



รายงานการวิจัย

การโคลน cDNA ของยีนควบคุมการกินอาหาร และ ยีนควบคุมการเจริญเติบโต และการศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการกินอาหารในปลาสร้อย

(Cloning of cDNA of feed intake control and growth regulating genes and study on the expression of feed intake control genes in snakeskin gourami)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-50-12-16



## รายงานการวิจัย

การโคลน cDNA ของยีนควบคุมการกินอาหาร และ ยีนควบคุมการเจริญเติบโต และการศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการกินอาหารในปลาสด

(Cloning of cDNA of feed intake control and growth regulating genes and study on the expression of feed intake control genes in snakeskin gourami)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสาธิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2555

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง “การโคลน cDNA ของยีนควบคุมการกินอาหาร และ ยีนควบคุมการเจริญเติบโต และการศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการกินอาหารในปลาสลิค (Cloning of cDNA of feed intake control and growth regulating genes and study on the expression of feed intake control genes in snakeskin gourami) ” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550 การทำวิจัยในครั้งนี้ได้รับการเอื้อเฟื้อให้ใช้ห้องปฏิบัติการเครื่องมือ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และบุคลากร จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (F3) และการการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดลองเลี้ยงปลา จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แผนกสัตว์น้ำ นอกจากนี้การวิจัยนี้ยังได้รับการสนับสนุนการทำวิจัยบางส่วนจาก Associate Professor Dr. Goro Yoshizaki

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งบุคลากรฝ่ายสนับสนุนทุกท่าน ที่ได้ให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวศิริวรรณ เพชรสมบัติ หัวหน้างานกลุ่มห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และนายมานะ ชาญเวช พนักงานวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือ และคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณหัวหน้าสถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร (รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง) บุคลากรของสถานวิจัย (นางศุภกัญจน์ บุญอยู่ และนาง ปุณณภา สุปโภคสูง) ที่ได้ให้คำแนะนำ และการช่วยเหลือในส่วนของงานธุรการและการเงินในการวิจัยครั้งนี้

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ บุคลากรและนักศึกษา ของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ที่ได้ให้การช่วยเหลือ คำแนะนำ และการสนับสนุนในด้านต่าง ๆ สำหรับงานวิจัยนี้

## 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

ยีนเมลานโคติน 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

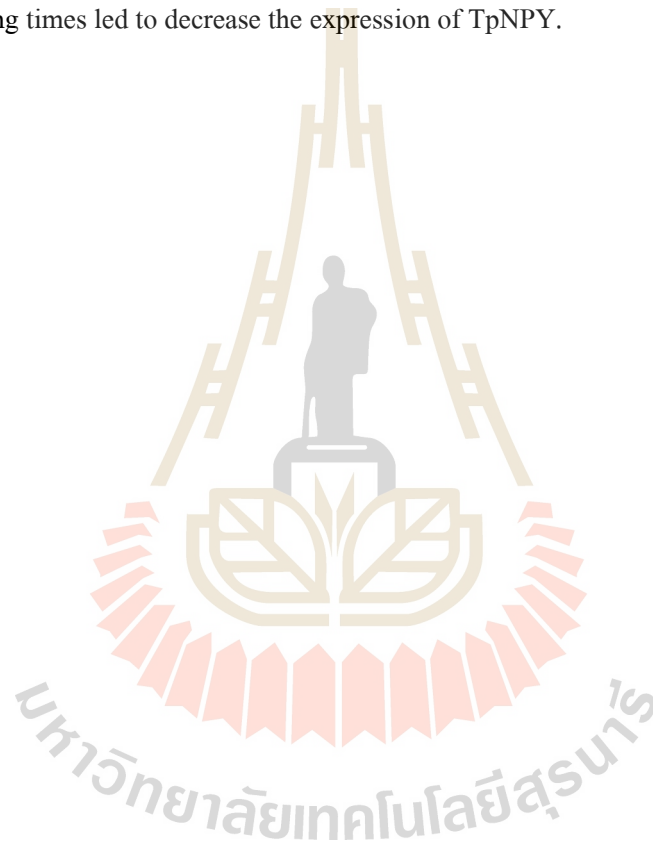
## Abstract

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.



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อ .....	ข
Abstract .....	ง
สารบัญ .....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญภาพ .....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
ความสำคัญและที่มาของการวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	16
ขอบเขตของการวิจัย .....	16
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	16
<b>บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	
การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ ควบคุมการเจริญเติบโต และยีน house keeping gene.....	18
การทดลองที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเมลานอคอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ (Melanocortin 4 receptor) ต่อการกินอาหารในรอบวันและ การอดอาหาร.....	28
การทดลองที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของยีนนิวโรเปปไทด์วาย (Neuropeptide Y) และผลของการ อดอาหารต่อการแสดงออกของยีน Neuropeptide Y....	35
<b>บทที่ 3 ผลการวิจัย</b>	
ผลการทดลองที่ 1 .....	37
ผลการทดลองที่ 2 .....	47
ผลการทดลองที่ 3 .....	76
อภิปรายผลการทดลอง.....	80
<b>บทที่ 4 บทสรุป</b>	
สรุปผลการวิจัย .....	89
ข้อเสนอแนะ .....	91
บรรณานุกรม .....	92
ภาคผนวก ก.....	99





## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าต่อหน่วยน้ำหนัก ของปริมาณผลผลิตการเลี้ยง สัตว์น้ำจืด 5 อันดับแรกของประเทศ (ปี 2548).....	2
ตารางที่ 1.2 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์.....	8
ตารางที่ 1.3 ความยาวของโปรตีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ.....	12
ตารางที่ 2.1 ไพรมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	20
ตารางที่ 3.1 เปร้ให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่สมบูรณ์ และ Transmembrane (TM) domain ระหว่าง TpMC4R และ MC4R ของ ปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่อ และคน.....	53
ตารางที่ 3.2 Genbank database ของกรดอะมิโนของ melanocortin receptors (MCRs) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง.....	58
ตารางที่ 3.3 Genbank database ของกรดอะมิโนของ MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง .....	60
ตารางที่ 3.4 การแสดงออกของยีน <i>MC4R</i> ในอวัยวะของปลาชนิดต่าง ๆ.....	85

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 ระบบ melanocortin ในสมองต่อการรักษาสมดุลพลังงาน เมื่อมีการกินอาหาร  
ที่มีไขมันสูง (A) และเมื่อมีการกินอาหารอย่างจำกัด (B)..... 14

ภาพที่ 1.2 การทำงานของ MC4R ต่อการควบคุมการกินได้..... 15

ภาพที่ 2.1 พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (A) และลำดับนิวคลีโอไทด์และ  
Multiple cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (B)..... 26

ภาพที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ growth hormone cDNA ของปลาสด (TpGH)..... 38

ภาพที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Insulin like growth factor-1 cDNA  
ของปลาสด (TpIGF-1)..... 39

ภาพที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Insulin like growth factor-2 cDNA  
ของปลาสด (TpIGF-2)..... 40

ภาพที่ 3.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Elongation factor 1- $\infty$  cDNA  
ของปลาสด (TpEF-1 $\infty$ )..... 41

ภาพที่ 3.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA  
ของปลาสด (TpGAPDH)..... 43

ภาพที่ 3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  $\beta$ -Actin cDNA ของปลาสด (Tp $\beta$ -Actin)..... 45

ภาพที่ 3.7 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของ Tp $\beta$ -actin  
กับ  $\beta$ -actin ของปลาต่าง ๆ..... 46

ภาพที่ 3.8 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง  
ชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA  
ของยีน TpMC4R ด้านปลาย 3'..... 49

ภาพที่ 3.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R.....52

ภาพที่ 3.10 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และ transmembrane (TM) ระหว่าง  
TpMC4R และ MC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่อ และคน..... 54

ภาพที่ 3.11 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin receptor ทั้ง 5 subtypes  
ของปลาสด และสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ  
โดยการสร้าง phylogenetic tree ..... 57

ภาพที่ 3.12 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin 4 receptor ของปลาสดและ  
สัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ โดยการสร้าง phylogenetic tree..... 59

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 3.13 การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* และ *Tpβ-actin*  
 ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนของปลาสดที่ระยะ  
 5, 7, 11, 15, 21, 24, และ 28 ชั่วโมงหลังจากปลาสดวางไข่  
 (hours post spawning; hps) โดยใช้เทคนิค RT-PCR ..... 62

ภาพที่ 3.14 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง  
 และอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสด..... 65

ภาพที่ 3.15 การแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในสมองส่วน telencephalon ..... 66

ภาพที่ 3.16 การแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในสมองส่วน Diencephalon  
 และ pituitary gland (PG)..... 67

ภาพที่ 3.17 การแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในสมองส่วน Mesencephalon (A)  
 และ Metencephalon (B)..... 68

ภาพที่ 3.18 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*  
 ในระหว่างมื้ออาหาร (daily feeding)..... 69

ภาพที่ 3.19 ผลของการอดอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA  
 ของยีน *TpMC4R* ..... 70

ภาพที่ 3.20 ผลของการอดอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือด ..... 71

ภาพที่ 3.21 ผลของการฉีด (การฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ) MC4R antagonist (HS024)  
 ต่อการกินได้ของปลาสด โดยทำการฉีด HS024 ที่ความเข้มข้น 1 µg/kg,  
 3 µg/kg ซึ่งเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับการฉีด 0.9% saline และ  
 กลุ่มปลาสดที่ไม่ได้รับการฉีด HS024 (uninjected) ..... 73

ภาพที่ 3.22 ผลของการฉีด (การฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ) MC4R antagonist (HS024)  
 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากมีการฉีด  
 antagonist HS024 ที่ 4, 8 และ 12 ชั่วโมง ..... 74

ภาพที่ 3.23 ผลของการแช่สมองปลาสดในสาร MC4R antagonist (HS024)  
 ในระดับต่าง ๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*..... 75

ภาพที่ 3.24 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ *TpNPY*..... 77

ภาพที่ 3.25 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน *TpNPY* และ *NPY* ของปลากระดุกแฉิ่ง  
 ชนิดต่าง ๆ ไก่ สุกร และคน..... 78

ภาพที่ 3.26 ผลของการอดอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA  
 ของยีน *TpNPY* ..... 79

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปลาสลิด (Snakeskin gourami) หรือปลาใบไม้ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichogaster pectoralis* เป็นปลาน้ำจืด มีรูปร่างแบนข้างคล้ายใบไม้ ความลึกลำตัว (body depth) เป็น 2.2-2.5 เท่าของความยาวมาตรฐาน (standard length) ปลาสลิดมีอวัยวะพิเศษช่วยหายใจเรียกว่า Labyrinth organ ช่วยให้ปลาสลิดใช้ออกซิเจนจากอากาศได้ ปลาสลิดชอบอาศัยอยู่ในน้ำนิ่งตามบริเวณที่มีพรรณไม้น้ำ เช่น ผักและสาหร่าย เพื่อใช้เป็นที่พักอาศัย กำบังตัว และอาจจะใช้เป็นแหล่งก่อกวางไข่นอกจากนี้สามารถเจริญเติบโตอยู่ในน้ำที่มีความเป็นกรดถึง pH 5.6 - 6 และเป็นด่างได้ถึง pH 9 ปลาสลิดเป็นปลาที่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้กับเพศเมียอย่างเด่นชัด โดยสังเกตจากลักษณะภายนอกได้ชัดเจน ตัวผู้มีลำตัวยาวเรียว ส่วนตัวเมียมีสันท้องยาวมนไม่ขนานกับสันหลัง และครีบลึงมนไม่ยาวจรดถึงโคนหาง ในฤดูวางไข่ท้องจะอูมเป่งออกมาทั้งสองข้างอย่างเห็นได้ชัด ปลาจะสมบูรณ์พันธุ์ที่อายุประมาณ 7-12 เดือน หรือมีขนาด 8-10 เซนติเมตร (ประเทือง เชาวน์วันกลาง, 2536)

ปลาสลิดเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ถึงแม้ว่าปลาสลิดจะมีปริมาณการผลิตและมูลค่าของผลผลิตเป็นอันดับที่ 4 ของผลผลิตสัตว์น้ำจืดในประเทศรองลงมาจาก ปลานิล ปลาดุก และปลาตะเพียน แต่ปลาสลิดมีมูลค่าต่อหน่วยน้ำหนักสูงสุด (ตารางที่ 1.1) ปลาสลิดถูกนำไปประกอบอาหารทั้งในรูปแบบปลาสด ทำเค็มและตากแห้ง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ปลาสลิดตากแห้งเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศและส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ ในอดีตแหล่งที่ผลิตปลาสลิดปริมาณมากคือ พื้นที่ในจังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตปลาสลิดใหญ่ที่มีชื่อเสียงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ ต่อมาได้มีการขยายพื้นที่เลี้ยงไปยังจังหวัดอื่น ๆ ได้แก่ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา และสุพรรณบุรี ในการเลี้ยงปลาสลิดโดยทั่วไปจะได้ผลผลิตประมาณ 200-500 กิโลกรัมต่อไร่ ระยะเวลาการเลี้ยงขึ้นกับขนาดปลาที่ปล่อยเริ่มต้น เช่น ถ้าเริ่มเลี้ยงตั้งแต่ลูกปลาที่ได้จากพ่อแม่ปลาสลิดจะใช้เวลาการเลี้ยงเกือบปี หรือ 10-12 เดือน ถ้าปล่อยลูกปลาขนาด 5 เซนติเมตร หรือ 10 เซนติเมตร จะใช้ระยะเวลาการเลี้ยงนานถึง 7-8 เดือน หรือ 5-6 เดือน ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวนี้ จะเห็นได้ว่ารอบการเลี้ยงปลาสลิดใช้ระยะเวลานานมากเมื่อเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น

รูปแบบหรือระบบการเลี้ยงปลาสลิดโดยส่วนใหญ่จะเป็นระบบการเลี้ยงแบบธรรมชาติ (extensive system) โดยเป็นการเลี้ยงแบบอาศัยอาหารธรรมชาติ ได้แก่ พืชน้ำ แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ และพืชน้ำ เป็นหลัก โดยเกษตรกรใช้วิธีการตัดหญ้าข้าง ๆ บ่อไปหมักเพื่อให้เกิดการ

เน่าสลายและความอุดมสมบูรณ์ ต่อมารูปแบบการเลี้ยงได้มีการพัฒนาเป็นระบบการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา (semi-intensive system) กล่าวคือ มีการให้อาหารสมทบในช่วงท้ายของการเลี้ยงเพื่อขุนปลาให้โตเร็วขึ้น พื้นที่ที่ใช้เลี้ยงปลาสลิดมักจะเป็นบ่อที่มีพื้นที่ขนาดใหญ่ตั้งแต่ 10 ไร่ขึ้นไป ถึง มากกว่า 100 ไร่ จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงปลาสลิดต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่ รูปแบบการผลิตปลาสลิดที่เป็นแบบระบบการเลี้ยงแบบธรรมชาติ และกึ่งพัฒนา ทำให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ต่ำ ระยะเวลาการเลี้ยงนาน ซึ่งพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงปลาสลิดกันมาก จะอยู่ในเขตจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาครนั้น เนื่องจากการขยายตัวของสังคมเมืองทำให้มีการเปลี่ยนพื้นที่ของการเลี้ยงปลาสลิดไปเป็นพื้นที่โรงงานอุตสาหกรรมและที่อยู่อาศัยมากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้พื้นที่เลี้ยงปลาสลิดมีแนวโน้มจะลดลงเรื่อย ๆ ถึงแม้ว่าปลาสลิดจะเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงและการเพาะพันธุ์ปลาสลิดมาอย่างต่อเนื่อง แต่การศึกษาทางด้านพันธุกรรมปลาสลิด เพื่อนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตและการคัดเลือกพันธุ์ปลา ยังมีอยู่น้อยมาก

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าต่อหน่วยน้ำหนัก ของปริมาณผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด 5 อันดับแรก ของประเทศ (ปี 2548)

อันดับของผลผลิต	ปริมาณสัตว์น้ำจืดจาก การเพาะเลี้ยง (1,000 ตัน)	มูลค่าผลผลิตการเลี้ยง	
		สัตว์น้ำ (พันบาท)	มูลค่าผลผลิตต่อหน่วย น้ำหนัก (บาท/กิโลกรัม)
1. ปลานิล	203.7	5,883,668	28.9
2. ปลาดุก	142.2	4,616,267	32.5
3. ปลาดุกเพียน	60.6	1,776,610	29.3
4. ปลาสลิด	35.9	1,431,951	39.9
5. ปลาสร้อย	27.3	564,383	20.7

ที่มา: กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง  
(รวบรวมข้อมูลจากกรมศุลกากร)

การพัฒนาเทคโนโลยีทางอนุพันธุวิทยาทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจการศึกษาทางด้านอื่นที่เกี่ยวข้องกับ พฤติกรรมการกิน (feeding behavior) คุณภาพของพลังงาน (energy homeostasis) การกินได้ (feed intake) การควบคุมน้ำหนักตัว (body weight regulation) โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจ เพราะการเพิ่มอัตราการกินได้ในสัตว์และการควบคุมคุณภาพของพลังงานที่เหมาะสมจะ

ส่งผลให้สัตว์ที่เลี้ยงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น ลดระยะเวลาการเลี้ยงสัตว์ให้สั้นลงได้ ในสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้น อัตราการกินได้จะถูกควบคุมโดยการทำงานของสมอง ซึ่งจะเป็นศูนย์กลางการรับรู้ความรู้สึกและควบคุมการทำงานการกินอาหาร การย่อยอาหาร โดยส่วนของสมองที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการกินได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือสมองส่วนไฮโปธาลามัส (hypothalamus) สมองส่วนไฮโปธาลามัสจะสร้างสารนิวโรเปปไทด์ (neuropeptide) เพื่อควบคุมการกินในสัตว์ โดยนิวโรเปปไทด์ที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการกิน เรียกว่า orexigenic factors ส่วนนิวโรเปปไทด์ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการกินได้เรียกว่า anorexigenic factors นิวโรเปปไทด์ที่มีบทบาทควบคุมการกินได้ ได้แก่ โพรตีนในระบบเมลาโนคอร์ติคิน (melanocortin system) (ได้แก่  $\alpha$ -melanocortin stimulating hormone;  $\alpha$ -MSH, agoutirelated protein; AgRP), neuropeptide Y (NPY), cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART), corticotrophin-releasing hormone (CRH), melanin-concentrating hormone (MCH) and orexins เปปไทด์เหล่านี้จะมีผลต่ออวัยวะอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของพลังงาน ควบคุมการกินได้ และการใช้พลังงานในสัตว์ (Schwartz, 2001; Strader and Woods, 2005; Baile and Della-Fera, 2009)) ในจำนวนนิวโรเปปไทด์ทั้งหลายนั้น NPY เป็นนิวโรเปปไทด์ที่ได้มีรายงานถึงบทบาทหน้าที่หลักต่อการกินได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง นอกจากนี้ melanocortin receptor เป็นอีกยีนหนึ่งที่มีบทบาทต่อการกินได้และการควบคุมสมดุลของพลังงาน และมีรายงานการศึกษาถึงการทำงานในทางตรงกันข้ามของ NPY และ  $\alpha$ -MSH โดยการทำงานของ NPY ในหนู พบว่าเมื่อนฉีด NPY มีผลกระตุ้นการกินได้ในหนู แต่การฉีด  $\alpha$ -MSH ร่วมด้วยทำให้ไปลดผลของ NPY ต่อการกระตุ้นการกินได้ในหนู และการฉีด antagonist ของ melanocortin receptor -4 (MC4R) มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ แต่ว่าการฉีด NPY และ antagonist ของ MC4R ร่วมกันกลับไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการกินได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรฉีด NPY เพียงอย่างเดียว (Hansen and Morris, 2002) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงได้มุ่งเน้นศึกษาที่จะโคลนยีน NPY และ MC4R และศึกษาถึงผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีนทั้งสอง นอกจากนี้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนทั้งสองระหว่างวันที่ได้รับอาหารปกติ

นิวโรเปปไทด์วาย (Neuropeptide Y; NPY) เป็นนิวโรเปปไทด์ที่อยู่ในกลุ่มของ NPY และในกลุ่มของ NPY ยังมีนิวโรเปปไทด์อื่น เช่น peptide YY (PYY), pancreatic polypeptide (PP) และ peptide Y (PY) NPY ถูกพบครั้งแรกในสมองของสุกร เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 ตัว เป็นนิวโรเปปไทด์ที่ควบคุมเกี่ยวกับสมดุลของพลังงาน ควบคุมการกินได้ นอกจากนี้ยังพบว่า NPY เกี่ยวข้องกับการหลั่ง growth hormone, gonadotropin ตอบสนองต่อฮอร์โมนเพศ ทำหน้าที่ร่วมกับฮอร์โมน gonadotropin releasing hormone (Tatemoto et al., 1982; Volkoff, 2006; Kah et al., 1989; Cerda-Reverter et al., 1999)

รีเซปเตอร์ของนิวโรเปปไทด์ในกลุ่ม NPY คือ รีเซปเตอร์ในกลุ่มของ G-protein coupled receptors ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบ Y1, Y2, Y4, Y5 และ Y6 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นั้น NPY จัดเป็นเปปไทด์ที่กระตุ้นการกินได้ที่สำคัญ หรือจัดเป็น orexigenic agents และกระตุ้นการกินได้ โดยจับกับรีเซปเตอร์ Y1 และ Y5 (Pedrazzini et al., 2003) ในปลานั้นพบนิวโรเปปไทด์ 3 ชนิด ได้แก่ NPY, PYY และ PY การรวบรวมผลศึกษาในปลา พบว่า ได้มีการโคลนและการศึกษา ยีน NPY ใน ปลา ดุก ปลา sea bass ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาแอตแลนติกคอด ปลา flounder และปลาหมึก (Leonard et al., 2001; Cerda-Reverter et al., 1999; Blomqvist et al., 1992; Jensen and Conlon, 1992; Kurowa and Suzuki, 2002; Sodenberg et al., 2000) โดย mRNA ของ NPY จะแสดงออกที่สมองของปลาเป็นหลัก และพบการแสดงออกของ NPY ในไต ต่อมใต้สมอง และระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังได้มีการพบ การแสดงออกของ รีเซปเตอร์ Y1 และ รีเซปเตอร์ Y2 ในสมองและอวัยวะในระบบทางเดินอาหารใน ปลา (Carda-Reverter and Larhammar, 2000; Larhammar et al., 2001; Fredriksson et al., 2004; Larsson et al., 2005)

การศึกษาทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของ NPY ได้มีการศึกษาข้อมูลลำดับกรดอะมิโนใน สุนัข โค ปลาเทร้า ปลาแอตแลนติกคอด เป็นต้น มีการศึกษาโดยการโคลน cDNA ใน คน หนู ไก่ ปลา ทอล ปลาแลมเพอร์ และการศึกษาในระดับยีน ได้แก่ คน หนู ไก่ เป็นต้น (Soderberg et al., 1993; Tatemoto et al., 1982; Minth et al., 1984; Minth et al., 1986; Corder et al., 1988; Higuchi et al., 1988; Larhammar et al., 1987; Blomqvist et al., 1992; Jansen and Conlon, 1992)

การศึกษาในปลาพบว่า NPY กระตุ้นการกินได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปลาทอง และ ปลาในกลุ่ม catfish แต่ผลการศึกษา ยังไม่อาจจะสรุปได้ว่ารีเซปเตอร์ใดทำหน้าที่ในการเป็นตัวรับของ NPY เพื่อกระตุ้นการกินได้ปลา ได้มีรายงานการศึกษาว่า เมื่อมีการฉีดแอนตาโกนิสต์ของรีเซปเตอร์ Y1 เข้าสู่สมองส่งผลให้เกิดการลดการกินได้ในปลาทอง ในขณะที่เมื่อนฉีด agonist ของ Y1 หรือ Y5 ส่งผลให้ เกิดการกระตุ้นการกินได้ (Narnaware and Peter, 2001 Narnaware et al., 2000) อย่างไรก็ตามใน การศึกษาทางด้านอนุพันธุวิทยานั้น ไม่พบการแสดงออกของยีน รีเซปเตอร์ Y1 และ รีเซปเตอร์ Y5 ใน ปลาฟูก และปลาหมึก และอาจเป็นไปได้ว่าปลาบางชนิดนั้นอาจจะมียีนรีเซปเตอร์ Y1 และ รีเซป เตอร์ Y5 และการทำงานของ NPY อาจทำงานผ่านรีเซปเตอร์ตัวอื่น ๆ แทน (Larhammar and Salaneck, 2004)

ภาวะการอดอาหารกระตุ้นการแสดงออกของยีน NPY ในปลาทองและปลาซาลมอน ในทางตรงกันข้ามการที่ปลาทองอดอาหารกลับมาได้รับอาหารอีกครั้งจะมีการแสดงออกของยีน NPY ลดลง และพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ NPY ในสมองในช่วงระหว่างการกินอาหาร ของปลาทอง นอกจากนี้ยังพบว่าสารอาหารมีผลต่อการแสดงออกของยีน NPY โดยพบว่าปลาทองที่



ได้รับอาหารที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต หรือไขมันสูง จะมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ ยีน NPY (Narnaware and Peter, 2002; Narnaware and Peter, 2001; Silverstein et al., 1999; Narnaware et al., 2000)

ยีนอีกยีนหนึ่งที่ได้มีการรายงานว่าจะแสดงผลเด่นชัดต่อการควบคุมการกินได้คือ เมลาโนคอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ (melanocortin 4 receptor; MC4R) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อยีน MC4R มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) ส่งผลให้สุกรมีการเพิ่มการกินได้ (Kim et al., 2000; Kim et al., 2004) และยังมีรายงานการศึกษาถึงการพัฒนารายพันธุ์ MC4R เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกพันธุ์สุกร (marker-assisted selection) (Kim et al., 2006) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะใช้เทคนิคทางอนุพันธุวิทยาโมเลกุลและศึกษาลำดับเบสของยีน MC4R ในปลาสด นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการสังเคราะห์ non-peptide antagonists ของ MC4R โดยทดลองให้หนูกิน ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการกินได้ในหนู (Tucci et al., 2005) ข้อมูลทางวิชาการดังกล่าวนี้เป็นจุดเริ่มต้นที่อาจนำไปสู่การพัฒนาการใช้ MC4R antagonist เป็นสารเสริมในอาหารปลา (feed additive) เพื่อเพิ่มอัตราการกินได้และการเจริญเติบโตในสัตว์และในปลาสดต่อไป

ระบบเมลาโนคอร์ติน (Melanocortin system) ประกอบไปด้วย เมลาโนคอร์ติน (Melanocortin peptide) ซึ่งเป็นสาร agonist ต่อ melanocortin receptor (Melanocortin receptors: MCRs) โดยที่สาร 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 et al., 2006; Lasaga et al., 2008) ซึ่ง melanocortin system นั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่การควบคุมการให้สี (pigmentation), การสร้าง steroid hormone (steroidogenesis), การตอบสนองต่อความเครียด, การควบคุมสมดุลของพลังงาน (energy homeostasis), การกินได้ (feed intake), การทำหน้าที่เกี่ยวกับเพศ (sexual function) เป็นต้น

Melanocortin peptide คือ neuromodulatory peptide ถูกสร้างมาจากโปรตีนตั้งต้นคือ pro-opiomelanocortin (POMC) โดยผ่านกระบวนการ posttranslation ทำให้ผลผลิตเป็น melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -,  $\beta$ - และ  $\gamma$ -MSH) และ adrenocorticotrophic hormone (ACTH) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง melanocortin peptide จะถูกผลิตที่ต่อมใต้สมองและระบบประสาทส่วนกลางเป็นหลัก นอกจากนี้ยังสามารถพบการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่น ๆ ด้วย melanocortin peptide ทุกตัวจะประกอบไปด้วย 7 peptide เป็นหลัก (heptapeptide core) คือ Met<sup>4</sup>-Glu<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Trp<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup> แต่ใน  $\gamma$ -MSH ในตำแหน่ง Gly<sup>10</sup> จะถูกแทนที่ด้วย Asp<sup>9</sup> ซึ่งในตำแหน่งที่ 4-9 ของ  $\alpha$ -MSH จะมีความจำเป็นต่อการจับกับ

MC1R ดังนั้นหาก Glu<sup>5</sup> ถูกแทนที่ด้วย Ala จะไม่มีผลทำให้ความสามารถในการจับ (affinity) กับรีเซปเตอร์ลดลง แต่เมื่อมีการแทนที่ His<sup>6</sup> ในกลุ่มกรดอะมิโน Met<sup>4</sup>, His<sup>6</sup>, Phe<sup>7</sup>, Arg<sup>8</sup> และ Trp<sup>9</sup> ด้วย Ala จะมีผลทำให้ความสามารถในการจับ (affinity) กับรีเซปเตอร์ลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่า His<sup>6</sup> มีความจำเป็นต่อการจับกันของ peptide และ MCRs นอกจากนี้ peptide ในตำแหน่ง 4, 7, 8 และ 9 มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง melanocortin peptide กับ MCRs และหากมีการแทนที่ Gly<sup>10</sup> ของ  $\alpha$ -MSH ด้วย Asp และ Pro<sup>12</sup> แทนด้วย Ala จะมีผลทำให้ความสามารถในการจับของ peptide ลดลง (Sahm et al., 1994; Peng et al., 1997)

