



## ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาคุณลักษณะของ Complementary DNA และการแสดงออกของยีน Transferrin  
ในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther)

Characterization of Complementary DNA and Expression of Transferrin Gene in Günther's  
Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* Günther)

นามผู้วิจัย นางสาวอรุณศิริ ศรีบุญแสน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อาริย์ชน, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาคุณลักษณะของ Complementary DNA และการแสดงออกของยีน Transferrin  
ในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther)

Characterization of Complementary DNA and Expression of Transferrin Gene in Günther's  
Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* Günther)

โดย

นางสาวอรุณศิริ ศรีบุญแสน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2552

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

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Transferrin ของปลาอุกอุย โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid Amplification cDNA Ends (RACEs) PCR พบว่า Transferrin cDNA ของปลาอุกอุยมีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 2,183 bp ซึ่งเป็นส่วน Open reading frame 1,884 bp สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 628 Residues และเมื่อพิจารณาโครงสร้างโปรตีนพบว่า Transferrin ของปลาอุกอุย ประกอบด้วย Iron binding domain จำนวน 2 Lobes ได้แก่ N- และ C-lobes ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันและเชื่อมต่อกันด้วย Interdomain bridge นอกจากนี้โครงสร้าง cDNA ของยีน Transferrin ของปลาอุกอุยยังประกอบด้วยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ใช้จับกับไอออนเหล็ก (Iron-binding ligand) จำนวน 8 ตำแหน่ง ตำแหน่ง Second shell-hydrogen-binding-network, Dilycine trigger และ Carbonate anion จำนวน 8, 4 และ 2 ตำแหน่งตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาความคล้ายคลึงและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่ายีน Transferrin ของปลาอุกอุย มีความคล้ายคลึงกับปลากระดุกแข็งแรงมากที่สุดในช่วง 50.5-60.8% และเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin จากเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาอุกอุยโดยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่ามีการแสดงออกในระดับเท่านั้น นอกจากนี้ เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน 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 ของปลาอุกอุยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) 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*.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก เป็นอย่างสูงในความช่วยเหลือวางแผนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำและแก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ จนเป็นวิทยานิพนธ์ที่สมบูรณ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมเป็นอย่างสูงในความกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนออกมาเป็นรูปเล่มที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราห์ เทพาหุดี ประธานการสอบปากเปล่าขั้น สุดท้าย ดร.ดำริ ดาราวีโรจน์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่ให้คำแนะนำและ ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยในการสอบประมวลความรู้

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร คุณไฝภูมิ งามจันทร์ รวมถึงพี่ ๆ ฟาร์มสุพรรณบุรีทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลาคุณุขเพื่อใช้ในการงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.จุฑาธิ ปานพรหมมินท์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา แนะนำความรู้ที่เป็นประโยชน์ตลอดมา รวมถึงเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ สมาชิกห้องปฏิบัติการ การจัดการสุขภาพสัตว์น้ำและห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่สนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษา คอยเป็นกำลังใจ รวมถึงให้คำปรึกษาดี ๆ รวมถึงน้องแดง ญาติ และเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและเอาใจ ช่วยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

อรุณศิริ ศรีบุญแสน

พฤษภาคม 2552

## สารบัญ

|                                                                                                                                                                      | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| สารบัญ                                                                                                                                                               | (1)  |
| สารบัญตาราง                                                                                                                                                          | (2)  |
| สารบัญภาพ                                                                                                                                                            | (3)  |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ                                                                                                                                            | (5)  |
| คำนำ                                                                                                                                                                 | 1    |
| วัตถุประสงค์                                                                                                                                                         | 3    |
| การตรวจเอกสาร                                                                                                                                                        | 4    |
| อุปกรณ์และวิธีการ                                                                                                                                                    | 17   |
| อุปกรณ์                                                                                                                                                              | 17   |
| วิธีการ                                                                                                                                                              | 20   |
| ผลและวิจารณ์                                                                                                                                                         | 35   |
| ผล                                                                                                                                                                   | 35   |
| วิจารณ์                                                                                                                                                              | 57   |
| สรุปและข้อเสนอแนะ                                                                                                                                                    | 77   |
| สรุป                                                                                                                                                                 | 77   |
| ข้อเสนอแนะ                                                                                                                                                           | 79   |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง                                                                                                                                                 | 80   |
| ภาคผนวก                                                                                                                                                              | 91   |
| ภาคผนวก ก สารเคมีที่ใช้สำหรับงานทางด้าน Molecular techniques                                                                                                         | 92   |
| ภาคผนวก ข การปั่นแยกเม็ดเลือดขาว (Peripheral Blood Leukocytes)                                                                                                       | 95   |
| ภาคผนวก ค การเตรียม Competent cells                                                                                                                                  | 97   |
| ภาคผนวก ง ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน<br>(Identity และ Similarity) ของยีน Transferrin ของปลาคูยกอเมือ<br>เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ | 99   |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน                                                                                                                                          | 104  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่     |                                                                                                                                              | หน้า |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1            | เซลล์และสารชีวโมเลกุลของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงและแบบไม่จำเพาะ เจาะจง                                                                 | 9    |
| 2            | Gene specific primers เพื่อใช้ในการศึกษา 3' และ 5' RACE PCR                                                                                  | 23   |
| 3            | Gene specific primers เพื่อใช้ในการศึกษา RT-PCR                                                                                              | 30   |
| 4            | Gene specific primers เพื่อใช้ในการศึกษา Real-time PCR                                                                                       | 32   |
| 5            | Gene specific primers เพื่อใช้ Amplify และการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA fragment ที่ได้จาก 5' RACE                                         | 36   |
| 6            | ค่าคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับยีน Transferrin ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ | 42   |
| 7            | ตำแหน่ง Iron binding ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับของมนุษย์                                                                   | 47   |
| 8            | ตำแหน่งของ Iron-binding ligand ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ                                            | 48   |
| 9            | คุณลักษณะของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ                                                                    | 58   |
| <br>         |                                                                                                                                              |      |
| ตารางผนวกที่ |                                                                                                                                              |      |
| ง1           | ค่า Identity และ Similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ            | 100  |
| ง2           | ค่า Identity และ Similarity ของลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ               | 102  |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                                                                         | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของมนุษย์                                                                       | 14   |
| 2 ภาพและแผนผังการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' RACE              | 36   |
| 3 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ                           | 37   |
| 4 Full-length ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย                                         | 39   |
| 5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้าน C-lobe และ N-lobe ของ cDNA ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุย                                   | 40   |
| 6 การทำนายโครงสร้างลำดับที่ 2 ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย                                                                  | 41   |
| 7 การหาตำแหน่ง Hydrophobic leader peptide โดยใช้โปรแกรม DAS Transmembrane prediction                                           | 43   |
| 8 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ                                              | 46   |
| 9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยกับยีน Transferrin ของปลาชนิดอื่น ๆ                               | 49   |
| 10 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อีก 34 ชนิด   | 51   |
| 11 การแสดงออกของยีน Transferrin ในเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุยโดยใช้เทคนิค RT-PCR                                    | 52   |
| 12 Amplification plot เพื่อการสร้าง Standard curve ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยด้วยเทคนิค Real-time PCR | 55   |
| 13 Melt curves ของ Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย                                           | 55   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                               | หน้า |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 14     | Standard curve ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลาดุกอุย                                                                                       | 56   |
| 15     | การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยหลังจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas hydrophila</i> ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเทคนิค Real-time PCR | 56   |

