกปลา

จากการตรวจการแสดงออกของยีน GFP ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์เบต้าแอคตินที่บริเวณส่วนท้องของลำตัวปลา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นซ์ จะเห็นได้ว่า มีการเรืองแสงที่เกิดจากยีน GFP ที่เซลล์บริเวณลำตัวและผนังเซลล์ที่รอบ ๆ ถุงไข่แดงของลูกปลา (ภาพที่ 3.5) จากภาพจะสามารถเห็นการเรืองแสงสีเขียวอ่อนที่เกิดจากสารในถุงไข่แดงของปลาได้ แต่การเรืองแสงมีเขียวอ่อนซึ่งเกิดจากสารในถุงไข่แดงนั้น จะมีสีอ่อน ซึ่งแตกต่างจากการเรืองแสงที่เกิดจากการแสดงออกของยีน GFP

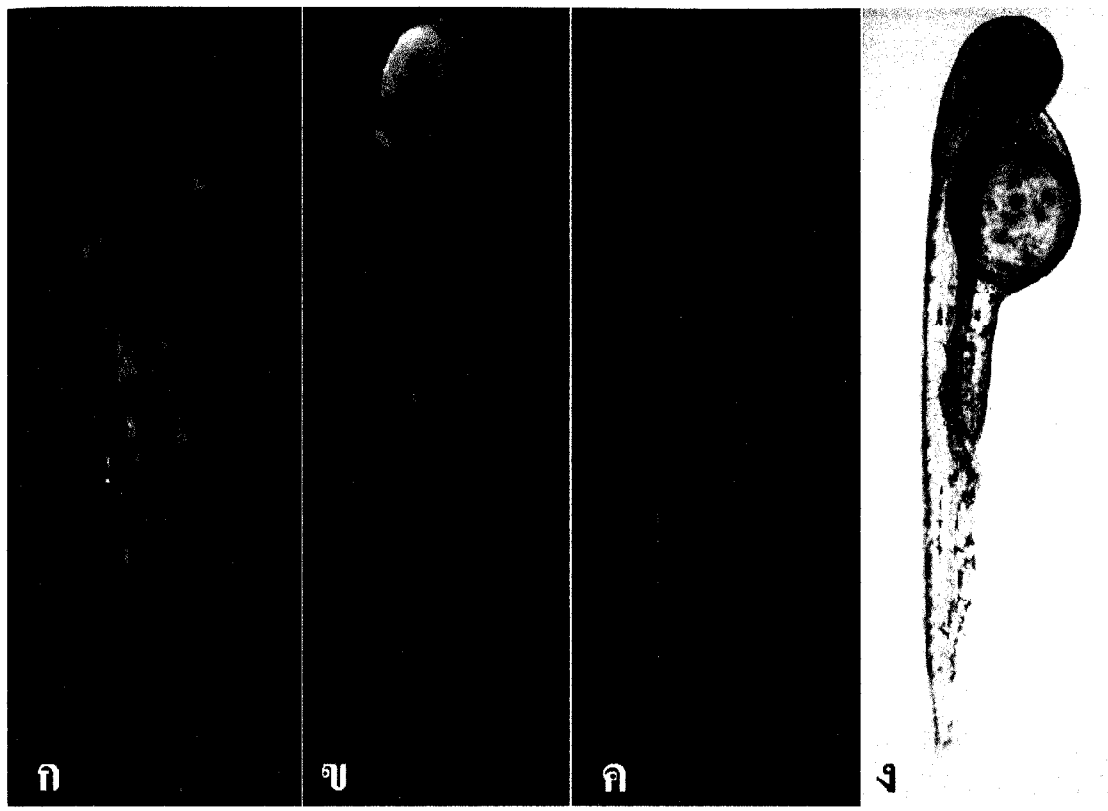


ภาพที่ 3.1 การตรวจผลการเตรียม pAG และการวิเคราะห์ restriction enzyme map

M DNA marker
1 pAG
2 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Sac* I
3 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Sac* I/*Sal* I
4 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Sal* I
5 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Sal* I/*Xho* I
6 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Xho* I
7 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Xho* I/*Kpn* I
8 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Kpn* I
9 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Kpn* I/*Sac* I
10 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Sac* I
11 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Sac* I/*Eco*R I
12 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Eco*R I
13 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Eco*R I/*Xho* I
14 pAG ที่ถูกตัดด้วย *Xho* I
M DNA marker



ภาพที่ 3.2 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งจะทำให้เห็นนิวเคลียสของเซลล์เป็นสีเขียวเข้ม

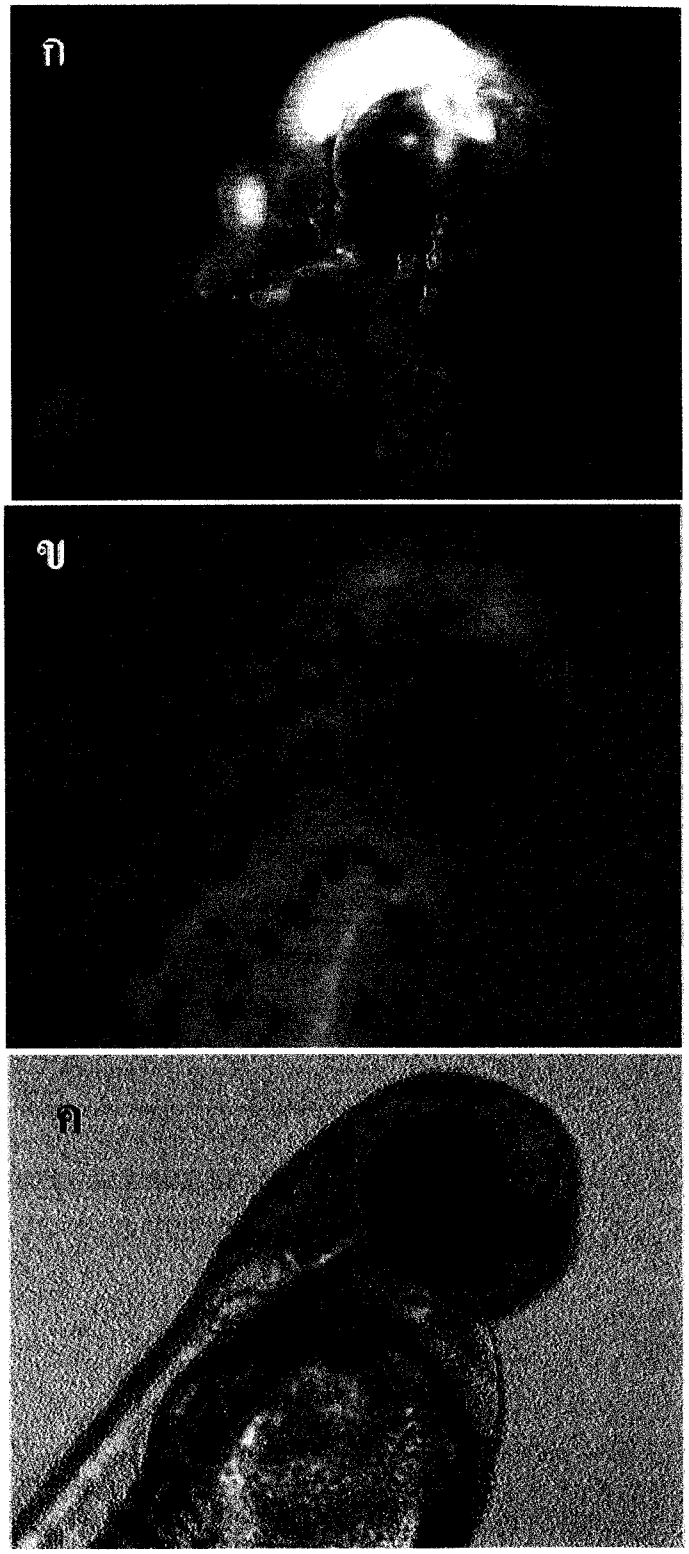


ภาพที่ 3.3 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) แบบชั่วคราว (transient GFP gene expression) ในปลาม้าลาย ที่อายุประมาณ 48 ชั่วโมงหลังจากไข่ปลาได้รับการผสม