ในการควบคุมการกินได้ เกิดจากการที่  $\alpha$ -MSH จับกับ MC4R ในระบบประสาทส่วนกลาง จึงมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ (Irani and Haskell-Luevano, 2005) การขัดขวางการทำงานของ MC4R เกิดเมื่อ MC4R antagonists จับกับ MC4R จึงมีผลทำให้  $\alpha$ -MSH ไม่สามารถเข้าจับกับ MC4R ได้ จึงทำให้เกิดการกระตุ้นการกินได้ (Kawaguchi and Baker, 2004) MC4R antagonists เป็นสารสังเคราะห์ melanocyte-stimulating hormone (MSH) analogs ซึ่งได้แก่ SHU9119, HS014, HS024 และ agouti-related peptide (AgRP) ซึ่ง MC4R antagonist มีทั้งแบบ nonselective antagonist (SHU9119) และแบบ selective antagonist (HS014, HS024) และ agouti-related peptide (AgRP) (Schjolden et al., 2008) การศึกษาการทำงานของยีน MC4R ในปลา สามารถทำได้โดยการฉีดสาร MC4R antagonist เข้าไปในสมองของสัตว์ เพื่อไปยับยั้งการทำงานของ MC4R ซึ่งมีผลทำให้สัตว์มีการกินได้เพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Cerda-Reverter et al. (2003) ในปลาทอง เมื่อมีการฉีด MC4R antagonist (HS024) เข้าทางสมอง cerebroventricular injection (ICV) ที่ระดับ 0.8, 1.6 และ 3.2 nmol พบว่าในช่วงระยะเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากการฉีด MC4R antagonist ที่ระดับ 1.6 และ 3.2 nmol ปลาทองมีการกินได้สะสมเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาทอง ที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ แต่การฉีด MC4R antagonist ที่ระดับ 1.6 และ 3.2 nmol ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาในปลา rainbow trout พบว่าการฉีด MC4R antagonist ที่ระดับ 3.0 nmol ส่งผลให้มีการกินได้เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากการฉีด MC4R antagonist ที่ระดับ 1.0 nmol และ 0.3 nmol แต่การฉีด MC4R antagonist ทั้ง 3 ระดับส่งผลให้ปลา rainbow trout มีการกินได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉีดน้ำเกลือ แต่การฉีด MC4R antagonist ชนิด SHU9119 ที่ระดับ 0.3, 1.0 และ 3.0 nmol ไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ ซึ่งจากการที่ HS024 มีประสิทธิภาพต่อการเพิ่มการกินได้มากกว่า SHU9119 เพราะ HS024 มีความสามารถในการจับกับ MC4R ของปลา rainbow trout ได้สูง (high affinity) กว่า SHU9119 (Schjolden, et al., 2008) ซึ่งในการศึกษาบทบาทการทำงานของยีน MC4R ต่อการควบคุมการกินได้ของปลา ยังมีการศึกษาน้อย ดังนั้นจึงค่อนข้างมีข้อจำกัดในการหาระดับของการฉีด MC4R antagonist ที่จะฉีดเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน MC4R ในปลาได้ ดังนั้นจึงได้ทำการรวบรวมระดับของการฉีด MC4R

antagonist ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการหาระดับที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาทดลองในปลาชนิดอื่น และนอกจากนี้ มีรายงานการศึกษาของผลของการยับยั้งการทำงานของ MC4R ในระยะยาวในหนู โดยมีการฉีด MC4R antagonist ชนิด HS014 ที่ระดับ 1 nmol เป็นระยะเวลา 6 วัน วันละ 2 ครั้ง พบว่าหนูที่ถูกฉีดด้วย HS014 มีการกินได้ที่เพิ่มตั้งแต่ในวันที่ 1-6 และมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 4-6 เมื่อมีการหยุดฉีด HS014 หนูจะมีการกินได้ลดลง (Kask, et al., 1999) และมีรายงานการศึกษาของ Jonsson และคณะ (2002) ซึ่งทำการทดลองในหนู พบว่าเมื่อมีการฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1 nmol ต่อชั่วโมง โดยฉีดทาง ICV พบว่าหลังจากการฉีดตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์ หนูที่ได้รับการฉีด HS024 มีการเพิ่มการกินได้และมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ผลการศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist ต่อการเพิ่มอัตราการกินได้ในสัตว์แสดงดังตารางที่ 1.2

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 *MCRs* 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 et al., 2003) ยีน *MCRs* แต่ละตัวนั้นมีบทบาทหน้าที่ในการทำงานที่แตกต่างกัน ยีน *MCRs* 2 ตัวที่มีความสำคัญต่อการควบคุมการกินได้ คือยีน *MC3R* และยีน *MC4R* การศึกษาวิจัยทางด้านเทคโนโลยีการผลิตสัตว์จึงให้ความสนใจกับยีน *MC4R* เพราะมีรายงานวิจัยบทบาทหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับอัตราการกินได้ (feed intake) และการควบคุมสมดุลของพลังงาน (energy homeostasis) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่มีการแสดงออกของยีน *MC4R* ที่บริเวณสมองเป็นหลัก ได้แก่ สมองส่วน telencephalon, metencephalon, mesencephalon และ diencephalon นอกจากนี้พบว่าในไก่และปลานั้น ยีน *MC4R* มีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ (Takeuchi and Takahashi, 1998; Kobayashi et al., 2008) ได้มีการศึกษาการโคลนยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ดังสรุปในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.2 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์

ชนิด	Antagonist	ระดับ (หน่วย / กรัม น้ำหนักตัว)	วิธีการ	ระยะเวลา (หลังจาก การฉีด)	ผลการศึกษา	ที่มา
Goldfish	HS024	0.8 nmol 1.6 nmol 3.2 nmol	ICV	4 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 1.6 และ 3.2 nmol ปลา มีระดับการกินมากกว่าในกลุ่มควบคุม 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 ปลา มีระดับการกินมากที่สุด 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 1.2 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์ (ต่อ)

ชนิด	Antagonist	ระดับ (หน่วย / กรัม น้ำหนักตัว)	วิธีการ	ระยะเวลา (หลังจากการฉีด)	ผลการทดลอง	ที่มา
Ring	AgRP	1 nmol	ICV	10-12 ชั่วโมง	มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	
dove	HS014	0.02 nmol	ICV	4 ชั่วโมง	ทุกระดับการฉีด HS014 มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	
		0.2 nmol			ชบกับกลุ่มควบคุม	
		2.0 nmol		8 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด HS014 2.0 nmol มีผลต่อการเพิ่ม	Strader et al.
					ได้	(2003)
	SHU9119	0.02 nmol	ICV	8-24 ชั่วโมง	ทุกระดับการฉีด HS014 มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	
		0.2 nmol			ชบกับกลุ่มควบคุม	
		2.0 nmol				
หนู (Rat)	SHU9119	10 pmol	PVN	2-24 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 50 pmol มีระดับการกินได้สูงกว่าที่	Girauda
		50 pmol			10 pmol และทั้งสองระดับมีผลต่อการเพิ่มการกินได้สูง	et al.
					ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ	(1998)

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

ตารางที่ 1.2 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์ (ต่อ)

ชนิด	Antagonist	ระดับ (หน่วย / กรัม น้ำหนักตัว)	วิธีการ	ระยะเวลา (หลังจากการฉีด)	ผลการทดลอง	ที่มา
หนู (Rat)	SHU9119	0.3 nmol	ICV	1-4 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 1.0 nmol มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	
		1.0 nmol		3-4 ชั่วโมง	ที่ระดับการฉีด 0.3 nmol มีผลต่อการเพิ่มการกินได้	
		3.0 nmol 6 nmol				
	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	Kask et al. (1998)
	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 1.2 ผลของ MC4R antagonist ต่อการกินได้ในสัตว์ (ต่อ)

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

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

ตารางที่ 1.3 ความยาวของโปรตีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ

GenBank accession no.	ชนิดสัตว์	จำนวนกรดอะมิโน
NP_005903	คน (human)	332
NP_037231	หนู (rat)	332
NP_058673	หนู (mouse)	332
NP_776535, AAG17639	วัว (cattle)	332
NP_001119842	แกะ (sheep)	332
NP_001074193	สุนัข (dog)	332
NP_999338	สุกร (pig)	332
NP_001026685	ไก่ (chicken)	331
NP_775385	ปลาม้าลาย (zebrafish)	326
NP_001027732,AA065551	ปลาฟูก (Fugu)	322
AAS45132	ปลาเทร้า (trout)	339
CAD58853	ปลาทอง (goldfish)	326

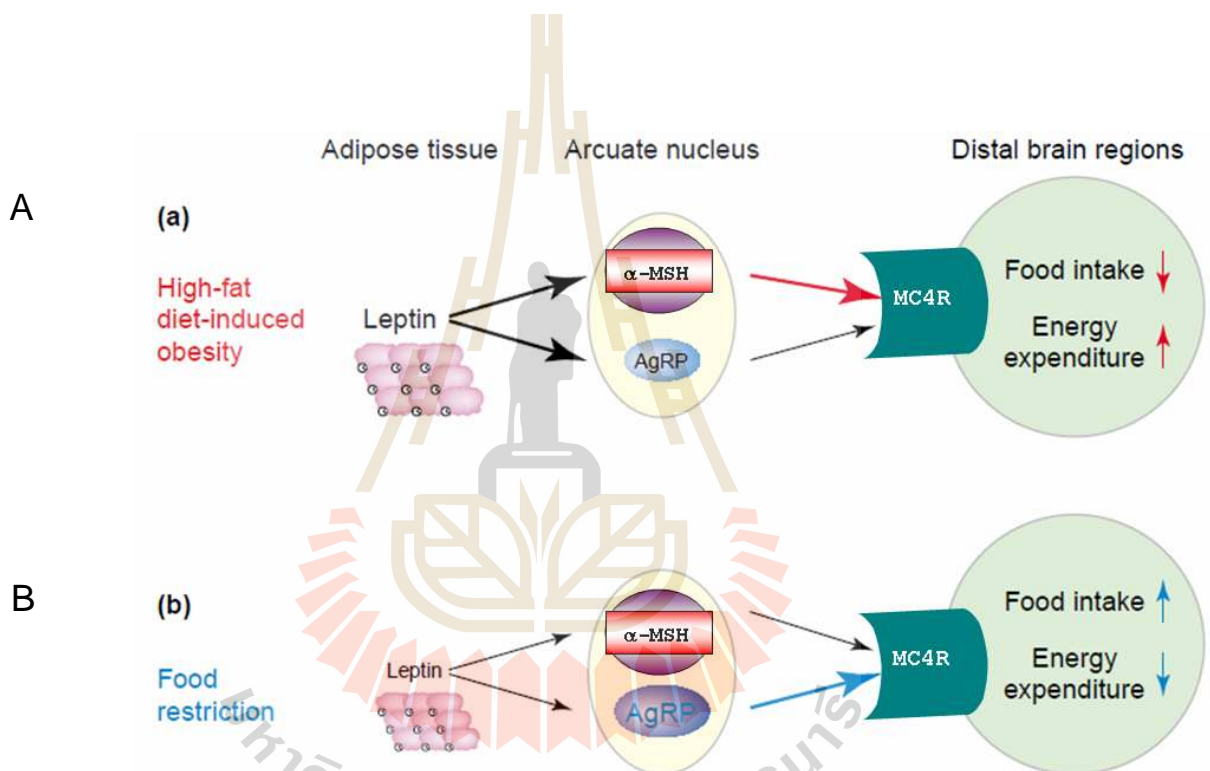


การควบคุมสมดุลของพลังงานมี 2 แบบ คือ แบบ positive energy balance และแบบ negative energy balance ซึ่งการควบคุมสมดุลของพลังงานแบบ positive energy balance ในสภาวะปกติ จะมีการเพิ่มการใช้พลังงาน (energy expenditure) และลดการกินได้ ซึ่งเป็นผลจากการที่  $\alpha$ -MSH จับกับ MC4R ทำให้มีการยับยั้งการกินได้ และจะมีการใช้พลังงานเพิ่มขึ้น หากในสภาวะที่มีการเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มีไขมันสูง จะมีผลทำให้มีการเพิ่มน้ำหนักของ adipose tissue ซึ่งจะมีผลทำให้ระดับ leptin ในพลาสมาเพิ่มขึ้น มีผลทำให้มีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *POMC* เพิ่มขึ้น (เนื่องจาก leptin จะเป็นตัวส่งสัญญาณไปที่สมองบริเวณ arcuate nucleus เพื่อกระตุ้น *POMC* มีการสังเคราะห์  $\alpha$ -MSH) แต่การแสดงออกของ *AgRP* ลดลง (ในบริเวณ arcuate nucleus ของสมองส่วน hypothalamus) การควบคุมสมดุลของพลังงานแบบ negative energy balance ในสภาวะปกติจะมีการเพิ่มการกินได้และลดการใช้พลังงาน ซึ่งเป็นผลจากการ *AgRP* ไปจับกับ *MC4R* ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการกินได้ จึงทำให้มีการใช้พลังงานน้อยลง ในขณะที่เดียวกันระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *AgRP* เพิ่มขึ้น แต่การแสดงออกของ *POMC* ลดลง ทำให้มีการสังเคราะห์  $\alpha$ -MSH ลดลงด้วย (Schwartz et al., 2000; Adan and Kas, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 1.1

จากการศึกษาของ Balthasar และคณะ (2005) เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ *MC4R* โดยการ knockdown ยีน *MC4R* ในหนู พบว่าหนูที่ถูก knockdown ยีน *MC4R* มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้น และมีน้ำหนักไขมันเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ (wild type) เนื่องจากมีการลดการทำงานของยีน *MC4R* ก็จะมีผลต่อการเพิ่มการกินได้ จึงทำให้เกิดการสะสมเนื้อเยื่อไขมัน 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* เนื่องจากในหนูปกติที่มีการทำงานของ MC4R ที่เป็นปกติจึงทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ และเมื่อหนูมีการกินอาหารน้อยลงจึงมีการนำไขมันที่สะสมมาเผาผลาญเป็นพลังงานสำหรับการดำรงชีวิต

บทบาทของ MC4R ต่อการควบคุมการกินเกิดจากการที่ *POMC* ที่อยู่ในสมอง ทำการสังเคราะห์  $\alpha$ -MSH แล้วหลั่งออกมา ซึ่ง  $\alpha$ -MSH จะถูกส่งไปที่สมองบริเวณไฮโปทาลามัส เพื่อมาจับกับ MC4R ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ (Irani and Haskell-Luevano, 2005) ในขณะที่ *AgRP* ก็ถูกหลั่งมาจากสมอง เพื่อเข้ามาจับ MC4R ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการกินได้ในสัตว์ เมื่อ  $\alpha$ -MSH มาจับกับ MC4R จะมีการส่งสัญญาณมากระตุ้นให้เอนไซม์ adenylyl cyclase ให้มีการเพิ่ม cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ภายในเซลล์ ซึ่ง cAMP จะไปกระตุ้นให้ protein kinase A (PKA) ทำงาน

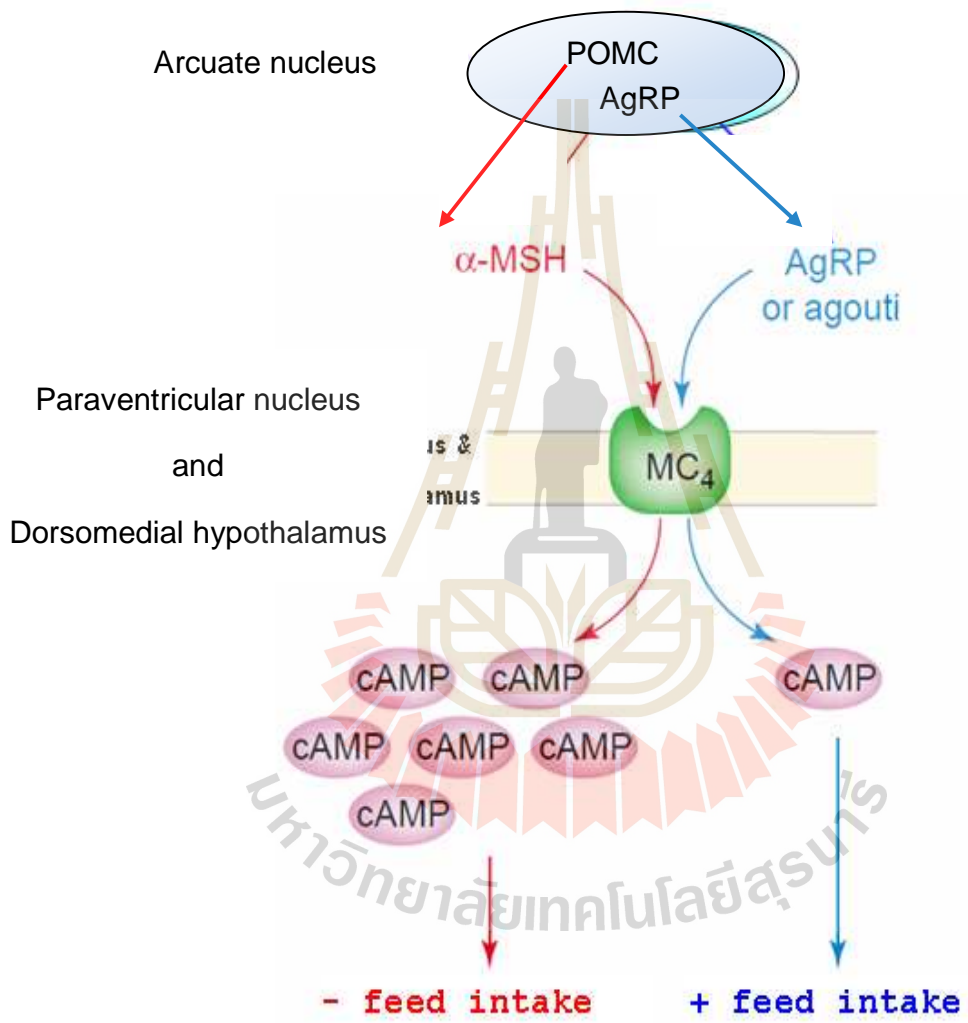
โดย PKA จะเร่งการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของ gene regulatory protein ในการทำงานดังกล่าวจะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการกินได้ และในทางตรงกันข้ามเมื่อ AgRP เข้ามาจับ MC4R จะเหนี่ยวนำให้ MC4R มีการเปลี่ยนโครงสร้าง ซึ่งจะทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ phosphodiesterase และทำให้มีการลดระดับ cAMP ภายในเซลล์ จึงมีผลทำให้ลดการทำงานของ PKA ในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของ gene regulatory protein ในการทำงานดังกล่าวจะมีผลทำให้เพิ่มการกินได้ (Sanchez et al., 2009) ดังแสดงในภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.1 ระบบ melanocortin ในสมองต่อการรักษาสมดุลพลังงาน เมื่อมีการกินอาหารที่มีไขมันสูง

(A) และเมื่อมีการกินอาหารอย่างจำกัด (B)

ที่มา : Adan and Kas (2003)



ภาพที่ 1.2 การทำงานของ MC4R ต่อการควบคุมการกินได้

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต ยีนในกลุ่ม house keeping gene
2. เพื่อโคลนและศึกษาถึงบทบาทของยีนเมลานอร์คอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ (melanocortin 4 receptor; MC4R) ต่อการกินอาหารและผลของภาวะการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าวในปลาสด
3. เพื่อโคลนและศึกษาถึงบทบาทของยีนนิวโรเปปไทด์วาย (neuropeptide Y, NPY) ผลของภาวะการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าวในปลาสด

## ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นจะโคลนยีนที่จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางพันธุกรรมของปลาสด โยได้ทำการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของปลาสด ยีนที่อยู่ในกลุ่ม house keeping gene และยีนที่น่าจะมีบทบาทควบคุมการกินได้ในปลาสด โดยการวิจัยนี้ได้โคลนชิ้นส่วนของ cDNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ growth hormone, insulin like growth factor-1, และ insulin like growth factor-2 และได้ที่โคลนชิ้นส่วนของ cDNA ของยีนในกลุ่ม house keeping gene ได้แก่  $\beta$ -actin, Elongation factor 1, และ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase นอกจากนี้ในการวิจัยนี้ได้ดำเนินการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *MC4R* รวมทั้งการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนและการเปรียบเทียบความเหมือนกันของโปรตีน *MC4R* กับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *IpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน, ในอวัยวะต่าง ๆ และในระหว่างมีอาหารและในสภาวะการอดอาหารของปลาสด ทำการศึกษาผลของการใช้ *MC4R* antagonist ต่อการเพิ่มอัตราการกินได้ของปลาสด และได้ทำการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *NPY* และศึกษาผลของการอดอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *NPY* ที่ระดับการทรานสคริปชัน

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลงานวิจัยนี้จะทำให้ได้ข้อมูลเชิงวิชาการ โดยทราบข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการกินได้ในปลาสด และการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านพันธุศาสตร์ของปลาสด และอาจนำไปใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาสดให้มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น มีระยะเวลาการ

เลี้ยงที่สั้นลง ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้  
เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยในปลาอื่น ๆ ได้ เป็นข้อมูลสนับสนุนด้านความสัมพันธ์ทาง  
วิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิต



## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการกินอาหารในปลาสด ได้ดำเนินการทดลองที่ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อาคารเครื่องมือ 3 และฟาร์ม มหาวิทยาลัย แผ่นกสัณฑ์น้ำ เพื่อศึกษาผลของการแสดงออกของยีนต่อการกินอาหารในปลาสด อันจะมีผลต่อการเจริญเติบโตต่อไป จึงได้แบ่งการศึกษาวิจัยออกเป็น 3 การทดลองย่อย ได้แก่

การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบควบคุมการเจริญเติบโต และยีน house keeping gene

การทดลองที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเมลานอคอร์ติน 4 รีเซพเตอร์ (Melanocortin 4 receptor) ต่อการกินอาหารในรอบวันและการอดอาหาร

การทดลองที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของยีนนิวโรเปปไทด์วาย (Neuropeptide Y) และผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีน Neuropeptide Y

การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบควบคุมการเจริญเติบโต และยีน house keeping gene

การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบควบคุมการเจริญเติบโต และยีน house keeping gene ทำโดยวิธี 3'-Rapid Amplification cDNA Ends (3'-RACE) โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการ โคลน แล้วใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adaptor ที่ปลาย 3' ของปลาย cDNA (3'-RACE) ในการโคลนยีน จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 1. ปลาสดที่ใช้ในการศึกษา

นำปลาสดมาจากฟาร์มในเขตจังหวัดนครราชสีมา มาพักเลี้ยงที่ฟาร์มประมงของ มทส. โดยทำการเลี้ยงปลาในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 5 x 10 x 1 ลูกบาศก์เมตร ทำการฝึกปลาสดให้กินอาหารสำเร็จรูปทางการค้า (โปรตีน 40 %, ไขมัน 6%) โดยให้กินอาหารวันละ 2 ครั้ง ที่เวลา 10.00 น. และ 16.00 น. ตลอดการทดลอง

## 2. การเก็บตัวอย่างสมองและตับของปลาสด

นำปลาสดที่มีสุขภาพดีที่มีน้ำหนักประมาณ 60 กรัม มาทำการเก็บสมอง โดยนำปลาสดไปแช่ใน 300 ppm 2-phenoxyethanol เพื่อทำการสลบปลาสด หลังจากนั้นทำการเปิดกะโหลกปลาและใช้คีมปลายแหลมดึงสมองออกจากโพรงกะโหลก การเก็บตัวอย่างตับปลาสดใช้มีดผ่าตัดผ่าช่องท้องปลา เพื่อเก็บตัวอย่างตับ

## 3. การสกัด Total RNA และการสร้าง the first strand cDNA

สกัด total RNA โดยใช้สาร trizol (invitrogen) โดยใช้ตัวอย่างสมองหรือตับประมาณ 50-100 มิลลิกรัม ต่อสารละลาย Trizol 1 มิลลิตร ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต แล้วทำการย่อย DNA ด้วย RNase-free Dnase จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย phenol/Chloroform ตกตะกอน total RNA ด้วย 99.5 % เอทานอลปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรสารละลาย ปั่นแยกตะกอนและละลายตะกอนด้วยน้ำปราศจาก RNase (DEPC water) แล้วจึงทำการตั้งเคราะห์ the first strand cDNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป SMART™ RACE cDNA amplification kit ตามวิธีการที่ระบุมา กับชุดน้ำยา และเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

## 4. การออกแบบไพรเมอร์

4.1 ไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน เมลาโนคอร์ติน 4 รีเซพเตอร์ ทำการรวบรวมข้อมูลของยีน *MC4R* ในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะในปลาที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความตรงกัน (alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC4R* (ดังภาพที่ 2.1) โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) และทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาใช้ในการโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 3' (ดังตารางที่ 2.1)

4.2 ไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีนนิวโรเปปไทด์วาย ทำการออกแบบเช่นเดียวกับข้อ 4.1 และมีรายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 2.1

4.3 ไพรเมอร์สำหรับยีน growth hormone, Insulin like growth factor 1 และ 2,  $\beta$ -actin, Elongation factor 1, และ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ใช้ไพรเมอร์ที่มีอยู่แล้วจากผลการวิจัยที่ผ่านมา



ภาพที่ 2.1 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลน cDNA ของยีน TpMC4R ด้านปลาย 3'



Goldfish	AGCATCATCAAGAACATGGACAACATTTTTGACTCGATGATCTGCAGCTCACTGTTGGCCTCCATTTGGAGT	411
Zebrafish	AGCATCATTAAGAACATGGACAACGTTTGGACTCTATGATCTGCAGCTCTCTGTTGGCCTCCATTTGGAGT	411
Karasu	ACGCTGATCAAGAGCATGGACAACGTTTGGACTCCATGATCTGCAGCTCTTTGCTGGCGTCCATCTGCAGC	405
Flounder	ACGTTGATTAAGAAGCATGGACAACGTTTGGACTCTATGATCTGCAGCTCCCTGCTGGCGTCCATCTGCAGC	414
Saebass	CAGTTGATCAAAAAGCATGGACAATGTGTTTGGACTCTATGATCTGTAGTTCTCTGTTAGCATCCATCTGCAGC	420
Trout	TCGCTCATAAAGAGCATGGACAACGTTTCGACTCCATGATCTGTAGCTCACTGCTGGCGTCAATCTGTAGT	432
Dogfish	AATTTAATCAAGAACATGGACAACGTTTGGACTCGATGATCTGCAGCTCTCTTCTGGCTTCCATTTGCAGC	414
Human	AGTTTCACAGTGAATATGATAATGTCATTGACTCGGTGATCTGTAGCTCCCTGCTTGCATCCATTTGCAGC	417
Chicken	AGCTTTACCATAAACATGACAATGTCATTGACTCAGTGATTTGCAGTTCCTGCTTGCATCAATTTGCAGT	414
	* *	
Goldfish	TTGTTGGCCATAGCGGTGGACCGCTACATCACGATCTTCTACGCCTTGGCCTACCACAACATCATGACCCAA	483
Zebrafish	TTGTTGGCCATCGCGGTGGACCGCTACATCACAACTTCTACGCCTTGGCCTACCACAACATCATGACCCAG	483
Karasu	CTGCTCGCCATCGCCGTCGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCCTTGGCCTACCACAACATCGTCACCCTG	477
Flounder	CTGCTCGCTATCGCAGTCGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCCTTGGCCTACCACAACATCGTCACCCTG	486
Saebass	TTGCTGGCCATCGCGGTGATCGTTACATCACTATCTTCTACGCCTTGGCCTACCACAACATTTGGCACCCCTG	492
Trout	CTCTTGGCCATCGCCATAGACCGCTACATCACCATATTCTACGCCTTGGCCTACCATAACATTTGTGACGGTA	504
Dogfish	TTGCTGGCCATCGCTATTGACAGGTACATCACCATCTTCTACGCCTTGGCCTACCATAACATCGTGACAGTG	486
Human	CTGCTTTCAATTGCAAGTGGACAGGTACTTTACTATCTTCTATGCTCTCCAGTACCATAACATTATGACAGTT	489
Chicken	CTCCTCTCAATAGCAGTGGACAGGTATTTTACTATCTTTTATGCCCTCCAGTACCATAAATATCATGACGGTC	486
	* *	
Goldfish	CGGCGGGCGGGCACCATCATCACCTGCATCTGGACCTTGTGTACGGTCTCTGGCGTGCTCTTTATTGTGTAC	555
Zebrafish	CGGCGGGCGGGCACCATCATCACCTGCATCTGGACCTTGTGCACAGTCTCCGGGTAATCTTTATCGTGTAT	555
Karasu	CGGAGAGCCTCGCTGGTCAATCAGCAGCATCTGGACGTGCTGCACCGTGTCCGGCGTCTTTCATCGTCTAC	549
Flounder	CGGCGGGCGGATGCTGGTCAATCAGCAGCATCTGGACGTGCTGCATCGTGTCTGGCATCCCTTTCATCATCTAC	558
Saebass	CGGAGAGCAATGTTGGTCAATCAGCAGCATCTGGACATGCTGCATTTGTGTCCGGCATCCCTGTTTATCATCTAC	564
Trout	AAGCGAGCGATGGCGGTAATCGCGTGCATCTGGTGTGTTGTGTGGCATCGGGCGTCTTTCATTATCTAC	576
Dogfish	CGGAGGGCCTGATGATTATCGCCGCCATCTGGGACGCTGCACGGGCTCAGGGATCCCTTTCATCGTTTAT	558
Human	AAGCGGGTTGGGATCATCATAAGTTGTATCTGGGCAGCTTGCACGGTTTCAGGCATTTTGTTCATCATTTAC	561
Chicken	AAGCGTGTAGGGTCAATCATCATGATGATCTGGGCCTTGCAGTGTCTCAGGCATTTTGTTCATCATTTACT	558
	* *	
Goldfish	TCTGAGAGCACCACCGTTCTCATCTGCCTTATCAGCATGTTCTTACCATGCTGGCGCTTATGGCCTCGCTC	627
Zebrafish	TCAGAAAGCACCAGTCTCTCATCTGCCTCATCAGCATGTTCTTACCATGCTGGCGCTCATGGCCTCACTC	627
Karasu	TCGGAGAGCACCACCGTGTCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTACCATGCTGGTGTCTATGGCCTCCCTC	621
Flounder	TCGGAGAGCACCACCGTGTCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTACCATGCTGGTGTCTATGGTGTGCTG	630
Saebass	TCAGAGAGCACCACAGTGTCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTACCATGTTGGTGTCTATGGCGTCTG	636
Trout	TCTGAGAGCACCACGGTCTCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTACCATGCTGGCGCTCATGGCCTCTCTC	648
Dogfish	TCCGAGAGCACCAGTCAATCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTACCATGCTGGCCTCATGGCCTCGCTC	630
Human	TCAGATAGTAGTGTGTATCATCTGCCTCATCACCATGTTCTTACCATGCTGGCCTCATGGCCTCTCTCTC	633
Chicken	TCTGACAGCAGGTTGTCATCATCTGCCTTATCAGCATGTTCTTACCATGCTCATTTCTATGGCATCCCTT	630
	** ** ** *	
Goldfish	TACGTCCACATGTTCTTCTAGCCCGCTGCACATGAAGCGCATTGCCCGCTCCCTGGCAACGGCCCTATC	699
Zebrafish	TACGTCCACATGTTCTTCTAGCCCGCTGCACATGAAGCGGATCGCCGCTTACCTGGAAACGGCCCGATA	699
Karasu	TACGTCCACATGTTCTGCTGGCGCGCTGCACATGAAGCGGATCGCCGCTTACCTGGAAACGGCCCGATC	693
Flounder	TACGTCCACATGTTCTGCTGGCGCGCTGCACATGAAGCGGATCGCCGCTTACCTGGAAACGGCCCGATC	702
Saebass	TACGTCCACATGTTCTGCTGGCCGCTTTCACATGAAGCGCATCGCAGCATTGCCAGGAAACGGCCCGATC	708
Trout	TACGTCCACATGTTCTGCTGGCCCGCTGCACATAAAGAGGATTGCCGCTGCCCGGAAACGTTCCCATC	720
Dogfish	TACGTCCACATGTTCTGCTGGCCCGCTTGCACGTCAGCGCATCGCCCGCTGCCCGGAAACGGCCCGCTC	702
Human	TATGTCCACATGTTCTGATGGCCAGGCTTACATTAAGAGGATTGCTGCTCCCGGCACTGGTGCATC	705
Chicken	TATGTTCCACATGTTCTGATGGCTCGAATGCATATCAAGAAGATAGCAGTCTTCCAGGGACTGGCCCATC	702
	** ** *	