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

|                        |   |                                                 |
|------------------------|---|-------------------------------------------------|
| PCR                    | = | Polymerase chain reaction                       |
| RT-PCR                 | = | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| mRNA                   | = | Messenger ribonucleic acid                      |
| cDNA                   | = | Complementary deoxyribonucleic acid             |
| $\mu$ l                | = | Microlitre                                      |
| Ig                     | = | Immunoglobulin                                  |
| NaCl                   | = | Sodium chloride                                 |
| Tf                     | = | Transferrin                                     |
| TfR                    | = | Transferrin receptor                            |
| MHC                    | = | Major histocompatibility                        |
| APC                    | = | Antigen presenting cell                         |
| CMI                    | = | Cell mediated immune                            |
| ROS                    | = | Reactive oxygen species                         |
| MPO                    | = | Myeloperoxidase                                 |
| RACEs                  | = | Rapid Amplification of cDNA Ends                |
| $\text{Fe}^{3+}$       | = | Ferric form                                     |
| $\text{Fe}^{2+}$       | = | Ferrous form                                    |
| $\text{O}_2^-$         | = | Superoxide anion                                |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | = | Hydrogen peroxide                               |
| $\text{OH}^\cdot$      | = | Hydroxyl radical                                |
| TNF- $\alpha$          | = | Tumor necrosis factor $\alpha$                  |
| OTF                    | = | Ovotransferrin                                  |
| LTF                    | = | Lactotransferrin                                |
| MTF                    | = | Melanotransferrin                               |
| GSP                    | = | Gene specific primer                            |
| UPM                    | = | Universal primer                                |
| PBLs                   | = | Peripheral blood leukocytes                     |

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

|         |   |                                     |
|---------|---|-------------------------------------|
| Ala (A) | = | Alanine                             |
| Arg (R) | = | Arginine                            |
| Asn (N) | = | Asparagine                          |
| Asp (D) | = | Aspartic acid                       |
| Cys (C) | = | Cysteine                            |
| Glu (E) | = | Glutamic acid                       |
| Gln (Q) | = | Glutamine                           |
| Gly (G) | = | Glycine                             |
| His (H) | = | Histidine                           |
| Ile (I) | = | Isoleucine                          |
| Leu (L) | = | Leucine                             |
| Lys (K) | = | Lysine                              |
| Met (M) | = | Methionine                          |
| Phe (F) | = | Phenylalanine                       |
| Pro (P) | = | Proline                             |
| Ser (S) | = | Serine                              |
| Thr (T) | = | Threonine                           |
| Trp (W) | = | Tryptophan                          |
| Tyr (Y) | = | Tyrosine                            |
| Val (V) | = | Valine                              |
| Asx (B) | = | Asparagine หรือ Aspartic acid       |
| Glx (Z) | = | Glutamine หรือ Glutamic acid        |
| Xle (J) | = | Leucine หรือ Isoleucine             |
| Xaa (X) | = | Unspecified หรือ Unknown amino acid |

## การศึกษาคุณลักษณะของ Complementary DNA และการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus* Günther)

### Characterization of Complementary DNA and Expression of Transferrin Gene in Günther's Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* Günther)

#### คำนำ

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตต่อพื้นที่สูงสุดและให้ผลผลิตต่อปีสูงสุดในอันดับ 1-3 ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา โดยมีผลผลิตเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 40,000 ตัน/ปี และเป็นที่ทราบกันดีว่าปลาดุกที่เลี้ยงเป็นการค้าในประเทศไทยมีหลายชนิด ที่นิยมเลี้ยงกันแพร่หลายในยุคแรก ๆ คือปลาดุกด้าน หลังจากภาวะราคาคตกต่ำเกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus* Günther) และปลาดุกลูกผสมบักอูย (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) แทน (อุทัยรัตน์, 2544) โดยปลาดุกอูยนั้นเป็นปลาที่นิยมนำมาเลี้ยงและบริโภค เนื่องจากเนื้อนุ่มรสชาติดี และขายได้ราคาสูงกว่าปลาดุกชนิดอื่น ๆ แต่ในปัจจุบันปลาดุกอูยมีการเลี้ยงที่ลดน้อยลงมาก เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้าและเกิดโรคได้ง่าย โดยโรคที่สร้างความเสียหายในการเลี้ยงปลาดุกอูยส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย ได้แก่ โรคกักหุบวม ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* รวมถึงโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา และในบางครั้งจะพบโรคที่เกิดจากการขาดแร่ธาตุหรือวิตามินบางชนิด เช่น วิตามินซี ปัจจุบันเกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงปลาดุกบักอูยแทน เนื่องจากปลาดุกลูกผสมชนิดนี้มีการเจริญเติบโตเร็วและยังมีรสชาติดีเหมือนกับปลาดุกอูยอีกด้วย

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของปลากระดูกแข็ง (Teleost) เพิ่มขึ้น เนื่องจากข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้นอกจากจะทำให้เราเข้าใจกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลาดีขึ้นแล้ว ข้อมูลดังกล่าวยังจะช่วยให้สามารถหาวิธีการหรือแนวทางใหม่ ๆ มาใช้ในการป้องกันรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นในปัจจุบันทำให้ทราบว่าระบบภูมิคุ้มกันของปลากระดูกแข็งโดยทั่วไปจะประกอบด้วยระบบภูมิคุ้มกัน 2 ส่วนที่มีความคล้ายคลึงกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูงโดยทั่วไป ซึ่งได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Specific immunity) และระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงข้อมูลการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในปลาดุกอูยในปัจจุบัน กลับพบว่ามีน้อยมากเมื่อเทียบกับปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่น โดยเฉพาะการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับอณูวิทยา

ภูมิคุ้มกันพบว่ามีเพียงการสร้างห้องสมุดของยีนจากตับและกล้ามเนื้อของปลาตุ๊กตาคูโดยใช้เทคนิค Expressed sequence tags (ESTs) เท่านั้น โดยห้องสมุดของยีนที่ได้จากตับจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเท่ากับ 11.2% ได้แก่ ยีน Transferrin, Complement C3-H1, Pentraxin และ Metallothionein (Panprommin, 2008) แต่อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันนี้ยังคงไม่พบข้อมูลที่รายงานถึงการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะและการแสดงออกของยีนเหล่านี้เพิ่มเติม

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ

Complementary DNA (cDNA) และการแสดงออกของยีน Transferrin ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาตุ๊กตาคูทั้งในสภาวะปกติและที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดย Transferrin นั้นเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงชนิดหนึ่ง ซึ่งมีความสามารถในการจับกับไอออนเหล็กเพื่อควบคุมและสำรองปริมาณธาตุชนิดนี้ในร่างกาย และจากคุณสมบัตินี้ Transferrin จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้ไอออนเหล็กเพื่อการเจริญเติบโต ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นส่วนที่จะทำให้สามารถเข้าใจถึงระบบการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลาตุ๊กตาคูได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาเพื่อหาแนวทางในการควบคุมป้องกันและแก้ไขปัญหาโรคต่าง ๆ อย่างมีประสิทธิภาพได้ต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุย
2. เพื่อศึกษาลักษณะของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุย
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ
4. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ในเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุย
5. เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ทั้งในสภาวะปกติและมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของปลาดุกอุย