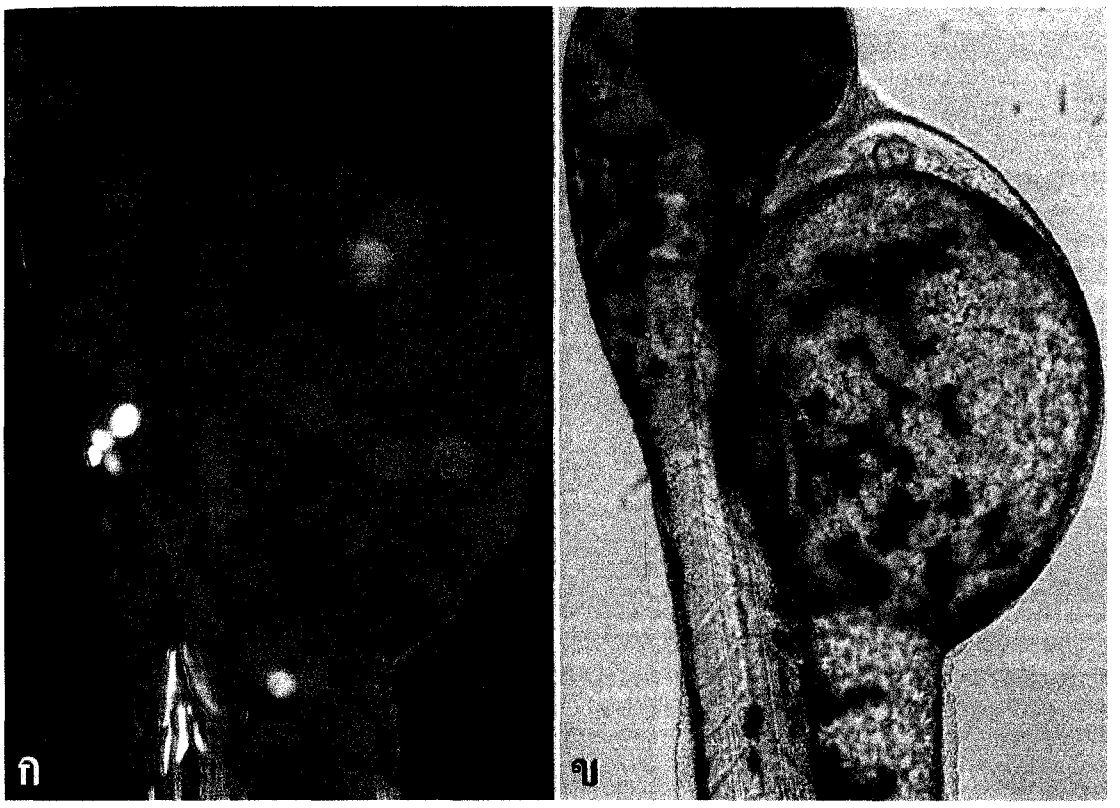
ก-ข การเรืองแสงของโปรตีน GFP เกิดในลูกปลาที่ได้รับการไมโครอินเจคชัน ภาพถ่ายภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นซ์

ค ปลาในกลุ่มควบคุมคือปลาที่ไม่ได้รับการฉีดยีน

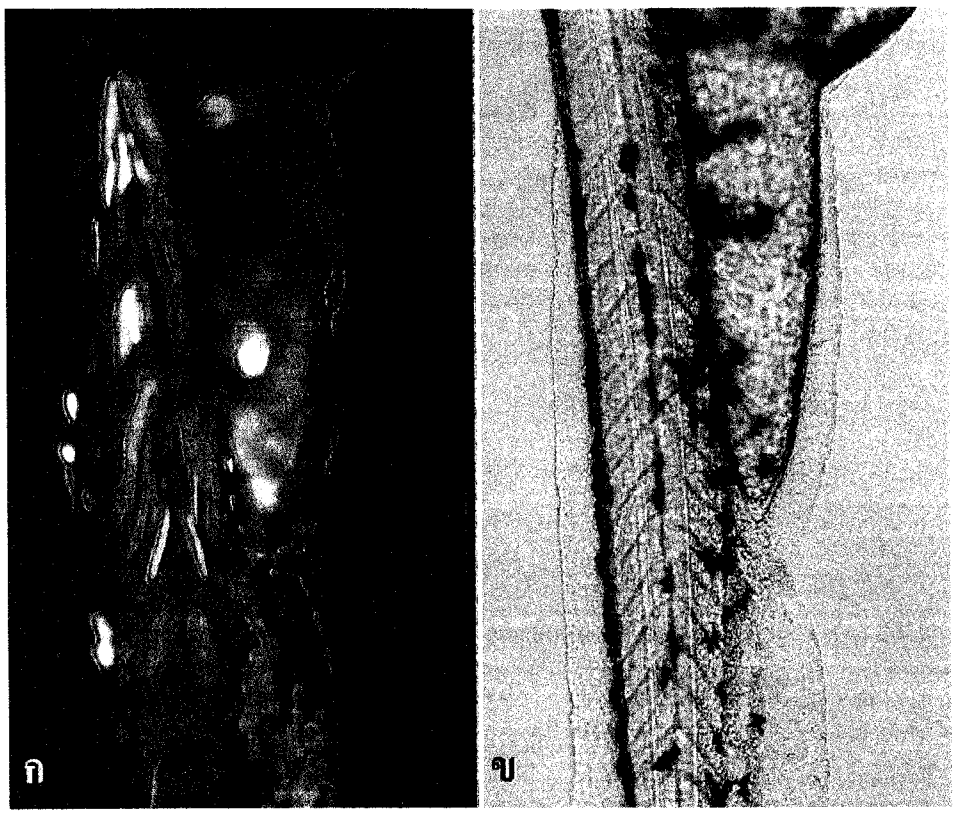
ง ภาพลูกปลาม้าลายถ่ายภายใต้แสง bright field



ภาพที่ 3.4 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนหัวของลูกปลาม้าลาย (ก) ลูกปลาม้าลายที่ระยะเดียวกันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จะเห็นสีเขียวอ่อนที่บริเวณหัว (ข) ภาพถ่ายหัวปลาภายใต้แสง bright field (ค) ภาพถ่ายที่ระยะ 48 ชั่วโมง หลังจากที่ไข่ปลาได้รับการผสม



ภาพที่ 3.5 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งเกิดขึ้นที่บริเวณลำตัว และ ผิวหนังของ yolk sac ของลูกปลาม้าลาย ที่ระยะ 48 ชั่วโมงหลังจากไข่ปลาได้รับการผสม
(ก) ภาพถ่ายภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นซ์
(ข) ภาพถ่ายภายใต้แสง bright field



ภาพที่ 3.6 การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งเกิดขึ้นที่บริเวณลำตัว ส่วนหาง และครีบของลูกปลาม้าลาย ที่ระยะ 48 ชั่วโมงหลังจากไข่ปลาได้รับการผสม

(ก) ภาพถ่ายภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นซ์

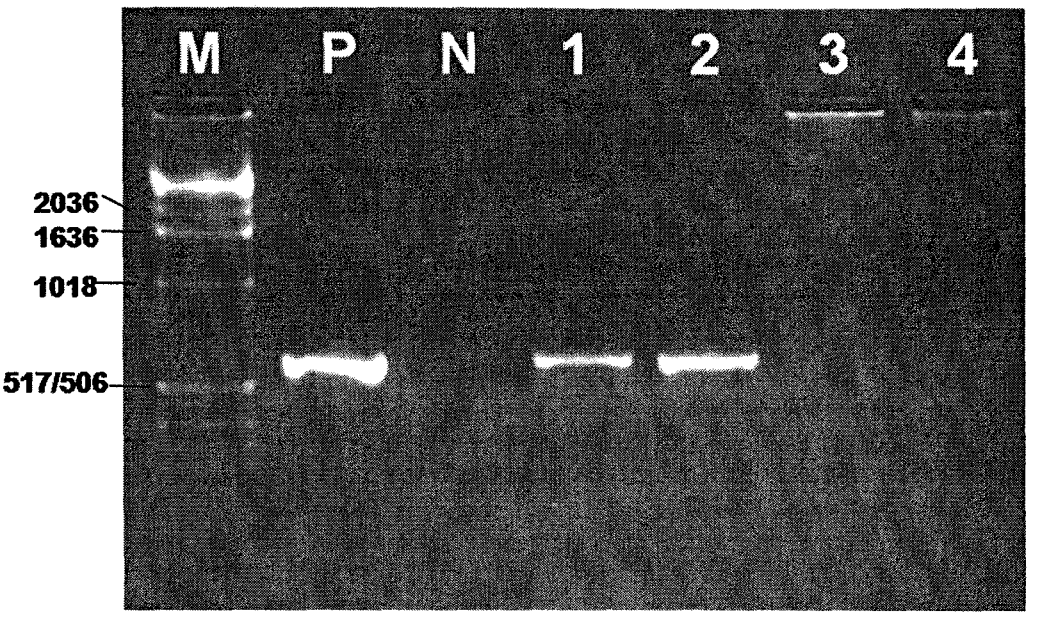
(ข) ภาพถ่ายภายใต้แสง bright field

3.5 การแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณส่วนหางของลูกปลา

จากการตรวจการแสดงออกของการเรืองแสงสีเขียวที่เกิดจากยีน GFP ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรเมอร์เตอร์เบต้าแอคติน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ที่บริเวณส่วนท้ายและส่วนหางของลูกปลา จะเห็นได้ว่าเซลล์ที่บริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีการแสดงออกของยีน GFP นอกจากนี้ที่บริเวณครีบของปลาก็พบการเรืองแสงสีเขียวที่เกิดจากยีน GFP ด้วยเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 3.6)

3.6 การตรวจการถ่ายยีนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

หลังจากทำการสกัด genomic DNA จากปลาที่ได้รับการถ่ายยีน และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน GFP โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ (รายละเอียด แสดงในบทที่ 2) เมื่อนำผลิตผล PCR มาทำการแยก 2 % agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ เป้าหมายซึ่งมีขนาดประมาณ 600 เบสแพร์ ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 3.7 จะเห็นได้ว่า positive control ที่ใช้ plasmid pAG เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ได้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาดประมาณ 600 เบสแพร์ ตามที่ประมาณการเอาไว้ การทำ PCR โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้จากลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีนได้ผลผลิตตรงกับผลผลิตที่ได้ใน positive control ในขณะที่การทำ PCR ในครั้งเดียวกันโดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้จากลูกปลาในกลุ่มควบคุม คือ ลูกปลาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ไม่ให้ผลผลิต PCR ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลสำเร็จของการถ่ายยีนเป้าหมายคือ pAG เข้าสู่ไข่ปลาม้าลายโดยวิธีไมโครอินเจคชัน



ภาพที่ 3.7 การตรวจผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

M DNA marker

P Positive control โดยใช้ expression vector pAG เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