ภาพที่ 2.1 (ต่อ)

Goldfish	TGGCAGGCGGCAAATATGAAAGGGGCCATCACTATCACTATCCTGCTGGGAGTATTCGTGGTGTGCTGGGCT	771
Zebrafish	TGGCAGGCGGCGAAATATGAAAGGGGCCATACCATTACTATACTACTGGGGGTGTTTGTGGTGTGCTGGGCG	771
Karasu	CACCAGAGAGCCAACCTGAAGGGGCCATCACCTCACCATCCTCCTGGGAGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCG	765
Flounder	CTTCAGCGAGCCAACATGAAGGGGCCATCACCTCACCATCCTCCTGGGGTGTTCGTGGTGTGCTGGGCG	774
Saebass	CATCAGCGGGCCAACATGAAGGGGCCATCACCTCACCATCCTCATCGGGGTGTTTCGTGGTGTGCTGGGCG	780
Trout	CGCCAGCGTGCCAACATGAAGGGGCCATCACCTCACCATCCTCCTGGGAGTGTTCGTAGTGTGCTGGGCT	792
Dogfish	CGCCAAGCGGCGAAACATGAAGGGGGCGATCACGCTGACCATCCTGCTGGGGGTCTTTGTGCTGCTGGGCG	774
Human	CGCCAAGGTGCCAATATGAAGGGAGCGATTACCTTGACCATCCTGATTGGCGTCTTTGTTGTGCTGCTGGGCC	777
Chicken	CGCCAAGGGGCCAACATGAAGGGGCCATCACTCTCACTATACTGATTGGAGTTTTTGTGTGCTGCTGGGCC	774
	* * * * *	
Goldfish	CCCTTTTTTTTGCACCTCATCCTCATGATTTCTGCCCCGGAATCCCTATTGCATCTGTTTCATGTCCCAC	843
Zebrafish	CCCTTTTTTCTTGACCTCATCCTCATGATCTCCTGCCCGCGGAATCCTTATTGTGTCTGCTTCATGTCCAC	843
Karasu	CCTTTCCTTCCACCTCATCCTCATGATCACCTGCCCAAGAACCATACTGCACGTGCTTCATGTCCCAC	837
Flounder	CCGTTTCTTCCACCTCATCCTCATGATCACCTGCCCGAGGAACCCGTACTGCACCTGCTTCATGTCCCAC	846
Saebass	CCCTTTTTTCTCCACCTCATCCTCATGATCACTTGCCCCAGGAACCCCTATTGCACCTGCTTCATGTCCAA	852
Trout	CCCTTTTTTCTCCACCTCATCCTCATGATATCATGCCCCAGGAACCCCTACTGTGCTGCTTCATGTCCAC	864
Dogfish	CCTTTCCTTGCACCTCATTTCTCATGATCTCCTGCCCGCAGAACCCTGCTGTGCTGCTTCATGTCCAC	846
Human	CCATTTCCTCCACTTAATATTCTACATCTCTGTCCCGAGGAACCCGTAATGTGTGCTTCATGTCTCAC	849
Chicken	CCATTTTTTCTGCACCTCATTTTCTACATCTCCTGCCCTACAATCCTTACTGTGTGCTTCATGTCTCAC	846
	* * * * *	
Goldfish	TTCAACATGTATCTGATCCTCATTATGTGCAACTCGGTCATAGACCCTCTCATCTACGCATTCAGGAGCCAA	915
Zebrafish	TTCAACATGTATCTGATCCTCATTATGTGCAACTCGGTCATAGACCCTCATATATGCCTTCAGAAGCCAA	915
Karasu	TTCAACATGTACCTCATCCTCATCATGTGCAACTCCGTCATCGACCCCATCATCTACGCCTTTCGCAGCCAG	909
Flounder	TTCAACATGTACCTCATTCTCATCATGTGCAACTCCGTCATCGACCCCATCATCTACGCCTTTCGCAGCCAG	918
Saebass	TTCAACATGTACCTCATCCTTATCATGTGCAACTCTGTTCATTGACCCCATCATCTACGCCTTTCGCAGCCAA	924
Trout	TTCAACATGTACCTCATCCTCATCATGTGCAACTCTGTTCATCGACCCCATCATCTACGCCTTTCAGGAGCCAA	936
Dogfish	TTCAACATGTACTTAATCCTCATCATGTGCAACTCGGTCATCGACCCCTCATCTACGCCTTTCGCAGTCAA	918
Human	TTTAACCTTGTATCTCATACTGATCATGTGTAATTCAATCATCGATCCTCTGATTTATGCCTCCGGAGTCAA	921
Chicken	TTTAACCTTCTACCTCATCCTCATCATGTGTAATTCCATCATTGATCCACTTATCTATGCATTTCCGGAGTCA	918
	* * * * *	
Goldfish	GAGATGAGGAAAACCTTCAAGGAGATCTGCTGCTGCTGGTATGGACTGGCGTCTCTGTGTGTATGA-----	981
Zebrafish	GAAATGAGGAAGACCTTCAAGGAGATCTGCTGCTGCTGGTATGGACTTGCATCTCTGTGTGTATAA-----	981
Karasu	GAGATGAGAAAACCTTCAAGGAGATCTTCTGCTG-----CTCCCAAATGCTGGTGTGCATGTGA-----	969
Flounder	GAAATGAGGAAAACCTTCAAAGAGATTTTCTGCTG-----CTCTCACGCTCTGCTGTGTGTGTGA-----	978
Saebass	GAGATGAGAAAACCTTCAAAGAGATTTTCTGCTG-----CTCACACGCTCTCTGTGCGTGTGA-----	984
Trout	GAGATGAGGAAGACCTTAAAGGAAATCTTCTGCTGGT---ACAGTCTGCCAAAACCTGTGTGTGTGCGAGCTG	1005
Dogfish	GAAATGCGGAAGACCTTCAAAGAAATAATCTGCTGCT---ACAGTCTGCCGGGGCTGTGTGACCTG-----	981
Human	GAACTGAGGAAAACCTTCAAAGAGATCATCTGTTGCT---ATCCCCTGGGAGGCCTTTGTGACTTG-----	984
Chicken	GAGCTCAGGAAAACATCAAAGAAATTATATGCTGCT---GTAACCTGAGAGGGCTTTGTGATTTA-----	981
	* * * * *	
Goldfish	-----	
Zebrafish	-----	
Karasu	-----	
Flounder	-----	
Saebass	-----	
Trout	CCAGGGAATATTGA 1020	
Dogfish	ACAAGTGAATATTAA 996	
Human	TCTAGCAGATATTAA 999	
Chicken	CCTGGCAAATATTAG 996	

ภาพที่ 2.1 (ต่อ)

ตารางที่ 2.1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>PCR</b>	<b>Primer order</b>
<b><u>MC4R</u></b>			
MC4R-F1	5'-TCTCCACGGAGGTSTTCCTSAC-3'	3'RACE	Sense
MC4R-F2	5'-TCAGCCTS YTGGAGAACATCCT-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)
MC4R-RT-F	5'-GCATCCTCTTCATCATCTACTCGGA-3'	Real-time RT-PCR	Sense
MC4R-RT-R	5'-GCAGTAGGGGTTCCGGGGGCAGGTG-3'	Real-time RT-PCR	Antisense
<b><u>NPY</u></b>			
NPY-F1	5'-GCATCCTAACTTGGTGAN-3'	3'RACE	Sense
NPY-F2	5'-AAACCVGAGAACCCCGGGGAGG-3'	3'RACE	Sense(nested)
NPY-R1	5'-ATCTCAGGACTGGACCTCTTCCCGT-3'	5'RACE	Antisense
NPY-R2	5'-GATGTAGTGTCTCAGGGCTGAGTAG-3'	5'RACE	Antisense(nested)
NPY-RT-F	5'-GCCATCCGGTTTGGCTCGACCTCAC-3'	Real-time RT-PCR	Sense
NPY-RT-R	5'-GGGTTGAGTATACACAGAGGCGGAT-3'	Real-time RT-PCR	Antisense
<b><u>Actin</u></b>			
Actin-F	5'-ACTACCTCATCAAGATCCTG-3'	Actin 3'RACE	Sense
Actin-RT-F	5'-TGGCAATGAGAGGTTCCG-3'	Real-time RT-PCR	Sense
Actin-RT-R	5'-TGCTGTTGTAGGTGGTTTCG-3'	Real-time RT-PCR	Antisense
<b><u>GH</u></b>			
GH-F1	5'-GCCAGCGTTTGTCTCCAT-3'	3'RACE	Sense
GH-F2	5'-CAGAGACTCTTCTCGGACT-3'	3'RACE	Sense(nested)

ตารางที่ 2.1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer	Sequence	PCR	Primer order
<b><u>GAPDH</u></b>			
GAPDH-F1	5'-GGTTGTGGCCATCAATGACCCCTTC-3'	3'RACE	Sense
GAPDH-F2	5'-TACATGTTCAAGTACGACTCCACCC-3'	3'RACE	Sense(nested)
<b><u>EF1<math>\alpha</math></u></b>			
EF1-F1	5'-ATGGGAAAGGAAAAGACCCACATCA-3'	3'RACE	Sense
EF1-F2	5'-CATTGGCCATGTCTGACTCCGGCAAG-3'	3'RACE	Sense(nested)
<b><u>IGF-1</u></b>			
IGF-1-F1	5'-ATGTCTAGCGCTTTTTCCCTTC-3'	cDNA cloning	Sense
IGF-1-R1	5'-GTGGCATTATGTGATGTCTTC-3'	cDNA cloning	Antisense
<b><u>IGF-2</u></b>			
IGF-2-F1	5'-ATGGAAACCCAGCAAAGATACG-3'	cDNA cloning	Sense
IGF-2-R1	5'-AACAGCAGAATGAAGGTCAAGAGGA-3'	cDNA cloning	Antisense
UPM-L	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT-3'		
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'		

## 5. การโคลนยีน

### 5.1 การโคลน 3' cDNA ของ MC4R ในพลาสติก

ทำการโคลน 3' cDNA ของ MC4R ในพลาสติก โดยวิธี nested PCR ซึ่งประกอบด้วย การทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง (primary and nested PCR) ในการโคลน MC4R จากพลาสติกในครั้ง นี้ ใช้ gene specific primer 3 เส้น (sense primer) และ ไพรเมอร์ (reverse primer) จากชุดน้ำยา SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit

การทำ primary PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ *La Taq* polymerase (Takara) ไพรเมอร์ที่ใช้ ในปฏิกิริยา PCR คือ primer MC4R-F1 และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit ได้ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR สำหรับปริมาตรทั้งหมด 10  $\mu$ l ซึ่งประกอบ ไปด้วย 1.0 x buffer *LA Taq*, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP Mix, 1.0  $\mu$ M ของไพรเมอร์แต่ละเส้น 1 U *LA Taq* และใช้ the first strand cDNA 3' RACE ของสมองพลาสติก เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็น เวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมาเปลี่ยนเป็น 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 53°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 35 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (1 %)

นำผลผลิต PCR จาก primary PCR มาทำการเจือจาง 50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ MC4R-F2 หรือ MC4R-F3 (primer forward) และ ไพรเมอร์ NUP จากชุดน้ำยา SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit) โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ *La Taq* polymerase (Takara) และมีการเตรียมปฏิกิริยา และสภาวะของการเปลี่ยนอุณหภูมิเพิ่มปริมาณขึ้นในหลอด ทดลอง เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วใน primary PCR หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (1 %)

### 5.2 การโคลน 3' cDNA ของ $\beta$ -actin ในพลาสติก

ทำการโคลน 3' cDNA ของ  $\beta$ -actin ในพลาสติก โดยวิธี PCR ใช้ gene specific primer (Actin-F; sense primer) และ ไพรเมอร์ (UPM-L; reverse primer) (ตารางที่ 2.1) จากชุดน้ำยา SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit การทำ PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ *La Taq* polymerase (Takara) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ Actin-F และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit ได้ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR สำหรับปริมาตรทั้งหมด 10  $\mu$ l ซึ่ง ประกอบไปด้วย 1.0 x buffer *LA Taq*, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP Mix, 1.0  $\mu$ M ของไพรเมอร์แต่ละ เส้น, 1 U *LA Taq* และใช้ the first strand cDNA 3' RACE ของตับพลาสติก เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็น

เวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมาเปลี่ยนเป็น 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 55°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 35 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (1 %)

### 5.3 การโคลน 3' cDNA ของ NPY ในปลาสด

ทำการโคลน 3' cDNA ของ NPY ในปลาสด โดยวิธี nested PCR ซึ่งประกอบด้วย การทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง (primary and nested PCR) ในการทำ primary PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ La *Taq* polymerase (Takara) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ primer NPY-F1 (ตารางที่ 2.1) และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit ได้ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR สำหรับปริมาตรทั้งหมด 10 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 1.0 x buffer LA *Taq*, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP Mix, 1.0 µM ของไพรเมอร์แต่ละเส้น 1 U LA *Taq* และใช้ the first strand cDNA 3' RACE ของสมองปลาสด เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมาเปลี่ยนเป็น 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 55°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 35 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (1 %)

นำผลผลิต PCR จาก primary PCR มาทำการเจือจาง 50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ NPY -F2 (primer forward) (ตารางที่ 2.1) และ ไพรเมอร์ NUP จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit) โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ La *Taq* polymerase (Takara) และมีการเตรียมปฏิกิริยา และสภาวะของการเปลี่ยนอุณหภูมิเพิ่มปริมาณขึ้นในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วใน primary PCR หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (1 %)

### 5.4 การโคลน 3' cDNA ของ growth hormone (GH) ในปลาสด

ทำการโคลน 3' cDNA ของ growth hormone (GH) ในปลาสด โดยวิธี nested PCR ซึ่งประกอบด้วย การทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง (primary and nested PCR) ในการทำ primary PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ La *Taq* polymerase (Takara) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ primer GH -F1 (ตารางที่ 2.1) และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 5.3 นำผลผลิต PCR จาก primary PCR มาทำการเจือจาง 50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ GH -F2 (primer forward) (ตารางที่ 2.1) และ ไพรเมอร์

NUP จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit ) ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 5.3

### 5.5 การโคลน 3' cDNA ของ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ในพลาสติก

ทำการโคลน 3' cDNA ของ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ในพลาสติก โดยวิธี nested PCR ซึ่งประกอบด้วย การทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง (primary and nested PCR) ในการทำ primary PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ La *Taq* polymerase (Takara) ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ primer GAPDH -F1 (ตารางที่ 2.1) และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit และใช้ the first strand cDNA 3' RACE ของตับพลาสติก เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 5.3 นำผลผลิต PCR จาก primary PCR มาทำการเจือจาง 50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ nested PCR ด้วยไพรมเมอร์ GAPDH -F2 (primer forward) (ตารางที่ 2.1) และ ไพรมเมอร์ NUP จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 5.3

### 5.6 การโคลน 3' cDNA ของ Elongation factor 1- $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ ) ในพลาสติก

ทำการโคลน 3' cDNA ของ Elongation factor 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) ในพลาสติก โดยวิธี nested PCR ซึ่งประกอบด้วย การทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง (primary and nested PCR) ในการทำ primary PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ La *Taq* polymerase (Takara) ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ primer EF1-F1 (ตารางที่ 2.1) และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit และใช้ the first strand cDNA 3' RACE ของสมองพลาสติก เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 5.3 นำผลผลิต PCR จาก primary PCR มาทำการเจือจาง 50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ nested PCR ด้วยไพรมเมอร์ EF1-F2 (primer forward) (ตารางที่ 2.1) และ ไพรมเมอร์ NUP จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit ) ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 5.3

### 5.7 การโคลน 3' cDNA ของ Insulin like growth factor 1 (IGF-1) และ Insulin like growth factor 2 (IGF-2) ในพลาสติก

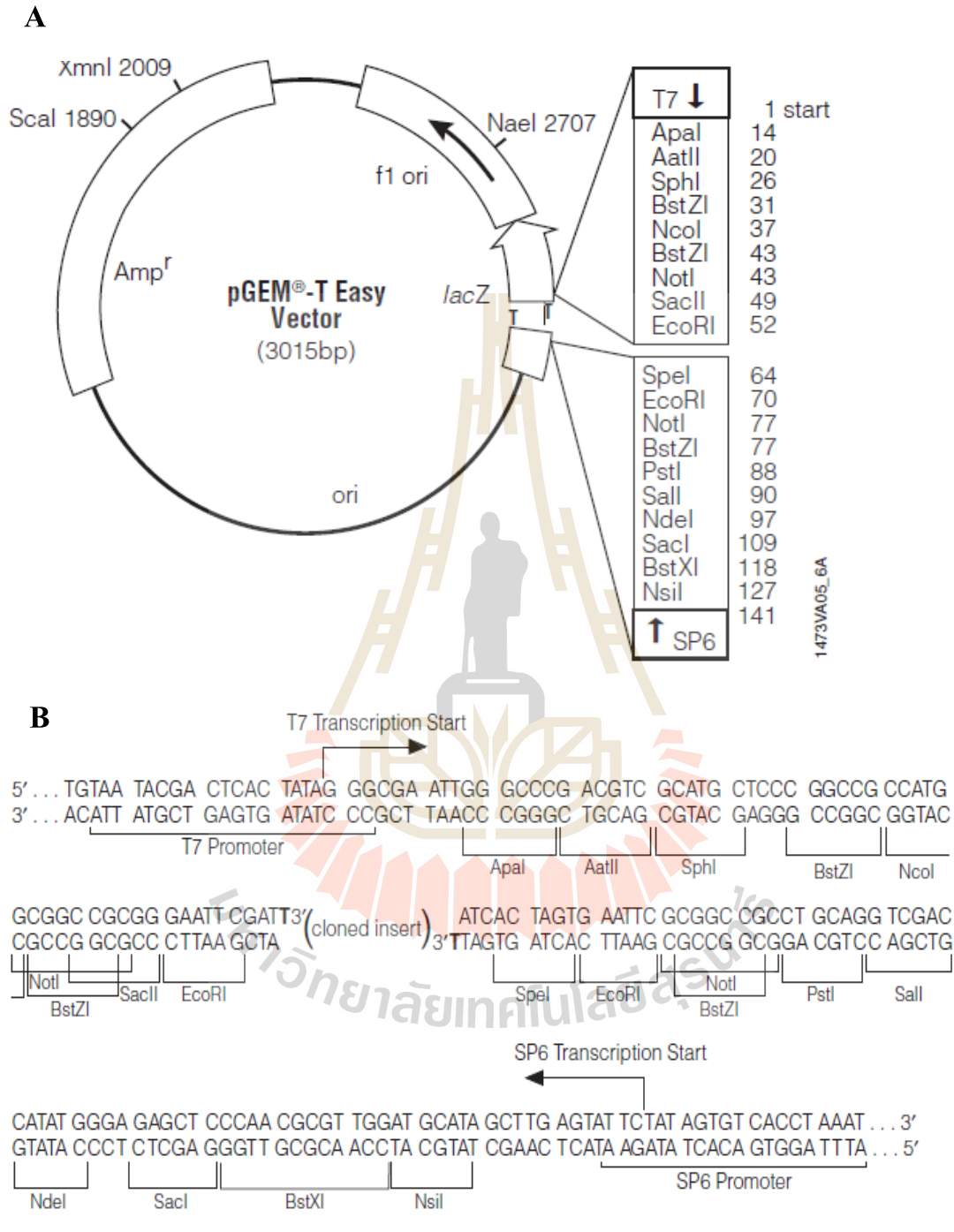
ทำการโคลน coding sequence (CDS) ของ Insulin like growth factor 1 (IGF-1) และ Insulin like growth factor 2 (IGF-2) ในพลาสติก โดยวิธี PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ La *Taq* polymerase (Takara) ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับการโคลน IGF-1 คือ primer IGF-1-F1 และ IGF-1-

R1 (ตารางที่ 2.1) และ IGF-2 คือ primer IGF-2-F1 และ IGF-2-R1 (ตารางที่ 2.1) โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ *La Taq* polymerase (Takara) ได้ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR สำหรับปริมาตรทั้งหมด 10  $\mu$ l ซึ่งประกอบไปด้วย 1.0 x buffer *LA Taq*, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 2 mM dNTP Mix, 1.0  $\mu$ M ของไพรเมอร์แต่ละเส้น 1 U *LA Taq* และใช้ the first strand cDNA 3' RACE ของตับปลาสด เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมาเปลี่ยนเป็น 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 55°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 35 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (1 %)

#### 6. การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis การทำชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้บริสุทธิ์ และการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เข้ากับเวกเตอร์พาทะ

ทำการเตรียม agarose gel ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้วเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล โดยตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว โดยใช้การบัฟเฟอร์ 0.5X TBE buffer, 60 ng/L ethidium bromide เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำการแยกดีเอ็นเอตามขนาดโมเลกุล แล้วจึงใช้มีดผ่าตัดตัดชิ้นเจลที่มีผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะมี ยีนที่ต้องการ เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen) นำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เชื่อม (ligation) ต่อเข้ากับเวกเตอร์พาทะ pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Promega) (ภาพที่ 2.2)





ภาพที่ 2.2 พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (A) และลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multiple Cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM<sup>®</sup>-T Easy (B) (Promega)

## 7. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านให้เป็น competent cell และการนำพลาสมิดเข้า

### สู่ competent cell

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* JM109 (Promega) บน LB agar (1 % bacto-tryptone, 0.5 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 1.5 % agar) ที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมา 1 โคโลนีลงใน SOB (2.0 % bacto-tryptone, 0.5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) 2 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติม 250  $\mu$ l ของแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ลงใน SOB 60 มิลลิลิตร เขย่าที่ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-7 ชั่วโมง (OD<sub>550</sub> ~ 0.3-0.4) นำแบคทีเรียที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนของตะกอนแบคทีเรีย แล้วเติม 10 มิลลิลิตรของ TFB (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) เขย่าแบคทีเรียให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนของตะกอนแบคทีเรีย แล้วเติม 2.4 มิลลิลิตรของ TFB เขย่าแบคทีเรียให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที แล้วเติม DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 7 % เขย่าให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที เก็บ competent cell ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

หลังจากทำการเชื่อมต่อ ผลผลิต PCR เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM T easy แล้ว จึงทำการเคลื่อนย้าย พลาสมิดเวกเตอร์ที่มีการเชื่อมต่อกับ ผลผลิต PCR (transformation) เข้าสู่ competent cell ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับ ผลผลิต PCR เพื่อนำไปสกัด พลาสมิด (plasmid DNA isolation extraction-alkaline lysis method) ทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดย phenol/Chloroform เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท MacroGen (<http://www.macrogen.com>) วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *MC4R* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม BlastN และ BlastX และทำการเปรียบเทียบความตรงกัน (alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน *TpMC4R* โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

เก็บเซลล์ที่มีพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนต่าง ๆ ได้แก่ 3'-RACE ของ *MC4R* (p-3-TpMC4R), 3'-RACE ของ Actin (p-3-TpActin), NPY (p-3-TpNPY), EF-1 $\alpha$  (p-3-TpEF1), GAPDH (p-3-TpGAPDH), GH (p-3-TpGH), IGF-1 (p-TpIGF-1) และ IGF-2 (p-TpIGF-2) เพื่อใช้ในการศึกษาอื่น ๆ ต่อไป

## การทดลองที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเมลานอร์คอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ (Melanocortin 4 receptor) ต่อการกินอาหารในรอบวันและการอดอาหาร

การศึกษานี้เป็นการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน MC4R และทำการศึกษาการแสดงออกของยีน MC4R ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน ในอวัยวะต่าง ๆ และการแสดงออกของยีน MC4R ในรอบวันที่ได้รับอาหารเป็นปกติ และผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีน MC4R นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist (HS024) ต่อการเพิ่มการกินได้ในปลาสด

### 1. การโคลน cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5' ด้วยเทคนิค 5'RACE

ทำการสังเคราะห์ the First strand cDNA ของยีน *TpMC4R* ด้านปลาย 5' โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากการทดลองที่ 1 ข้อ 3 มาสังเคราะห์ the first strand cDNA for 5' RACE โดยใช้ SMART™ RACE cDNA amplification kit (Clontech)

การออกแบบไพรเมอร์ทำโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของ 3' RACE ของ MC4R (p-3-TpMC4R) แล้วทำการโคลน 5' cDNA ของ *TpMC4R* โดยวิธี nested PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน 5' cDNA ของ *TpMC4R* แสดงดังตารางที่ 2.1

การทำ primary PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ *Ex Taq* polymerase (Takara) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ primer MC4R-R1 และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit ได้ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR สำหรับปริมาตรทั้งหมด 10  $\mu$ l ซึ่งประกอบไปด้วย 1.0 x buffer *Ex Taq*, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP Mix, 1.0  $\mu$ M ของไพรเมอร์แต่ละเส้น 1 U *Ex Taq* และใช้ the first strand cDNA 5' RACE ของสมองปลาสด เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมาเปลี่ยนเป็น 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 53°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกันจำนวน 35 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (2 %)

นำผลผลิต PCR จาก primary PCR มาทำการเจือจาง 50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ MC4R-R2 หรือ MC4R-R3 (reverse primer) และ ไพรเมอร์ NUP (forward primer) จากชุดน้ำยา SMART™ RACE cDNA amplification kit ) โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ *Ex Taq* polymerase (Takara) และมีการเตรียมปฏิกิริยา และสภาวะของการเปลี่ยนอุณหภูมิ

เพิ่มปริมาณยีนในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วใน primary PCR หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis (2 %)

ทำการแยกชิ้น PCR product ที่คาดว่าจะเป็น 5' cDNA ของ *TpMC4R* ออกมาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อเชื่อมต่อกับ pGEM T easy ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อที่ 6-7 ของการทดลองที่ 1

## 2. การวิเคราะห์การแสดงของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของปลาสด โดยใช้เทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR)

### 2.1 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ และการเก็บตัวอย่างของตัวอ่อนปลาสด

นำปลาสดที่มีสุขภาพที่ดีและมีความสมบูรณ์พันธุ์ มาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 2 x 2.5 x 0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีพืชน้ำเช่นผักบุงที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วลอยไว้ในบ่อ โดยเตรียมไว้สำหรับให้ปลาสดผสมพันธุ์และก่อหวอด ซึ่งมีอัตราการปล่อยคือ ปลาสดเพศผู้ 2 ตัว ต่อ ปลาสดเพศเมีย 4 ตัว สำหรับการผสมพันธุ์จะทำการฉีดฮอร์โมน Lutinizing hormone releasinsng hormone analog (Suprefact) ร่วมกับ domperidone (Motilium M) ตรงบริเวณโคนครีปหลังของปลาสด (ปลาสดเพศเมีย: เข็มที่ 1; Suprefact 10 µg/kg และ Motilium M 10 µg/kg, พักปลาเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง, เข็มที่ 2; Suprefact 20 µg/kg และ Motilium M 10 µg/kg, ปลาสดเพศผู้ Suprefact 10 µg/kg และ Motilium M 5 µg/kg ฉีดพร้อมปลาสดเพศเมีย เข็มที่ 1) หลังจากการฉีดฮอร์โมนปล่อยปลาสดลงบ่อเพาะพันธุ์ ปลาจะเริ่มผสมพันธุ์กันประมาณ 14 ชั่วโมงหลังจากได้รับการฉีดฮอร์โมน ปลาจะเริ่มก่อหวอด ทำการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนของปลาที่ได้มีการวางไข่แล้วที่ 5, 7, 11, 15, 21, 24 และ 48 ชั่วโมง (hours post spawning : hps) และทำการเก็บตัวอย่างไข่จากแม่พันธุ์ปลาสดที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งก็คือไข่ปลาที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg) หลังจากนั้นทำการสกัด total RNA จากตัวอย่างตัวอ่อนของปลาสด และไข่ปลาที่ไม่ได้รับการผสม ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 3 ของการทดลองที่ 1 และสังเคราะห์ the first stand cDNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ImProm-II™ Reverse Transcription system kit (Promega) โดยใช้ oligo dT เป็นไพรเมอร์

### 2.2 Reverse transcription PCR (RT- PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้  $\beta$ -actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลาสด ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับ การทำ RT-PCR ในยีน MC4R (MC4R-RT-F และ MC4R-RT-R) และ ในยีน  $\beta$ -actin (Actin-RT-F และ Actin-RT-R) (ตารางที่ 2.1) ชุดสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR คือชุด

สารละลาย GoTaq® (Promega) และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR มีรายละเอียดดังนี้ 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 ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis

### 3. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่างๆ ของปลาสลิด ด้วยวิธี Real time reverse transcription PCR (Real time RT-PCR)

#### 3.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อต่างๆ

นำปลาสลิดโตเต็มวัยที่มีสุขภาพที่ดีจากบ่อเลี้ยงของฟาร์มมหาวิทยาลัย มทส. มีน้ำหนักประมาณ 60 กรัม เพศเมีย และเพศผู้เพศละ 4 ตัว มาทำการวางยาสลบด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บเนื้อเยื่อของอวัยวะ ได้แก่ สมอง 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 (Invitrogen) ดังรายละเอียดที่กล่าวในข้อ 3 ของการทดลองที่ 1 และสังเคราะห์ the first strand cDNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป First Strand cDNA Synthesis Kit (GE healthcare) โดยใช้ oligo dT เป็นไพรเมอร์

#### 3.2 การวัดระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี Realtime reverse transcription PCR (Real time RT-PCR)

