

## บทคัดย่อ

ปลาสด (Trichogaster pectoralis) เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม แต่การศึกษาทางด้านลักษณะทางพันธุกรรมและทางอณูพันธุวิทยาของปลาสดยังมีอยู่น้อยมาก ในการวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต (house keeping gene) และ ยีนที่ควบคุมการกินได้ในปลาสด ได้แก่ cDNA ของ ยีนควบคุมการเจริญเติบโต (growth hormone gene), insulin like growth factor-1, insulin like growth factor-2, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), elongation factor-1 $\alpha$  และ  $\beta$ -actin นอกจากนี้การวิจัยที่ได้ทำการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของ melanocortin 4 receptor (TpMC4R) และ neuropeptide Y (TpNPY) และศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งสองต่อการกินได้ในรอบวันและสภาวะการอดอาหาร

ยีนเมลานอคอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ (melanocortin 4 receptor; MC4R) มีความเกี่ยวข้องกับสมรรถภาพการเจริญเติบโต และการควบคุมสมดุลพลังงานในสัตว์ การศึกษาลักษณะโครงสร้างของยีน และ โปรตีน MC4R จากปลาสด (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 ชั่วโมงหลังจากที่ปลาสดวางไข่ (hours post spawning : hps) รวมไปถึงไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ พบว่ายีน TpMC4R มีการแสดงออกในทุกระยะของการพัฒนาการของตัวอ่อน นอกจากนี้ TpMC4R ยังมีการแสดงออกในไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิด้วย แสดงให้เห็นว่ายีน TpMC4R จัดเป็น maternal ยีนและจากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน TpMC4R ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสดที่ระยะโตเต็มวัย พบว่ายีน TpMC4R มีการแสดงออกมากที่สุดในสมองทุกส่วนและในอวัยวะ (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 ในสมองแต่ละส่วนของปลาสดในระหว่างมีอาหาร ได้ทำการฝึกให้ปลาสดกินอาหาร

วันละ 2 มื้อ ในเวลา 10.00 และ 16.00 น. และทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ที่เวลา 9.00 11.00 13.00 และ 15.00 น. พบว่าปลาสดมีการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 15.00 น. หรือ 1 ชั่วโมงก่อนอาหารเย็น และเมื่อทำการศึกษาผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีน *TpMC4R* โดยทำการวิเคราะห์ระดับของยีน *TpMC4R* ที่ระยะเวลาการอดอาหาร 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่ *TpMC4R* มีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ที่ระยะเวลาการอดอาหาร 18 และ 24 ชั่วโมง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ยีน *TpMC4R* มีความสัมพันธ์กับการกินอาหารในรอบวันและสมดุลพลังงานในระหว่างการอดอาหาร และการศึกษาผลของ MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ในปลาสด พบว่าปลาสดที่ฉีดด้วย antagonist HS024 มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) อย่างไรก็ตามพบว่า HS024 เพิ่มการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในสมองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิจัยนี้ได้ทำการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของ neuropeptide Y จากสมองของปลาสด (TpNPY) และพบว่า TpNPY มีความคล้ายคลึงกับ neuropeptide Y ของปลาอื่น ๆ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของการอดอาหารที่ระยะเวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง ต่อการแสดงออกของ TpNPY ในสมองของปลาสด ผลการศึกษาเป็นไปในทางตรงกันข้ามกับ *TpMC4R* นั่นคือ TpNPY มีการแสดงออกลดลงเมื่อระยะเวลาการอดอาหารนานขึ้น

## Abstract

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. In this study, several cDNAs involved in regulation of growth, house keeping gene, and the central control of feed intake were cloned. Partial cDNAs of growth hormone (GH), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and insulin like growth factor 2 (IGF-2) were isolated. In addition, the partial cDNAs of the house keeping gene including Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Elongation factor -1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), and  $\beta$ -actin were cloned. Full-length cDNA of melanocortin 4 receptor (MC4R) and neuropeptide Y (NPY) were characterized and designated as TpMC4R and TpNPY, respectively. Further, TpMC4R and TpNPY expression related to daily feed intake and fasting were investigated.

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 pectoralis*) (*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. Significant increase in the expression of *TpMC4R* was observed at 18 and 24 hour fasting periods ( $P < 0.05$ ). 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. The result showed that the antagonist HS024 did not significantly increase the feed intake of the experimental fish ( $P>0.05$ ). However, HS024 affected to increase the mRNA level of TpMC4R.

The full-length of TpNPY was cloned, and the deduced amino acid sequence showed high similarity to other piscine NPY cDNAs. Effects of short term fasting (6, 12, 18 and 24 h) on neuronal *TpNPY* expression were determined. Conversely to the expression of TpMC4R, increased fasting times led to decrease the expression of TpNPY.