N Negative control คือ ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่น้ำแทนเทมเพลท

1-2 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น genomic DNA ของปลาที่ได้รับการไมโครอินเจคชันด้วย pAG

3-4 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบเป็น genomic DNA ของปลาในกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ไม่ได้รับการไมโครอินเจคชัน

3.7 การถ่ายทอดของยีน GFP ไปสู่ลูกปลารุ่น F1 และ F2

เมื่อนำลูกปลาที่ได้รับการไมโครอินเจคชัน และผ่านการตรวจสอบว่ามีการแสดงออกของยีน GFP มาเลี้ยงต่อจนมีอายุประมาณ 3-4 เดือน โดยให้อาหารเป็นไรน้ำเค็มอย่างสม่ำเสมอ เพื่อตรวจสอบการถ่ายทอดของยีน GFP ไปยังลูกรุ่น F1 โดยการนำเอาปลาที่ได้รับการถ่ายยีนมาผสมกับปลาปกติ หรือปลาในกลุ่ม wild type จากนั้นนำไข่ปลามาเลี้ยงจนลูกปลาฟักออกเป็นตัวปลา ตรวจการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของลูกปลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และนับจำนวนลูกปลาที่มีการเรืองแสงสีเขียวต่อลูกปลาทั้งหมด พบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราการถ่ายทอดยีน GFP ไปยังรุ่นลูกอยู่ในอัตรา 14.23 $\pm$ 2.79 % (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) จากนั้นทำการเลี้ยงปลารุ่น F1 จนถึงระยะโตเต็มวัย นำไปผสมกับปลาปกติ พบอัตราการถ่ายทอดยีนจากปลารุ่น F1 ไปยังปลารุ่น F2 เท่ากับ 51.46 $\pm$ 1.21 (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

3.8 การตรวจการแสดงออกของยีนโดยวิธี reverse transcription PCR

เมื่อสุ่มลูกปลารุ่น F1 ที่มีการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวมาตรวจการแสดงออกของยีน GFP โดยทำการสกัด total RNA และนำไปสร้าง first strand cDNA แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ที่เตรียมได้ โดยการวิเคราะห์ยีนแอคติน ซึ่งเป็น house keeping gene เพื่อใช้ในการเทียบเคียงคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ ผลแสดงดังภาพที่ 3.8 จะเห็นได้ว่าคุณภาพของ cDNA ที่เตรียมได้จากตัวอย่างปลาที่ได้รับการถ่ายยีน (lane 1) และปลาปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (กลุ่มควบคุม) (lane 3-4) มีคุณภาพของ cDNA ใกล้เคียงกัน

นำตัวอย่างของ cDNA ที่ได้มีการเปรียบเทียบคุณภาพของ cDNA ระหว่างปลาที่ได้รับการถ่ายยีน (lane 1) และปลาปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (กลุ่มควบคุม) (lane 3-4) มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน GFP พบว่าปลาที่ได้รับการถ่ายยีนและมีการเรืองแสงสีเขียวให้ผลเป็นบวก (ภาพที่ 3.9, lane 1) และปลาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และไม่มีการเรืองแสงไม่ให้ผลผลิตของ PCR (ภาพที่ 3.9, lane 3-4) แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับการถ่ายยีนนั้น เป็นการได้รับการถ่ายทอดของยีน GFP จากพ่อแม่ไปสู่ลูก และมีการทรานสคริบชันของยีน GFP

ในการทดลองครั้งนี้ เมื่อทำการแยกเอาลูกปลาที่ได้รับยีน GFP มาอนุบาลต่อเพื่อสร้างสายพันธุ์ปลาที่แสดงลักษณะการเรืองแสงสีเขียวในปลาที่ถาวรนั้น มักจะพบว่าลูกปลามีอาการอ่อนแอ และมักจะตายเมื่ออนุบาลไปประมาณ 1 สัปดาห์ จึงได้ทำการสุ่มปลาที่มีลักษณะอาการอ่อนแอ มาตรวจสอบชิ้นส่วนยีน GFP ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR ซึ่งพบว่าปลาดังกล่าวมี

ยีน GFP อยู่ (ภาพที่ 3.9 lane 2) แต่เนื่องจากลูกปลาอ่อนแอ ทำให้คุณภาพของ cDNA ที่เตรียมได้มีคุณภาพไม่ดี จะเห็นได้จากผลของ PCR ของยีนแอคติน (ภาพที่ 3.8 lane 2) จึงทำให้ผลของ PCR ของยีน GFP ในภาพที่ 3.9 lane 2 ได้ผล PCR ที่ไม่เข้มนัก

ภาพที่ 3.8 การตรวจผลการแสดงออกของ actin cDNA โดยวิธี reverse transcription PCR

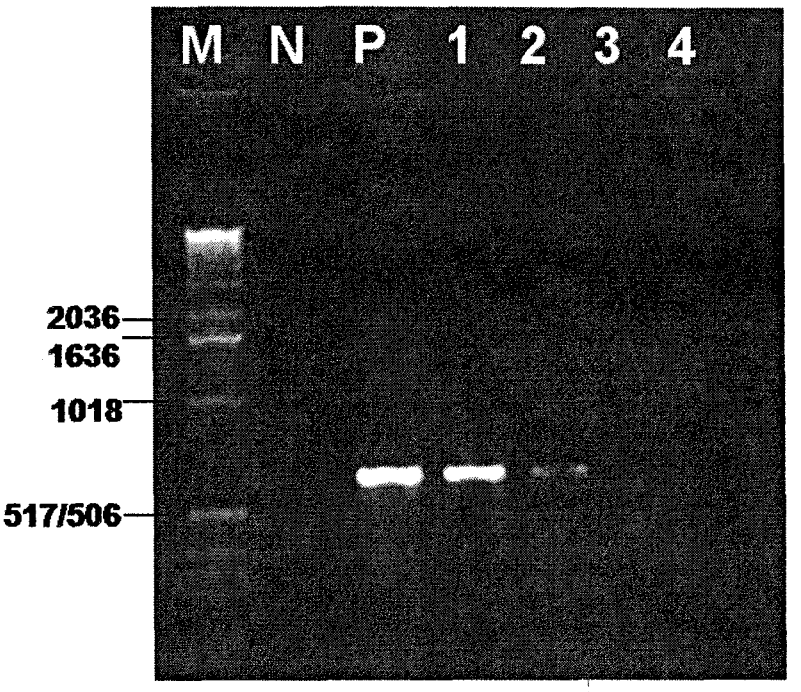
M DNA marker

N Negative control คือ ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่น้ำ แทนเทมเพลท

1 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น cDNA ของลูกปลา transgenic pAG

2 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น cDNA ของลูกปลา transgenic pAG (ลูกปลาที่มีการแสดงออกของยีน GFP แต่อ่อนแอ)

3-4 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบเป็น cDNA ของปลาในกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ไม่ได้รับการไมโครอินเจคชัน



ภาพที่ 3.9 การตรวจผลการแสดงออกของ GFP cDNA โดยวิธี reverse transcription PCR

M DNA marker

P Positive control โดยใช้ expression vector pAG เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

N Negative control คือ ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่น้ำ แทนเทมเพลท

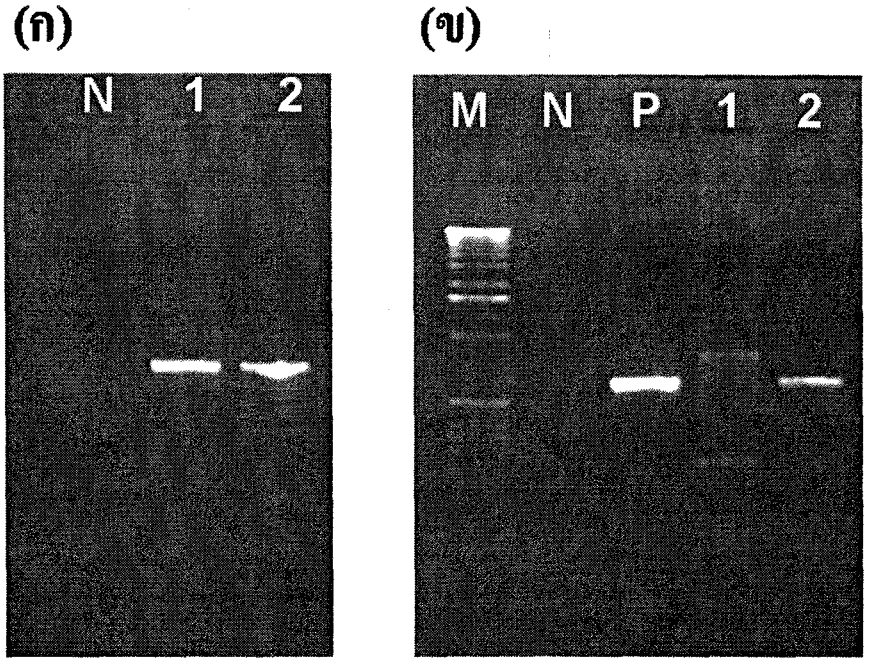
1 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น cDNA ของลูกปลา transgenic pAG

2 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น cDNA ของลูกปลา transgenic pAG (ลูกปลาที่มีการแสดงออกของยีน GFP เด่อ่อนแอ)

3-4 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบเป็น cDNA ของปลาในกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ไม่ได้รับการไมโครอินเจคชัน

3.9 การผลิตปลารุ่น F2 ที่ได้รับการถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว

