

การพัฒนาวิธีการศึกษาหน้าที่ของยีนในปลาหมึกโดยเทคนิคยีนน็อคควานี้ได้มีมาอย่างต่อเนื่อง แต่ว่าการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นเทคนิคยีนน็อคควานี้ระยะสั้น ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาพัฒนาของมูลิจีโนมของปลาหมึกแต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการนำยีนในส่วนโปรโมเตอร์ไปใช้ในการแสดงออกสำหรับ short hairpin RNA (shRNA) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการโคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน U6 snRNA และการตัดต่อโปรโมเตอร์เพื่อนำไปใช้สำหรับการสร้างเวกเตอร์สำหรับยีนน็อคควานี้ ผลการโคลนยีน U6 snRNA ในปลาหมึกทำให้ได้ยีน U6 snRNA ที่แตกต่างกัน 3 ยีน ได้แก่ U6-1, U6-2 และ U6-3 ผลจากการสร้าง phylogenetic tree พบว่ายีน U6-1 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของสัตว์เลื้อยคลานมากกว่ายีน U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ยีน U6-2 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของ *Xenopus* และ ยีน U6-3 มีความใกล้เคียงกับยีน U6 snRNA ของแมลงหวี่มากกว่ายีน U6 snRNA ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ผลการศึกษาโครงสร้างของโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA ในปลาหมึกได้จำแนกกลุ่มนิวคลีโอไทด์ TATA box และ proximal sequence element โดยเปรียบเทียบตำแหน่งกับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น พบกลุ่มเบส CCAAT ตรงบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณของ Distal sequence element ผลจากการวิเคราะห์ Blastn analysis กับจีโนมของปลาหมึก พบว่ายีน U6-1 มีการกระจายตัวอยู่ในโครโมโซมต่าง ๆ ของปลาหมึกถึง 555 ชุด ในขณะที่ยีน U6-2 และ U6-3 พบเพียง 1 ชุดในจีโนมของปลาหมึก ผลจากการทำ RT-PCR แสดงให้เห็นว่ายีน U6 snRNA ทั้งสามมีการแสดงออกในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาหมึก เมื่อนำเอาโปรโมเตอร์ไปตัดต่อกับยีนที่สร้างเป็น shRNA พบว่าโปรโมเตอร์ทั้ง 3 ชนิดของยีน U6 snRNA สามารถสร้าง shRNA ได้เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา *in vitro* transcription โดยใช้สารสกัดจากเซลล์ของปลาหมึก ผลการทดสอบดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าโปรโมเตอร์ของยีน U6 snRNA สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการใช้ในการตัดต่อยีนสำหรับยีนน็อคควานี้ระยะยาวได้ในปลาหมึก เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของ shRNA ด้วยโปรโมเตอร์ U6 snRNA (ของปลาหมึก) ในสารสกัดจากเซลล์ของปลาหมึก ปลาในและปลาตุ๊ก พบว่ามี การแสดงออกเมื่อใช้สารสกัดจากเซลล์ของปลาหมึกแต่ไม่มีการแสดงออกในสารสกัดจากเซลล์ของปลาตุ๊กและปลาใน แสดงให้เห็นว่าการนำโปรโมเตอร์ U6 snRNA ของปลาหมึกไปใช้กับปลาอื่น ๆ จะได้ผลหลากหลาย นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ Blastn analysis กับข้อมูลจีโนมของปลาหมึก ได้พบยีน U6 snRNA อีกหนึ่งชนิด (U6-4) แสดงให้เห็นว่าปลาหมึกมียีน U6 snRNA ที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ชนิด

Gene function studies via gene knockdown (GKD) in zebrafish have been intensively conducted; however, most techniques offer only transient interfering effects. Although zebrafish genomic information is available, the U6 snRNA genes and the use of their promoters for short hairpin RNA (shRNA) expression have not been fully characterized. In this study, the structure of the U6 snRNA genes and their genomic organization are elucidated. Additionally, transcription assays utilizing the U6 promoters were conducted to provide sustained vector-based RNA interference (RNAi). Three U6 snRNA genes were characterized and randomly designated as U6-1, U6-2, and U6-3. Phylogenetic tree analysis indicated that the U6-1 gene is closely related to the mammal U6 snRNA genes and that the U6-2 and U6-3 genes are more closely related to *Drosophila* and *Xenopus* U6 snRNA genes. According to the conserved position of the upstream regulatory elements, TATA box and the proximal sequence element were located. The “CCAAT box” is predicted to function as the distal sequence element in the zebrafish U6 snRNA genes. Genomic BLASTn analysis revealed that at least 555 copies of the U6-1 gene are dispersed throughout the zebrafish genome, whereas the U6-2 and U6-3 genes are each present as a single copy. RT-PCR demonstrated that these three U6 snRNA genes are functionally expressed in various tissues. All three putative promoters were able to transcribe shRNA in zebrafish, providing that they have potential to be used for vector-based RNAi in zebrafish. A putative U6 promoter would provide a powerful tool for long-term GKD in zebrafish. The zebrafish U6 promoter efficiently promoted shRNA *in vitro* expression in cell extracts isolated from Nile tilapia, but not from catfish or common carp, demonstrating that the zebrafish U6 promoters promoted variable transcription efficiency across species. Another U6 snRNA was found from the genomic BLASTn search and designated as U6-4, suggesting that there are four different types of zebrafish U6 snRNA genes.