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* เป็นการใช้เทคนิค realtime-RT-PCR โดยการวัดจำนวนชุดของยีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน กราฟมาตรฐานของยีน *TpMC4R* สร้างโดยใช้พลาสมิด p-3-*TpMC4R* ที่ทราบจำนวนชุดของพลาสมิดเป็น DNA template (รายละเอียดการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรฐาน แสดงดังภาพผนวก ก) และในการศึกษาครั้งนี้ใช้  $\beta$ -actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ  $\beta$ -actin โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน กราฟมาตรฐานของยีน  $\beta$ -actin สร้างโดยใช้พลาสมิด p-3- $\beta$ -actin ที่ทราบจำนวนชุดของพลาสมิดเป็น DNA template

การทำ real time RT-PCR สำหรับการแสดงออกของยีน *MC4R* (ไพรเมอร์: *MC4R-RT-F*; *MC4R-RT-R*) และสำหรับการวัดปริมาณการแสดงออกของยีน  $\beta$ -actin (ไพรเมอร์:

Actin-RT-F; Actin-RT-R) (ตารางที่ 2.1) โดยใช้การใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) และมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ (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 ติดต่อกัน จำนวน 50 รอบ และเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ melting curve คือ 95°C เป็นเวลา 5 วินาที, 60°C เป็นเวลา 10 วินาที และ 95°C เป็นเวลา 1 วินาที จำนวน 1 รอบ และขึ้นสุดท้ายคือลดอุณหภูมิมาที่ 40°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นทำการบันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในอวัยวะต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ Melting curve ของ PCR products หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบค่า Cycle threshold method (CT method) ซึ่งค่า CT คือ จำนวน cycle ที่สามารถตรวจพบแสงฟลูออเรสเซนซ์สองครั้งแรก (threshold value) สร้างกราฟมาตรฐานของ จำนวนชุดของพลาสมิด (p-3-MC4R หรือ p-3- $\beta$ -actin) และ ค่า CT และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน โดยเปรียบเทียบค่า CT ของตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของยีนนั้น จากนั้นแปลงค่าจำนวนชุดของยีนที่ทำการวิเคราะห์เป็นค่าลอการิทึม แล้วหาค่า Normalized mRNA ของยีนที่ศึกษาด้วยสูตรการคำนวณดังนี้

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

นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis

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

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน MC4R ในสมองส่วนต่าง ๆ ของปลาสลิด

ทำการสร้างโพรบ โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ p-3-MC4R เป็น DNA template สำหรับ sense และ antisense probe โดยทำการตัด p-3-MC4R ด้วยเอ็นไซม์ *Pst* I และ *Apa* I ตามลำดับ และสร้างโพรบด้วยปฏิกิริยา *In vitro* transcription โดยใช้ DIG-labeled uridine triphosphate (UTP) (Roche Diagnosis) และเอ็นไซม์ T7 RNA polymerase ในการสร้าง sense probe และ SP6 RNA polymerase ในการสร้าง antisense probe (Promega)

นำสมองแต่ละส่วน ได้แก่ telecephalon, mesencephalon, metencephalon, diencephalon ติดกับ pituitary gland มาดองด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ และฝังชิ้นเนื้อใน พาราฟิน แล้วจึงการตัดเนื้อเยื่อหนาประมาณ 5 ไมครอน เพื่อนำมาทำ *In situ* hybridization กับ antisense probe หรือ sense probe

## 5. การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมือ อาหารของการกินอาหารปกติ และผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการแสดงออก ของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

### 5.1 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมือ อาหาร (Daily feeding) ของการกินอาหารปกติ

#### 5.1.1 การเตรียมปลาสดสำหรับทดลอง

นำปลาสดที่มีสุขภาพดี น้ำหนักประมาณ 60-65 กรัม ทำการสุ่ม ปลาสดลงตู้ สำหรับเลี้ยงปลา 60 x 30 x 45 (กว้าง \* ยาว \* สูง) ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 21 ตู้ ในการเลี้ยงปลามีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28°C-29°C ควบคุมช่วง แสง 12 ชั่วโมง และช่วงมืด 12 ชั่วโมง (โดยช่วงแสงระหว่าง 8.00-20.00 น.) การให้อาหารปลาสดให้ วันละสองมือ โดยมีมือเช้าจะให้เวลา 10.00 น. และมือเย็นให้เวลา 16.00 น. ซึ่งในการให้อาหารและ การกินอาหารของปลาสดในแต่ละมือใช้เวลาประมาณ 30 นาที อาหารที่ให้ปลาสดเป็นอาหาร สำเร็จรูป (มีโปรตีนประมาณ 40%, ไขมัน 6%) ทำการเลี้ยงในตู้ปลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้ปลาสด ปรับสภาพให้เข้ากับช่วงแสงและการกินอาหารสำเร็จรูปอย่างเป็นเวลา

#### 5.1.2 การเก็บตัวอย่างสมองของปลาสด และการศึกษาระดับการแสดงออก ของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมืออาหาร จะทำ การวิเคราะห์ที่เวลา 09.00 (ก่อนอาหารเช้า 1 ชั่วโมง), 11.00, 13.00, และ 15.00 (ก่อนอาหารเย็น 1 ชั่วโมง) สุ่มปลาสดจำนวน 5 ตัวในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง มาวางยาสลบ 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บเนื้อเยื่อสมอง 4 ส่วน ได้แก่ สมองส่วน telencephalon, mesencephalon, metencephalon และ diencephalon เพื่อนำไป สกัด total RNA (Invitrogen) ดัง รายละเอียดที่กล่าวในข้อ 3 ของการทดลองที่ 1 และ สังเคราะห์ the first stand cDNA โดยใช้ ImProm-

II<sup>TM</sup> Reverse Transcription system kit (promega) วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของ ยีน *TpMC4R* ด้วยเทคนิค real time RT-PCR ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2

## 5.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหาร (Fasting period)

หลังจากที่ปลาสดได้รับอาหารอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสภาวะการอดอาหารของปลาสด โดยเก็บตัวอย่างหลังจากมีการอดอาหาร 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการสุ่มปลาสดจากตู้ปลา จำนวน 5 ตัว ต่อระยะเวลาการอดอาหาร ทำการวางยาสดปลาด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และจึงทำการเก็บเนื้อเยื่อสมอง 4 ส่วน ประกอบด้วยสมองส่วน telencephalon, mesencephalon, metencephalon และ diencephalon และทำสกัด total RNA (invitrogen) ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 3 ของการทดลองที่ 1 เพื่อนำไปสังเคราะห์ the first stand cDNA โดยใช้ ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription system kit (promega) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* โดยวิธี Realtime-RT-PCR ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2

## 6. การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสด และผลของ MC4R antagonist ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

### 6.1 การศึกษาผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสด

#### 6.1.1 การเตรียมปลาสดสำหรับทดลอง

เลี้ยงปลาสด (น้ำหนักตัวประมาณ 80-90 กรัม) ในตู้เลี้ยงปลาที่มีขนาด (60 (กว้าง) x 30 (ยาว) x 45 (สูง) ลูกบาศก์เซนติเมตร ตู้ละ 7 ตัว โดยในการเลี้ยงปลามีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28°C-29°C และมีการควบคุมช่วงแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และช่วงมืด 12 ชั่วโมง (โดยช่วงแสงระหว่าง 8.00-20.00 น.) การให้อาหารปลาสดให้วันละสองมื้อ โดยมีมือเช้าจะให้เวลา 10.00 น. และมีมือเย็นให้เวลา 16.00 น. ซึ่งในการให้อาหารและการกินอาหารของปลาสดในแต่ละมื้อใช้เวลาประมาณ 30 นาที อาหารที่ให้ปลาสดเป็นอาหารสำเร็จรูป (มีโปรตีนประมาณ 40%, ไขมัน 6%) ทำการเลี้ยงในตู้ปลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้ปลาสดปรับสภาพให้เข้ากับช่วงแสงและการกินอาหารสำเร็จรูป

#### 6.1.2 การศึกษาผลของการของ HS024 ต่อการกินได้ในปลาสด



กลุ่มทดลองในการศึกษานี้ มี 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดสาร (กลุ่มที่ 1) กลุ่มที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือ 0.9 % (กลุ่มที่ 2) กลุ่มที่ได้รับการฉีด HS024 ที่ระดับ 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (กลุ่มที่ 3) กลุ่มที่ได้รับการฉีด HS024 ที่ระดับ 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (กลุ่มที่ 4) แต่ละกลุ่มทดลองจะมีจำนวนซ้ำ 9 ซ้ำ และทำการเก็บข้อมูลการกินได้ของปลาสดเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1-12 ชั่วโมงหลังจากปลาได้รับการฉีดสารตามที่กำหนดในแต่ละกลุ่มทดลอง

## 6.2 การศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

ปลาทดลอง การเลี้ยงปลาทดลอง แผนการทดลอง กลุ่มทดลอง (แต่ละกลุ่มทดลองมีจำนวนซ้ำ 6 ซ้ำ) เป็นดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อที่ 6.1.1

### 6.2.1 ผลของการฉีด HS024 ต่อการแสดงออกของยีน MC4R ในสมอง

การฉีด HS024 บริเวณโคนครีบท้องของปลาสด ในระดับต่าง ๆ ตามกลุ่มการทดลองที่จัดไว้ ดังที่กล่าวไว้ในข้อที่ 6.1.1 ทำการเก็บตัวอย่างสมองที่เวลา 4, 8, 12 ชั่วโมงหลังการฉีด HS024 จำนวนตัวอย่างปลาที่เก็บแต่ละเวลา เท่ากับ 6 ตัว ทำการวางยาสดด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และก่อนทำการเก็บตัวอย่างสมองมาสกัด total RNA (invitrogen) ดังรายละเอียดที่กล่าวในข้อ 3 ของการทดลองที่ เพื่อนำไปสังเคราะห์ the first stand cDNA โดยใช้ ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription system kit (promega) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* โดยวิธี Realtime-RT-PCR ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2

### 6.2.2 ผลของการแช่สมองปลาสดใน HS024 ต่อการแสดงออกของยีน MC4R

ระดับความเข้มข้นของ MC4R antagonist (HS024) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

กลุ่มที่ 1 สมองปลาสดที่แช่ใน buffer (Holtfreter's solution)

กลุ่มที่ 2 สมองปลาสดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 0.1 nmol

กลุ่มที่ 3 สมองปลาสดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 1 nmol

กลุ่มที่ 4 สมองปลาสดที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 10 nmol

(หมายเหตุ : ระดับความเข้มข้นของ HS024 ถูกเจือจางด้วย Holtfreter's solution

buffer [1L; 3.46 g NaCl, 0.05 g KCl, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g NaHCO<sub>3</sub>])

ทำการสุ่มปลาลงในตู้ปลาขนาด 30 (กว้าง) x 60 (ยาว) x 45 (สูง) ลูกบาศก์ เซนติเมตร ตู้ละ 10 ตัว การให้อาหารพลาสติกให้วันละสองมื้อ โดยมื้อเช้าจะให้เวลา 10.00 น. และมื้อเย็นให้เวลา 16.00 น. ซึ่งในการให้อาหารและการกินอาหารของพลาสติกในแต่ละมื้อใช้เวลาประมาณ 30 นาทีอาหารที่ให้พลาสติกเป็นอาหารสำเร็จรูป (มีโปรตีนประมาณ 40%, ไขมัน 6%) ทำการเลี้ยงในตู้ปลาประมาณ 1 เดือน เพื่อให้พลาสติกปรับสภาพให้เข้ากับช่วงแสงและการกินอาหารสำเร็จรูป

ทำการสุ่มพลาสติกจากตู้ปลา จำนวน 6 ตัว ต่อการเก็บหนึ่งช่วงเวลา มาทำการวางยาสลบด้วย 300 ppm 2-Phenoxy ethanol และทำการเก็บสมองและนำไปแช่ในสารละลาย Holtfreter's solution หรือ HS024 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามที่กำหนด โดยระยะเวลาในการแช่คือ 2 และ 4 ชั่วโมง เมื่อครบตามช่วงเวลาจึงทำการเก็บสมองของพลาสติกในแต่ละช่วงเวลา เพื่อทำการสกัด total RNA (invitrogen) ดังรายละเอียดที่กล่าวในข้อ 3 ของการทดลองที่ 1 เพื่อนำไปสังเคราะห์ the first stand cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription system kit (promega) และวิเคราะห์หกระดับการแสดงออกของยีน *TpMC4R* โดยวิธี Realtime-RT-PCR ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2

## 7. การวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติในการศึกษานี้ใช้โปรแกรม SPSS version 10 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test และยอมรับความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$  ( $P < 0.05$ ) ตลอดการวิจัย

## การทดลองที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของยีนนิวโรเปปไทด์วาย (Neuropeptide Y) และผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีน Neuropeptide Y

การศึกษานี้เป็นการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน Neuropeptide Y (NPY) และทำการศึกษาผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีน NPY

### 1. การโคลน cDNA ของยีน NPY ด้านปลาย 5' ด้วยเทคนิค 5'RACE

การออกแบบไพรเมอร์ทำโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของ 3' RACE ของ NPY (p-3- NPY) แล้วทำการโคลน 5' cDNA ของ NPY โดยวิธี nested PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน 5' cDNA ของ NPY แสดงดังตารางที่ 2.1

การทำ primary PCR โดยใช้ชุดเอ็นไซม์ Ex *Taq* polymerase (Takara) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ primer NPY -R1 และ UPM-L จากชุดน้ำยา SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit ได้ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR ดังรายละเอียดข้อที่ 1 ในการทดลองที่ 2 โดยใช้ 5' RACE cDNA ที่ได้จากข้อที่ 1 ของการทดลองที่ 2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) นำผลผลิต PCR จาก primary PCR มาทำการเจือจาง 50 เท่า เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ NPY-R2 (reverse primer) และ ไพรเมอร์ NUP (forward primer) จากชุดน้ำยา SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA amplification kit ดังรายละเอียดวิธีการในข้อที่ 1 ของการทดลองที่ 2 และทำการแยกชิ้น PCR product ที่คาดว่าจะเป็น 5' cDNA ของ NPY ออกมาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อเชื่อมต่อกับ pGEM T easy ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อที่ 6-7 ของการทดลองที่ 1

## 2. การศึกษาผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน NPY

### 2.1 การเตรียมปลาสดสำหรับทดลอง

เตรียมปลาทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ข้อ 5.1.1

### 2.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน NPY ในสภาวะการอดอาหาร (Fasting period)

หลังจากที่ปลาสดได้รับอาหารอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำการศึกษา ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน NPY ในสภาวะการอดอาหารของปลาสด โดยเก็บตัวอย่าง หลังจากมีการอดอาหาร 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการสุ่มตัวอย่างปลา มาเก็บตัวอย่างสมอง ส่วนต่าง การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน NPY ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อที่ 5.2 ของการทดลองที่ 2

### บทที่ 3

#### ผลการศึกษา

##### ผลการทดลอง

##### การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกินอาหาร ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบควบคุมการเจริญเติบโต และยีนในกลุ่ม house keeping gene

การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกินอาหาร ได้แก่ การโคลน 3' cDNA ของ ยีนเมลาโนคอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ ในปลาสด (TpMC3R) และ การโคลน 3' cDNA ของยีนนิวโรเปปไทด์วาย (TpNPY) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะได้ทำการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ และศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการกินอาหารและการอดอาหารในผลการทดลองที่ 2-3

การวิจัยนี้ทำการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ การโคลน 3' cDNA ของ growth hormone gene (TpGH) ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดัง ภาพที่ 3.1 และ ส่วนของ coding sequence (CDS) ของ Insulinlike growth factor-1 (TpIGF-1) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังภาพที่ 3.2 และ ภาพที่ 3.3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CDS ของ IGF-2 ของปลาสด (TpIGF-2)

House keeping gene ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ การโคลน 3' cDNA ของ Elongation factor 1- $\alpha$  (TpEF-1 $\alpha$ ) (ภาพที่ 3.4), การโคลน 3' cDNA ของ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TpGAPDH) (ภาพที่ 3.5) และ การโคลน 3' cDNA ของ  $\beta$ -actin (Tp $\beta$ -actin)

1	TCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGAGAGTTCTTTGCAGATTGAAGAGCAGCGTCAGCTCAA	60
61	CAAAATCTTCTCCAGGATTTTGTAACTCTGATTACATCATCAGTCCCATAGACAAGCA	120
121	CGAGACACAGCGCAGCTCTGTGCTGAAGCTCTTATCAATCTCTTATCGGCTGATTGAATC	180
181	CTGGGAGCTCCCCAGCCGCTCTCTATATGGAGGCTCTGCTCAGAGATAACCAGATTTCTCC	240
241	CAAACTGTCTAGAGCTGATGAGAGGCATTCAGCTGCTGATCAAGCCAATCAGGACGGAGC	300
301	AGAGATGTCTCTGATAGCGCGGTCCCGCAGCTTGC GCCATATGGAACTACTACCAGAG	360
361	TCTGGGAGATGACGAGTCTCTCAGGCGCAGCTACGAACCTTCTGGCCTGCTTCAAGAAGGA	420
421	CATGCACAAGGTGGAGACATACCTGACTGTGGCTAAATGCCGACTTTCTCCAGAAGCTAA	480
481	CTGCACTCTGTAGCCCCTCGACCTAAACAATACCATAATCATCTGTGTTCTGTAGTCCCTG	540
541	TTCTTCTGTGCTAGCATTAGCATTAGTTTCTTTCTTTCTTGTGTGTCTTTTTTCCAG	600
601	TTCCAGCACAAATGTGATTTTAGACTGCCAGCATATTAATAAAGTTTGTTTGATTCAAAA	660
661	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	683

ภาพที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ growth hormone cDNA ของปลาสด (TpGH)

1	GTTGGCATTTATGTTGATGTCCTTCAAGAGTGTGATTTGCTTGGATCTCTCTGTTGGCCACACCCCT	60
61	CTCGCTACTGCTGTGCGTCCCTCACCCCTGACTCCGACGGGAACAGGGGGCCCAAAACC	120
121	AGAGACCCTCTCCGGCCCGCCACCTCTCTGGACACCCCTCCACTTTCTCTGTGAGATAGACG	180
181	CTTTTATTTCAATAAACCAACCGGGCTAAGGCTCCGAGTCAAGGCGGTCCAGCGGGCAATTCT	240
241	TGACGAGTGTGCTTCCCAAAGCTGTGAGCTACAACGCTGGAGATGTACTGTGCACCTCC	300
301	CAAGCCTAGCAAGCCAGCTGTGCGTGCACACGCGCACACAGAAATGCCGAGAACACCGAA	360
361	GGTTAGTACACAGGACACAAAGTTGAAAGGTTACAGAGGTAGGACAGCACAGTCCCTC	420
401	AGACAAGCCRAAPACAAACAGATCTTTGGCTGGAAATAGTCACTCATCGTTCCAGGA	460
461	GCTGCATCAGAAAACCTCAACTCGAGCCAAACACAGCGGGCCAGAACTACACAAATGTAC	538

ภาพที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Insulin like growth factor-1 cDNA ของปลาสด (TpIGF-1)

1	ATGGAAACCCAGCAAAAGATACGGACACCCTCCTTTGCCACACCTGCCGGAGAACGGAG	60
61	AGCAGCAAAATGAAGGTCAAAAAGATGTCTTCGTCCAGTCCGCTCGCTGCTGTTCGGCTG	120
121	GCCCTCACGCTCTACGTTGTGCGAAATGGCCTCGGCGGAGACGCTGTGTGGGGGAGAGCTG	180
181	GTGGATGCGCTGCAGTTTCGTCTGTGAAGACAGAGGATTTATTTTCAGTAGGCCAACCCAGC	240
241	AGGGGTAAACAACCGACGCTCCAGAGCCGCGGGATCGTAGAGGAGTGTGTTTCCGTAGC	300
301	TGTGACCTCAACCTGCTGGAACAGTACTGTGCCAAACCTGCCAAGTCTGAAAGGGACGTG	360
361	TCGGCCACTTCTCTTCAAATCATCCCCGTGATGCCCGCACATAAACAGAAATGACCCGAAG	420
421	AAGCAACATGTGACCGTGA	439

ภาพที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Insulin like growth factor-2 cDNA ของปลาสด (TpIGF-2)

1	CRTTGGCCATGTCCACTCCCGLAAGTCCACCTCCACC GGACACTTGATCTACAAGTGCGG	60
61	AGGAATCCSAAAGGAGAACCACTCGAGAACTTCGAGAAGGAGGCCGCGAGATGGGCAAGGG	120
121	CTCCCTCCRAATACCCCTGGGCTCCCGSACAAGCTGAAGGCCGAGCGTGAGCCGCGGTATCAC	180
181	CATCGACATCGGCTCTCTGGAACTTCGAGAACAGCAAGTACTACCTCACCATCATTCGATGC	240
241	CCCTGGACACAGGCACTTCATCAAGAACATGATCACCTGGTACCTCTCAGGCTGACTGTGC	300
301	TGTGCTGATCGTTCTCTGCTCTGTCTGGTGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAGAACGGTCA	360
361	GTCCCGTGAAGTCCCGCTGCTCTGCTCTTCACTCTCTGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGGAGT	420
421	CTACAGATGGACTCCACTCAAGCCCTTACAGCCAGGCCCGCTTTGAGGAAATCACCCAG	480
481	GGAGTGTAGCGCTACATCAAGAGATCGGCTACAACCCCGCTACCGTTGCCCTTTCTCCC	540
541	AATCTCTCGTTGCCACCGCCACAACTCCCTGCCAGCCACCGACAAGATCGGCTGCTACAA	600
601	GGCATCGAAGATCCACCCTAACGAACGAAATCCCAACGGTGTACACTTCTCGAGCCTCT	660
661	GGATGCCATCATGCCACCCCGCCCGCCACCCACAAGCCCTTCTCTGCCCTTCCAGCA	720
721	TGTCTTCATAATTGGCGCTATTGTAAGTGTCCCGCTCGGTGCTGTTGAGACTGGTGTCT	780
781	CAAGCCCGTATGCTCTGTCACCTTCTCTCCCGCCAACTTCACCACTGAGCTCAACTCTCT	840
841	GGAGATGCAACACCACTCTCACTCACGCTCTCCCGGTGACAATGTTGGCTTCAACAT	900
901	CAAGAACCTCTCCCTCAAGCAATCCGCTCTCGATACCTTCTCTGACAGCAAGAACCA	960
961	CCCACCTAAGCTCTCTGACAGCTTCAACGCCACCGCTCATCTCTCAACCACCTTCCCA	1020
1021	GATCAACGAGGCTACGCCCCGCTGCTGGCTGACACACCGCCACATCGCTGCAAGTT	1080
1081	CAAGGAGCTCATTTGAGAGATCGACCGTCTCTTGGCAAGAAGCTTGAGGACAACCCCAA	1140
1141	GAACATTAAGTCTCGAGATCTGCACTTGTCAAACCTGATCCCAAAAAGCCCATGTTGT	1200
1201	GGAACTTTCTCCAGCTACCTCCCGCTTGTCTGTTTGGCCGTGCGTGACATGAGGCAGAC	1260
1261	GGTCTGCTGTGGTCTCATCAAGCCCTTGCACCAAGGAGATCTCTGGAAAGACAACAAA	1320
1321	GGCTGCAGAGAGCCCGAGAGAGAAATCAATGGTCACTGAAGGACATCCAACAAGAAGT	1380
1381	GTGCCGACAGCAGCGGGCCACTTCTCTCCATCTCTCCCGCCCTGGATCACTTCCACT	1440
1441	GAAGCATAGCTCTCTACTCAAAGACTGCTCTCTGCTGATTAAGCTCATCGAAAAGTTT	1500
1501	TCCGAGGAAAAAGAACTTTCTGCACTTCTCACCTTGAATCATGACGGTGCATCTTCTGAGT	1560
1561	TAAGTTTAAGTTTCAATGCTTTAGAACCTCTCTCTGATGCTAATGCCACAAATCAAAAT	1620
1621	GGAAAGAAAGCTGCTCTGTAACAATAAAATTAAGCTCTTTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAA	1680
1681	AAAAAAAAA	1690

ภาพที่ 3.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Elongation factor 1- $\alpha$  cDNA ของปลาช่อน (TpEF-1 $\alpha$ )

1	TACATGTTCAAGTACGACTCCACCCACGGCCGATACAAGGGTGATGTGTCTCATGACGAT	60
61	GGCAAGCTCATAGTCGATGGCAGTGC AATCTCTGTCTTTCAAAGCATGAASCCASCAGAG	120
121	ATCCCTTGGGGCAGTGTGGAGCCAAATACGTTGTGGGTCCACTGGAGTTTTCCTCAAC	180
181	GTTGAGAAGGSCCTCTTCCCACATCCAAGGTGGAGCTCAGCGTGTGGTTGTSTCTGCCCC	240
241	TCACCTGATGCTCCAATGTTTGTATGGGAGTAAATGAGGACAAATATGACCCATCCTCC	300
301	ATGACAACTCTCAGCAATGCCCTCTGCACCACCAACTGCCTGGCCCCCTCTGCTAAAGTC	360
361	ATCCATGATAACTTTGGCAITTEAGGAAGCTCTTATGACTACAGTCCATGCATACACTGCA	420
421	ACCCAGAAGACAGTGGATGGACCCAGTGTAAAGCCCTGGCGTGACGGTCGTGSCCCAC	480
481	GCGAATAICATTCAGCTTCTACTGGTGCTGCCAAGGCAGTGGGCAAGTCAATCCCGAG	540
541	CTTAACGGCAAGCTTACAGGCATGGCGTTACAGGTTGCCAGTGGCTGATGTGTCTGTGTT	600
601	GACCTGACTTGCCTGTGACCAAGCCCTGCATCTATGCTGCCATTAAAGAGCTGTTAAA	660
661	AAGGCTGCACATGGACCCCTGAAGGGAGTGTCTGGTTACACCGAGGACCAGTGTCTCC	720
721	TCTGACTTTCATTTGGETACACCCATTCCTCCATCTTTGATGCTGGTGGCTATCTCCCTC	780
781	AATGACAACTTTGTCAAGCTCATTTCTTGGTATGACAAATGAGTTTGGCTACAGTCAACCT	840
841	GTCGCTGACCTGCTGCTGTACATGCCTCCAGGAGTAAATACTTCCCTTGCCTAAAPACA	900
901	AGTCAGGACTGGGACCACCCCAAGCATTTCTCCCATCTCCCTTTCTCTTTTATACCAAC	960
961	CTAACCATAGCCATGTCTATAGCATCAGGACCCCCAGAGCTACTACATATATGTACAGTAG	1020
1021	CAGCAAAAAAGTGTCTTAGTGTATTTTAGTATTAATCTGTATTCCTTTAACAATGAGAAACT	1080
1081	GGCCGGTGAAGATATTTGTGTCCGTGTGGCCCCATCCATCTCTCACCGCCCTTTTAGATG	1140
1141	TGTTACTATGGCTCAGTACTGTGGTAAGTACTGTAATCCATCTCCCTGTGGTGTGTTTAA	1200
1201	AAGGTTTATCACCAGTAGAATGAGAAGGCTGAGAGGCAGAGCTACTGTAACTTAACT	1260
1261	TGTGACAAAGAAATTAAGTTGAAATTCCTCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT	1319

ภาพที่ 3.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA ของปลาสิลิด (TpGAPDH)



## การทดลองที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเมลานอคอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ (Melanocortin 4 receptor) ต่อการควบคุมการกินอาหารในรอบวันและการอดอาหาร

### 1. การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน MC4R ในปลาสด (TpMC4R)

การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน MC4R ในปลาสด ทำโดยวิธี RACE (Random amplification of cDNA ends) โดยขั้นต้นได้ทำการโคลน cDNA ด้านปลาย 3' ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1100 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ พบว่ามีส่วนของยีนที่มีความคล้ายคลึงกับ cDNA ของ MC4R ในปลาอื่น ๆ จึงได้ใช้ข้อมูลลำดับเบสนี้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อทำการโคลนยีน MC4R ด้านปลาย 5' ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 400 คู่เบส และมีลำดับดีเอ็นเอส่วนหนึ่งตรงกับ MC4R ด้านปลาย 3' และ MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ จึงได้นำข้อมูลของลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งปลาย 3' และ ปลาย 5' มาเชื่อมต่อกัน ได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอ แสดงดังภาพที่ 3.6 โดย cDNA เส้นสมบูรณ์ของ MC4R ที่โคลนได้จากปลาสดในการวิจัยนี้จะเรียกว่า *TpMC4R* มีขนาด 1311 คู่เบส เป็นส่วนของ open reading frame (ORF) ยาว 984 คู่เบส แปรรหัสไปเป็นกรดอะมิโนได้ 327 กรดอะมิโน มีส่วนของ 5'-untranslated region (5'-UTR) ยาว 17 คู่เบส และมีส่วนของ 3'-untranslated region (3'-UTR) 310 คู่เบส ตรงปลายของ 3'-UTR เป็นปลาย poly A tail

จากการแปลรหัสพันธุกรรมของ cDNA เส้นสมบูรณ์ของ *TpMC4R* ได้ลำดับของกรดอะมิโน 327 กรดอะมิโน ผลการศึกษาโครงสร้างของ *TpMC4R* โดยใช้โปรแกรม Split 4.0 server (<http://split.pmsft.hr/split/4/>) ทำนายตำแหน่ง transmembrane (TM) domain 7 domain (ภาพที่ 3.7) หลังจากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของ transmembrane (TM) domain ของ *TpMC4R* ทั้ง 7 domain กับลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในแต่ละ TM ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน ดังแสดงผลในตารางที่ 3.1 โครงสร้างโปรตีนของ *TpMC4R* มีส่วนของ extracellular loop (ECL) จำนวน 3 loop และ intracellular loop (ICL) จำนวน 3 loop โดย ECL ที่ 1 ซึ่งเป็น ECL ที่ใหญ่ที่สุด มีกรดอะมิโน 30 residues (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 97-126) ECL ที่ 2 มีกรดอะมิโน 5 residues (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 188-192) และ ECL ที่ 3 มีกรดอะมิโน 4 residues (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 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