จากการนำปลารุ่น F1 ที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงจนเจริญเติบโตเป็นพ่อแม่พันธุ์ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตปลาที่ได้รับการถ่ายทอดยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวในรุ่น F2 แล้วทำการเลี้ยงปลารุ่น F2 จากนั้นทำการวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน โดยการตัดครีบหลังเพื่อนำมาสกัด Genomic DNA และ ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนแอคตินในหลอดทดลอง เนื่องจากปริมาณ genomic DNA ที่ทำการสกัดได้มีปริมาณน้อย จึงทำการตรวจสอบคุณภาพ genomic โดยการทำ PCR ยีนแอคติน เพื่อใช้เป็น internal control ผลของการทำ PCR ยีนแอคนิต แสดงดังภาพที่ 3.10 (ก) และผลการวิเคราะห์ยีนเรืองแสงสีเขียวด้วยการทำ PCR แสดงผลดังภาพที่ 3.10 (ข) แสดงให้เห็นว่า ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนมีการถ่ายทอดยีน GFP ไปสู่ลูกรุ่น F2



ภาพที่ 3.10 การตรวจคุณภาพของการสกัด Gnomic DNA โดยการทำ PCR เพิ่มปริมาณยีนแอคติน (ก) และการตรวจผลการถ่ายทอดยีน GFP สู่ลูกปลารุ่น F2 โดยวิธี PCR (ข)

M DNA marker

N Negative control คือ ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่น้ำ แทนเทมเพลท

P Positive control โดยใช้ expression vector pAG เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

1 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น genomic DNA ของลูกปลา wild type

2 ปฏิกิริยา PCR ที่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น genomic DNA ของลูกปลา transgenic pAG รุ่น F2

อภิปรายผลการทดลอง

ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในปลา โดยใช้ปลาม้าลายเป็นปลาทดลองและใช้ expression vector pAG เป็นยีนเป้าหมาย จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการไมโครอินเจคชัน pAG เข้าไปในไข่ปลาม้าลายที่ระยะ 1-2 เซลล์ และทำการตรวจการแสดงออกของยีน GFP โดยการตรวจสอบการเรืองแสงสีเขียวในลูกปลาพบว่า ลูกปลามีการเรืองแสงซึ่งเกิดจากการแสดงออกของยีน GFP และผลของการทำ PCR ยืนยันความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยวิธีไมโครอินเจคชัน นอกจากนี้ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนได้มีการถ่ายทอดยีนไปยังลูกรุ่น F1 และ ลูกรุ่น F2 ได้ แสดงให้เห็นว่ายีนที่ใช้ทำการไมโครอินเจคชันเข้าสู่ไข่ปลาที่ได้รับการผสมแล้ว เข้าไปรวมกับโครโมโซม และมีการถ่ายทอดไปยังลูกปลารุ่นต่อไปตาม และการถ่ายทอดยีนดังกล่าวก่อให้เกิดลักษณะการเรืองแสงสีเขียวที่เกิดจากยีน GFP ในลูกปลา ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้จึงบรรลุวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ pAG เป็น expression vector ซึ่ง pAG ได้มีการตัดต่อให้มีการบรรทุกยีน GFP และให้อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรเมอร์เตอร์ที่ได้จากปลาเมดากะ ผลการแสดงออกของยีน pAG ในปลาม้าลายแสดงให้เห็นว่า โปรโมเตอร์แอคตินที่ได้จากปลาเมดากะ สามารถทำงานได้ในปลาม้าลาย แม้ว่าในการจัดจำแนกปลาตามอนุกรมวิธานนั้น ปลาม้าลาย และปลาเมดากะจะอยู่ต่างอันดับ (order) โดยปลาม้าลายจะอยู่ในอันดับ *Cypriniformes* ส่วนปลาเมดากะจะถูกจัดอยู่ในอันดับ *Beloniformes* แต่เนื่องจากยีนเบต้าแอคติน (β-actin gene) เป็นยีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม house keeping gene และเป็นยีนที่มีความเหมือนกันมากเมื่อเทียบเคียงลำดับเบสของยีนระหว่างสัตว์มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ดังนั้นโปรโมเตอร์ของยีนแอคติน ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ได้จากปลาเมดากะ สามารถทำงานได้เช่นเดียวกันในปลาม้าลาย ซึ่งผลการแสดงออกของยีนที่อวัยวะต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ ก็คล้ายคลึงกับผลการศึกษาการถ่ายยีน pAG เข้าสู่ปลาเมดะกะ (Hamada et al., 1998)

ผลการแสดงออกของยีน GFP ในปลาที่ได้รับการไมโครอินเจคชันนั้น จะเป็นการแสดงออกแบบชั่วคราว (transient expression) ซึ่งเป็นการแสดงออกของยีนที่อยู่นอกโครโมโซม (extrachromosomal DNA) แต่จะไม่ถาวร ระยะเวลาของการแสดงออกจะขึ้นกับการย่อยสลายของยีนดังกล่าวด้วยเอ็นไซม์นิวคลีเอสต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Takeuchi et al., 1999) การแสดงออกของยีนที่ได้รับการถ่ายยีนจะเป็นการแสดงออกที่ถาวร (stable expression) จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อยีนที่ที่ฉีดเข้าไปเข้าไปรวมอยู่กับโครโมโซมของปลา ซึ่งในการสร้างปลาจีเอ็มโอหรือการถ่ายยีนในปลานั้น มักพบการแสดงออกแบบชั่วคราวในปลาที่พึ่งได้รับการถ่ายยีน (Founder) และปลาที่มีการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าไปอย่างถาวรนั้นจะเกิดในปลารุ่นลูกหรือปลารุ่น F1 ขึ้นไป ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนและการใช้ประโยชน์จากปลาจีเอ็มโอ จึงต้องรอเลี้ยงปลาไปจนถึงรุ่น F1 ขึ้นไป (Saunders et al., 1998; Rahman and Maclean, 1999; Yoshizaki et al., 2000) นอกจากนี้การแสดงออกของยีน

GFP ในปลาที่ได้รับการถ่ายยีนยังเป็นลักษณะ Mosaic คือที่การเซลล์ของปลาตัวเดียวกันมีพันธุกรรมแตกต่างกัน ซึ่งเป็นเหตุการณ์ปกติที่มักพบในปลาที่ได้รับการถ่ายยีน (Culp et al., 1991; Tewari, 1992)

ลักษณะการเกิด mosaic เกิดขึ้นเนื่องจากสาเหตุของการที่ปลาได้รับยีนที่ได้จากการฉีดเข้าไปในไข่ปลาในระยะต้น ๆ ของการพัฒนาการ (1-2 เซลล์) ปลามีการพัฒนาแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างต่อเนื่อง แต่การแพร่กระจายของยีนที่ฉีดเข้าไปไม่สม่ำเสมอในเซลล์ทุกเซลล์ เป็นผลให้เมื่อยีนที่ฉีดเข้าไปนั้นไปแทรกตัวในโครโมโซมไม่เท่ากันในแต่ละเซลล์ (integration) นอกจากนี้การแทรกตัวของยีนที่ฉีดเข้าไปกับโครโมโซมนั้นเกิดอย่างไม่จำเพาะเจาะจง จึงทำให้เซลล์แต่ละเซลล์ของปลาที่ได้รับการฉีดยีนเมื่อเริ่มต้น ที่เรียกว่า ปลา Founder นั้นมีการแทรกตัวและมีการแสดงออกของยีนที่ฉีดเข้าไปแตกต่างกัน จึงต้องนำปลา founder ดังกล่าวนี้มาผสมพันธุ์ต่อเพื่อสร้างปลารุ่น F1 ปลารุ่น F1 ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างปลา Founder กับปลาปกติจะไม่เป็น mosaic หมายถึงเซลล์ทุกเซลล์จะมี genotype เหมือนกัน เพราะปลา F1 จะได้จากเซลล์สืบพันธุ์เพียงเซลล์เดียวเท่านั้น แต่จะมี genotype ที่เป็น transgenic เพียงครึ่งเดียว (1n) อีกครึ่งหนึ่งเป็นปลาปกติ ดังนั้นเมื่อนำปลารุ่น F1 ไปผสมพันธุ์ต่อกับปลาปกติเพื่อให้ได้ปลารุ่น F2 ความน่าจะเป็นที่จะได้ปลารุ่น F2 เป็น transgenic จึงเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์

ยีน GFP ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการเชื่อมส่วนของ nuclear localization signal ของ Simian virus 40 ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ประโยชน์สำหรับการติดเครื่องหมายส่วนของนิวเคลียสภายในเซลล์ เมื่อใช้ต่อเชื่อมกับโปรตีนเป้าหมาย จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายแสดงส่วนของนิวเคลียสได้ เพื่อประโยชน์สำหรับในงานการถ่ายโอนนิวเคลียสจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (nuclear transfer) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ nuclear localization signal ที่เชื่อมต่อกับยีน GFP ทำให้เห็นนิวเคลียสของเซลล์ได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกันกับงานทดลองในหนูที่ศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของรีเซบเตอร์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในนิวเคลียสของเซลล์ (Cicatiello et al., 1995)