## การตรวจเอกสาร

### 1. ปลาอุกอุย

#### 1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปลาอุกอุยมีชื่อสามัญคือ Günther's walking catfish และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias macrocephalus* Günther เป็นปลาน้ำจืดพื้นบ้านของไทยชนิดหนึ่ง พบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป เช่น ห้วย หนอง คลอง บึง แม่น้ำ หรือกว๊าน แม้กระทั่งแหล่งน้ำที่มีน้ำเพียงเล็กน้อย และน้ำที่มีลักษณะขุ่นหรือเป็นโคลนมาก ๆ ปลาอุกอุยก็สามารถอาศัยอยู่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากปลาอุกอุยมีอวัยวะพิเศษที่ช่วยในการหายใจ นอกจากนี้ปลาอุกอุยยังสามารถอาศัยอยู่ในบริเวณที่น้ำมีสภาพเป็นน้ำกร่อย หรือค่อนข้างเค็มได้เป็นอย่างดี ปลาอุกอุยนอกจากจะพบในประเทศไทยแล้ว ยังพบได้ในประเทศต่าง ๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศพม่า ลาว กัมพูชา เวียดนามและอินโดนีเซียอีกด้วย (วิเศษ, 2534) โดย Nelson (1994) ได้จัดลำดับทางอนุกรมวิธานปลาอุกอุยไว้ดังนี้

Kingdom    Animalia

Phylum    Chordata

Subphylum    Vertebrata

Superclass    Gnathostoma

Class    Actinopterygii

Order    Siluriformes

Family    Clariidae

Genus    *Clarias*

Species    *macrocephalus*

## 1.2 ชีวิตวิทยาของปลาดุกอุย เกิดขึ้นและคณะ (2538) ได้รายงานไว้ ดังนี้

### 1.2.1 ลักษณะทั่วไป

ปลาดุกอุยมีลักษณะคล้ายปลาดุกด้านมากแต่จะแตกต่างกันที่ปลายกะโหลกท้ายทอยจะโค้งมน ความกว้างของฐานยาวประมาณ 3-5 เท่าของความยาวครีบล้าง ครีบก้นและครีบท้องไม่ติดกัน ระยะห่างจากกระดูกท้ายทอยถึงจุดเริ่มต้นของครีบล้างยาวประมาณ 1 ใน 5-7 ของความยาวของหัว ครีบล้างมีก้านครีบบนอยู่ระหว่าง 68-72 อัน ครีบก้นมีก้านครีบบนอยู่ระหว่าง 47-52 อัน ลักษณะของฟันที่เพดานปากและที่ขากรรไกรเป็นฟันซี่เล็ก ๆ จำนวนกระดูกซี่กรองเหงือกมีประมาณ 32 ซี่

### 1.2.2 ความแตกต่างระหว่างเพศและฤดูวางไข่

สามารถสังเกตได้ชัดเจนจากลักษณะอวัยวะเพศ โดยเฉพาะทางออกของไข่และน้ำเชื้อ ซึ่งจะอยู่ถัดจากทวารหนักลงมา ปลาเพศเมียจะมีอวัยวะรูปร่างรูปไข่ปลายมน ส่วนปลาเพศผู้มีอวัยวะเพศยาวเรียวยาวปลายแหลม ฤดูวางไข่ของปลาดุกอุยจะอยู่ในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคม-ตุลาคม ซึ่งเมื่อถึงฤดูวางไข่ปลาเพศเมียจะมีท้องอูมพอง ส่วนเพศผู้จะมีลำตัวยาวเรียวยาวเห็นได้ชัด

### 1.2.3 ข้อแตกต่างระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกด้าน

วิเศษ (2534) รายงานว่าปลาดุกอุยและปลาดุกด้านมีลักษณะแตกต่างกันที่สามารถสังเกตเห็นชัดเจน ดังนี้

1.2.3.1 ฐานกระดูกท้ายทอยของปลาดุกอุยมีลักษณะป้านและสั้น ส่วนของปลาดุกด้านมีลักษณะแหลมและยาวกว่า แต่ในขณะที่ปลาดุกอุยยังมีขนาดเล็ก กระดูกท้ายทอยจะแหลมเช่นเดียวกับปลาดุกด้าน เมื่อโตขึ้นจึงค่อย ๆ มนเข้า ถ้าจะแยกดูปลาดุกอุยออกจากปลาดุกด้านควรสังเกตจากสีและจุดประข้างลำตัวจะชัดเจนกว่า

1.2.3.2 ลำตัวปลาดุกอุยมีผิวค่อนข้างเหลืองถึงเหลืองปนเทา และมีจุดประตามบริเวณด้านข้างลำตัว ส่วนปลาดุกด้านมีสีเทาเข้มและไม่มีจุดประตามลำตัว

1.2.3.3 เนื้อของปลาดุกอุยมีสีค่อนข้างเหลืองถึงเหลืองเข้ม เนื้อฟูนุ่ม ส่วนเนื้อปลาดุกด้านมีสีขาวและเนื้อจะแข็งกว่าเนื้อปลาดุกอุยเล็กน้อย

1.2.3.4 ไข่ของปลาดุกอุยมีสีน้ำตาลและขนาดโตกว่าไข่ปลาดุกด้าน ซึ่งมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรือสีเหลืองส้ม

1.2.3.5 อวัยวะของปลาดุกอุยมีบางส่วนแตกเป็นแขนง ลักษณะคล้ายนิ้วมือ แต่ในปลาดุกด้านจะไม่พบลักษณะดังกล่าว

#### 1.2.4 อาหารและนิสัยการกินอาหาร

ปลาดุกอุยมีนิสัยชอบกินอาหารตามหน้าดิน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นโคลน เนื่องจากปลาดุกอุยมีตาที่เล็กไม่ได้สัดส่วนกับขนาดตัว แต่มีหนวดที่รับรู้สีกได้ดี ปลาดุกจึงใช้หนวดมากกว่าตาในการหาอาหาร ชอบกินอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ เช่น ตัวอ่อนของแมลงในน้ำ แมลง กุ้งและลูกปลาเล็ก ๆ บางชนิด

### 1.3 โรคและปัญหาของปลาดุกอุย

#### 1.3.1 สาเหตุของโรค

อุทัยรัตน์ (2544) รายงานว่าลักษณะอาการที่เรียกรวม ๆ กันว่า “เป็นโรค” นั้นเกิดได้จากสาเหตุต่าง ๆ กันดังนี้