1	GCAACCAAGGAGGATAATCAACACCACAGATCCAGTGGATTAAGCCGGCTACCACAACCAAGCCAAACACAGCCACG	83
1	M <b>N T T</b> D P S G L S P G Y H <b>N R S</b> Q T T A T	22
84	CTGCCACTAACAGACTCCCTCTGAGGAGAGGACTCGTCTGAGGGTGTACGGCCAGCTGCTGATCTCCACTGAGTT	167
23	L P T N K D L P S E E K D S S A G C Y G <b>Q L L I S T E V</b>	50
	<b>TM1</b>	
168	TTCCCTCACTCTGGGATGTGAGCTGTGAGAACATCCGCTGTGGCTGCCATAGTGAAAAACAAGACTCCACTCTCC	251
51	<b>F L T L G I V S L L E N I L V V A A I V K</b> N K N L <b>H S P</b>	78
	<b>TM2</b>	
252	ATGTACTTTTTCATCTGTAGCTGCGGTGCCGACATGCTGGTGGAGCGTCAAAATGCCCTCTGAGACATTGTCTGAGCTC	335
79	<b>M Y F F I C S L A V A D M L V S V S</b> ; <b>N A S</b> E T I V I E L	106
336	ATCAATGAGGCACCTGAGCATCCCATCACACTCATCAAGAGCATGACAAACGTTTCGACTCCATGACTGCGCTCTCTG	419
107	I N G G T L S I P I T L I K S M D N V F <b>D S M I C S S L</b>	134
	<b>TM3</b>	
420	CTGCCCTCCATCTGAGCTTGTGCTATGCTGTGACCGCTACATCCACATCTTCTACGGCTGCGTTACCAACAACATGTT	503
135	<b>L A S I C S L L A I A V D R Y I T I F</b> Y A L R Y H N I V	162
	<b>TM4</b>	
504	ACGTTGGCAGGGCCACGCTGTCTATCAGCACCATCTGGACGTGCTGCACGGTGTCCGCATCCCTTCAICATCTACTCGGAG	587
163	<b>T L R</b> 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
	<b>TM5</b>	
588	AGCACCACGGTCTCATCTGCTCATIACATGTTCTTACCATGCTGGTGCATGGCGTGCCTTAGTGCAATGTTCTCTG	671
191	S T <b>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</b>	218
	<b>TM6</b>	
672	CTGGCGGCTCCACATGAAGGGATGCGAGCGTCCCGGCAACCGGCCATCCAGCAGCCGCCAACATGAAGGGCCATC	755
219	<b>L A R</b> 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
	<b>TM7</b>	
756	ACCCCTACCACTCTGCTGGGGTGTGCTGGTGTGCTGGCGCGTTCCTCCACCTCACTGATGATCACCTGCCCCCGG	839
246	<b>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</b>	274
840	AACCCCTACTGACCTGCTTATGTCCTCACTTCAATGTACCTGATCCCTCATCATGTGCAACTCATCATCGATCCCATCATC	923
275	<b>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</b>	302
	<b>TM8</b>	
924	TACGCCITTTGCGCCAGAGATCGGAAAACCTCAAGGAGTTTTCGCTGCTGCAGCCCTCCTGTGCGTCTGAGTTTGT	1007
303	<b>Y A F R S Q E M R K</b> <b>T F K</b> E F F C C S Q P L L C V *	327
1008	GTTTGTAGTAAATTAACCCGGGTCACACTGTACTATTTAAGTAAACCTGGTCAACAGGGAGTTTCAAACTCTCATCACT	1091
1092	GTGGACAGATGTGGTCTGTGTGCTCCCTGCTGGCTGTAAACTCTTAATGATGTAGGGCTGCTGGGTTTGTAAAG	1175
1176	ACGTAGCTTTGTATCACCCTGTATCACAGCATCACCGTGGAGACGACGACGACGCTTTGTTGTTCAGTGAAGCTTGTGAA	1259
1260	ATGCAACTTAAATGAAATGTCGCGAGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1311

### ภาพที่ 3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R

หมายเหตุ : แถบสีเทาแสดง Transmembrane (TM) domain ทำนายโดยโปรแกรม Split 4.0 sever

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

แถบสีด้า = N-linked glycosylation site

กรอบสีขาว = Protein kinase C of phosphorylation site

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

ตารางที่ 3.1 เปรอ์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่สมบูรณ์ และ Transmembrane (TM) domain ระหว่าง TpMC4R และ MC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ใ้ก่และคน

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)

		▽	TM1	
TpMC4R	-MNTTDP--SGLS-PGYH-NRSQTATLPTNKDLPSE-EKDSSAG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			77
Flounder	-MNTTEH--PGLS-QGFH-NWSQTA--SPLNEDFSAQ-DKDSAG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			75
Seabass	-MNTTEA--HGLI-HGYH-NRSQTSGLLPLNKDLASAE-EKDSSTG-CYEQLLISPEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			77
Fugu	-MNATDP--PGRV-QDFS-NGSQTTP----ETDFPNE-EKESSTG-CYEQMLISTEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			72
Trout	MMNSTDH--QGLISVGYTRNLSTAGTLGLTNKDSBGVGIKDSSTG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			81
Goldfish	-MNTSHH--HGLH-HSYR-NHSQGA----LPVGKPDQGERGSTG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			74
Zebrafish	-MNTSHH--HGLH-HSFR-NHSQGA----LPVGKPSHGDRGSAG-CYEQLLISTEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			74
Dogfish	-MNSSFH--HRLPETPQLRNHSVAR----FASANGSRSDGFSSG-CYEQLWISTEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			75
Lamprey	-MTFSAGGVGVNHHHGANGHQQG----GNHSGHGATGGGHRPCQVLIPIEVFLILGVISLLLENILVITAILKKNLHS			78
Chicken	-MNFTHQ--RGTLPPLHFWNQS-NR----LHRGASEPSAKGHSSGGCYEQLFVSPEVFLTLGIVSLLLENILVVAIVKKNLHS			76
Human	-MVNSTH--RGMHTSLHLWNRSSYR----RHSNASESLGKGYSDGGCYF			77
	*			
		▽	TM2	▽
		▽	TM3	▽
TpMC4R	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIELINGGTLSPITLTKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			161
Flounder	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINGGNTIPVTLTKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			159
Seabass	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINGGKLTIPVQLTKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			161
Fugu	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINGGTLTIPATLTKSMDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			156
Trout	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVIALINGGNTISGSLKSMNDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			165
Goldfish	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVMALITGGNLTYESI IKNMNDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			158
Zebrafish	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVMALITGGNLTNRESI IKNMNDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			158
Dogfish	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVFAMLKSRHLTAPENLTKMNDNVFDSMICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			159
Lamprey	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVMALLQNGSLAMQEDTLKQMDNIMDSMICTSVVAMCSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			162
Chicken	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVITLLNNTDQASFTINIDNVIDSVICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			159
Human	PMYFFICSLAVADMLVSVSNASETIVITLLNNTDQASFTINIDNVIDSVICSSLLASICSLLAIAVDRIYITIFYALRYHNI			160
	*** **			
		▽	TM4	▽
		▽	TM5	▽
TpMC4R	VTLRRATLVISTIWTCCTVSGILFIYSESTVLIICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIQQRANMKGA			245
Flounder	VTLRRAMLVITSIWTCCTVSGILFIYSESTVLIICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPILQRANMKGA			243
Seabass	GTLRRAMLVSSIWTCCTVSGILFIYSESTVLIICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIHQQRANMKGA			245
Fugu	VTLRRASLVSSIWTCCTVSGVLFIVYSESTVLIICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIHQQRANLKGGA			240
Trout	VTVKRAMAVIACIWSCCVASGVLFIVYSESTVLIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIRQRANMKGA			249
Goldfish	MTQRRAGTIITCIWTLCTVSGVLFIVYSESTVLIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIWQQRANMKGA			242
Zebrafish	MTQRRAGTIITCIWTFCTVSGVLFIVYSESTVLIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIWQQRANMKGA			242
Dogfish	VTVRRALMIIAAIWAACVSGILFIYSESTAVIICLITMFFAMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIVQQRANMKGA			243
Lamprey	MTVRRASLIIGAIWGTCTVSGVLFIVYSDSTAVIICLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIHQKTSMRGA			246
Chicken	MTVKRVGIITCIWAACTVSGILFIYSDSSVVIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIRQGANMKGA			243
Human	MTVKRVGIIISCIWAACTVSGILFIYSDSSAVIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRIALPQGNAPIRQGANMKGA			244
	* * * * *			
		▽	TM6	▽
		▽	TM7	▽
TpMC4R	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMITCPRNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCC--SQPLLCV			327
Flounder	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMITCPRNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCC--SHALLCV			325
Seabass	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMITCPRNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCC--SHALLCV			327
Fugu	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMITCPRNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCC--SQMLVCM			322
Trout	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMISCPNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCWY--SLPNLCV			332
Goldfish	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMISCPNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCCWYGLASLCV			326
Zebrafish	ITITILLGVFVVCWAPFFLHLILMISCPNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCCWYGLASLCV			326
Dogfish	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILMISCPNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCCWYGLASLCV			326
Lamprey	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILIVSCPRSPYCVCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCCWYGLASLCV			329
Chicken	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLIFIYISCPNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCCWYGLASLCV			326
Human	ITLTILLGVFVVCWAPFFLHLIFIYISCPNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNSVIDPIIYAFRSQEMRKTFFKIFCCWYGLASLCV			327
	** ** *			
TpMC4R	----- 327			
Flounder	----- 325			
Seabass	----- 327			
Fugu	----- 322			
Trout	CELPKY 339			
Goldfish	----- 326			
Zebrafish	----- 326			
Dogfish	LTSEY-- 331			
Lamprey	LPATWKY 336			
Chicken	LPKY-- 331			
Human	LSSRY-- 332			

ดูคำอธิบายหน้าต่อไป

ภาพที่ 3.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน และ transmembrane (TM) ระหว่าง TpMC4R และ MC4R ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ และคน

หมายเหตุ : การจัดเรียงเพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนใช้โปรแกรม Clustal W2 software

\* แสดงความตรงกันของกรดอะมิโนของยีน MC4R

▼ แสดงความตรงกันของกรดอะมิโน cysteine ของยีน MC4R ของสัตว์ทุกชนิดที่ได้ทำการเปรียบเทียบ

▽ แสดงตำแหน่ง cysteine residues ในปลาสลิค ซึ่งตรงกับสัตว์อื่น ๆ ที่ได้ทำการเปรียบเทียบบางชนิด

ตัวอักษรสีขาวพื้นดำ แสดง N-linked glycosylation

กรอบสีขาว แสดง phosphorylation site

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

ที่มา : Flounder (Kobayashi et al., 2008), Seabass (Sanchez et al., 2009), Fugu (Klovins et al., 2004), Trout (Haitina et al., 2004), Goldfish (Cerdeira-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)

ภาพที่ 3.7 แสดงความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของ *TpMC4R* กับ *MC4R* ของปลากระดูกแข็งอื่น ๆ ในไก่ และปลา เฮอร์เซนต์ความคล้ายคลึงกรดอะมิโนของ *TpMC4R* กับ *MC4R* ปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ มีค่าอยู่ในช่วง 77 - 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกรดอะมิโนของ *TpMC4R* กับ *MC4R* ในไก่ และ คน มีค่าเท่ากับ 66 และ 67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) *TpMC4R* มี N-linked glycosylation site 3 ตำแหน่ง ดังนี้ พบ N-linked glycosylation site 2 ตำแหน่งอยู่ที่ N-terminal extracellular domain และ N-linked glycosylation site อีก 1 ตำแหน่ง ที่ ECL 1 ถึงแม้ว่า N-terminal extracellular domain จะเป็นบริเวณที่องค์ประกอบของกรดอะมิโนใน *MC4R* ของปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันมากในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่ แต่จะเห็นว่า N-linked glycosylation site จะพบอยู่ในตำแหน่งที่ 2 และ 15 ของ *MC4R* ในสัตว์ส่วนใหญ่ โปรตีน *TpMC4R* มี cysteine 15 residues อยู่ในตำแหน่งที่ 40, 84, 131, 139, 177, 178, 197, 258, 272, 278, 280, 294, 319, 320 และ 326 นอกจากนี้พบ protein kinase C of phosphorylation site อยู่ใน ICL ที่ 2 ตรงตำแหน่งที่ 163 และพบอยู่ในส่วนของ C-terminal domain ตรงตำแหน่งที่ 313 ของ *TpMC4R* และพบกลุ่ม PMY motif, DRY motif และ DPIIY (NPXXY) motif ในตำแหน่งเดียวกันกับ motif ดังกล่าวของโปรตีน *MC4R* ในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ในไก่ และคน (ภาพที่ 3.7)

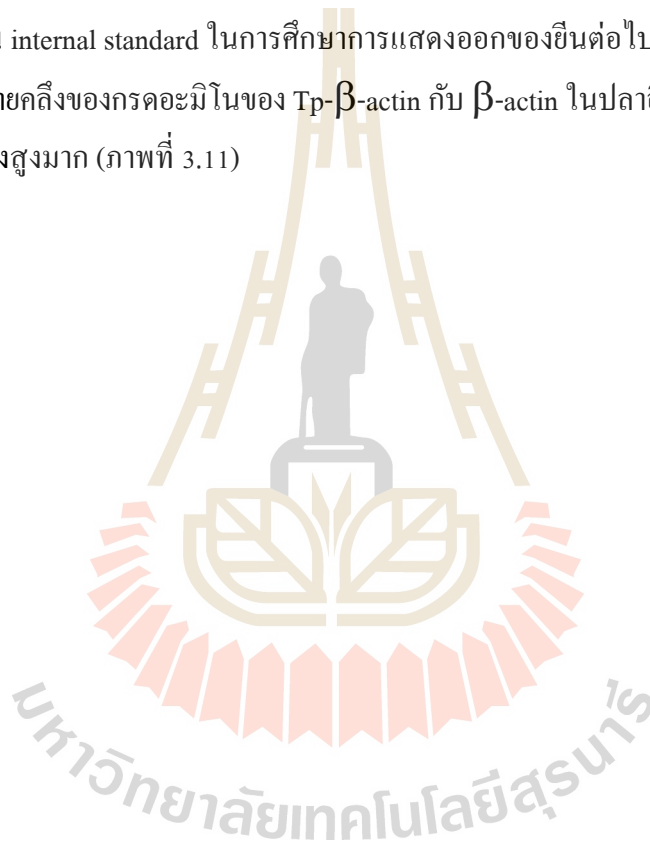
## 2. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *MC4R* ของปลาสดและสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

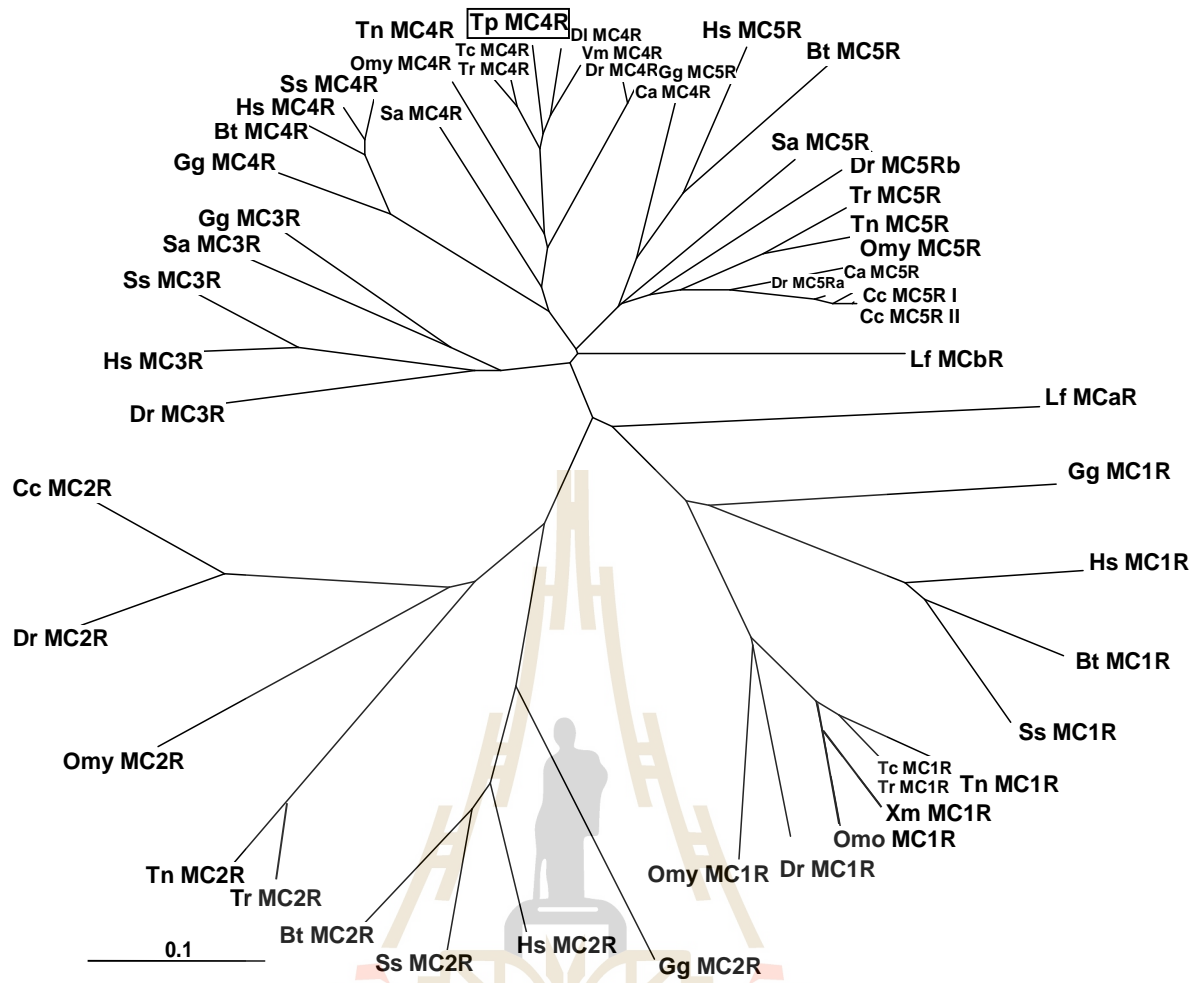
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *TpMC4R* โดยการสร้าง phylogenetic tree ซึ่งทำการเปรียบเทียบระหว่างกรดอะมิโนของ *TpMC4R* กับกรดอะมิโนของ melanocortin receptor (MCR) ทั้ง 5 subtype ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบว่า ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกรดอะมิโน MCR ถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Melanocortin 1 receptor (MC1R) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Melanocortin 2 receptor (MC2R) กลุ่มที่ 3 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Melanocortin 3 receptor (MC3R) กลุ่มที่ 4 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Melanocortin 4 receptor (MC4R) และกลุ่มที่ 5 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Melanocortin 5 receptor (MC5R) ซึ่งกรดอะมิโนของ *TpMC4R* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 4 จึงเป็นการยืนยันอีกทางหนึ่งว่า *TpMC4R* ที่ได้ในการศึกษานี้เป็น *MC4R* และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอยู่ในกลุ่มของยีน *MC4R* ร่วมกับ *MC4R* ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ (ดังภาพที่ 3.8)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *TpMC4R* ของปลาสดกับกรดอะมิโนของ *MC4R* ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ (ภาพที่ 3.9) พบว่า *TpMC4R* มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับกรดอะมิโนของปลามากกว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ และกลุ่ม *MC4R* ของปลา มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสัตว์ปีกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

### 3. การโคลน cDNA ด้านปลาย 3' ของยีน $\beta$ -actin ในปลาสลิด (Tp- $\beta$ -actin)

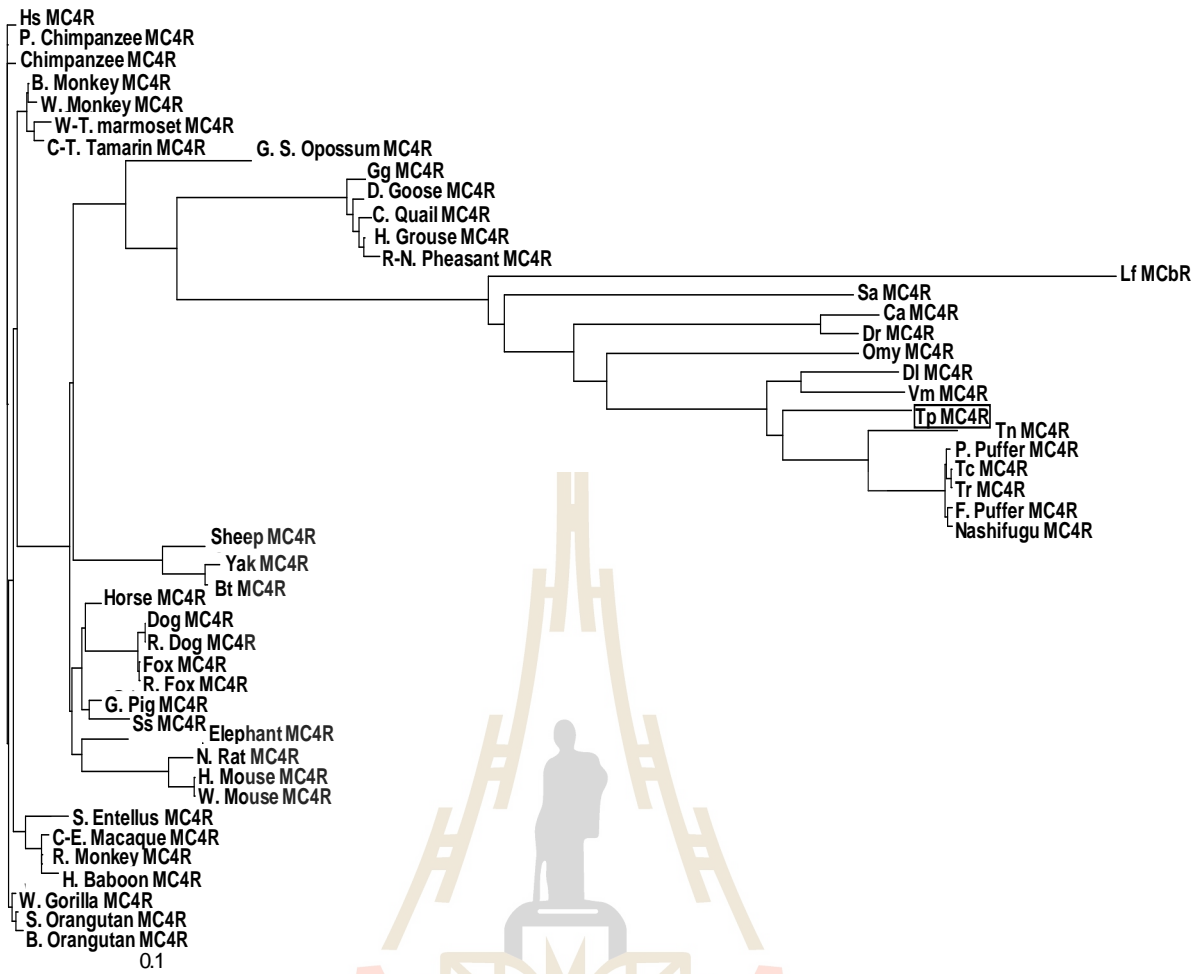
การโคลน cDNA ด้านปลาย 3' ของยีน  $\beta$ -actin ในปลาสลิด ทำโดยวิธี RACE (Random amplification of cDNA ends) (ภาพที่ 3.10) ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1200 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ พบว่ามีส่วนของยีนที่มีความคล้ายคลึงกับ cDNA ของ  $\beta$ -actin ในปลาอื่น ๆ ค่อนข้างสูง จึงกำหนดให้ยีนนี้ชื่อ Tp- $\beta$ -actin จากนั้นทำการแปลรหัสของกรดอะมิโนของ Tp- $\beta$ -actin ได้ จากส่วนของ coding sequence (CDS) 567 คู่เบส ซึ่งจะแปลเป็นจำนวนกรดอะมิโน 188 กรดอะมิโน ส่วนของปลาย 3' รวม poly A tail มีขนาด 677 คู่เบส การโคลนยีน Tp- $\beta$ -actin นี้เพื่อใช้เป็น internal standard ในการศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป และได้ทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของ Tp- $\beta$ -actin กับ  $\beta$ -actin ในปลาอื่น ๆ พบว่าจะมีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างสูงมาก (ภาพที่ 3.11)





ภาพที่ 3.8 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin receptor ทั้ง 5 subtypes ของปลาสด และ สัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ โดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธีการของ Neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987)

หมายเหตุ : Genbank database ของกรดอะมิโนของ MCR ทั้ง 5 subtype ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ แสดงดังภาคผนวก ข



ภาพที่ 3.9 Phylogenetic tree ของโปรตีน melanocortin 4 receptor ของปลาสดและสัตว์เลี้ยงลูก  
 สันหลังชนิดอื่น ๆ โดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธีการของ Neighbor-joining  
 method (Saito and Nei, 1987)