ในการศึกษาครั้งนี้ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนได้ถ่ายทอดยีนเป้าหมายไปยังรุ่นลูก แต่เนื่องจากการเกิด mosaic ซึ่งจะเกิดในเซลล์ ๆ ต่างของตัวอ่อนปลารวมทั้งเซลล์ที่เป็นต้นตอของอวัยวะสืบพันธุ์ (Tewari, 1992) จึงเป็นผลทำให้อัตราการถ่ายทอดยีนไปยังรุ่นลูกไม่สามารถคาดการณ์ได้ขึ้นกับการเกิด mosaic และการเชื่อมของยีนเป้าหมายกับจีโนมของเซลล์ต้นตอของระบบสืบพันธุ์ โดยในการศึกษาครั้งนี้พบอัตราการถ่ายทอดของยีน GFP จากปลาที่ได้ทำการไมโครอินเจคชัน (founder) ไปยังรุ่นลูก F 1 อยู่ที่อัตราประมาณ 14 % ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของการถ่ายยีนในปลาเมดากะ ซึ่งได้ใช้โปรโมเตอร์ชนิดเดียวกันคือ โปรโมเตอร์เบต้าแอคตินเชื่อมต่อกับยีนเป้าหมาย *lacZ* gene แล้วทำการไมโครอินเจคชัน expression vector นี้เข้าสู่ไข่ของปลาเมดากะ การเก็บข้อมูลในรุ่น F1 พบว่ามีอัตราการถ่ายทอดของปลาที่ได้รับการถ่ายยีนที่ตรวจนับในลูกปลาเท่ากับ 15 % (Takagi et al., 1994)

การตรวจการแสดงออกของยีนในครั้งนี้ ได้ทำการตรวจการแสดงออกของยีนที่ระดับการสร้างโปรตีน โดยการตรวจสอบฟีโนไทป์ของการเรืองแสงของโปรตีนสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ และทำการตรวจสอบการแสดงออกที่ระดับการสร้าง mRNA โดยวิธี reverse transcription PCR พบว่าลูกปลาที่ได้จากพ่อแม่ที่ได้รับการถ่ายยีน GFP จะมีการแสดงออกของยีน GFP ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้การทำ reverse transcription PCR ของ actin cDNA เป็น internal control เพื่อเทียบเคียงปริมาณของ RNA

ลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีนในรุ่น F1 เมื่อได้ทำการอนุบาลจนลูกปลามีอายุประมาณ 1 สัปดาห์ขึ้นไป มักพบว่าจะมีอาการอ่อนแอ นอนอยู่ตามพื้นตู้ ไม่ค่อยเคลื่อนไหวไปมา และจะมีอัตราการรอดต่ำมาก ซึ่งแตกต่างจากปลาปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อนำลูกปลาที่มีอาการอ่อนแอมาทำการตรวจการแสดงออกด้วยวิธี reverse transcription PCR จะพบว่า ผลของการทำ reverse transcription PCR ของ actin cDNA ชี้ให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีนโดยทั่วไปในร่างกายต่ำ แต่มีการแสดงออกของยีน GFP อยู่ในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างจากปลาในกลุ่มปกติ (เมื่อเทียบเคียงความเข้มของผลผลิต PCR ที่ได้จากยีน GFP ต่อยีน actin) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงพบว่าลูกปลาที่ได้จากพ่อแม่ที่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนใหญ่จะมีความผิดปกติ ไม่สามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปลามีการแสดงออกของยีน GFP สูง โปรตีน GFP ที่ได้จากการแสดงออกในตัวลูกปลาอาจมีความเป็นพิษ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและการดำรงชีวิตของลูกปลา จึงทำให้ลูกปลามีอาการอ่อนแอและตายในที่สุด ผลการศึกษาดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าลูกปลาม้าลายที่ได้รับการถ่ายยีน GFP ที่มีการแสดงออกของยีน GFP ที่ระดับสูง มักไม่สามารถเลี้ยงต่อไปจนเป็นพ่อแม่พันธุ์ในรุ่นต่อไปได้ (Higashijima et al., 1997) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการเพาะพันธุ์และเลี้ยงลูกปลาม้าลายที่ได้รับการถ่ายยีน GFP ในระดับที่ไม่สูงมากนัก และสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างศึกษาสำหรับบทปฏิบัติการศึกษาต่อไป (ภาคผนวก)

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีน pAG โดยวิธีไมโครอินเจคชันเข้าสู่ไข่ของปลาม้าลาย ทำให้ได้ปลาม้าลาย (founder) ที่ได้รับยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว และมีการแสดงออกเห็นเป็นเซลล์สีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และให้ผลการตรวจสอบเป็นบวกจากการตรวจสอบการถ่ายยีนโดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

2. การแสดงออกของยีนเรืองแสงสีเขียว ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเมอตอร์เบต้าแอคตินที่ได้จากปลาเมดากะ จะเกิดขึ้นตลอดลำตัวปลา ตา ครีบปลา และผนังเซลล์ที่ห่อหุ้มถุงไข่แดง แสดงให้เห็นว่า โปรโมเตอร์แอคตินที่ได้จากปลาเมดากะนั้น สามารถทำงานได้ในเซลล์ของปลาม้าลายเช่นเดียวกัน

3. พลาสมิด pAG ซึ่งได้บรรทุกยีน GFP และเชื่อมต่อกับส่วนของ nuclear localization signal จะทำให้นิวเคลียสของเซลล์มีสีเขียวเข้มมากกว่าส่วนของไซโตพลาสซึมทำให้สามารถเห็นส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ได้ชัดเจน

4. การเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีน GFP โดยวิธี reverse transcription PCR ในปลารุ่น F1 แสดงถึงการถ่ายทอดของยีน GFP จากปลาที่ได้รับการไมโครอินเจคชัน ไปสู่ปลารุ่นลูก (F1) ดังนั้นการถ่ายยีนเป็นวิธีการหนึ่งของการปรับแปลงพันธุกรรมสัตว์เพื่อให้เกิดการถ่ายทอดยีนที่ได้มีการปรับแปลงจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้

5. ปลาที่ได้รับการไมโครอินเจคชันในการศึกษาครั้งนี้ สามารถถ่ายทอดยีนเรืองแสงสีเขียวไปยังลูกรุ่น F1 และ F2 ได้ และมีผลทำให้ลูกรุ่น F1 และ F2 มีการเรืองแสงสีเขียวด้วยเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่านอกจากกจะมีการถ่ายทอดยีนทางพันธุกรรมแล้ว ยังมีการแสดงลักษณะของยีนเป้าหมายในรุ่นลูกด้วย อย่างไรก็ตามปลารุ่น F1 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มักจะอ่อนแอกว่าปลาปกติ จึงทำการเพาะพันธุ์ปลาเพิ่มเติมเพื่อค้นหาปลาที่ได้รับการถ่ายยีน

ในระดับที่เหมาะสมที่จะสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติต่อไปได้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการใช้เป็นตัวอย่างปลาในการศึกษาเรื่องเทคโนโลยีชีวภาพของสัตว์น้ำต่อไป (ภาคผนวก)

ปัญหาและอุปสรรค

1. น้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลามักจะมีคลอรีนอยู่มากบ้างน้อยบ้าง คุณภาพน้ำไม่สม่ำเสมอ ทำให้การจัดการคุณภาพน้ำก่อนการนำน้ำมาใช้ในการเลี้ยงปลาม้าลายมีความยุ่งยาก และต้องใช้งบประมาณสิ้นเปลืองไปกับการจัดหาอุปกรณ์เพิ่มเติมสำหรับการกำจัดคลอรีน

2. ในการทำการผสมพันธุ์ปลาม้าลายเพื่อนำเอาไข่ปลามาทำการไมโครอินเจคชัน ซึ่งควบคุมโดยการให้แสงไฟอย่างสม่ำเสมอแล้วก็ตาม มักพบว่าในบางวันที่มีการเตรียมการฉีดแล้ว แต่ปลามักให้ไข่บ้าง ไม่ให้บ้าง ทำให้การทดลองใช้ระยะเวลานานออกไปมาก

3. ไข่ปลาม้าลายในบางครั้งที่ทำการผสมอย่างต่อเนื่อง มักจะมีพัฒนาการที่ไม่ปกติ ไม่สามารถพัฒนาการจนไปถึงฟักออกเป็นตัวได้ ทำให้การทดลองประสบความล้มเหลวบ่อยครั้ง ทำให้ผู้วิจัยต้องมีการเปลี่ยนปลาพ่อแม่พันธุ์บ่อยครั้ง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ขยายเวลาทำวิจัยออกไป เพราะต้องเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ปลาหลายครั้งและต้องรอเวลาที่ปลาพร้อมจะผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ไข่ปลาที่สมบูรณ์พร้อมเพื่อนำมาใช้ในการไมโครอินเจคชัน

4. ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเลี้ยง ปลาในรุ่น F1 ที่เป็น transgenic fish ไปประมาณ 1 สัปดาห์ ปลาจีเอ็มโอนี้จะอ่อนแอ และตายลงในที่สุด เหตุการณ์นี้อาจจะอธิบายได้ว่ายีนที่ทำการถ่ายไปในปลาม้าลาย จะเป็นพิษต่อลูกปลาในรุ่น F1 ดังนั้นเพื่อให้ได้ปลาจีเอ็มโอที่ถาวรนั้น ผู้วิจัยจะทำการเลี้ยงปลาต่อไป โดยการทำการผสมพันธุ์ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนกับปลาปกติ เพื่อให้ได้ปลารุ่น F1 ที่มีการเชื่อมต่อของยีน pAG กับโครโมโซมในลักษณะที่ไม่เป็นผลเสียต่อการดำรงชีวิตของปลา และมีระดับการแสดงออกของยีนเรืองแสงสีเขียวที่ไม่เป็นอันตรายต่อปลา

การประยุกต์ใช้

ผลงานวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาสวยงามและปลาที่ใช้เป็นโมเดลการทดลอง โดยการนำไปประยุกต์ใช้นั้นควรจะทำการตัดต่อยีนใหม่ ใช้โปรโมเตอร์อื่น ๆ ที่อาจจะทำให้เกิดการแสดงออกที่สูงกว่านี้ และไม่