1.3.1.1 โรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย โดยส่วนใหญ่เชื้อโรคมาสู่ตัวปลาได้โดยมากับน้ำหรือติดมากับเครื่องมือที่ใช้ในบ่อ หรือกระจายมาจากปลาในบ่อเดียวกัน ในสภาพปกติปลาจะมีภูมิคุ้มกันทำให้เชื้อโรคทำอันตรายไม่ได้ เมื่อเกิดสภาพไม่เหมาะสม เช่น น้ำในบ่อเสีย อากาศเย็น ฝนตกหนัก ปลาถูกรบกวนมาก ระบบภูมิคุ้มกันของปลาจะทำงานไม่เต็มที่ปลาก็จะเป็นโรค ดังนั้นจึงควรระวังไม่ให้ปลาเกิดความเครียด จะช่วยลดความเสี่ยงของการเป็นโรคลง โดยเฉิดฉันและคณะ (2538) ได้รายงานถึงโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรคตัวดำซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Flexibacter columnaris* โรคท้องบวม กกหูบวม ตัวเป็นแผล ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย

*Aeromonas hydrophila* ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นเชื้อโรคที่สร้างความเสียหายในการเพาะเลี้ยงปลาคู่มากที่สุดในปัจจุบัน

1.3.1.2 โรคที่เกิดจากปรสิตภายนอก ในน้ำมีปรสิตหลายชนิดที่ทำอันตรายต่อปลาได้ทำให้เกิดปัญหาบ่อย คือเห็บกระซัง (*Trichodina* sp.) และปลิงใส (*Gyrodactylus* sp. และ *Dactylogyrus* sp.) ปรสิตเหล่านี้จะเกาะเหงือกทำให้ปลาหายใจลำบากเกิดความรำคาญ ถ้ามีมาก ๆ ปลาอาจตายได้ นอกจากนี้ยังเกาะตามลำตัวทำให้ปลาเกิดความรำคาญ เกิดแผลและเป็นช่องทางให้เกิดโรคชนิดอื่นได้

1.3.1.3 โรคที่เกิดจากธาตุอาหาร เช่น โรคกะโหลกร้าวและหนดกุด ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากการขาดวิตามินซีในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลา (เจดั่นและคณะ, 2538) แม้อาหารที่ผลิตจากโรงงานจะมีคุณค่าทางอาหารครบถ้วนตามความต้องการของปลาแต่ถ้านำมาเก็บไว้นานเกินไปหรือเก็บไว้ที่ไม่เหมาะสมก็อาจทำให้สารบางชนิดเสื่อมไปได้

1.3.1.4 โรคคิซ่าน ปลาคูที่เป็นโรคคิซ่านจะมีอาการตัวเหลือง ปลาป่วยจะค่อย ๆ ทอยตายในระยะแรกของการเป็นโรค และจะตายเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ อย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา โรคนี้พบบ่อยในช่วงอากาศร้อน ปลาป่วยจะมีตับสีน้ำตาลอ่อนปนเหลืองซีด ไขมันในช่องท้องมีสีเหลือง อาจพบของเหลวสีน้ำตาลแดงปนเหลืองในช่องท้อง ม้ามและไตบวม กล้ามเนื้อลำตัวมีสีเหลือง ถุงน้ำดีมีขนาดใหญ่กว่าปกติและมีน้ำดีสีเหลืองบรรจุอยู่เต็ม ปลาป่วยจะแสดงอาการของโรคโลหิตจางอย่างเห็นได้ชัด ผลการศึกษาทางด้านโลหิตวิทยาปรากฏว่าปริมาณ Hematocrit เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว Hemoglobin และ Bilirubin ของปลาที่เป็นโรคคิซ่านมีค่าแตกต่างจากปลาปกติอย่างเห็นได้ชัด ลักษณะทางพยาธิสภาพพบว่ามีผลึกของสารสีเหลืองทองกระจายอยู่ทั่วไประหว่างเซลล์ตับและภายใน Cytoplasm ของ Macrophage ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มในตับ นอกจากนี้ยังพบผลึกชนิดเดียวกันนี้ภายใน Hemopoietic tissue และท่อไตของปลาป่วยด้วย ระหว่างเซลล์ของม้ามก็พบผลึกสีเหลืองนี้กระจายอยู่ทั่วไปเช่นกัน ในขณะที่เซลล์ของซีเหงือกมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยคือ การเกิดการบวมขึ้นของเซลล์เยื่อซีเหงือกและการเกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อของซีเหงือกอย่างไม่รุนแรง (สุปราณีและคณะ, 2535)

## 2. ระบบภูมิคุ้มกันของปลากระดูกแข็ง (Teleost)

ระบบภูมิคุ้มกันของปลากระดูกแข็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบใหญ่ ๆ ได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific หรือ Innate immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Specific หรือ Adaptive immunity) (Ellis, 1999) เช่นเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ซึ่งถูกจำแนกโดยชนิดของ Leukocytes ที่พบหลากหลายชนิด, Immunoglobulin (Ig), Complement factor และโมเลกุลของ Cytokines (Yada, 2007) ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองแบบยังสามารถแบ่งออกเป็นกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่คล้ายคลึงกันได้ 2 กลไก ได้แก่ กลไกการตอบสนองแบบใช้โปรตีนหรือสารน้ำในน้ำเลือด (Humoral defenses) และกลไกแบบใช้เซลล์ (Cellular หรือ Cell mediated defenses) โดย Magnadóttir (2006) รายงานว่าระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบจะทำงานที่สัมพันธ์เกี่ยวข้องกัน ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงจะเกิดขึ้นก่อนและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงจะเกิดภายหลัง โดยภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นและการหายเป็นปกติภายหลังการติดเชื้อนั้นเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างกลไกแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับกลไกแบบจำเพาะเจาะจง (Lorenzen, 1993)

### 2.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เกี่ยวข้องกับการป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งเกิดขึ้นตั้งแต่ยังไม่พบกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมใด ๆ เลย (Bols *et al.*, 2001) และไม่มีการจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดเดิมเมื่อพบเป็นครั้งที่สอง การตอบสนองแบบนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและใช้เวลาในการตอบสนองสั้น โดย Bayne and Gerwick (2001) รายงานว่า ระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงแล้วพบว่า ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงประกอบด้วยเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ (Mobile cells) และอยู่กับที่ (Fixed cells) รวมถึงโมเลกุลจำนวนมากที่ละลายอยู่เป็นของเหลวภายในร่างกายซึ่งมีความหลากหลายสูง ในขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงจะประกอบด้วยเซลล์ Lymphocytes เป็นหลัก ซึ่งมีหน้าที่ในการทำงานเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงออกเป็นกลไกย่อย ๆ ได้ 3 กลไกดังนี้

**ตารางที่ 1** เซลล์และสารชีวโมเลกุลของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงและแบบไม่จำเพาะเจาะจง

| Types             | Adaptive immunity | Innate immunity                                                                                                                 |
|-------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cells             | T and B-cells     | NK cells, monocytes/macrophage, granulocytes (predominantly neutrophils)                                                        |
| Tissues           | Lymphoid          | Liver, spleen, pronephros                                                                                                       |
| Regulators        | Cytokines         | Cytokines                                                                                                                       |
| Humoral component | Igs               | Complement system, clotting system, antiproteases, metal-binding, proteins, lectins, lysozyme, antimicrobial peptides, opsonins |
| Kinetics          | ตอบสนองอย่างช้า ๆ | ตอบสนองอย่างรวดเร็ว                                                                                                             |