หมายเหตุ : Genbank database ของกรดอะมิโนของ MC4R ที่นำมาใช้ในการสร้าง  
 phylogenetic tree แสดงดังภาคผนวก ข



```

      10      20      30      40      50      60
ACTACCTCATCAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCTTTACCACCACAGCCGAGAGGG
  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
AAATCGTGCCTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGA
  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
TCATCACCATTGGTAATGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTCTCCAGCCTTCCTTCC
  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
TTGGTATGGAGTCCGCGGAATCCATGAGACCACCTACAATAGTATCATGAAGTGCAGC
  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
TTGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACACCGTGTCTGGTGGTACCACCATGTACC
  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
CCTCCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCC
  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
CCTCCATTGTCCACCGCAAATGCTTCTAAACGGACTGTTCCCTTCTCCCTTCTCCCAACC
  S I V H R K C F *
      610     620     630     640     650     660
AAACACCCAACAACCTTCCAGCTCTGTGCAACGACCACAACACATTTATCATAACACTCGG
  670     680     690     700     710     720
GCGCAGAGCCTAGATGACCAACTCATTGGCATGGCTTCAGTTATTTTTGGCGCTTGACTC
  730     740     750     760     770     780
AGGATTTTAAAAAAGTGAACGATGAAGGATACAGTAATGTTTTTGGCTAGGTATAAAAG
  790     800     810     820     830     840
CACCTAAGATTCTGCACCTGGGGTCTTAAAAAAAATGTACATTTTTTTTTTTTTTTTTT
  850     860     870     880     890     900
GAGTCATTCCAAATGTTTGTAACTGCATTGTTTCAGACACATGATTCCAAATGTTAACTG
  910     920     930     940     950     960
CATTGTTTCAGACACGTATTTGCCTCTGTGAAGGCTCCCCAGTGGTTGGCGCATACTTAAA
  970     980     990    1000    1010    1020
CATTGTTGTAGTATCGCTTGTATGTAATAATATGTGTGGGTTTTTTGTACTTTCAGCCTTA
  1030    1040    1050    1060    1070    1080
AAAATCTTGGTCCCTGTTTAAATTTTTTTTTTTGTTTTTGTATGCAAACCAATTGTGACCT
  1090    1100    1110    1120    1130    1140
CTCCTTCCCCTGTTCAACCTGGGGCAGTGGGGAAAAGGGTCTCAAAGTGAAGGGGTAA
  1150    1160    1170    1180    1190    1200
CAAGGGGTGCCAGACCGGTGGGGCAACCTGTACACTGAATGAAACAATCCCAATAAAGT
  1210    1220    1230    1240    1250
GCACATGTGTTCCGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

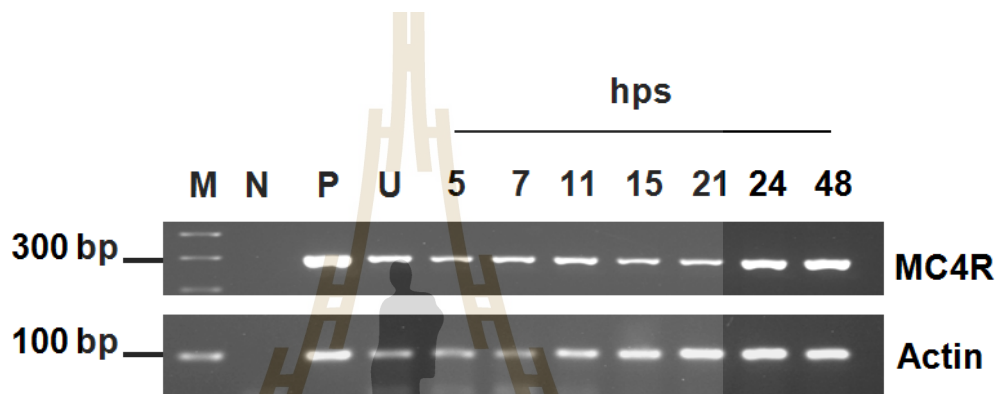
ภาพที่ 3.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ  $\beta$ -Actin cDNA ของปลาสด (Tp $\beta$ -Actin)

Saebass	MEDEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLNYP	IEHGI	75
Croaker	MEDEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLKYP	IEHGI	75
Grouper	MEDEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLKYP	IEHGI	75
Sculpin	MEDEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLKYP	IEHGI	75
Flounder	MEDEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLKYP	IEHGI	75
Tilapia	MEDEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLKYP	IEHGI	75
Sillago	MEDEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLKYP	IEHGI	75
Perch	MDEEIAALVVDNDSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SI	IVGRPRHQGVMVGMGQKDSYV	GDEA	QSKRGILTLKYP	IEHGI	75
Tpactin 3' RACE	-----						
Tpactin GSP	-----						
Saebass	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Croaker	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Grouper	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Sculpin	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Flounder	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Tilapia	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Sillago	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Perch	VTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP	EEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQ	IMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTG	150	
Tpactin 3' RACE	-----						
Tpactin GSP	-----						
Saebass	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Croaker	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Grouper	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Sculpin	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Flounder	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Tilapia	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Sillago	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Perch	IVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHA	ILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	225			
Tpactin 3' RACE	-----	YLIKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	38			
Tpactin GSP	-----	YLIKILTERGYS	FTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQ	38			
		**	*****				
Saebass	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Croaker	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Grouper	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Sculpin	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Flounder	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Tilapia	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Sillago	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Perch	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300	
Tpactin 3' RACE	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	113	
Tpactin GSP	EMGTAASSSSLEKSYELPDGQVIT	IGNERFRCP	EALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	113	
		*****	*****				
Saebass	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Croaker	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Grouper	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Sculpin	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Flounder	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Tilapia	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Sillago	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Perch	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	375	
Tpactin 3' RACE	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISKQEYDESGP	SIVHRKCF	188	
Tpactin GSP	GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	KIKI IAPPERKYSVWIGGS	ILASLSTFQQM	WISK	-----	172	
		*****	*****				

ภาพที่ 3.11 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของ Tp $\beta$ -actin กับ  $\beta$ -actin ของปลาต่าง ๆ

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน TpMC4R ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพาะผสมพันธุ์ปลาสดโดยการฉีดฮอร์โมนและให้ผสมแบบเลียนแบบธรรมชาติ และทำการเก็บตัวอย่างเอ็มบริโอที่ระยะเวลาการพัฒนาการที่ 5, 7, 11, 15, 21, 24, และ 48 ชั่วโมงหลังจากที่ปลาได้ผสมพันธุ์และวางไข่ (hours post spawning; hps) นอกจากนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างไข่ปลาที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์เพื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน TpMC4R โดยมี Tp- $\beta$ -actin เป็น internal standard ผลการศึกษาพบว่ายีน TpMC4R มีการแสดงออกในเอ็มบริโอทุกระยะ และในไข่ที่ยังไม่ได้ปฏิสนธิ (ภาพที่ 3.12)



ภาพที่ 3.12 การแสดงออกของ mRNA ของยีน TpMC4R และ Tp $\beta$ -actin ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนของปลาสดที่ระยะ 5, 7, 11, 15, 21, 24, และ 28 ชั่วโมงหลังจากปลาสดวางไข่ (hours post spawning; hps) โดยใช้เทคนิค RT-PCR

หมายเหตุ : M = DNA marker

N = Negative control ซึ่งใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน (distilled water)

P = Positive control ซึ่งใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ p-3-TpMC4R สำหรับ MC4R หรือ p-3-TpActin สำหรับ  $\beta$ -actin ของปลาสด

U = ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg)

## 5. การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน TpMC4R ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสด

การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน TpMC4R ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาสด ได้แก่ สมองส่วน telencephalon, mesencephalon, metencephalon และ diencephalon รวมทั้งต่อมใต้สมอง (pituitary gland) และส่วนของเหงือก (gill) ตับ (liver) ไตส่วนต้น (head kidney) ไตส่วนปลาย (trunk kidney) กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) ม้าม (spleen) กล้ามเนื้อ (muscle) รังไข่ (ovary) อัณฑะ (testis) โดยใช้วิธี realtime-RT-PCR และการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วย agarose gel electrophoresis

จากการใช้การวิเคราะห์ผลความแตกต่างทางสถิติร่วมในการเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ TpMC4R ในแต่ละอวัยวะ สามารถจัดระดับการแสดงออกของยีน TpMC4R ได้ดังนี้ TpMC4R มีการแสดงออกที่ระดับสูงใน สมองทุกส่วน อัณฑะ และ ตับ และ TpMC4R มีการแสดงออกระดับกลางที่ เหงือก ไตส่วนต้นและส่วนปลาย กระเพาะอาหาร ลำไส้ ม้าม กล้ามเนื้อ และ รังไข่ นอกจากนี้พบว่า TpMC4R มีการแสดงออกระดับต่ำที่ม้าม (ภาพที่ 3.13 A) ผลการวิเคราะห์ผลผลิตของ RT-PCR ของ TpMC4R และ Tp- $\beta$ -actin (เป็น internal standard) พบว่ามีขนาดตรงตามผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้รับ (ภาพที่ 3.13 B)

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่บริเวณสมองส่วน telencephalon ของปลาสด โดยวิธี *In situ* hybridization โดยใช้โพรบ antisense probe (ภาพที่ 3.14 B และ D) ภาพที่ 3.14 A แสดงภาพวาดตำแหน่งต่าง ๆ ของสมองส่วน telencephalon ที่พบการแสดงออกของ TpMC4R ได้แก่ medial dorsalis telecephalon (Dm), dorsal dorsalis telecephalon (Dd), central dorsalis telecephalon (Dc), lateral dorsalis telecephalon (Dl), และ ventralis telencephalon (Vv) การใช้ sense probe (ภาพที่ 3.14 C และ E) ไม่พบเซลล์ที่มี signals ของ sense probe

ภาพที่ 3.15 A แสดงตำแหน่งใน Diencephalon ที่มีการแสดงออกของ mRNA ของ TpMC4R พบการแสดงออกของ TpMC4R ในส่วนของ Lateral tuberal nucleus (LTN) (ภาพที่ 3.15 B และ D), preoptic nucleus (PVO) (ภาพที่ 3.15 D), diffuse nucleus of inferior love (DNIL) (ภาพที่ 3.15 H), periventricular part (PPN), Torus lateralis (TL), Anterior tuberal nucleus (ATN), nucleus glomerulosus (GN) และ พบการแสดงออกของ TpMC4R อย่างอ่อนที่ต่อมใต้สมอง (pituitary gland; PG) (ภาพที่ 3.15 B) ไม่พบ signals ของ sense probe (ภาพที่ 3.15 C, E และ G)

การศึกษาการแสดงออกของ TpMC4R ในบริเวณสมองส่วน mesencephalon และ metencephalon แสดงดังภาพที่ 3.16 ภาพที่ 3.16 A แสดงสรุปการพบการแสดงออกของ mRNA ของ TpMC4R ในส่วนของ valbula cerebella (VC) (ภาพที่ 3.16 C), torus longitudinalis (TL) (ภาพที่ 3.16 C), torus semicircularis (TS) (ภาพที่ 3.16 C), optic tectum (OT) (ภาพที่ 3.16 C), stratum griseum

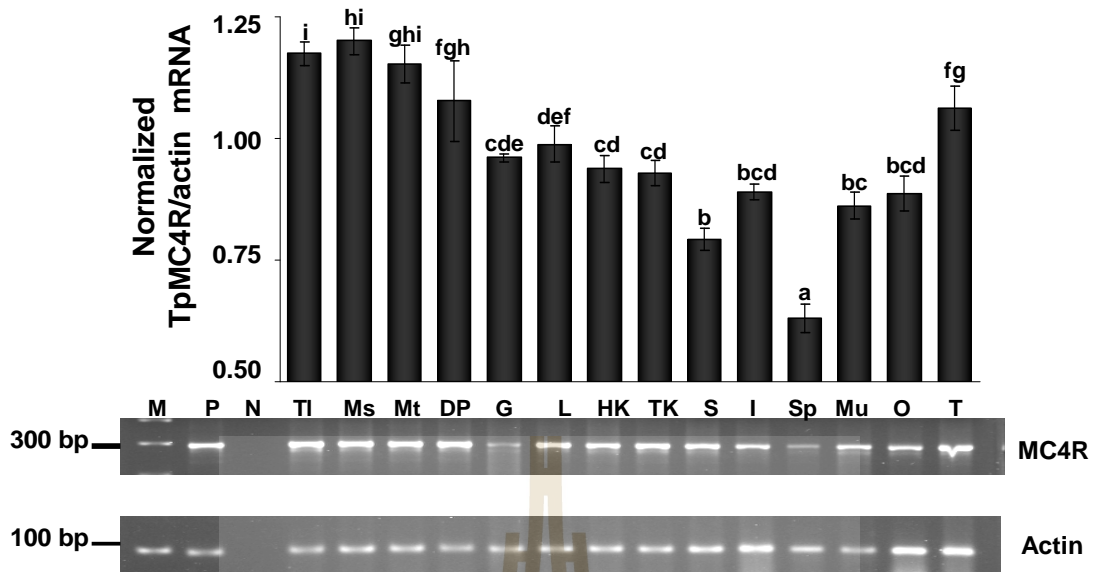
periventricula (SGP) (ภาพที่ 3.16 E) ไม่พบการแสดงออกของบริเวณดังกล่าวเมื่อใช้ sense probe (ภาพที่ 3.16 D และ F) ภาพที่ 3.16 B แสดงการพบการแสดงออกของ TpMC4R ในส่วนของ metencephalon โดยพบการแสดงออกของ mRNA ของ TpMC4R เมื่อใช้ antisense probe ที่บริเวณ cerebellar cortex (CC) และ Purkinje's cell ในส่วนของ central acoustic lobe (CA) (ภาพที่ 3.16 G) การใช้ sense probe จะไม่พบ signals (ภาพที่ 3.16 D, F และ H)

## 6. การศึกษาการแสดงออกของยีน TpMC4R ในรอบวันของการกินอาหารปกติ

จากการได้นำปลาสดมาเลี้ยงและให้กินอาหารที่เวลา 10.00 และ 16.00 นาฬิกา เป็นระยะเวลา 1 เดือน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน TpMC4R ที่สมองส่วนต่าง ๆ ได้แก่ telencephalon, Mesencephalon, Metencephalon และ Diencephalon ในระหว่างรอบวันของการกินอาหารของปลาสด ด้วยวิธี realtime-RT PCR โดยใช้ Tp- $\beta$ -actin เป็น internal standard พบว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ของ TpMC4R ในสมองแต่ละส่วนที่ทำการศึกษาจะเป็นไปในทางเดียวกัน (ภาพที่ 3.17) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงในเวลาเริ่มกินอาหารเช้า และหลังได้รับอาหารเช้า แต่จะมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเวลาก่อนเริ่มได้รับอาหารเย็น

## 7. การศึกษาผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน TpMC4R

หลังจากได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน TpMC4R ในวงจรรอบวันของการกินอาหารปกติของปลาสดแล้ว จึงทำการศึกษาผลของการอดอาหาร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน TpMC4R ในสมองส่วน telencephalon, Mesencephalon, Metencephalon และ Diencephalon ด้วยวิธี realtime-RT PCR โดยใช้ Tp- $\beta$ -actin เป็น internal standard พบว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ของ TpMC4R ในสมองแต่ละส่วนที่ทำการศึกษาจะเป็นไปในทางเดียวกัน (ภาพที่ 3.18) ระดับ mRNA ของ TpMC4R จะมีระดับต่ำที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง และ ระดับ mRNA ของ TpMC4R จะเพิ่มขึ้นจากการเพิ่มระยะเวลาการอดอาหารนานขึ้นถึง 12 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) เริ่มพบความแตกต่างของการเพิ่มขึ้นของ ระดับ mRNA ของ TpMC4R ที่ระยะเวลาการอดอาหารนาน 18 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) และที่ระยะเวลาการอดอาหารนาน 24 ชั่วโมง จะมี ระดับ mRNA ของ TpMC4R สูงขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ ระดับ mRNA ของ TpMC4R ที่ระยะเวลาการอดอาหารนาน 18 ชั่วโมง ( $P > 0.05$ )

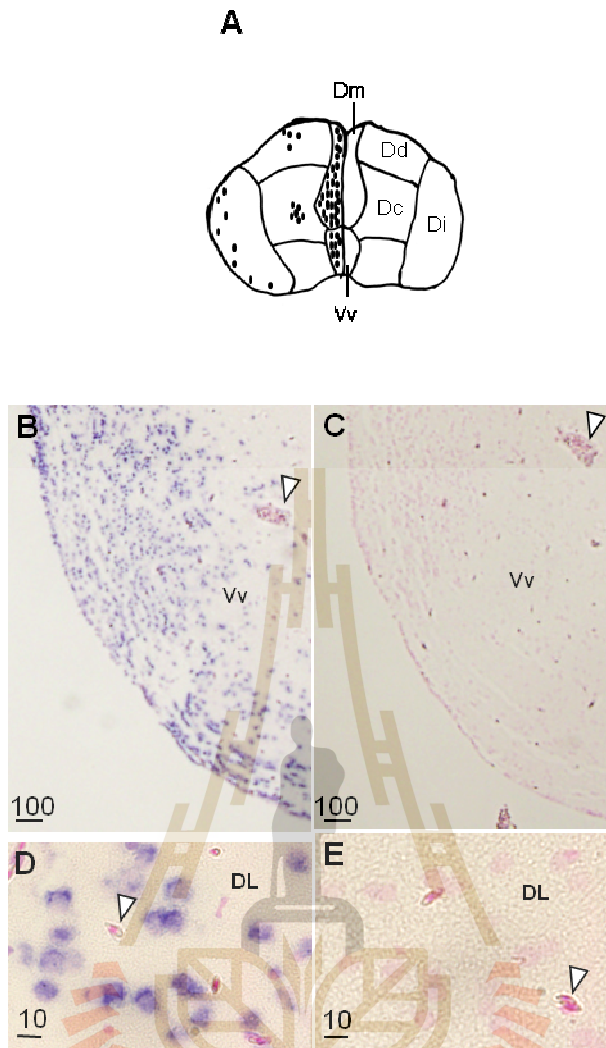


ภาพที่ 3.13 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง และอวัยวะต่าง ๆ ของปลาชนิด ได้แก่ สมองส่วน telencephalon (TI), สมองส่วน mesencephalon (Ms), สมองส่วน metencephalon (Mt), สมองส่วน diencephalon & pituitary (DP), อวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ gill (G), liver (L), head kidney (HK), trunk kidney (TK), stomach (S), intestine (I), spleen (Sp), muscle (Mu), ovary (O) และ testis (T)

(A) แสดงผลของ Real-Time RT PCR เพื่อวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของ *MC4R* ระดับการแสดงออกของ mRNA ของ *MC4R* เป็นค่าที่ได้จากการเทียบระดับของ *MC4R* mRNA ต่อการแสดงออกของยีนอ้างอิง  $\beta$ -actin mRNA แสดงค่าในรูปของ means  $\pm$  SE (จำนวนตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง) ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$

(B) ผลการตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ : M = DNA marker, N = Negative control ซึ่งใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน (distilled water), P = Positive control ซึ่งใช้พลาสมิดดีเอ็นเอของ p-3-TpMC4R หรือ p-3-TpActin ของปลาชนิด



ภาพที่ 3.14 การแสดงออกของยีน TpMC4R ในสมองส่วน telencephalon

A: แสดงภาพสรุปของการพบการแสดงออกของ TpMC4R mRNA

B: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ในบริเวณ ventralis telencephalon (Vv)

C: เนื้อเยื่อบริเวณเดียวกับภาพ B ที่ไฮบริไดซ์ด้วย sense probe

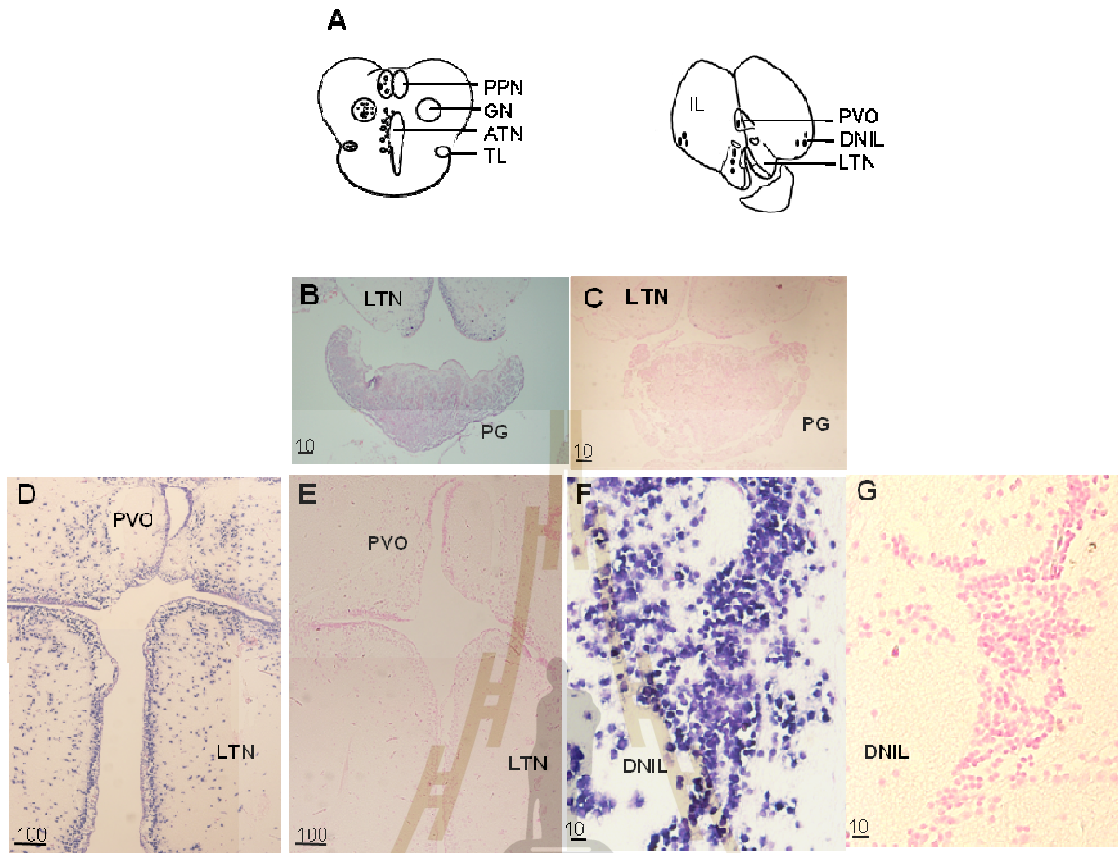
D: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ในบริเวณ lateral dorsalis telencephalon (DL)

E: เนื้อเยื่อบริเวณเดียวกับภาพ D ที่ไฮบริไดซ์ด้วย sense probe

หมายเหตุ: ตัวย่อ medial dorsalis telencephalon (Dm), dorsal dorsalis telencephalon (Dd), central dorsalis telencephalon

Scale bar ภาพ B และ C = 100  $\mu$ m; ภาพ D และ E = 10  $\mu$ m

หัวลูกศรสีขาวแสดงเส้นเลือด



ภาพที่ 3.15 การแสดงออกของยีน TpMC4R ในสมองส่วน Diencephalon และ pituitary gland (PG)

A: แสดงภาพสรุปของการพบการแสดงออกของ TpMC4R mRNA,

B: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ในบริเวณ lateral tuberal nucleus (LTN) และ pituitary gland (PG)

D: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ในบริเวณ preoptic nucleus (PVO) และ LTN

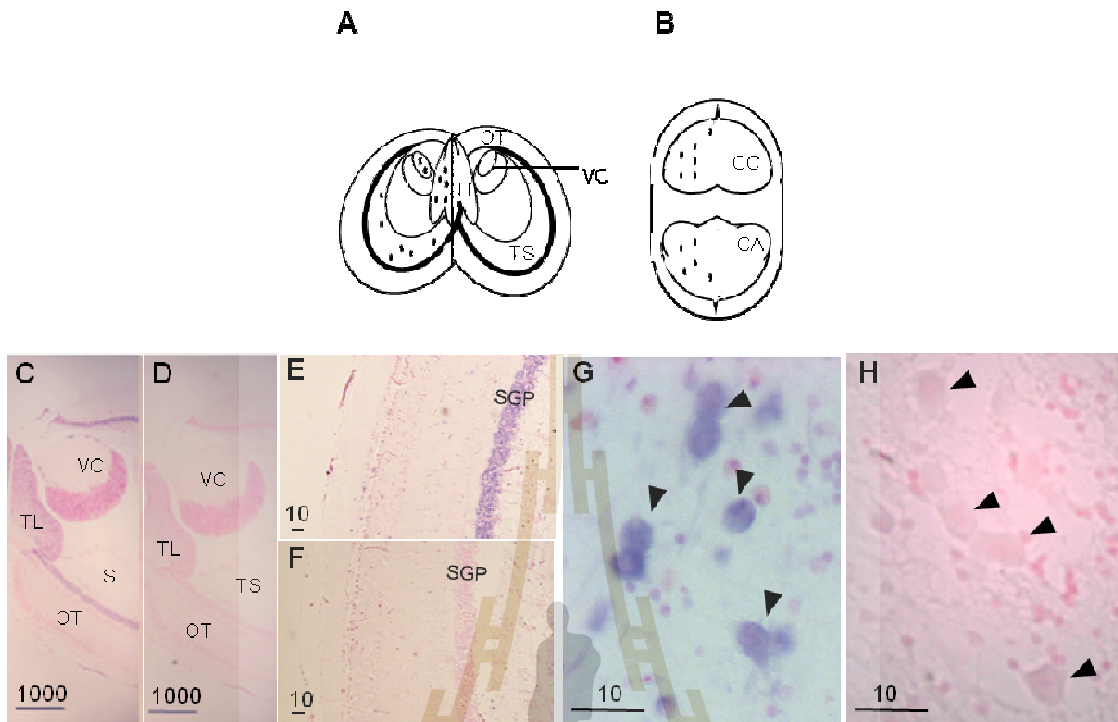
F: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ในบริเวณ diffuse nucleus of inferior lobe (DNIL)

C, E และ G: เนื้อเยื่อบริเวณเดียวกับภาพ B, D และ F ตามลำดับที่ไฮบริไดซ์ sense probe

หมายเหตุ: ตัวย่อ periventricular part (PPN), anterior tuberal nucleus (ATN), nucleus glomerulosus (GN), inferior lobe (IL)

Scale bar ภาพ D และ E = 100  $\mu\text{m}$ ; ภาพ B, C, F และ G = 10  $\mu\text{m}$





**ภาพที่ 3.16** การแสดงออกของยีน TpMC4R ในสมองส่วน Mesencephalon (A) และ Metencephalon (B)

C: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ของสมองส่วน mesencephalon ในบริเวณ valvula cerebelli (VC), torus longitudinalis (TL), torus semicircularis (TS) และ optic tectum (OT)

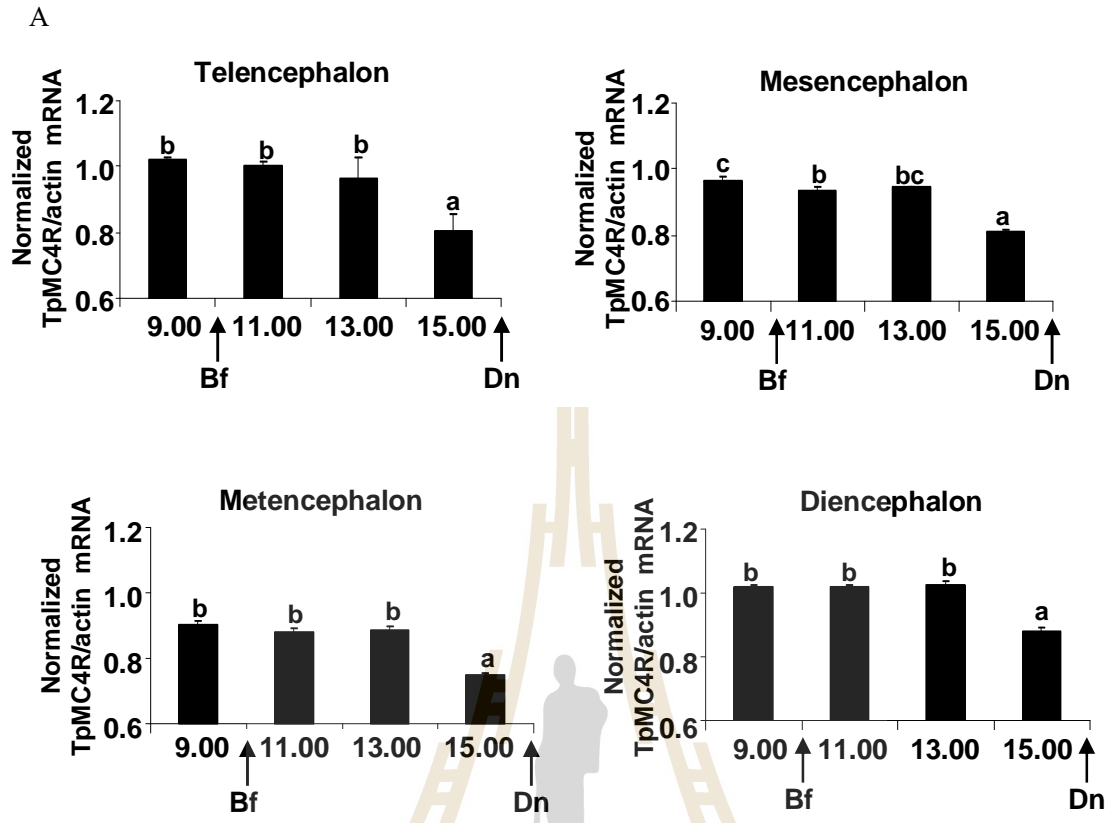
E: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ของสมองส่วน mesencephalon ในบริเวณ stratum griseum periventricula (SGP)

G: เซลล์ที่มีการแสดงออกของ TpMC4R mRNA ของสมองส่วน metencephalon ในบริเวณ cerebellar cortex (CC) ลูกศรสีดำแสดง Purkinje's cell

D, F และ H: เนื้อเยื่อบริเวณเดียวกับภาพ C, E และ G ตามลำดับที่ไฮบริไดซ์ sense probe

หมายเหตุ: ตัวย่อ central acoustic lobe (CA)

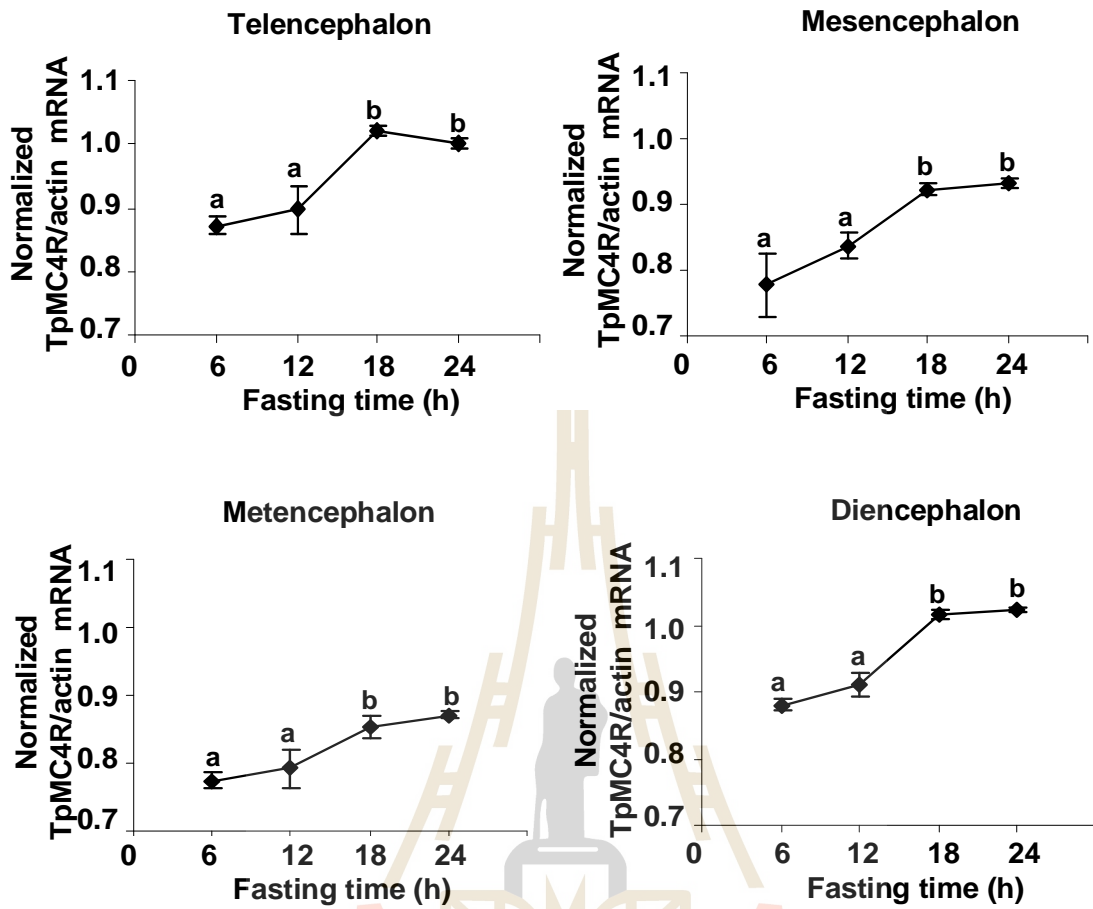
Scale bar ภาพ C และ D = 1000  $\mu\text{m}$ ; ภาพ E, F, G และ H = 10  $\mu\text{m}$



ภาพที่ 3.17 การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหาร (daily feeding)

ปลาชนิดนี้ได้รับอาหารในมื้อเช้าเวลา 10.00 น. (breakfast : Bf) และมื้อเย็นเวลา 16.00 น. (dinner : Dn) การศึกษาในครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, Mesencephalon, Metencephalon และ Diencephalon โดยใช้ mRNA ของยีน  $\beta$ -actin เป็น internal standard

หมายเหตุ : - การวิเคราะห์ผลทำโดย เปรียบเทียบค่า Cp ของยีนที่ศึกษากับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Cp และจำนวนชุดของพลาสมิด (p-3-TpMC4R) หรือพลาสมิด (p-3-TpActin) การคำนวณทำโดยการแปลงค่าจำนวนชุดยีนให้อยู่ในรูป  $\log_{10}$   
 - ค่าแสดงในรูป means  $\pm$  SE (จำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง) ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$



ภาพที่ 3.18 ผลของการอดอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน

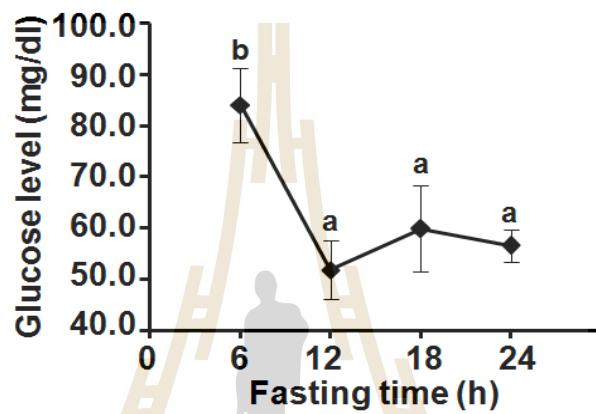
*TpMC4R*

การศึกษาในครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, Mesencephalon, Metencephalon และ Diencephalon โดยใช้ mRNA ของยีน  $\beta$ -actin เป็น internal standard

หมายเหตุ : - การวิเคราะห์ผลทำโดย เปรียบเทียบค่า Cp ของยีนที่ศึกษากับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า

Cp และจำนวนชุดของพลาสมิด (p-3-TpMC4R) หรือพลาสมิด (p-3-TpActin) การคำนวณทำโดยการแปลงค่าจำนวนชุดยีนให้อยู่ในรูป log 10

- ค่าแสดงในรูป means  $\pm$  SE (จำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง) ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$



ภาพที่ 3.19 ผลของการอดอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือด

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means  $\pm$  SE (จำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง) ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างแสดง  
ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$

## 8. ผลของ MC4R antagonist ต่ออัตราการกินได้ของปลาสด และการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในสมองของปลาสด

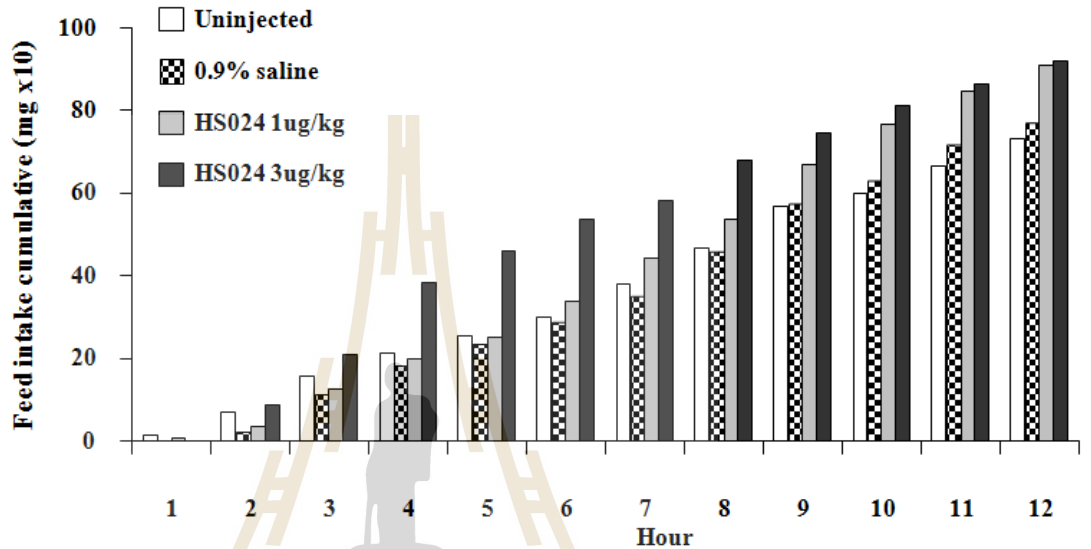
ก่อนเริ่มการศึกษานี้ ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นถึงระดับการฉีด HS024 หลายระดับ (การฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  และ 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ต่อการเพิ่มการกินได้ พบว่าระดับที่มีแนวโน้มต่อการเพิ่มการกินได้อยู่ในช่วง 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นจึงได้กำหนดระดับของการทดลองนี้ เท่ากับ 1 และ 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$

การศึกษานี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบการกินได้ของปลาสดที่ได้รับการฉีด HS024 ที่ระดับ 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  และ 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  กับปลาสดที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) และปลาสดกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีด (uninjected fish) ผลการทดลองพบว่าระดับการฉีด HS024 ที่ระดับ 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  เพิ่มการกินได้ในปลาสดเมื่อเปรียบเทียบกับปลาสดที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือและ uninjected fish แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการกินได้ที่เพิ่มขึ้นจะพบในช่วงเวลาตั้งแต่ 3 ชั่วโมงเป็นต้นไป ระดับการฉีด HS024 ที่ระดับ 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  พบว่าทำให้ปลามีการกินได้เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับปลาสดที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือและ uninjected fish และพบว่าการกินได้เพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 เป็นต้นไป (ภาพที่ 3.20)

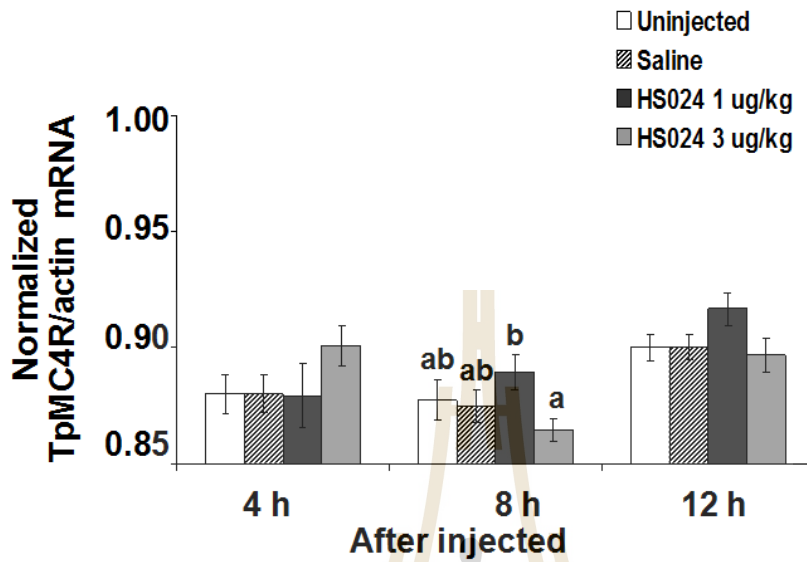
การศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง โดยทำการแบ่งกลุ่มการทดลองทั้งหมด 4 กลุ่มการทดลอง คือปลาสดในกลุ่มควบคุม (uninjected) กลุ่มปลาสดที่มีการฉีด 0.9% saline ปลาสดที่มีการฉีด HS024 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  และ 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  เข้าสู่กล้ามเนื้อ และทำการเก็บตัวอย่างสมองของปลาสดที่ 4, 8 และ 12 ชั่วโมงหลังจากการฉีด พบว่าหลังจากการฉีด 4 ชั่วโมง ปลาสดที่มีการฉีด HS024 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของปลาสดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากการฉีด HS024 ในชั่วโมงที่ 8 พบว่าปลาสดที่มีการฉีด HS024 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงกว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของปลาสดในกลุ่มอื่น ๆ นอกจากนี้หลังจากการฉีด HS024 ในชั่วโมงที่ 12 พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ของปลาสดทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) (ภาพที่ 3.21)

การศึกษาผลของการแช่สมองใน MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง โดยทำการแบ่งกลุ่มการทดลองทั้งหมด 4 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (Holtfreter's solution) กลุ่มของ Holtfreter's solution ที่มี HS024 ที่ระดับ 0.1, 1, และ 10 nmol ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 2 ชั่วโมง ระดับ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองที่แช่ใน Holtfreter's solution ที่มี HS024 ทุกระดับไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ที่เวลา 4 ชั่วโมง

พบว่าระดับ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองที่แช่ใน Holtfreter's solution ที่มี HS024 ที่ระดับ 1, และ 10 nmol มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ภาพที่ 3.22)



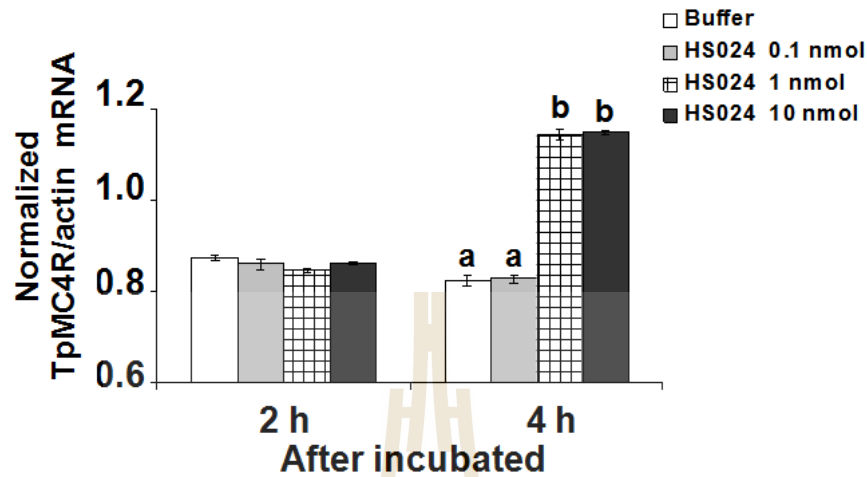
ภาพที่ 3.20 ผลของการฉีด (การฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ) MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ของปลาสด โดยทำการฉีด HS024 ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ซึ่งเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับการฉีด 0.9% saline และกลุ่มปลาสดที่ไม่ได้รับการฉีด HS024 (uninjected)



ภาพที่ 3.21 ผลของการฉีด (การฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ) MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* หลังจากมีการฉีด antagonist HS024 ที่ 4, 8 และ 12 ชั่วโมง ปลาที่ได้รับการฉีด HS024 ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  เปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับการฉีด 0.9% saline และกลุ่มปลาสดที่ไม่ได้รับการฉีด HS024 (uninjected)

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูปแบบ means  $\pm$  SE (จำนวนตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง)

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$



ภาพที่ 3.22 ผลของการแช่สมองปลาสดในสาร MC4R antagonist (HS024) ในระดับต่างๆ ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* โดยทำการศึกษาผลของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สมองปลาสดที่แช่ใน buffer (Holtfreter's solution), HS024 ที่มีความเข้มข้น 0.1 nmol, 1 nmol และ 10 nmol เป็นเวลาที่ 2 และ 4 ชั่วโมง

หมายเหตุ : ค่าแสดงในรูป means  $\pm$  SE (จำนวนตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง)  
ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$



### การทดลองที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของยีนนิวโรเปปไทด์วาย (Neuropeptide Y) และผลของการอดอาหารต่อการแสดงออกของยีน Neuropeptide Y

#### 1. การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน NPY ในปลาสด (TpNPY)

การโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน NPY ในปลาสด ทำโดยวิธี 3' และ 5' RACE (Random amplification of cDNA ends) ได้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ แสดงดังภาพที่ 3.23 โดย cDNA เส้นสมบูรณ์ของ MC4R ที่โคลนได้จากปลาสดในการวิจัยนี้ จะเรียกว่า TpNPY มีขนาด 735 คู่เบส เป็นส่วนของ open reading frame (ORF) ยาว 300 คู่เบส แปรรหัสไปเป็นกรดอะมิโนได้ 99 กรดอะมิโน มีส่วนของ 5'-untranslated region (5'-UTR) ยาว 90 คู่เบส และมีส่วนของ 3'-untranslated region (3'-UTR) 345 คู่เบส ตรงปลายของ 3'-UTR เป็นปลาย poly A tail การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของยีน TpNPY กับยีน NPY ของปลาและสัตว์อื่น ๆ แสดงดังภาพที่ 3.24

#### 2. การศึกษาผลของการอดอาหารระยะสั้นต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน TpNPY

การศึกษาการผลของการอดอาหาร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน TpNPY ในสมองส่วน telencephalon, mesencephalon, metencephalon และ diencephalon ด้วยวิธี realtime-RT PCR โดยใช้ Tp- $\beta$ -actin เป็น internal standard พบว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ของ TpNPY ในสมองทุกส่วนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการอดอาหาร ในสมองส่วน metencephalon จะมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่การอดอาหาร ที่ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ในสมองส่วน mesencephalon และ ส่วน Diencephalon พบการลดลงของ mRNA ของ TpNPY อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลาการอดอาหารที่เวลา 18-24 ชั่วโมง

Filename : Tp npy summary  
 Sequence Size : 735  
 Sequence Position: 1 - 735

Translation Position: 91 - 735;

Genetic Code : Universal