เป็นอันตรายต่อเซลล์ของปลา และอาจจะมีการเปลี่ยนยีนเป้าหมายเป็นยีนที่ทำให้เกิดสีต่าง ๆ เช่น Red Fluorescent Protein, Cyan Fluorescent Protein, หรือ Yellow Fluorescent Protein นอกจากนี้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้กับปลาสวยงามอื่น ๆ ได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการถ่ายยีนในปลานั้นยังอยู่ในระดับขั้นตอนการศึกษาวิจัย การพัฒนาเทคนิคดังกล่าวเพื่อนำไปใช้สร้างปลาสวยงามเพื่อการค้ายังต้องการมาตรการที่ชัดเจนในการระมัดระวังและป้องกันไม่ให้ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนหลุดรอดออกไปสู่แหล่งน้ำสาธารณะ

นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นบทปฏิบัติการในการศึกษาทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในสัตว์น้ำ (ภาคผนวก) (ซึ่งได้ใช้สอนแล้วในบทปฏิบัติการเรื่องเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ในรายวิชา 303 319 ปฏิบัติการกายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยาของสัตว์) และสามารถใช้ยีน pAG เป็นการฝึกเริ่มต้นสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่ทำวิจัยด้านการถ่ายยีนในปลาต่อไป

บรรณานุกรม

Amsterdam, A., Lin, S. and Hopkins, N. (1995). The *Aequorea Victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. Developmental Biology, 171:123-129.

Amsterdam, A., Lin,S., Moss, L.G. and Hopkins, N. (1996). Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos.Gene, 173:99-103.

Bondioli, K.R., Biery, K.A., Hill, K.G., Jones, K.B., and De Mayo, F.J. (1988) Production of transgenic cattle by pronuclear injection. p. 265-274. *In* First, N.L. and Haseltine, F.P. (eds) Transgenic animals. Butter-Hinemann. Boston, USA.

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G., Takeuchi, Y., Morita, T. and Takeuchi T. (2002). Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. Marine Biotechnology. 4: 256-266

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G. and Takeuchi T. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. Biochemical Biophysical Research Com.munication 310: 1089-1095

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 263:802-805.

Cicatiello, L., Cobellis, G., Addeo, R., Papa, M., Altucci, L., Sica, V., Bresciani, F., LeMeur, M., Kumar, V.L., Chambon, P., Weisz, A. (1995). In vivo functional analysis of the mouse estrogen receptor gene promoter: a transgenic mouse model to study tissue-specific and developmental regulation of estrogen receptor gene transcription. Molecular endocrinology, 9:1077-1090.

Culp, P., Nusslein-Volhard, C., and Hopkins, N. (1991). High frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafsih eggs. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA., 88:7953-7957.

Gordon, J.W. and Ruddle, F.H. (1985). DNA mediated genetic transformation of mouse embryo and bone narrow-a review. Gene, 33: 121-136.

Guise, K.S., Kapuscinski, A.A.R., Hackett, P.B., Faras, A.J. (1988). Gene transfer in fish. p. 295-306. *In* First, N.L. and Haseltine, F.P. (eds) Transgenic animals. Butter-Hinemann. Boston, USA.

Hamada, K., Tamaki, K., Sasado, T., Watai, Y., Kani, S., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Kinoshita, M., Kohno, R., Takagi, S. and Kimura, M. (1998). Usefulness of the medaka β-actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). Molecular Marine Biology and Biotechnology, 7:173-180.

Hammer, R.E., Purselt, V.G., Rexroad Jr. C.E., Walt, R.J., Bolet, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature, 315: 680-683.

Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y. and Eguchi, G. (1997). High frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. Developmental Biology, 192:289-299.

Hunter, C.V., Tiley, L.S. and Sang, H.M. (2005). Developments in transgenic technology: applications for medicine. Trends in Molecular Medicine, 11: 293-297.

Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y. and Okabe, M. (1995). A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green flurescent protein (GFP). FEBS Letters, 375:125-128.

Inoue, K., Yamada, S. and Yamashita, S. 1993. Introduction, expression, and growth-enhancement effect of rainbow trout growth hormone cDNA fused to an avian chimeric promoter in rainbow trout fry. Journal of Marine Biotechnology, 1:131-134.

Lewin, B. (1994). Gene V. Oxford University Press. Oxford, 1272 p.

Long, O., Meng, A., Wang, H., Jessen, J.R., Farrell, M.J. and Lin, S. (1997). *GATA-1* expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. Development, 124:4105-4111.

Meng, A., Tang, H., Ong, B.A., Farrell, M.J. and Lin, S. (1997). Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2. . Proceedings of the National Academy of Sciences. USA., 94:6267-6272.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 545 p.

Mori, T. and Devlin, R.H. (1999). Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and non pituitary tissues of normal and growth hormone transgene salmon. Molecular Cell Endocrinology, 149:129-139.

Moss, J.B., Price, A.L., Raz, E., Driever, W. and Rosenthal, N. (1996). Green fluorescent protein marks skeletal muscle in murine cell lines and zebrafish. Gene, 173:89-98.

Mumm, J.S., Williams, P.R., Godinho, L., Koerber, A., Pittman, A.J., Roeser, T., Chein, C-B., Baier, H. and Wong, R.O.L. (2006). In vivo imaging reveals dendritic targeting of laminated afferents by zebrafish retinal ganglion cells. Neuron, 52:609-621.

Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Biruberg, N.C. and Evans, R.M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature, 300:611-615.

Rahman, M.A. and MacLean, N. (1999). Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. Aquaculture, 173:333-346.

Salter, D.W. and Crittenden, L.B. (1988). Insertion of a disease resistance gene into the chicken germline. p. 125-132. *In* First, N.L. and Haseltine, F.P. (eds) Transgenic animals. Butter-Hinemann. Boston, USA.

Saunders, R.L., Fletcher, G.L., Hew, C.L. (1998). Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon. Aquaculture, 168:177-193.

Takagi, S., Sasado, T., Tamiya, G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A., Kimura, M. (1994). An efficient expression vector for transgenic medaka construction. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3:192-199.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G. and Takeuchi, T. (1999). Green fluorescent protein as a cell-labeling tool and a reporter of gene expression in transgenic rainbow trout. Marine Biotechnology, 1:448-457.

Tannahill, D., Bray, S. and Harris, W.A. (1995). A *Drosophila E(spl)* gene is "Neurogenic" in Xenopus: a green fluorescent protein study. Developmental Biology, 168:694-697.

Tewari, R., Michardvanhee, C., Terrot, E. and Chourrout, D. 1992. Mendelain transmission, structure and expression of transgenes following their injection into the cytoplasm of trout eggs. Transgenic research, 1:250-260.

Wang, S. and Hazelrigg, T. (1994). Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. Nature, 369:400-403.

Westerfield, M. (1993). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*)." University of Oregon Press, Oregon. USA.

Yoon, S.J., Liu, Z., Kapuscinski, A.R., Hockett, P.B., Faras, A. and Guise, K.S. (1989). Succesful gene transfer in fish. P. 29-34. *In* Verma, I., Mulligan, R. and Beauset, A. (eds). Gene transfer and gene therapy. Alan R. Liss, Inc. New York, USA.

Yoshizaki, G., Oshiro, T. and Takashima, F. (1991). Introduction of carp globin gene into rainbow trout. Nippon Suisan Gakkashi, 57:819-824.

Yoshizaki, G. Takeuchi, Y., Sakatani, S. and Toshio, Takeuchi, T. (2000). Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout *vasa*-like gene promoter. International Journal of Developmental Biology, 44:323-326.

Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzalea-Villasenor, L.I., Lin, C.M., Dunham, R.A., Chen, T.T. and Powers, D.A. (1990) Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). Molecular Reproduction and Development, 25:3-13.

Zhang, P., Zhou, J. and Wang, R. (1993). Gene transfer in goldfish, *Carrasius auratus*, by oocytes microinjection. Aquaculture, 111:311.

Zou, J., Beermann, F., Wang, J., Kawakami, K. and Wei, X. (2006). The Fugu *tyrp1*promoter directs specific GFP expression in zebrafish: tools to study the RPE and the neural crest-derived melanophores. Journal compilation, 19:615-627.

http://www.i-sis.org.uk/TFC.php

ภาคผนวก

ปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพทางการผลิตสัตว์
เรื่อง การตรวจหายีนในปลาที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี PCR

เทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการผลิตสัตว์ เช่น การพัฒนาการผลิตเอ็นไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยอาหาร เพื่อใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ และใช้เทคนิคทางอณูวิทยาในการศึกษาด้านยีนเพื่อประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เทคโนโลยีการถ่ายยีนเข้าสู่ตัวสัตว์ (Gene Transfer Technology) ซึ่งได้มีการศึกษาในระดับการวิจัยว่าสามารถปรับแปลงพันธุกรรมสัตว์และก่อให้เกิดลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมปศุสัตว์ อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีการถ่ายยีนในสัตว์ที่จะนำไปบริโภคยังไม่เป็นที่ยอมรับให้ผลิตเป็นอาหารของมนุษย์ได้ เพราะยังต้องรอการศึกษาพิสูจน์ความปลอดภัยในการบริโภค แต่เทคโนโลยีการถ่ายยีนดังกล่าวนี้ก็ยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ได้