**ที่มา:** Bayne and Gerwick (2001)

2.1.1 กลไกการตอบสนองทางกายภาพ (Physical defenses) กลไกการตอบสนองแบบนี้ถือว่าเป็นกลไกการป้องกันตัวด่านแรก (Secombes *et al.*, 2001) ซึ่งประกอบด้วย เกิดเมื่อ ผิวหนังและเหงือก (Magnadóttir, 2006) และ Jones (2001) ได้รายงานว่าบริเวณผิวหนังของปลานั้นประกอบไปด้วย Immunoglobulin, Complement, C-reactive protein, Lectins, Lysozyme และ Haemolysins ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้จะมีหน้าที่สำคัญในการทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกายโดยตรง

2.1.2 กลไกการตอบสนองแบบใช้สารน้ำและโปรตีนในน้ำเลือด (Humoral defenses) จะเกิดการตอบสนองเมื่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสามารถผ่านกลไกแบบ Physical defense เข้ามาได้ โดยมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองแบบนี้ เช่น Transferrin, Complement และ Cytokine และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เมื่อเกิดการอักเสบ (Inflammation) เกิดขึ้น จะส่งผลให้เกิดกระบวนการหลั่งของ Cytokine (Cytokine cascade) โดย Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) จะหลั่งออกมาก่อน จากนั้น Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) และ Interleukin-6 (IL-6) จึงถูกหลั่งตามออกมา โดยการหลั่งของ Cytokines เหล่านี้จะมีบทบาทเป็น Chemoattractants ซึ่งจะพาเนื้อมานำให้ Neutrophils และ Macrophages เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ ดังนั้นจึงเรียก Cytokines เหล่านี้ว่าเป็น Chemokines (Secombes *et al.*, 2001)

2.1.3 กลไกการตอบสนองแบบใช้เซลล์ (Cellular หรือ Cell-mediated defenses) มีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองแบบนี้ ได้แก่ เซลล์ Macrophage และเซลล์ Polymorpho-nuclei (PMN cell) ซึ่งเซลล์ PMN ในปลาจะมีหน้าที่เช่นเดียวกับ Neutrophil ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โดย Macrophage นั้นจะมีหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอมแบบ Phagocytosis และยังเป็นเซลล์ที่เชื่อมระหว่างระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงเข้าด้วยกัน ซึ่งทั้ง PMN และ Macrophage สามารถจับกินและกำจัดแบคทีเรียได้โดยการผลิต Reactive oxygen species (ROS) ออกมาในกระบวนการ Respiratory burst ซึ่งสารที่เกิดจากกระบวนการนี้จะรวมถึง Superoxide anion ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  และ Hydroxyl free radical (OH) ซึ่งจะไปลดความสามารถของแบคทีเรียในการก่อโรคได้ โดย Ellis (1999) ได้รายงานว่า Neutrophil จะสามารถผลิตเอนไซม์ Myeloperoxidase (MPO) ในปริมาณมาก ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารบางชนิดที่สามารถฆ่าเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์ได้ เช่น Bactericidal hypohalite ions มาจาก Halide ions และ  $H_2O_2$  นอกจากนี้ยังได้รายงานเพิ่มว่า Macrophage สามารถรับ MPO จาก Neutrophil ได้ ซึ่งอาจจะมีผลในการเพิ่มความสามารถในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียอีกด้วย

## 2.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง

โดยทั่วไปแล้วปลากระดูกแข็งมีระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้เพื่อทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมแบบจำเพาะเจาะจง ระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบนี้จะมีลักษณะสำคัญคือมีการจดจำและจะเกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วและรุนแรงเมื่อพบกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมชนิดเดิมเป็นครั้งที่สอง ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะใช้เซลล์ Lymphocytes และโมเลกุล Antibody เป็นโมเลกุลหลักในการควบคุมเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้ามาภายในร่างกาย ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดการติดเชื้อของไวรัส การเกิด Phagocytosis ต่อเชื้อโรค ตลอดจนการเกิด Opsonization และการกระตุ้น Complement ผ่านทาง Classical pathway (Lorenzen, 1993) ซึ่งระบบการตอบสนองต่อเชื้อโรคแบบนี้ยังสามารถแบ่งเป็น 2 ส่วนที่สำคัญคือ

2.2.1 กลไกการตอบสนองแบบใช้สารน้ำและโปรตีนในน้ำเลือด (Humoral defenses) มี Immunoglobulin หรือ Antibody เป็นโปรตีนหลักที่สร้างจาก B-lymphocytes ซึ่งอยู่ในม้ามและไตส่วนหน้าของปลา ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูง เช่น มนุษย์ จะพบ Immunoglobulin ทั้งหมด 5 class ได้แก่ IgA, IgM, IgD, IgG และ IgE อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลพื้นฐานในปัจจุบันทำให้พบว่าในปลากระดูกแข็งสามารถค้นพบ Immunoglobulin ได้หลายชนิด เช่น IgM, IgD ซึ่งมี

ความคล้ายคลึงกับ IgM และ IgD ของสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไป (Reynaud and Deschaux, 2006) รวมทั้ง IgT และ IgZ ด้วย โดย Hansen *et al.* (2005) ได้รายงานถึงการค้นพบ IgT ในปลา Rainbow trout และ Danilova *et al.* (2005) รายงานถึงการแสดงออกของ IgZ ในปลา Zebrafish โดยในปลาชนิดนี้ที่มีขนาดใหญ่พบว่า IgZ จะมีการแสดงออกในไตและต่อมไทมัสเท่านั้น

### 2.2.2 กลไกการตอบสนองแบบใช้เซลล์ (Cellular หรือ Cell-mediated defenses)

ซึ่งเป็นกลไกการตอบสนองที่เทียบเท่ากับในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมชั้นสูง โดยมี T lymphocyte เป็นชนิดของเซลล์ขั้นต้น ที่ใช้เป็นกลไกในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมจำพวก Tumor, Cancer, ไวรัส และแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* sp. หรือแบคทีเรียชนิดที่ก่อโรคแบบ Intracellular โดย Jansson *et al.* (2003) รายงานว่าเชื้อโรคที่เป็นแบคทีเรียชนิด Intracellular ได้แก่ *Mycobacterium bovis*, *M. leprae*, *M. tuberculosis* และ *Listeria monocytogenes* เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองแบบ Cell mediated immune (CMI) response อย่างไรก็ดีตาม การศึกษาเพื่อจำแนก T cell ในปลาในกลุ่ม Teleost นั้นยังไม่มีรายงานมาก่อน แต่พบการรายงานของโมเลกุล T cell receptor (TCR) แทน ซึ่ง TCR นั้นเป็นโมเลกุล Antigen receptor ซึ่งถูกทำให้แสดงออกโดย T lymphocytes ซึ่งพบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีขากรรไกรทุกชนิด (Jawed vertebrates) ขณะที่ปลาในกลุ่มที่ไม่มีขากรรไกร (Jawless fish) กลับไม่พบโมเลกุลของ TCR นี้เลย โมเลกุลของ TCR เป็นแบบ Heterodimer ซึ่งประกอบด้วยสาย  $\alpha/\beta$  หรือ  $\gamma/\delta$  โดยแต่ละสายจะประกอบด้วย Variable (V) และ Constant (C) domain และ TR ยังจัดอยู่ในกลุ่ม Immunoglobulin superfamily (IgSF) อีกด้วย โดยโมเลกุล T-cell จะถูกกระตุ้นเมื่อ TCR heterodimer ( $\alpha/\beta$  หรือ  $\gamma/\delta$ ) มารวมกับ CD3 complex เพื่อใช้ในการจดจำสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจง หลังจากนั้น Major histocompatibility (MHC) ซึ่งมีการแสดงออกบน Antigen presenting cell (APC) จะทำการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นให้กับ TCR ต่อไป (Randelli *et al.*, 2008)