```

    10      20      30      40      50      60
AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGAAGAGCAGAAGAGACGCCACGAGACAGCG

    70      80      90      100     110     120
CGCAAATCTCCCCCTGACCCTCTGGGAAATATGCATCCTAACTTGGTGAGCTGGTTGGGG
                                M H P N L V S W L G
    130     140     150     160     170     180
ACCCTGGGGTTCCTTCTGTGGGCTCTGCTCTGCCTGGGCGCCCTGACAGAGGGAAACCCG
T L G F L L W A L L C L G A L T E G N P
    190     200     210     220     230     240
GGGAAACCGGAGAACCCCGGAGAGGACGCCCCAGCCGAGGAACTGGCCAAGTACTACTCA
G K P E N P G E D A P A E E L A K Y Y S
    250     260     270     280     290     300
GCCCTGAGACACTACATCAACCTCATTACGAGGCAGAGGTACGGGAAGAGGTCCAGTCTT
A L R H Y I N L I T R Q R Y G K R S S P
    310     320     330     340     350     360
GAGATTCTGGACACGCTGGTCTCAGAGCTGTTGCTGAAGGAAAGCACAGACACGCTTCCA
E I L D T L V S E L L L K E S T D T L P
    370     380     390     400     410     420
CAGTCCAGATATGAACCAGCATTGTGGTGATGATGCCATCCGGTTTGGCTCGACCTCACT
Q S R Y E P A L W *
    430     440     450     460     470     480
GCCGCCCCATTACTGGTGACATTCTGACCTCTACACATTTGTCACCTTCTCACCCCTCTAA

    490     500     510     520     530     540
GCCAAATGACGACCCCTGCCTCTGCCCCTTTTACCTCTATCCGCCTCTGTGTATACTCA

    550     560     570     580     590     600
ACCCCCCTGCCCTCATCCTTACCCCTCCCGGCTGCAGCGAAAGCTTCTTAGAGTATGT

    610     620     630     640     650     660
GCCATAAACTGTAAATAGTTTATTTCAGAGTTACCATGTGTGAAACATTACAGTGGGGGA

    670     680     690     700     710     720
GGGGTACGTTGATTGTATTGTAAAATTGTGAATTAAGATTATTGTTTGAIAAAAAAAAAA

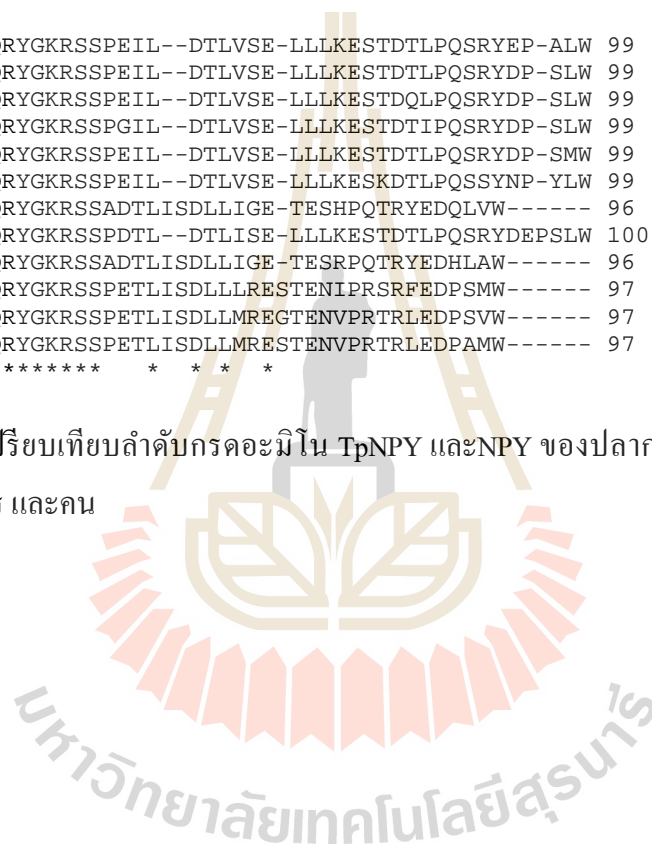
    730     740
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

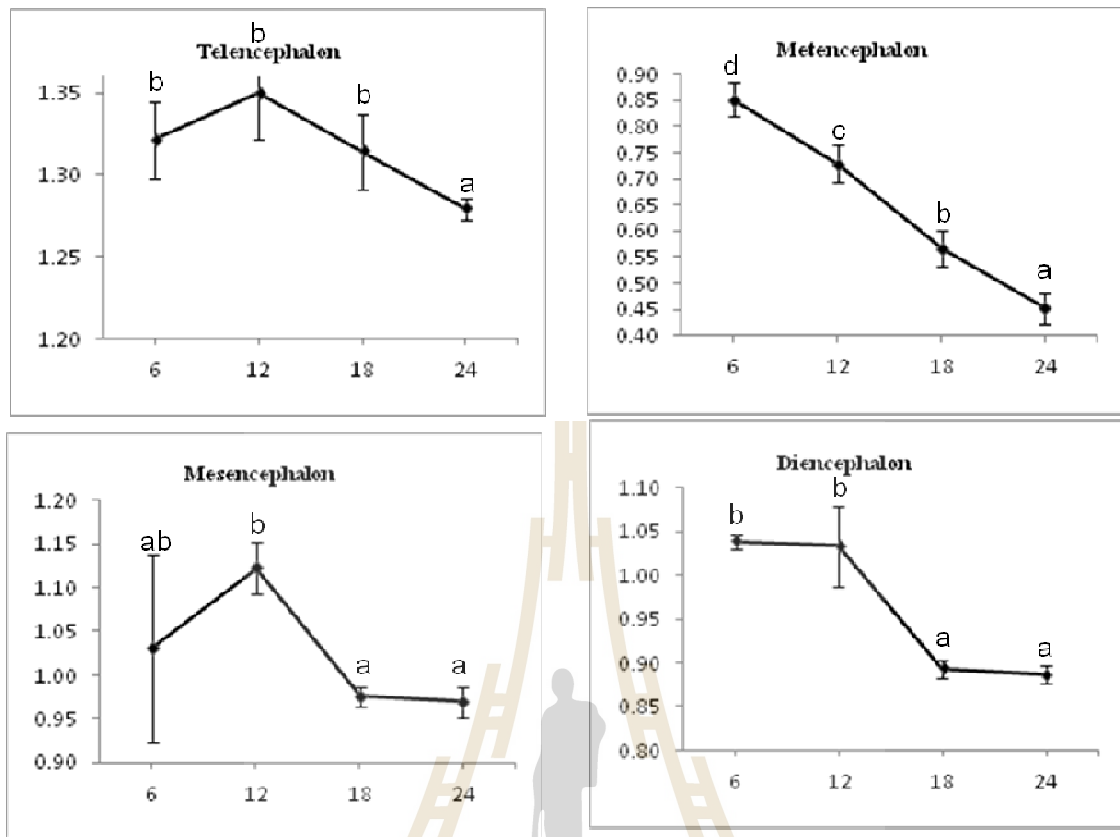
ภาพที่ 3.23 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ TpNPY

TpNPY	MHPNLVSWLGTGLGFLWALLCLGALTEGNPKPENPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Flounder	MHPNLVSWLGTGLGFLWALLCLGALTEGYPVKPENPGDDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Seabass	MHPNLVSWLGTGLGFLWALLCLGALTEGYPVKPENPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Mandarin	MHTSLVSWLGTGLGFLWALLCLGALTEGYPVKPENPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Tilapia	MHPNLVSWLGTGLGFLWALLCLGALTEGYPVKPENPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Medaka	MHPNLVSWLGTGLGFLWALLCLGALTEGYPMKPENPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Golfish	MHPNMKMWGWAAACAFLLFVCLGTLTEGYPTKPDNPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Trout	MHPNLGTWLGAVTLLVWTFICIGTLAEGYPVKPENPGEDAPTEELAKYYSALRHYINLIT	60
Zebrafish	MNPNMKMWMSWAACAFLLFVCLGTLTEGYPTKPDNPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLIT	60
Chicken	MQGTMLWVSVLTFALSLIICLGTAEAYPSKPDSPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLIT	60
Pig	MLGSKRLGLSRLTLALSLLVCLCALAEAYPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLIT	60
Human	MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLIT	60
	* * * * *	

TpNPY	RQRYGKRSSPEIL--DTLVSE--LLLKESTDTPQSRYP--ALW	99
Flounder	RQRYGKRSSPEIL--DTLVSE--LLLKESTDTPQSRYP--SLW	99
Seabass	RQRYGKRSSPEIL--DTLVSE--LLLKESTDTPQSRYP--SLW	99
Mandarin	RQRYGKRSSPIL--DTLVSE--LLLKESTDTPQSRYP--SLW	99
Tilapia	RQRYGKRSSPEIL--DTLVSE--LLLKESTDTPQSRYP--SMW	99
Medaka	RQRYGKRSSPEIL--DTLVSE--LLLKESTDTPQSSYNP--YLW	99
Golfish	RQRYGKRSSADTLISDLLIGE--TESHPQTRYEDQLVW-----	96
Trout	RQRYGKRSSPDTL--DTLISE--LLLKESTDTPQSRYPDEPSLW	100
Zebrafish	RQRYGKRSSADTLISDLLIGE--TESRQTRYEDHLAW-----	96
Chicken	RQRYGKRSSPETLISDLLRESTENIPRSRFEDPSMW-----	97
Pig	RQRYGKRSSPETLISDLLMREGTENVPRTRELDPSVW-----	97
Human	RQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRELDPAMW-----	97
	***** * * * *	

ภาพที่ 3.24 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน TpNPY และNPY ของปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ ไก่ สุกร และคน





ภาพที่ 3.25 ผลของการอดอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน TpNPY

การศึกษาในครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน TpNPY ของสมองในแต่ละส่วน ได้แก่ สมองส่วน Telencephalon, Mesencephalon, Metencephalon และ Diencephalon โดยใช้ mRNA ของยีน  $\beta$ -actin เป็น internal standard

หมายเหตุ : - การวิเคราะห์ผลทำโดย เปรียบเทียบค่า Cp ของยีนที่ศึกษากับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Cp และจำนวนชุดของพลาสมิด (p-3- TpNPY) หรือพลาสมิด (p-3-TpActin) การคำนวณ ทำโดยการแปลงค่าจำนวนชุดยีนให้อยู่ในรูป log<sub>10</sub>

- ค่าแสดงในรูป means  $\pm$  SE (จำนวนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง)
- ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $P < 0.05$

## อภิปรายผลการศึกษา

ปลาสดเป็นปลาที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย เป็นปลาที่มีมูลค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาน้ำจืดชนิดอื่น ๆ ปริมาณการผลิตน้อยกว่าปลาน้ำจืดอื่น ๆ เนื่องจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงใช้เวลานาน ทำให้เกษตรกรไม่นิยมเพาะเลี้ยง ปัจจุบันการแปรรูปปลาสดก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่ม และสามารถพัฒนาเป็นสินค้าส่งออกได้อีกชนิดหนึ่ง แม้ว่าการพัฒนาการเพาะเลี้ยงในด้านต่าง ๆ เช่น การเพาะพันธุ์ การเพาะเลี้ยงได้พัฒนาจากแบบดั้งเดิมที่พึ่งพาแต่อาหารธรรมชาติมาเป็นระบบที่มีการให้อาหารสมทบ แต่มีการพัฒนาทางด้านการปรับปรุงพันธุ์น้อย ผลการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในด้านการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมอันหนึ่งที่จะนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ปลาสดต่อไปในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการโคลน cDNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะการเจริญเติบโต ได้แก่ growth hormone และ insulin like growth factor 1 และ 2 ยีนทั้ง 3 ยีนนี้得有รายงานว่าเกี่ยวข้องกับเป็นยีนหลักที่ควบคุมการเจริญเติบโตของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Canosa et al., 2007) นอกจากนี้ได้มีการโคลนยีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม house keeping gene ได้แก่  $\beta$ -actin, Elongation factor-1 $\alpha$ , glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็นยีนที่มีรายงานว่านิยมใช้เป็น ยีนอ้างอิง (reference gene) ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระบบทางสรีรวิทยาด้านต่าง ๆ (MacDonald and Volkoff, 2009)

อัตราการกินได้ในสัตว์เลี้ยงจัดเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญอันหนึ่งในการเลี้ยงสัตว์ สัตว์ที่มีการกินได้สูงมักจะมีการเจริญเติบโตที่สูง อัตราการกินได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังถูกควบคุมโดยยีนจากสมอง โดยเฉพาะสมองส่วนไฮโปทาลามัส ในการวิจัยครั้งนี้ได้มุ่งเน้นที่จะโคลนยีนที่ควบคุมการกินได้ ได้แก่ ยีนเมลานอคอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนเมลานอคอร์ติน 4 รีเซปเตอร์ (melanocortin 4 receptor; MC4R) และยีนนิวโรเปปไทด์วาย (Neuropeptide Y, NPY) ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาว่ามีบทบาทสำคัญต่อการลักษณะการกิน การควบคุมสมดุลพลังงานในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และเกี่ยวข้องกับสภาวะโภชนาการของสัตว์ (Hansen and Morris, 2002; Cerda-Reverter et al., 1999; Narmaware and Peter, 2002; Metz et al., 2006; Lasaga et al., 2008)

ยีน TpMC4R ของปลาสดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ (Takeuchi and Takashi, 1998; Ringholm et al., 2002; Ringholm et al., 2003; Carda-Reverter et al., 2003; Klovinis et al., 2004; Haitina et al., 2004; Haitina et al., 2007; Kobayashi et al., 2008; Sanchez et al., 2009; Tan et al., 2009) โดยบริเวณที่จะมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนค่อนข้างสูงคือบริเวณ transmembrane ซึ่งบริเวณ transmembrane

เป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อการจับกับลิแกนด์และกระตุ้นในการทำงานของ MC4R (Oosterom et al., 1999; Langstrom et al., 2003) บริเวณที่มีความแตกต่างของกรดอะมิโนมาก คือ extracellular loop (ECL) ที่บริเวณปลาย N-terminal ของ MC4R ซึ่ง Srinivasan และคณะ (2004) ได้รายงานไว้ว่า บริเวณดังกล่าวนี้ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการจับกันระหว่าง MSH และ เมลาโนคอร์ทีนรีเซพเตอร์ (melanocortin receptor; MCR)

NPY ที่โคลนได้จากการศึกษานี้มีลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณ mature NPY ขนาด 36 กรดอะมิโน ที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน NPY ที่ได้มีการศึกษาในสัตว์ชนิดต่าง ๆ โดยมี องค์ประกอบกรดอะมิโนคือ [\*P\*KP\*\*PG\*\*AP\*\*\*\*A\*Y\*\*A\*RHYIMLITRQRY] (Larhammar, 1996)

ยีน TpMC4R มีลักษณะต่าง ๆ คล้ายคลึงกับกับ MC4R อื่น ๆ ของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ ยกตัวอย่างเช่น ตำแหน่งของ N-glycosylation และ phosphorylation, PMY, DPIIY ของจะตรงกันกับกลุ่มกรดอะมิโนดังกล่าวใน MC4R อื่น ๆ และ TpMC4R มีตำแหน่งของ cysteine 15 ตำแหน่ง ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในบริเวณที่ตรงกับตำแหน่ง cysteine ที่พบใน MC4R ของสัตว์อื่น ๆ โดย cysteine เชื่อว่ามีความสำคัญต่อการสร้างโครงสร้างทุติยภูมิที่จะสร้างพันธะ disulphide bridge ระหว่าง ECLs (Tarnow et al., 2003) และตำแหน่งของ cysteine ของ TpMC4R ทั้งหมด 15 ตำแหน่งนี้ตรงกับ cysteine ของปลาฟูกูและปลา seabass (Klovins et al., 2004; Sanchez et al., 2009) กลุ่ม DRY ซึ่งพบใน TpMC4R ในบริเวณที่ค่อนข้างตรงกับ MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ เป็นโมทีฟที่สำคัญที่พบใน G protein-coupled receptor (GPCR) ซึ่งน่าจะมีความสำคัญต่อการรักษาสภาพของ MCR เมื่ออยู่สถานะที่ยังไม่ถูกกระตุ้น (inactivated form) หรือเมื่อยังไม่มีการจับ (Schieth et al., 2005) บริเวณ phosphorylation ที่พบใน intracellular loop (ICL) เชื่อว่าเป็นบริเวณที่สำคัญต่อการจับของ G-protein ซึ่งมีผลต่อการควบคุมระดับการทำงานของ MCRs (Shinyama et al., 2003)

การศึกษาถึงหมู่อะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของ MC4R ได้มีการศึกษากันมากใน MC4R ของคนและปลาบางชนิด (Oosterom et al., 1999; Yang et al., 2000; Lee et al., 2001; Langerstrom et al., 2003; Haitina et al., 2004; Klovins et al., 2004) TpMC4R ก็มีองค์ประกอบกรดอะมิโนตรงกันกับกรดอะมิโนของปลาและคน ที่ได้มีการรายงานว่าสำคัญต่อการทำงานของ MC4R ยกตัวอย่างเช่น TpMC4R มีกรดอะมิโนที่ตรงกับ MC4R ของคน (hMC4R) Asp<sup>122</sup>, Asp<sup>126</sup> และ His<sup>264</sup> ซึ่งกรดอะมิโนในตำแหน่งเหล่านี้มีความสำคัญต่อการจับกับ  $\alpha$ -MSH (Yang et al., 2000; Lee et al., 2001; Adan and Gispen, 2000) และ TpMC4R มีกรดอะมิโนตรงกับ hMC4R ได้แก่ Glu<sup>100</sup>, Met<sup>200</sup>, Trp<sup>258</sup> และ Phe<sup>261</sup> ซึ่งได้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการจับกับ  $\alpha$ -MSH (Lee et al., 2001; Lagerstrom et al., 2003) ได้มีรายงานว่ากรดอะมิโน Glu<sup>100</sup>, Asp<sup>126</sup>, Ser<sup>127</sup>, Ala<sup>192</sup>, Phe<sup>267</sup> และ Tyr<sup>187</sup>

เป็นบริเวณที่สำคัญต่อ binding pocket ของ MC4R (Lee et al., 2001; Lagerstrom et al., 2003) พบว่า โปรตีน TpMC4R มี Glu<sup>100</sup>, Asp<sup>126</sup>, Ser<sup>127</sup>, และ Tyr<sup>187</sup> ที่เหมือนกับ hMC4R ในขณะที่ TpMC4R กรดอะมิโน Thr และ Leu แทน Ala<sup>192</sup>, Phe<sup>267</sup> ตามลำดับ ซึ่ง Thr และ Leu ในตำแหน่งดังกล่าวจะเหมือนกับ MC4R ในปลาส่วนใหญ่ ได้แก่ ปลา 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) โปรตีน MC4R ในคนจะมีกรดอะมิโน Tyr<sup>268</sup> ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถในการจับของ MC4R กับ  $\gamma$ -MSH อยู่ในระดับต่ำ (Adan et al., 2000) โปรตีน MC4R ของปลาจะมีกรดอะมิโน Met ในตำแหน่งที่ 268 จึงมีผลให้ MC4R มีความสามารถในการจับกับ  $\gamma$ -MSH (Haitina et al., 2004; Klovins et al., 2004) โปรตีน TpMC4R ในปลาชนิดที่มีกรดอะมิโน Met ในตำแหน่งที่ 268 เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า TpMC4R มีความสามารถในการจับกับ  $\gamma$ -MSH เช่นเดียวกันกับ MC4R ของปลาอื่น ๆ ซึ่งเห็นได้ว่าโปรตีน TpMC4R มีกรดอะมิโนหลายตำแหน่งที่เป็นลักษณะสำคัญต่อการทำหน้าที่ของยีน MC4R นอกจากนี้ TpMC4R น่าจะมีความสามารถในการจับกับ MSH เช่นเดียวกับยีน MC4R ของปลากระดูกแข็ง และของสัตว์เลื้อยลูกคี่ขนม