เทคโนโลยีการถ่ายยีนในสัตว์จะประกอบด้วยความรู้และเทคนิคหลายด้าน เช่น การเลี้ยงสัตว์ เทคนิคการผสมเทียมสัตว์ และเทคนิคทางด้านอณูวิทยา ดังนั้นเทคโนโลยีการถ่ายยีนในสัตว์หลายชนิดจึงมีขั้นตอนต่าง ๆ มาก ในที่นี้จึงจะศึกษาเทคนิคการถ่ายยีนในปลา เพราะปลาเป็นสัตว์ที่ผสมพันธุ์ภายนอก ให้ไข่ปลาจำนวนมากในแต่ละครั้งที่ทำการผสมพันธุ์ ตัวอ่อนที่ได้รับการผสมแล้วไม่จำเป็นต้องเจริญในมดลูกของแม่ รวมทั้งวงจงชีวิตสั้น โดยเฉพาะปลาม้าลาย (Zebrafsih, *Danio rerio*) ซึ่งเป็นปลาที่มักจะถูกนิยมใช้เป็นปลาทดลองสำหรับงานวิจัยในด้านชีวภาพ ทางการแพทย์ รวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น

สัตว์ที่ได้รับการถ่ายยีน (transgenic animal) หรือ สัตว์ที่ถูกปรับแปลงพันธุกรรม (Genetically modified animal) สร้างได้โดยการถ่ายยีนเป้าหมาย เข้าสู่ตัวอ่อนของสัตว์ ในระยะต้น ๆ ของการพัฒนาการของตัวอ่อน โดยยีนเป้าหมายจะเป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่แสดงลักษณะที่ต้องการเพิ่มหรือปรับแปลงในตัวสัตว์ เช่น การถ่ายยีนฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (Growth hormone gene) ให้กับปลาเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในปลา หรือยีนเครื่องหมาย (marker gene) เช่นยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein; GFP) ซึ่งนิยมใช้เป็นยีนเครื่องหมายหรือยีนบ่งชี้ในการถ่ายยีน เพราะสามารถตรวจการแสดงออกของยีนได้ง่าย โดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ในขณะที่ปลายังมีชีวิตอยู่ได้

การถ่ายยีนในปลาทำได้โดยการเตรียมยีนเป้าหมาย และฉีดยีนเป้าหมายเข้าสู่ตัวอ่อนของปลา (ไข่ปลาที่ได้รับการผสมแล้วที่ระยะ 1 เซลล์) แล้วเลี้ยงปลาจนโตเต็มวัย ปลาส่วนใหญ่ที่ได้รับการถ่ายยีนจะเกิดลักษณะ Mosaic หมายถึงการที่เซลล์แต่ละเซลล์ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันมีจีโนม

แตกต่างกัน หรือหมายถึงเซลล์ของปลาที่ได้รับการถ่ายยีนมียีนเป้าหมายหรือมีการแสดงออกของยีนเป้าหมายในเซลล์ต่าง ๆ ของปลาตัวเดียวกันไม่เหมือนกัน จึงต้องนำปลาที่ได้รับการฉีดยีน (Founder) มาผสมพันธุ์กับปลาปกติเพื่อสร้างปลารุ่น F1 ซึ่งจะได้จำนวนของปลาที่ได้รับการถ่ายยีนแตกต่างกันไป แต่ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนในรุ่น F1 จะมีเซลล์ทุกเซลล์ของปลาเป็นเซลล์ที่มียีนเป้าหมายอยู่เหมือนกัน (ไม่เป็น Mosaic) จากนั้นนำปลารุ่น F1 ไปผสมพันธุ์กับปลาปกติเพื่อสร้างปลารุ่น F2 โดยความน่าจะเป็นที่จะได้ปลารุ่น F2 ที่เป็นปลาที่ได้รับการถ่ายยีนเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์

การตรวจการถ่ายยีนสามารถทำได้หลายวิธี แต่ในปัจจุบันวิธีการที่นิยมคือการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย โดยวิธี polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณยีนในบริเวณยีนที่กำหนดอย่างจำเพาะเจาะจงในหลอดทดลองแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยปฏิกิริยาจะมีการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนเป้าหมาย และภายในปฏิกิริยาจะมีสาร dNTP (dATP; deoxyadenosine 5'-triphosphate, dCTP; deoxycytosine 5'-triphosphate, dGTP; deoxyguanosine 5'-triphosphate, dTTP; deoxythymidine 5'-triphosphate) บัฟเฟอร์ และเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสายดีเอ็นเอ ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* กลไกปฏิกิริยาจะเกิดจากการที่เพิ่มอุณหภูมิประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) แยกออกจากัน จากนั้นทำการลดอุณหภูมิลงมาประมาณ 45-65 องศาเซลเซียสเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบ และทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการที่เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ การเพิ่มและลดอุณหภูมิอย่างต่อเนื่องจำนวน 30-40 รอบ ทำให้เกิดเป็นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูกโซ่ ทำให้ได้ดีเอ็นเอผลผลิตของ PCR จำนวนมากพอที่จะตรวจดูด้วยการนำมาแยกด้วย agaros gel electorphoresis

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis เป็นการแตรียมวุ้นตัวกลางที่ทำด้วยผงวุ้น agarose นำมาต้มกับบัฟเฟอร์ Tris-boric acid EDTA (TBE: 89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0) นำผลผลิต PCR ที่ได้มาใส่ในช่องที่ใส่สารตัวอย่างในแผ่นวุ้น แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าคงที่ ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR จะเคลื่อนที่ในแผ่นวุ้นอะกาโรสภายใต้สนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยระยะทางการเคลื่อนที่จะขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอ ทำให้สามารถแยกขนาดดีเอ็นเอ และตรวจดูดีเอ็นเอที่ต้องการได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหลักการถ่ายยีนในปลา
2. เพื่อฝึกปฏิบัติการตรวจการถ่ายยีนโดยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction)

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่อง Thermal Cycler

ชุด electrophoresis

Micro pipette ขนาด 10 และ 100 ไมโครลิตร

dNTP

Ex Taq polymerase และ บัฟเฟอร์

primer GFP-F (5'-GACGTAAACGGCCACAAGT-3')

GFP-R (5'-TCCAGCAGGACCATGTGAT-3')

actin-F (5'-ACCTCTCTGGCCCCCTCCAC-3')

actin-R (5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3')

ผง agarose

TBE buffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0)

2.0 µg/ml ethidium bromide

Loading dye (0.25 % bromophenol blue, 0.25 % Xylene cyanol FF, 33 % glycerol)

วิธีการ

1. **การสังเกตการเรืองแสงของปลาที่ได้รับการถ่ายยีน**

นำลูกปลาที่ได้รับการถ่ายยีน GFP และลูกปลาปกติ มาสลบด้วยน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ที่ใส่ phenoxyethanol 300 ppm แล้วนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นซ์ ในห้องมืด สังเกตปลาในหัวข้อต่อไปนี้

1.1 รูปร่างและลักษณะภายนอกของปลา (เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงปกติ)

1.2 การเรืองแสงของปลาที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับปลาปกติ

2. **การตรวจการถ่ายยีนด้วยวิธี PCR โดยการเพิ่มปริมาณยีนแอคติน และยีน GFP**

2.1 เตรียมหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด เขียนระบุหลอดที่ข้างหลอด

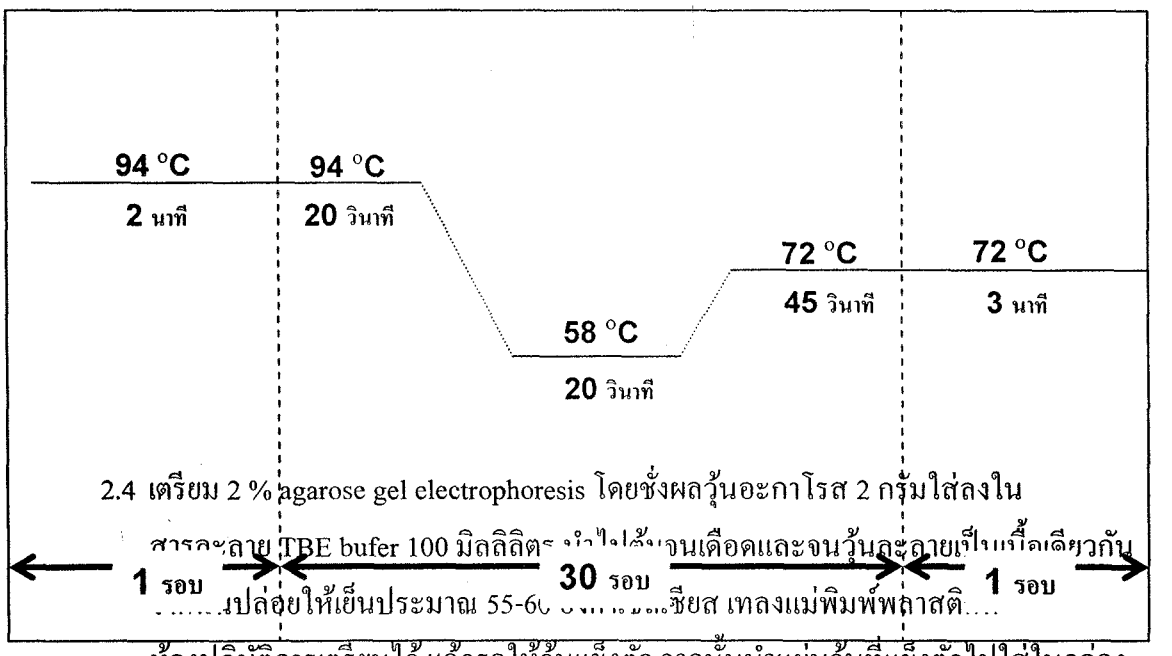
2.2 เตรียมสารผสมพีซีอาร์ สำหรับเพิ่มยีน GFP ในปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร (µl) ดังต่อไปนี้