## 3. Transferrin

### 3.1 คุณสมบัติโดยทั่วไป

Transferrin เป็น Glycoprotein ชนิดหนึ่ง มีหน้าที่หลักในการขนส่งไอออนเหล็กจากน้ำเลือดไปยังเซลล์ หรือช่วยควบคุมระดับของไอออนเหล็กของของเหลวที่อยู่ภายในร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Lambert *et al.*, 2005a; James and Mason, 2008) นอกจากนี้ยังมี Ovotransferrin (OTF), Lactotransferrin (LTC) และ Melanotransferrin (MTF) จัดอยู่ในกลุ่มของ

Transferrin superfamily ด้วยเช่นกัน โดย OTF พบในไข่ของสัตว์ปีก และ LTF พบในน้ำนม แต่ MTF ยังไม่ทราบถึงการทำงานที่แน่นอน ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกี่ยวข้องกับการขนส่งไอออนเหล็กหรือไม่ (Rengmark and Lingaas, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าโดยทั่วไปแล้ว Transferrin มีการสังเคราะห์ปริมาณมากในเซลล์ของตับ (Hepatocytes) แล้วจึงค่อยหลั่งออกสู่กระแสเลือด (Sergeant *et al.*, 2003) และ Gomme and McCann (2005) ได้รายงานว่ายังพบการแสดงออกของ Transferrin ในเซลล์ Sertoli, Ependymal, Oligodendroglia, Metastatic melanoma cell lines และ Cell lines ของมะเร็งทรวงอก (Breast cancer cell lines) ในมนุษย์อีกด้วย

### 3.2 โครงสร้างของ Transferrin

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้าง Tertiary structure ของ Transferrin แล้ว จะพบว่าโปรตีนชนิดนี้ทางด้าน N และ C lobes จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันซึ่งเชื่อกันว่าเป็นผลมาจากการเกิด Gene duplication (Stafford and Belosevic, 2003) โดยแต่ละ Lobe ของ Transferrin นั้นจะประกอบด้วยตำแหน่งที่จับกับไอออนเหล็ก (Iron-binding site) อย่างจำเพาะเจาะจง (Abe *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Aisen (2004) รายงานว่า Transferrin เป็นโปรตีนที่อยู่ในน้ำเลือดซึ่งประกอบด้วยตำแหน่ง  $\text{Fe}^{3+}$  binding sites ที่มีความจำเพาะเจาะจงจำนวน 2 ตำแหน่ง และมี 2 Domains หลักซึ่งประกอบด้วย  $\alpha$ -helices ที่จะไปหุ้มบริเวณส่วนตรงกลางของ  $\beta$ -sheet backbone (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ทั้ง 2 Lobe ยังเชื่อมต่อกันโดยใช้บริเวณของสาย Peptide ขนาดเล็ก (ประมาณ 15 Amino acids) ซึ่งเรียกว่า “Interdomain bridge” ซึ่งจะมีความยาวแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของ Transferrin (Stafford and Belosevic, 2003)

### 3.3 Polymorphism ของ Transferrin

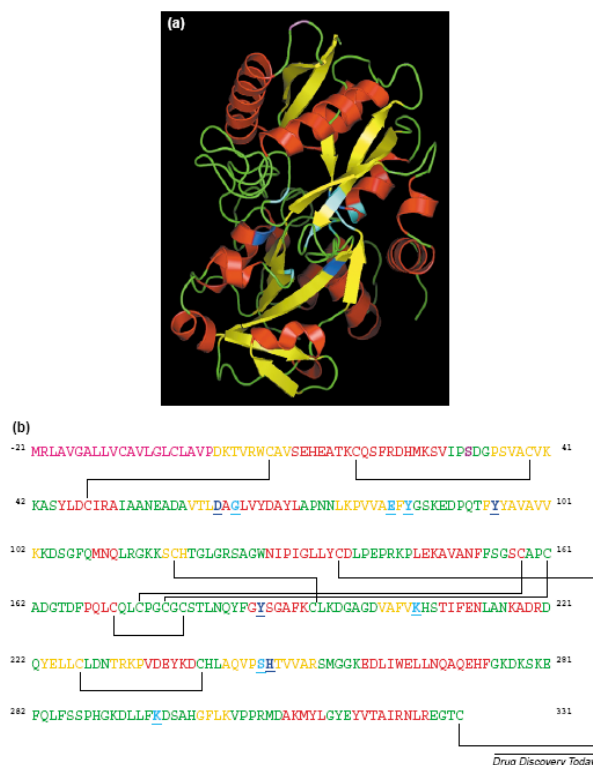
Stafford and Belosevic (2003) รายงานว่าในปัจจุบัน ความเป็น Polymorphism ของยีน Transferrin ได้รับการพิสูจน์และจำแนกแล้วว่าสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แมลง กลุ่มของ Crustaceans ปลา และในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากคุณสมบัติความเป็น Polymorphism นี้ Transferrin จึงจัดว่าเป็นยีนซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Zatta *et al.*, 2005) โดยในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีลักษณะจำเพาะภายในกลุ่มประชากร นอกจากนี้ภายในกลุ่มประชากรเดียวกันก็สามารถพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันได้ โดย Wojtczak *et al.* (2007) รายงานว่า Transferrin ในสัตว์มีกระดูกสันหลังถูกจำแนกกว่าเป็นยีนที่มีความเป็น Genetic polymorphism สูง เนื่องจากยีน Transferrin นั้นพบว่าเป็น

องค์ประกอบในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันหลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานว่ามากกว่า 30 ชนิด โดย Gomme and McCann (2005) รายงานถึง Transferrin ของมนุษย์ว่าประกอบด้วย 3 Isotypes หลัก ได้แก่ B, C และ D นอกจากนี้ Teixeira *et al.* (2002) ได้รายงานว่าในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่จะมีอัลลีลของยีน Transferrin เป็นแบบ Co-dominant และความผันแปร (Variants) ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากกรดอะมิโนที่แตกต่างกันเพียงตำแหน่งเดียว (Single gene locus)