จากการพิจารณาถึงโครงสร้างความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของ TpMC4R ในข้างต้นมีความสอดคล้องกันกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการสร้าง Phylogenetic tree ทำให้สามารถสรุปได้ว่ายีน TpMC4R อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน MC4R ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และยีน TpMC4R มีค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับปลากระดูกแข็งมากที่สุด

พบการแสดงออกของ mRNA ของยีน TpMC4R ในระหว่างการพัฒนาการตัวอ่อนในระยะต่าง ๆ ของปลาชนิดนี้ได้แก่ ตัวอ่อนที่ระยะ (ชั่วโมงหลังจากที่แม่ปลาวางไข่; hours post spawning; hps) 5 ชั่วโมง (ระยะ mid blastula), 7 ชั่วโมง (ระยะ gastrula), 11 ชั่วโมง (ตัวอ่อนที่มีลำตัวมีลักษณะเป็น body segment และอยู่ในช่วงที่มีการสร้างเม็ดสี (pigmentation)), 15 ชั่วโมง (ตัวอ่อนที่มีลำตัวมีลักษณะเป็น body segment และอยู่ในช่วงที่มีการสร้างเม็ดสี (pigmentation)), 21 ชั่วโมง (ระยะการฟักเป็นตัว (hatching stage)), 24 ชั่วโมง (ระยะที่ตามีการสร้างเม็ดสี) และ 48 ชั่วโมง (ตัวอ่อนปลาชนิดนี้จะได้รับอาหารเป็นมื้อแรก (first feeding)) ซึ่งสังเกตได้จากการที่ ตัวอ่อนของปลาชนิดนี้มีการดูดซึมถุงไข่แดง (yolk sack) จนเกือบหมดและปากของตัวอ่อนมีการเปิด ดังนั้นจึงเรียกระยะนี้ว่า first feeding แสดงว่า MC4R น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนปลา นอกจากนี้พบ mRNA ของ TpMC4R ในไข่ที่ไม่ได้รับการ

ปฏิสนธิ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *TpMC4R* mRNA นั้นเป็น maternal mRNA ที่มีสร้างในระหว่างการพัฒนาการของไข่ปลาแม่ปลา และนำไปเก็บสะสมในเซลล์ไข่ของลูกปลา

อวัยวะที่พบว่ามีการแสดงออกของยีน *MC4R* นั้นจะแตกต่างกันในสัตว์มีกระดูกสันหลังแต่ละชนิด ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยีน *MC4R* จะมีการแสดงออกที่บริเวณสมองเป็นหลัก ซึ่งยีน *MC4R* มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมของระบบประสาทส่วนกลาง (Mountjoy et al., 1994) และจากผลการศึกษาของในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ก็ได้มีรายงานว่า *MC4R* มีการแสดงออกในสมองส่วนต่าง ๆ (Ringholm et al., 2002; Kobayashi et al., 2008; Sanchez et al., 2009) ในการศึกษาจากการวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* โดยวิธี realtime-RT-PCR พบการแสดงออกของ *TpMC4R* ในสมองส่วนต่าง ๆ นอกจากนี้ผลการศึกษาการแสดงออกของ *TpMC4R* โดยวิธี *In situ* hybridization ในสมองส่วน telencephalon, diencephalon และ mesencephalon พบว่าผลการศึกษาส่วนใหญ่สอดคล้องกับผลการศึกษา ในปลาทอง, ปลา trout, ปลาฟูก, และปลา seabass (Cerda-Reverter et al., 2003; Klovins et al., 2004; Haitina et al., 2004) นอกจากนี้บริเวณที่พบการแสดงออกของ *TpMC4R* ในสมองส่วน hypothalamus ได้แก่ preoptic area และ tuberal hypothalamus เป็นบริเวณที่ได้มีการรายงานว่ามีความสำคัญต่อการควบคุมการกินได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Cerda-Reverter et al., 2003)

อย่างไรก็ตามมีผลการศึกษาขัดแย้งกันบ้าง เช่น การแสดงออกของ *MC4R* ในสมองส่วน metencephalon และ pituitary gland โดยในการศึกษาค้างนี้พบว่า *TpMC4R* มีการแสดงออกในส่วนของ metencephalon ซึ่งสอดคล้องกับกับผลการศึกษาใน ปลาทอง และปลาฟูก แต่ในปลาเทร้ากลับไม่พบการแสดงออกของ *MC4R* ใน metencephalon (Cerda-Reverter et al., 2003; Klovins et al., 2004; Haitina et al., 2004) ผลการศึกษาค้างนี้พบการแสดงออกของ *TpMC4R* ที่ pituitary gland ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาว่ามีการพบการแสดงออกของ *MC4R* ในต่อมใต้สมองของปลา seabass เช่นเดียวกัน (Sanchez et al., 2009) แต่ทว่าไม่พบการแสดงออกของ *MC4R* ในต่อมใต้สมองของปลาทอง (Cerda-Reverter et al., 2003)

ถึงแม้ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *TpMC4R* มีความคล้ายคลึงกันและมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันกับยีน *MC4R* ของไก่ (Takeuchi and Takahashi, 1998) และปลาชนิดต่าง ๆ แต่กลับพบว่าการแสดงออกของยีน *MC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ นั้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 3.2) ผลการศึกษาที่มีความหลากหลายในการแสดงออกของ *MC4R* ในอวัยวะต่าง ๆ ในปลาแต่ละชนิดที่แตกต่างกันนั้น อาจเกิดเนื่องจากความแตกต่างของระยะการเจริญเติบโตของปลาทดลอง ผลการศึกษาในค้างนี้พบการแสดงออกของ mRNA ของ ยีน *TpMC4R* ในทุกอวัยวะของปลาชนิดที่ได้ทำการศึกษาในค้างนี้ ปลาทดลองในการศึกษาค้างนี้เป็นปลาชนิดที่โตเต็มวัย การพบการแสดงออกของ mRNA ของ *TpMC4R* ในทุกอวัยวะที่ทำการตรวจวิเคราะห์ อาจเนื่องมาจากเป็นอวัยวะของปลา



โตเต็มวัยจึงมีการแสดงออกของยีน MC4R อย่างเต็มที่ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน MC4R ในปลา zebrafish ที่โตเต็มวัยกลับให้ผลการแสดงออกของยีน MC4R ที่ขัดแย้งกัน ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีน MC4R ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา rainbow trout ปลา fugu ปลา seabass ปลา goldfish และปลา lamprey (Cerdeira-Reverter et al., 2003; Haitina et al., 2004; Haitina et al., 2007; Klovins et al., 2004; Sanchez et al., 2009) นั้นไม่มีการให้ข้อมูลว่าปลาที่นำมาศึกษามีการเจริญเติบโตอยู่ที่ระยะใด ดังนั้นจึงมีหลักฐานไม่เพียงพอต่อการสรุปว่าความหลากหลายของการแสดงออกของ MC4R ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา เกิดจากปลาที่นำมาศึกษามีการเจริญเติบโตที่ระยะแตกต่างกัน

แต่ผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของ mRNA ของ ยีน *TpMC4R* ในทุกอวัยวะของปลาชนิดนั้น น่าจะเป็นไปได้ว่า *TpMC4R* นั้นน่าจะมีบทบาทหน้าที่ในปลาชนิดในระบบสรีรวิทยาอื่น ๆ ด้วย ซึ่งในความเป็นจริงนั้นเราจะพบอยู่เสมอว่า เมื่อปลาอยู่ในภาวะต่างๆ เช่น ช่วงสืบพันธุ์ ช่วงที่เกิดความเครียดนั้น ปลามักจะไม่กินอาหาร ดังนั้นระบบควบคุมการกินได้จึงเกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาในระบบอื่น ๆ ของปลา

ได้มีรายงานการศึกษารูปแบบของการแสดงออกของยีนในสมองส่วน hypothalamus ที่เกี่ยวข้องกับระบบควบคุมการกินได้ ได้แก่ ยีน *AgRP*, *Cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART)*, *Leptin receptor (LR)*, *Melanin concentrating hormone (MCH)*, *Neuropeptide Y (NPY)*, *Orexin* และ *POMC* และพบว่ายีนเหล่านี้เป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการกินอาหารในรอบวัน (circadian rhythm) และมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการได้รับอาหาร (Saper et al., 2005; Stutz et al., 2007) แต่การศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ mRNA ของยีน MC4R ในรอบวันของการกินอาหารยังมีข้อมูลอยู่น้อย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในระหว่างมื้ออาหารของสมองส่วนต่างนั้น พบว่ามีรูปแบบการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* จะลดลงเมื่อที่เวลา 1 ชั่วโมง ก่อนอาหารเย็น (15.00 น.) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน ดังนั้นยีน *TpMC4R* น่าจะมีความสัมพันธ์กับวงจรรอบของการกินอาหารในช่วงวันของปลา (circadian rhythm)

ตารางที่ 3.2 การแสดงออกของยีน *MC4R* ในอวัยวะของปลาชนิดต่าง ๆ

Species	gill	liver	HK	TK	stomach	intestine	spleen	muscle	ovary	testis	Ref.
Snakeskin Gourami	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Zebrafish	nd	nd	nd	nd	+(GI)	+(GI)	nd	-	+	nd	Ringholm et al., 2002
Goldfish	+	-	-	-	nd	-	+	-	+	-	Cerda-Reverter et al., 2003
Trout	nd	-	+	nd	nd	-	nd	-	-	nd	Haitina et al., 2004
Fugu	nd	-	+	nd	+	-	nd	-	nd	nd	Klovins et al., 2004b
Lamprey (MCbR)	nd	+	nd	nd	nd	-	nd	+	nd	nd	Haitina et al., 2007
Flounder	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Kobayashi et al., 2008
Seabass	-	+	-	-	nd	-	-	+(Wm)	-	+	Sanchez et al., 2009

หมายเหตุ : (+) = มีการแสดงออก  
 (-) = ไม่มีการแสดงออก  
 (nd) = ไม่ได้ทำการศึกษา

ตัวย่อ : HK = head kidney; TK = trunk kidney; GI = gastrointestinal tract; Wm = white muscle

นอกจากนี้ลักษณะของการแสดงออกของ mRNA ของยีน MC4R ยังมีความสัมพันธ์กับสถานะของโภชนาการ ในการศึกษาครั้งนี้มีวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีน TpMC4R ในสถานะการอดอาหาร 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.) และมีการแสดงออกของ mRNA ของยีน TpMC4R เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาของการอดอาหารเพิ่มขึ้น (24 ชั่วโมง) ซึ่งมีผลสอดคล้องกับผลงานการศึกษาของ Higgins et al. (2010) ที่ได้มีการศึกษาผลการแสดงออกของยีน MC4R ในไก่ที่อยู่ในสถานะการอดอาหาร ซึ่งพบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน MC4R เพิ่มขึ้นเมื่อมีช่วงเวลาการอดอาหารที่เพิ่มขึ้นถึง 48 ชั่วโมง ในปลา brafín flounder ในสถานะการอดอาหารไม่มีผลต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน MC4R ในสมอง แต่มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ mRNA ของยีน MC4R ในตับ (Kobayashi et al., 2008)

โดยทั่วไปปลาจะมีช่วงเวลาของการอดอาหารตามธรรมชาติ เช่น ในช่วงฤดูการผสมพันธุ์ การอพยพย้ายถิ่น และในช่วงฤดูหนาว เมื่อปลามีการอดอาหารก็จะมีผลต่อการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของ เมตาบอลิซึม โดยลักษณะของการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมจะขึ้นอยู่กับชนิดของปลา จากการศึกษาผลการอดอาหารในปลาชนิด พบว่าปลาชนิดที่มีการอดอาหารเป็นระยะเวลานานจะมีระดับของกลูโคสในเลือดลดลง สมองเป็นอวัยวะที่มีการใช้กลูโคสมากที่สุด ระดับกลูโคสอาจจะเป็นตัวสื่อสารต่อระบบควบคุมการกินอาหารในสัตว์ในสมอง นอกจากนี้สภาวะการอดอาหารที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน MC4R อาจมีผลเชื่อมโยงต่อการแสดงออกของยีนหลายยีน ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงการรักษาสสมดุลของพลังงาน เช่น รายงานการศึกษาถึงการทำงานร่วมกันระหว่างยีน leptin และการส่งสัญญาณของ melanocortin (Bertile and Raclot, 2006) ซึ่ง leptin จะถูกผลิตมาจาก adipose tissue เป็นหลัก ซึ่งมีหน้าที่ในการรักษาสสมดุลของพลังงาน ซึ่งมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น ยีน POMC (Schartz et al., 1997) และยีน MC4R (Dridi et al., 2005)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อปลาอดอาหารนานขึ้นจะส่งผลให้ระดับ mRNA ของ NPY ลดลงเมื่อระยะเวลาการอดอาหารนานขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Lambert et al., 1994; Schwartz et al., 1993) ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในปลาทองและปลาซาลมอนที่พบว่าระดับ mRNA ของ NPY ที่ไฮโปทาลามัสลดลง (Narnaware and Peter, 2001; Silverstein et al., 1999) อย่างไรก็ตามในปลา winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) ที่อดอาหารนาน 2 และ 4 สัปดาห์ พบว่าการแสดงออกของ

mRNA ของ NPY ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติในช่วงเวลาเดียวกัน และเมื่อปลาทองที่อดอาหารกลับมาได้รับอาหารจะมีการเพิ่มการแสดงออกของ mRNA ของ NPY (Narnaware and Peter, 2001) ดังจะเห็นได้ว่าระดับของ mRNA ของ NPY จะมีรูปแบบตรงกันข้ามกับการแสดงออกของ mRNA ของ MC4R ข้างต้น ได้มีรายงานการศึกษาว่า ยีน NPY และ ยีน MC4R มีการทำงานเกี่ยวข้องกันในการควบคุมการกินได้ เช่นการศึกษาในหนูแรท พบว่า  $\alpha$ -MSH ขัดขวางการทำงานของ NPY ในการเพิ่มการกินได้ของหนูแรท และ MC4R antagonist (HS014) เพิ่มการกินได้ในหนูแรท แต่อย่างไรก็ตามการฉีด NPY ร่วมกับการฉีด (MC4R antagonist) ไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับการฉีด NPY เพียงอย่างเดียว (Hansen and Morris, 2002)

รายงานการศึกษาในหนู พบว่าการฉีด MC4R antagonist (HS014 และ SH9119) เข้าในสมองของหนู ที่ระดับสูงเกินไปจะมีผลทำให้หนูมีการกินลดลง (Kash et al., 1998) ก่อนเริ่มการศึกษานี้ ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นถึงระดับการฉีด HS024 หลายระดับ (การฉีด HS024 ที่ระดับ 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  และ 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ต่อการเพิ่มการกินได้ พบว่าระดับที่มีแนวโน้มต่อการเพิ่มการกินได้อยู่ในช่วง 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นการศึกษาค้างนี้จึงได้เลือกระดับการฉีด HS024 ที่ระดับ 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  และ 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  พบการเพิ่มอัตราการกินได้ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอันเนื่องมาจากความแปรปรวนของค่าสังเกตที่ได้สูง

ในการวิจัยนี้พบว่าปลาสดที่มีการฉีด HS024 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสดในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ และปลาสดที่มีการฉีด HS024 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  มีการกินได้ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 7 ถึงแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะเห็นได้ว่าปลาสดที่มีการฉีด HS024 มีแนวโน้มต่อการเพิ่มการกินได้ 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 ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการกินได้ของปลาสด เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Schioth et al. (2003) ในหนูที่มีการฉีด MC4R antagonist (HS131) เข้าในช่องท้อง พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ นอกจากนี้ในหนูที่มีการฉีด MC4R antagonist เข้าใต้ผิวหนังที่ระดับ 1 mg/kg จะมีผลต่อการเพิ่มการกินได้หลังจากมีการฉีด 2 ชั่วโมง และมีผลการกินได้ที่ลดลงเมื่อมีระยะเวลาหลังจากการฉีดเพิ่มขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวนี้ การ

ชนิด HS024 ที่ไม่ใช่การฉีดเข้าสู่สมอง มีผลต่อการกินได้ที่ไม่ชัดเจน ซึ่งในทั้งนี้อาจเกิดได้จาก 2 สาเหตุ คือ 1) HS024 ไม่สามารถจับกับ MC4R ที่สมองของในพลาสติกได้ จึงมีผลทำให้ HS024 ไม่มีผลต่อการเพิ่มการกินได้ในพลาสติก และ 2) จากการฉีด HS024 เข้าไปในกล้ามเนื้อของพลาสติก มีผลทำให้ HS024 ไปจับกับ MC4R ที่อยู่ในอวัยวะต่าง ๆ ด้วย จึงอาจมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบการทำงานต่างๆ ภายในร่างกายพลาสติก ซึ่งอาจส่งผลต่อการกินได้ จึงมีผลทำให้การฉีด HS024 มีผลต่อการกินได้ที่ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาต่อไป คือการศึกษาผลของการใช้ HS024 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองของพลาสติก โดยมีการตั้งสมมุติฐานว่า ถ้า HS024 สามารถจับกับ MC4R ในพลาสติกได้ ก็น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองของพลาสติก

จากการศึกษาผลของการใช้ MC4R antagonist (HS024) ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง โดยวิธีการฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อ พบว่าหลังจากการฉีด HS024 4 ชั่วโมงนั้น พลาสติกที่มีการฉีด HS024 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงขึ้น หลังจากการฉีด HS024 ในชั่วโมงที่ 8 พบว่าพลาสติกที่มีการฉีด HS024 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  มีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงขึ้น ซึ่งผลที่ได้ยังไม่ชัดเจนเท่าไรนัก จึงได้ทำการศึกษา โดยการแช่สมองใน HS024 ต่อไป

จากการศึกษาระดับของการใช้ HS024 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมอง โดยวิธีการแช่สมองในสาร HS024 ที่ระดับต่าง ๆ พบว่าสมองของพลาสติกที่แช่ใน HS024 ที่มีความเข้มข้น 1 nmol และ 10 nmol เป็นเวลา 4 ชั่วโมงมีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* สูงกว่าการแสดงออก mRNA ของยีน *TpMC4R* ของสมองพลาสติกที่แช่ใน buffer และสมองที่แช่ใน HS024 ความเข้มข้น 0.1 nmol ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่า HS024 สามารถจับกับ MC4R ในพลาสติกได้ ดังนั้นผลของการฉีด MC4R antagonist (HS024) ต่อการกินได้ของพลาสติกที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ นั้น อาจเกิดจาก HS024 ไปจับกับ MC4R ในอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกายของพลาสติก จึงมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อการกินได้ ซึ่งทำให้การฉีด HS024 เข้ากล้ามเนื้อ มีผลต่อการกินได้ในพลาสติกที่ไม่ชัดเจน

## บทที่ 4

### บทสรุป

#### สรุปผลการศึกษา

1. การศึกษาครั้งนี้ได้มีการ โคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการกินได้จากปลาสด คือ TpMC4R (melanocortin 4 receptor) และ TpNYP (neuropeptide Y)
2. การศึกษาครั้งนี้ได้มีการ โคลนส่วนของ cDNA ยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ growth hormone และ Insulin like growth factor 1 และ Insulinlike growth factor 2
3. การศึกษาครั้งนี้ได้มีการ โคลนส่วนของ cDNA ยีนที่จัดเป็น house keeping gene ได้แก่  $\beta$ -actin, glyceraldehypde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) และ Elongation factor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )
4. โปรตีน TpMC4R ประกอบด้วยกรดอะมิโน 327 residues ประกอบด้วย transmembrane 7 transmembrane มีความคล้ายคลึงกับ โปรตีน MC4R ของสัตว์อื่น ๆ ก่อนข้างสูง อยู่ในช่วง 61-90 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในส่วนของ transmembrane ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ transmembrane ของสัตว์อื่น ๆ ในช่วง 61-100 เปอร์เซ็นต์
5. โปรตีน TpNYP ประกอบด้วยกรดอะมิโน 99 residues ส่วนของ mature NPY มีความคล้ายคลึงกับ mature NPY ของสัตว์อื่น ๆ ก่อนข้างสูง
6. โปรตีน TpMC4R ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายตัวที่ได้มีรายงานว่ามิบบทบาทหน้าที่สำคัญในการทำงานของ MC4R และ TpMC4R น่าจะมีความสามารถในการจับกับ MSH เช่นเดียวกับ MC4R ในปลา มีกระดูกแข็งอื่น ๆ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่ายีน TpMC4R จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน MC4R ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ และยีน TpMC4R มีค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ MC4R ของปลากระดูกแข็งมากที่สุด

7. ยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในทุกระยะของการพัฒนาการตัวอ่อนของปลาสดจนถึงระยะที่เริ่มกินอาหาร รวมทั้งพบการแสดงออกในไข่ปลาที่ไม่ได้รับการผสม
8. ยีน *TpMC4R* มีการแสดงออกในสมองทุกส่วนและในทุกอวัยวะของปลาสด ซึ่งอวัยวะที่มีการแสดงออกมากที่สุดคือ ในสมองทุกส่วนและในอัณฑะ (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)
9. การแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างมื้ออาหารของปลาสด โดยรูปแบบของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่เวลา 1 ชั่วโมงก่อนอาหารเย็นมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเวลาอื่น ๆ
10. การศึกษาผลของการอดอาหารระยะสั้นที่มีการอดอาหารปลาสดที่ระยะเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* ในสมองแต่ละส่วนมีลักษณะการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน เวลาการอดอาหาร 6 ชั่วโมงมีระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* อยู่ในระดับต่ำและมีการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R* เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาของการอดอาหารเพิ่มขึ้น แต่ผลของการแสดงออกของ *TpNPY* จะมีรูปแบบที่ตรงกันข้าม คือมีการแสดงลดลงเมื่อเวลาการอดอาหารนานขึ้น
11. ปลาสดที่มีการฉีด MC4R antagonist (HS024) 3 µg/kg มีแนวโน้มของการกินได้ที่เพิ่มขึ้น ( $P>0.05$ ) และการฉีด HS024 มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*
12. การแช่สมองของปลาสดใน HS024 มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ mRNA ของยีน *TpMC4R*

### ข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการสร้างข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของยีนที่น่าจะมีบทบาทสำคัญในการจะนำไปใช้ในการพัฒนาการศึกษาการพัฒนาการเลี้ยงปลาสด น่าจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาไปใช้เป็นยีน marker ในการศึกษาทางพันธุกรรมของปลาสด ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อการศึกษาการควบคุมลักษณะการกินได้ในปลาสด และยีนที่ควบคุมลักษณะการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงควรมีการนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ปลาสดต่อไปได้ นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีน TpMC4R และ TpNPY มีผลต่อการกินได้ในปลาสด ดังนั้นการพัฒนาการใช้ MC4R antagonist และ โปรตีน NPY ต่อการเพิ่มการกินได้ในปลาสด จึง เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ควบคุมการกินได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น



### บรรณานุกรม

- กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง (ออนไลน์).  
ได้จาก <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>
- บุญรัตน์ จันทร์สว่าง. (2523). ชีวประวัติของปลาสด. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติกรมประมง. 8: 1-30.  
ประเทือง เชาวน์วันกลาง. (2536). การเลี้ยงปลาน้ำจืด. กรุงเทพฯ ฟิสิกส์เซ็นเตอร์.
- สุปราณี ชินบุตร. (2515-2516). ชีววิทยาของปลาสด. รายงานประกอบวิชา Zoology บัณฑิต  
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-35.
- อากม ชุ่มชิ. (2548). การเพาะเลี้ยงปลาสด. กรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1-32.
- Adan, R. A. H. and Gispen, W. H. (2000). Melanocortins and the brain: From effects via receptors to drug targets. *European journal of pharmacology*. 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  $\alpha$ -MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain research bulletin*. 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. *The journal of endocrinology*. 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: 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 reseaech*. 1047: 214-223.
- Giraudó, 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 evolutionary biology*. 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 inhibitor 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. *Molecular biology reports*. 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. *Biochemical genetics*. 48: 944-953.
- 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. *The journal of endocrinology*. 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 porcine 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 (*HMGAI*) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits. *Animal genetics*. 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. *Molecular biology and evolution*. 21: 563–579.
- Kobayashi, Y., Tsuchiya, K., Yamanome, T., Schioth, 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. *Journal of biological chemistry*. 278: 51521-51526.

- Lasaga, M., Debeljuk, L., Durand, D., Scimonelli, T. N. and Caruso, C. (2008). Review role of  $\alpha$ -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. *European journal of biochemistry*. 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,  $\alpha$ -MSH and control of cortisol release: cloning, sequencing and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*. *The american journal of physiology*. 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. *Journal of biological chemistry*. 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. *Annual review of genetics*. 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 melanocortin 5 receptors from zebrafish show remarkable conservation in structure and pharmacology. *Journal of neurochemistry*. 82: 6-18.
- Ringholm, A., Klovins, J., Fredriksson, R., Poliakova, N., Larson, E.T., Kukkonen, J. P., Larhammar, D. and Schioth, H. B. (2003). Presence of melanocortin (MC4) receptor in spiny dogfish suggests an ancient vertebrate origin of central melanocortin system. *European journal of biochemistry*. 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. *Molecular biology and evolution*. 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*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 296: R1293-R1306.
- Saper, C. B., Lu, J., Chou, T. C. and Gooley, J. (2005). The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in neurosciences*. 28: 152-157.
- Schioth, H. B., Haitina, T., Fridmanis, D. and Klavins, J. (2005). Unusual genomic structure: Melanocortin receptors in *Fugu*. *Annals of the New York academy of sciences*. 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. *Biochemical and biophysical research communications*. 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*). *General and comparative endocrinology*. 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.
- Srinivasan, S., Lubrano-Berthelie, 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. *The Journal of clinical investigation*. 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., Staszkiwicz, 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. *General and comparative endocrinology*. 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. *Journal of biological chemistry*. 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 MacIntyre, D.E. (2002). A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 99: 11381-11386.
- 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*. General and comparative endocrinology. 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 ก

การเตรียมสารมาตรฐานพลาสมิดดีเอ็นเอ สำหรับ realtime RT-PCR

การเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น  $10^{10}$  copies/ $\mu$ l

DNA 1 bp	มีน้ำหนักเท่ากับ	$1.1 \times 10^{-15}$ $\mu$ g
p-3-MC4R	มีขนาดเท่ากับ (pGEM T easy + 3'-MC4R cDNA)	$3015 + 1060 = 4075$ bp
p-3-MC4R 1 copies	มีน้ำหนัก	$= 4075 \text{ bp} \times 1.1 \times 10^{-15} \mu\text{g} = 4.4825 \times 10^{-12} \mu\text{g}$
ดังนั้น p-3-MC4R	$10^{10}$ copies มีน้ำหนัก	$= 4.4825 \times 10^{-12} \times 10^{10} \mu\text{g}$
		$= 44.825 \text{ ng}/\mu\text{l}$

การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการเจือจาง p-3-MC4R ที่ความเข้มข้น

$10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$  ....



## ภาคผนวก ข

ชนิดสัตว์	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R
Human (Hs MCR)	AF 153431	AY 225229	AY 227893	EF 080880	EF 444993
Cattle (Bt MCR)	AF 445641	NM_174109	-	NM_174110	NM_001015542
Pig (Ss MCR)	EU 604026	-	FJ 185221	AB 021664	-
Chicken (Gg MCR)	NM_001031462	NM_001031515	AB 017137	AY 545057	AB 012868
Fugu rubripes (Tr MCR)	AY 161854	AY 225229	-	AY 161856	AY 161855
Spotted green pufferfish (Tn MCR)	AY 332238	AY 332239	-	AY 332240	AY 332241
Zebrafish (Dr MCR)	AY 161847	AY 161848	AY 161849	AY 161850	MC5Ra: NM_173279, MC5Rb: NM_173280
Karasu (Tc MCR)	AB 437784	-	-	AB 073675	-
Southern platyfish (Xm MCR)	DQ 866828	-	-	-	-
Mozambique tilapia (Omo MCR)	AJ 871147	-	-	-	-
Rainbow trout (Omy MCR)	NM_001195178	EU 119870	-	AY 534915	AY 534916
Common carp (Cc MCR)	-	AJ 605725	-	-	MC5RI: AJ 783917, MC5RII: AJ 783918
Spiny dogfish (Sa MCR)	-	-	AY 560605	AY 169401	AY 562212
European seabass (DI MCR)	-	-	-	FM 253127	-
Goldfish (Ca MCR)	-	-	-	AJ 534337	AJ 576322
Barfin flounder (Vm MCR)	-	-	-	AB 287975	-

ชนิดสัตว์	GenBank accession no.
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-earmarmoset (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 Gorilla (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

ชนิดสัตว์	GenBank accession no.
Raccoon dog (R. dog MC4R)	EF 450124
Sheep (Sheep MC4R)	EU 622853
Pygmy chimpanzee (P. Chimpanzee MC4R)	FJ 373050
Chimpanzee (Chimpanzee MC4R)	FJ 373057
Hamadryas 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 MCaR)	DQ 213059
(Lf MCbR)	DQ 213060

## ประวัติผู้วิจัย

### หัวหน้าโครงการ

- ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว สุรินทร บุญอนันตนาสาร  
(ภาษาอังกฤษ) Ms. Surintorn Boonanuntasarn
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2097 00017 95 1
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อ

สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224371, 224378

โทรสาร 044-224150

Email : [surinton@ccs.sut.ac.th](mailto:surinton@ccs.sut.ac.th)

### 5. ประวัติการศึกษา

ระดับ	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	วาริชศาสตร์	มหาวิทยาลัยบูรพา
ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก	Ph.D. Doctor of Philosophy	of Aquatic Biosciences	Tokyo University of Fisheries

### 6. ผลงานตีพิมพ์

Boonanuntasarn, 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

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

Boonanuntasarn, 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

- Boonanuntasarn, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 336: 438-443
- Boonanuntasarn, S. 2008. Gene knockdown: a powerful tool for gene function study in fish. *J. World Aquac. Soc.* 39: 311-323.
- Boonanuntasarn, S., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2008. Characterization and organization of the U6 snRNA gene in zebrafish and usage of their promoters to express short hairpin RNA. *Marine Genomics*, doi:10.1016/j.margen.2008.10.001 (available online)
- Boonanuntasarn, B., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2009. Usage of putative zebrafish U6 promoters to express shRNA in Nile tilapia and shrimp cell extracts. *Transgenic Res.* In press
- Jangprai, A., Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G. 2011. Characterization of melanocortin 4 receptor in snakeskin gourami and its expression in relation to daily feed intake and short-term fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173:27-37.
- Vechklang, K., Boonanuntasarn, S., Ponchunchoovong, S., Pirarat, N., and Wanapu, C. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. *Aquac Nutri.* In press.