

อรุณศิริ ศรีบุญแสน 2552: การศึกษาคุณลักษณะของ Complementary DNA และการแสดงออกของ ยีน Transferrin ในปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
 หลัก: อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D. 104 หน้า

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Transferrin ของ ปลาอุกอุย โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid Amplification cDNA Ends (RACEs) PCR พบว่า Transferrin cDNA ของปลาอุกอุยมีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 2,183 bp ซึ่งเป็นส่วน Open reading frame 1,884 bp สามารถแปลรหัส เป็นกรดอะมิโนได้ 628 Residues และเมื่อพิจารณาโครงสร้างโปรตีนพบว่า Transferrin ของปลาอุกอุย ประกอบด้วย Iron binding domain จำนวน 2 Lobes ได้แก่ N- และ C-lobes ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์และ กรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันและเชื่อมต่อกันด้วย Interdomain bridge นอกจากนี้โครงสร้าง cDNA ของยีน Transferrin ของปลาอุกอุยยังประกอบด้วยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ใช้จับกับไอออนเหล็ก (Iron-binding ligand) จำนวน 8 ตำแหน่ง ตำแหน่ง Second shell-hydrogen-binding-network, Dilysine trigger และ Carbonate anion จำนวน 8, 4 และ 2 ตำแหน่งตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาลำดับและคุณสมบัติเชิงวิวัฒนาการ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่ายีน Transferrin ของปลาอุกอุย มีความ คล้ายคลึงกับปลากระดูกแข็งมากที่สุดในช่วง 50.5-60.8% และเมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin จากเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาอุกอุยโดยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่ามีการแสดงออกในระดับที่แน่นอน นอกจากนี้ เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออก ของยีน Transferrin ภายหลังจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* 2 ความเข้มข้นที่  $10^7$  และ  $10^9$  Colony forming unit (CFU)/ml เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR พบว่าที่ 96 ชั่วโมง ยีน Transferrin ของปลาอุกอุยซึ่งได้รับแบคทีเรียในระดับ  $10^7$  CFU/ml จะมีระดับการแสดงออกของยีน Transferrin สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนระดับความเข้มข้น  $10^9$  CFU/ml จะมีผลให้ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาอุกอุยลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ตามลำดับ

Aroonsiree Sriboonsan 2009: Characterization of Complementary DNA and Expression of Transferrin Gene in Günther's Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* Günther). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoome, Ph.D. 104 pages.

The full-length of complementary DNA (cDNA) encoded for transferrin gene of Günther's walking catfish was successfully cloned using 5' and 3' Rapid Amplification cDNA Ends (RACEs) techniques. The complete cDNA of Günther's walking catfish transferrin comprised of 2,183 bp and contained open reading frame (ORF) of 1,884 bp or 628 amino acid residues. Structure of protein predicted on transferrin cDNA showed that this cDNA had two different lobes of iron binding domains (N- and C- lobes) which were held together by a short peptide or interdomain bridge. Sequence analysis revealed that these two lobes had high degree of sequence homology for each other. Transferrin cDNA of Günther's walking was also contained 8 iron binding ligands, 8 second shell-hydrogen-binding-networks, 4 dilysine triggers and 2 carbonate anion binding sites. Comparison analyses of nucleotide sequences between transferrin genes of Günther's walking catfish with other known organism transferrins showed the highest similarity ranged from 50.5-60.8% to teleost transferrins. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique indicated that transferrin gene of Günther's walking catfish was uniquely expressed only in liver. Expression analysis by real-time RT-PCR was employed to determine the transcriptional response of transferrin of Günther's walking catfish to bacterial injection at hour 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96, respectively. This study indicated that fish exposed to  $10^7$  colony forming unit (CFU)/ml of *Aeromonas hydrophila* resulted in significant up-regulation of transferrin mRNAs at hour 96 after challenging ( $P < 0.05$ ). On the other hand, the transcriptional expression levels of transferrin were found to be suppressed when fish were injected with  $10^9$  CFU/ml of *A. hydrophila*.