### 3.4 หน้าที่ของ Transferrin

โดยทั่วไปหน้าที่หลักของ Transferrin คือการเป็น Iron-binding protein ซึ่ง 2 ใน 3 ชนิดของ Transferrin ที่พบใน Serum จะเป็น Apotransferrin ซึ่งสามารถจับกับไอออนเหล็กที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว (Kim *et al.*, 2008) โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้ไอออนเหล็กเพื่อการเจริญเติบโต และแบคทีเรียพวกนี้มักจะเป็นแบคทีเรียก่อโรค (Kim and Lee, 2006) ซึ่ง Stafford and Belosevic (2003) รายงานว่า การจับไอออนเหล็กของ Transferrin จึงทำให้เกิดสภาวะการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Bacteriostatic environment) โดยไปจำกัดความสามารถในการใช้ไอออนเหล็กของแบคทีเรียในการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้ Transferrin จะทำหน้าที่เป็น Iron-binding protein แล้ว Transferrin ยังมีหน้าที่อื่น ๆ อีกมากมาย (Multi-task protein) เช่น การเป็น Antioxidative (Kim *et al.*, 2008) และ Antimicrobial protection รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การเกิดกระบวนการ Differentiation และ Cytoprotection (Gomme and McCann, 2005) นอกจากนี้ Transferrin ยังถือว่าเป็น Acute-phase protein เนื่องจากความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหากอยู่ภายใต้สภาวะเครียดหรือเกิดการติดเชื้อ (Kim *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับการรายงานของ Stafford and Belosevic (2001) ว่า Transferrin ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) จะทำหน้าที่เป็น Acute-phase protein ซึ่งจะมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Up-regulated) เมื่อเกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่ง Raida and Buchmann (2009) รายงานว่า Acute-phase proteins และ Complement factors เป็นโมเลกุลซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ Innate immune response ต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้จะถูกสังเคราะห์โดยเซลล์ตับ (Hepatocytes) ซึ่งการผลิตโมเลกุลเหล่านี้ถูกเหนี่ยวนำโดย Macrophage activating factor และทำให้เกิดการรวมตัวกัน (Combination) ของ Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) และ Interleukin-6 (IL-6) จากนั้นจะถูกหลั่งออกมาโดย Macrophage เมื่อมีเชื้อโรคโดยเฉพาะแบคทีเรียเข้ามาภายในร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่า Transferrin ยังมี Biological functions อื่น ๆ เช่น การที่ Transferrin ไปเหนี่ยวนำให้เกิด Neutrophilic end-stage

maturation รวมถึงการช่วยในการเจริญเติบโตและการ Differentiation ของ Promyelocytic cell line (HL-60) อีกด้วย (Stafford and Belosevic, 2003)



ภาพที่ 1 โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของมนุษย์ (สีเหลือง;  $\beta$ -sheets, สีแดง ;  $\alpha$ -helix, สีเขียว; Random coil)

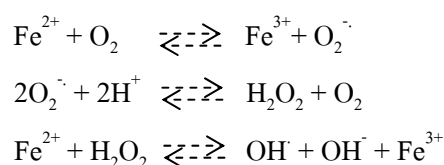
ที่มา: Gomme and McCann (2005)

### 3.5 กลไกการทำงานของ Transferrin

โดยทั่วไปแล้วกลไกการทำงานของ Transferrin จะเริ่มต้นโดยโมเลกุลของ Saturated transferrin ที่เรียกว่า “Apotransferrin” ที่อยู่ในน้ำเลือดจะถูกส่งมาจับกับไอออนเหล็กจนกลายเป็นโมเลกุลที่เรียกว่า “Holotransferrin (HoloTf)” (Haber *et al.*, 2008) ตรงบริเวณที่มีการแสดงออกของ Transferrin receptor (TfR) ซึ่ง Peng *et al.* (2007) รายงานว่า TfR จะมีการแสดงออกมากในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็วกว่าเซลล์ที่แบ่งตัวช้า หลังจากการจับกับ Receptor จนกลายเป็น Transferrin-transferrin receptor complex แล้ว Complex นี้จะเข้าสู่ภายในเซลล์บริเวณของ Endocytic vesicles ไอออนเหล็กที่ถูกจับไว้จะถูกปล่อยออกมาจาก Complex และเกิดกระบวนการ

อื่น ๆ ต่อไป ขณะที่ Transferrin จะวนกลับมาอยู่บนผิวเซลล์อีกครั้งและถูกปล่อยออกไปในกระแสเลือดเพื่อไปจับกับไอออนเหล็กตัวใหม่อีกครั้ง

โดยทั่วไปลักษณะพื้นฐานของไอออนเหล็กอิสระ (Free iron) สามารถพบได้ทั้งรูปแบบ  $\text{Fe}^{2+}$  (Reduced ferrous) และ  $\text{Fe}^{3+}$  (Oxidized ferric) (Krewulak and Vogel, 2008) ซึ่งไอออนเหล็กอิสระจะอยู่ในรูปของ Ferric form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ซึ่งมีความเป็นพิษสูง และมีคุณสมบัติการละลายน้ำได้ต่ำ ขณะที่ไอออนเหล็กในรูปของ Ferrous form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) จะสามารถทำให้เกิด Free radicals จากปฏิกิริยา Oxidation กับออกซิเจนได้ดังนี้



จากสมการนี้จะส่งผลทำให้เกิด Superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ), Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) และ Hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ) ซึ่งเกิดปฏิกิริยา Oxidation กับสารต่าง ๆ โดยเฉพาะโครงสร้างของเซลล์ได้ง่าย (Highly reactive) ซึ่งจากคุณสมบัติของ Transferrin ที่สามารถจับกับไอออนเหล็กในรูป  $\text{Fe}^{3+}$  ได้จึงเท่าเทียมว่าเป็นการดึง  $\text{Fe}^{3+}$  ออกจากสมการทำให้ปริมาณของ  $\text{Fe}^{2+}$  ลดลงตามไปด้วย เมื่อปริมาณของ  $\text{Fe}^{2+}$  ลดลงจึงทำให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation กับออกซิเจนลดน้อยลง ซึ่งส่งผลไปถึงการเกิด Free radicals ที่เกิดจากกระบวนการนี้ลดน้อยลงตามไปด้วย (Kibel *et al.*, 2008)