ตัวอย่าง	น้ำ (µl)	200 µM dNTP (µl)	DNA template (µl)	primer (µl) 100 pmol		10 X buffer (µl)	เอ็นไซม์ Taq (µl)
				GFP-F	GFP-R		
Negative	6.15	0.8	-	1	1	1	0.05
Positive	5.15	0.8	pAG 1 µl	1	1	1	0.05
ปลา 1*[1]	5.15	0.8	1 µl	1	1	1	0.05
ปลา 2*[2]	5.15	0.8	1 µl	1	1	1	0.05
ปลา 3*[3]	5.15	0.8	1 µl	1	1	1	0.05

*[1-2] ตัวอย่าง genomic DNA ที่ได้จากปลาที่ได้รับการถ่ายยีน

*[3] ตัวอย่าง genomic DNA ที่ได้จากปลาปกติ

2.3 นำตัวอย่างที่เตรียมได้เข้าเครื่อง Thermal cycler และปรับการทำงานของเครื่องดังต่อไปนี้



2.4 เตรียม 2 % agarose gel electrophoresis โดยชั่งผลวุ้นอะกาโรส 2 กรัมใส่ลงใน สารละลาย TBE bufer 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดและจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปล่อยให้เย็นประมาณ 55-60 องศาเซียส เทลงแม่พิมพ์พลาสติก ห้องปฏิบัติการเตรียมไว้ แล้วรอให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นนำแผ่นวุ้นที่แข็งตัวไปใส่ในกล่องพลาสติกที่จะต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า แล้วเท TBE buffer ให้ท่วมแผ่นวุ้น

2.5 นำตัวอย่างผลผลิต PCR ที่ได้มาผสมกับสี (loading dye) ที่ห้องปฏิบัติการเตรียมไว้ หยอดลงในช่องตัวอย่าง แล้วเปิดให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 100 มิลลิลิแอมแปร์ ใช้เวลาจนกระทั่งสารตัวอย่างเดินทางไปประมาณ 3 ใน 4 ของแผ่นวุ้น (สังเกตจากสีที่ผสมใน

ตัวอย่างดีเอ็นเอ) นำแผ่นวุ้นไปย้อมสี ethidium bormide ที่ห้องปฏิบัติการเตรียมไว้ แล้วส่องดูผลและบันทึกผลภายใต้แสงอัลตร้าไวเล็ต

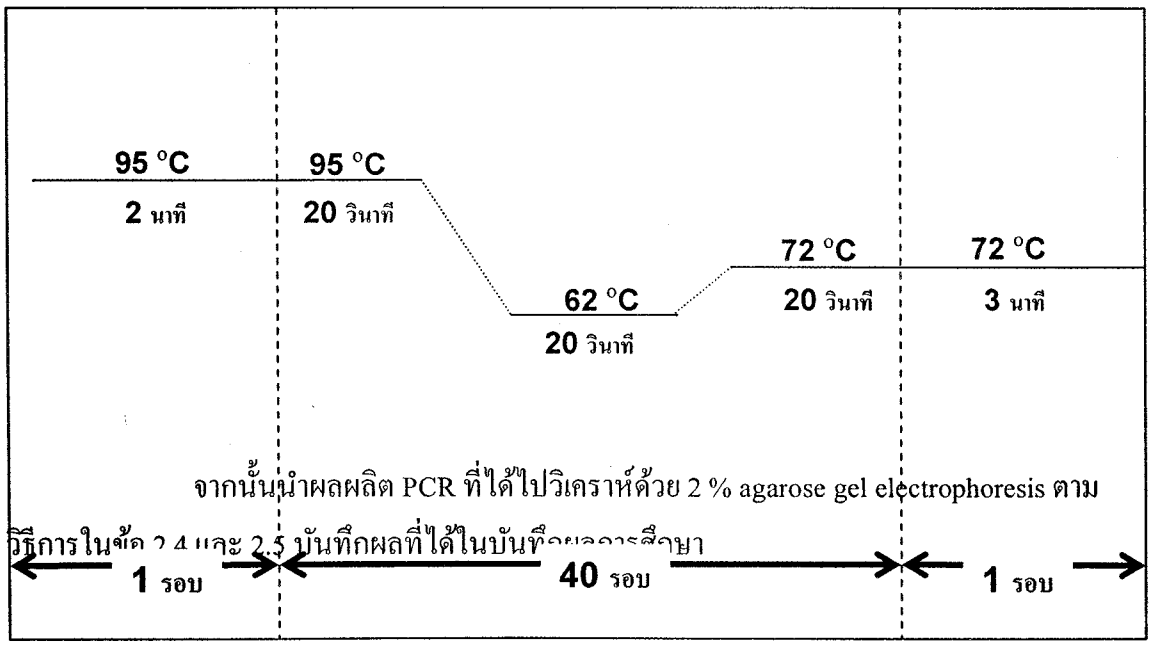
2.6 เตรียมสารผสมพีซีอาร์ สำหรับเพิ่มยีนแอคติน ในปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร (µl) ดังต่อไปนี้

ตัวอย่าง	น้ำ (µl)	200 µM dNTP (µl)	DNA template (µl)	primer (µl) 100 pmol		10 X buffer (µl)	เอ็นไซม์ Taq (µl)
				actin-F	actin-R		
Negative	6.15	0.8	-	1	1	1	0.05
ปลา 1*[1]	5.15	0.8	ป1*[1] 1 µl	1	1	1	0.05
ปลา 2*[2]	5.15	0.8	ป2*[2] 1 µl	1	1	1	0.05
ปลา 3*[3]	5.15	0.8	ป3*[3] 1 µl	1	1	1	0.05

*[1-2] ตัวอย่าง genomic DNA ที่ได้จากปลาที่ได้รับการถ่ายยีน

*[3] ตัวอย่าง genomic DNA ที่ได้จากปลาปกติ

2.7 นำตัวอย่างที่เตรียมได้เข้าเครื่องและปรับการทำงานของเครื่องดังต่อไปนี้



จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis ตามวิธีการในข้อ 2.4 และ 2.5 บันทึกผลที่ได้ในบันทึกผลการศึกษา

การบันทึกผลการศึกษา

บทปฏิบัติการเรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพสำหรับการผลิตสัตว์

(การถ่ายยีนในปลา)

กลุ่มที่.....

สมาชิกในกลุ่ม .....

.....

1. อธิบายเปรียบเทียบความแตกต่างที่สังเกตได้ ระหว่างปลาที่ได้รับการถ่ายยีนและปลาปกติในหัวข้อต่อไปนี้

หัวข้อที่บันทึกผล	ปลาปกติ	ปลาที่ได้รับการถ่ายยีน
ลักษณะรูปร่างภายนอก		
การเรืองแสง		

2. **ผลการศึกษา การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดย agarose gel electrophoresis**

ยีนที่ทำการตรวจ	Negative control	Positive control	ปลาตัวอย่างที่	ปลาตัวอย่างที่	ปลาตัวอย่างที่ .....
DNA template	-	Plasmid AGN	Genomic DNA	Genomic DNA	Genomic DNA
Actin gene					
GFP gene					

หมายเหตุ ให้ใส่เครื่องหมาย + สำหรับผลที่ได้ PCR product

\- สำหรับผลที่ไม่ได้ PCR product

สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง

1. ปลาที่ได้รับการถ่ายยีนมีความผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาปกติหรือไม่ อย่างไร

.....

.....

.....

.....

.....

2. ปลาตัวอย่างที่เท่าไร เป็นปลาที่ได้รับการถ่ายยีน ***Green Fluorescent Pprotein*** gene เพราะเหตุใด

.....

.....

.....

.....

.....

3. ผลการทดลองของการทำ PCR สำหรับ Actin gene บ่งบอกถึงอะไร

.....

.....

.....

.....

4. ผลการทดลองของการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ***Green Fluorescent Pprotein*** gene และใช้ plasmid AGN เป็น template บ่งบอกถึงอะไร

.....

.....

.....

.....

5. ผลการทดลองของการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด ในหลอด Negative control บ่งบอกถึงอะไร

.....

.....

.....

.....

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว สุรินทร นามสกุล บุญอนันธนสาร

(ภาษาอังกฤษ) Miss Surintorn Boonanuntanasarn

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2097 00017 95 1

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224371, 224378

โทรสาร 044-224150

Email : surinton@ccs.sut.ac.th

2. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต	วาริชศาสตร์	มหาวิทยาลัยบูรพา
ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก	Ph.D	Aquatic Biosciences	Tokyo University of Fisheries

3. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) อณูพันธุศาสตร์ในสัตว์น้ำ
การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

4. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

ผลงานตีพิมพ์

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G., Takeuchi, Y., Morita, T. and Takeuchi T. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Mar. Biotechnol.* 4: 256-266

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G. and Takeuchi T. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310: 1089-1095

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G., Iwai, K. and Takeuchi T. 2004. Molecular cloning, expression in albino mutants, and gene knockdown studies of two types of tyrosinase mRNA in rainbow trout embryos. *Pigment Cell Res.* 17: 413-421

Boonanuntanasarn, S. Toshio Takeuchi, Goro Yoshizaki. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 336: 438.443

Boonanuntanasarn S. 2008. Gene Knockdown: a powerful tool for gene function study in fish. Journal of World Aquaculture society. 39: 311-323.