โดยทั่วไปแล้ว Transferrin จะสามารถนำไอออนเหล็กเข้าสู่เซลล์ได้นั้นจะต้องอาศัย Transferrin-receptor (TfR) ด้วย โดย TfR จัดเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ (Flesland *et al.*, 2004) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งไอออนเหล็กที่จะไปจับกับ Transferrin และเกิดการขนส่งจากบริเวณช่องว่างที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular space) เข้าไปภายในเซลล์โดยกระบวนการ Endocytosis ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่บางส่วนของโมเลกุลของโปรตีน TfR ถูกปล่อยออกมาอยู่ในรูปของสารละลายซึ่งหมุนเวียนอยู่ในน้ำเลือดแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่า TfR จะมีการแสดงออกมากที่สุดบริเวณผิวของ Erythroid precursors ในไขกระดูก (Bone marrow) ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง และสามารถพบ TfR บน Erythroid cells ได้ในทุกระยะของการ Maturation จนถึงระยะสุดท้ายของ Immature reticulocyte ก่อนจะเข้าสู่กระแสเลือด และจากการที่ TfR มีการแสดงออกบนผิวเซลล์นี้เองจึงทำให้เมื่อร่างกายเกิดภาวะของการขาดแคลนไอออนเหล็ก หรือเกิด Erythropoiesis ก็จะมีผลให้ระดับของ TfR ในน้ำเลือดมีเพิ่มมากขึ้น (Ervasti *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ Graham *et al.* (2008); Trinder and Baker (2003) ได้รายงานไว้ว่า Tfr2 เป็น Membrane-bound glycoprotein ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สำคัญคล้ายคลึงกับ Tfr1 ซึ่งเป็น Orthologous กันและพบในเซลล์ตับเป็นหลัก และ Chiotoglou *et al.* (2008) ได้รายงานไว้ว่านอกจาก Tfrs จะมีความจำเป็นสำหรับ Normal erythropoiesis แล้วยังมีความสำคัญในการเกิด Proliferation และ Maturation ของเซลล์ Hematopoietic ชนิดอื่น ๆ ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถพบ Tfr1 ได้บนผิวของ T-cell และ B-cell ทั้งในระยะพัก (Resting) และระยะที่มีการ Mature แล้ว และพบว่า Tfr นั้นจะถูกเหนี่ยวนำอย่างเด่นชัดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Antigen หรือ Mitogen ซึ่งเป็นไปได้ว่าจะเกิดขึ้นในกรณีที่ต้องการลดขนาดของไอออนหลักของเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ขนาด 180 กรัม จำนวน 3 ตัว
2. ปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ขนาด 20 กรัม จำนวน 90 ตัว
3. อาหารปลาอุกสำเร็จรูป
4. ตู้กระจกขนาด 24 นิ้ว
5. เครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
6. กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร
7. เข็มฉีดยาขนาด 24G x 1.5 นิ้ว
8. Microcentrifuge ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Mikro 200R (Becthai)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำ (Microfuge)
10. ตู้ -20 องศาเซลเซียส (Whirlpool)
11. ตู้ -80 องศาเซลเซียส (Thermo Forma)
12. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (Memmert)
13. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer): Spectronic 2000 (Bausch & Lomb)
14. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) DU 650 (Beckman, USA)
15. ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Bio-Rad)
16. Autoclave (Hirayama, Japan)
17. Laminar flow : Dwyer Mark II Model # 25 (Dwyer instruments, USA)
18. Shaker-waterbath, GFL 1083
19. Touch mixer Model # 232 (Fisher Scientific, USA)
20. Power supply : Power PAC 3000 (Bio-Rad Laboratories, USA)
21. White/UV transilluminator: UVP ImageStore 7500 (Mitsubishi Electric Corporation, Japan)
22. Thermal cycle (Polymerase chain reaction; PCR) machine model TP600 (Takara Bio Inc.)
23. Sodium chloride (NaCl) (Merck)
24. เครื่องมือบดเนื้อเยื่อ (Ginder)

25. เครื่องมือผ่าตัด
26. ถุงมือปลอดเชื้อ
27. Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
28. PCR tube
29. Conical centrifuge tube
30. Automatic micropipette ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร
31. ตู้อบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot air oven)
32. Microwave oven (Sanyo Electric Co., Ltd.)
33. Vortex-2 Genie, Scientific Industries, USA
34. สารเคมีสำหรับงานทางด้านชีวโมเลกุล
  - 34.1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Fermentas)
  - 34.2 Absolute ethanol (Merck)
  - 34.3 Ammonium persulfate (Bio basic Inc.)
  - 34.4 Chloroform (Fisher Scientific)
  - 34.5 Phenol (Merck)
  - 34.6 Tris (Tris-Borate EDTA) (Fisher Scientific)
  - 34.7 Ethidium bromide (Sigma)
  - 34.8 Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium salt dehydrate; EDTA (Fluka)
  - 34.9 Diethyl pyrocarbonate; DEPC (Sigma)
  - 34.10 N, N-Dimethylformamide (Ajax Finechem)
  - 34.11  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma)
  - 34.12 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (BDH)
  - 34.13 Formamide (BDH)
  - 34.14 Formaldehyde (BDH)
  - 34.15 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid; MOPS (BIO BASIC INC.)
  - 34.16 Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside; IPTG (Sigma)
  - 34.17 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside; X-gal (Sigma)
  - 34.18 Trizol reagent (Molecular Research Center) Isopropanol (Merck)
  - 34.19 RNase A
  - 34.20 Histopaque-1077 (Sigma)
  - 34.21 RPMI-1640 (GIBCO)

- 34.22 Phosphate-buffer saline (PBS)
- 34.23 iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)
- 34.24 RevertAid™ Firststrand cDNA synthesis kit (Fermentas)
- 34.25 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit
- 34.26 Loading dye (Fermentas)
- 34.27 Gel star (Lonza)
- 34.28 Agarose gel (Conda)
- 34.29 Brilliant® II SYBR Green QPCR Master mix (Stratagene)
- 35. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย
  - 35.1 Technical agar (Difco, USA)
  - 35.2 Sodium chloride; NaCl (Merck)
  - 35.3 Bacto tryptone (BD, France)
  - 35.4 Yeast extract (Scharlau)
  - 35.5 Trypticase Soy Broth (Merck)
  - 35.6 Trypticase Soy Agar (Merck)
- 36. Restriction enzymes (Fermentas)
  - 36.1 *Eco* RI
- 37. สายพันธุ์แบคทีเรีย
  - 37.1 *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109
  - 37.2 *Aeromonas hydrophila* สายพันธุ์ AQAH 001

## วิธีการ

### 1. การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของ Complementary DNA ของยีน Transferrin ในปลาฉลามโดยใช้เทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### 1.1 ปลาที่ใช้ในการทดลอง

นำปลาฉลามเพสเมีย อายุประมาณ 1 ปี ขนาดประมาณ 180 กรัม จำนวน 1 ตัว ซึ่งมีลักษณะแข็งแรงไม่ปรากฏอาการของโรคต่าง ๆ ซึ่งได้จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาเลี้ยงในตู้กระจก ขนาด 80 ลิตรในห้องทดลองเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ระหว่างนี้ให้อากาศตลอดเวลาและให้อาหารเม็ดปลาฉลามสำเร็จรูปเป็นอาหารในอัตราส่วน 5% ของน้ำหนักตัว โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้งเช้าและเย็น

#### 1.2 การสกัด Total RNA

เก็บเนื้อเยื่อตับจากปลาตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัมมาบดด้วย TRIzol reagent (Molecular Research Center) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรให้ละเอียดแล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วนใสซึ่งประกอบด้วย RNA ไปยังหลอดใหม่ จากนั้นเติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันด้วยมือ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวของ RNA อยู่บริเวณก้นหลอด ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ RNA ทำได้โดยนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และทำ Electrophoresis โดยใช้ 1% Formaldehyde-agarose gel

### 1.3 การวัดคุณภาพ Total RNA ด้วย Formaldehyde-agarose gel electrophoresis

เตรียมตัวอย่าง Total RNA โดยผสม Total RNA ที่ได้ในข้อ 1.2 ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตรจาก Total RNA ความเข้มข้น 10-20 ไมโครกรัมด้วย DEPC-treated water, 50% Formamide ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 2.2 M Formaldehyde ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 10X MOPS ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที เติม 10X Formaldehyde gel loading buffer (50% Glycerol, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% (W/W) Bromophenol blue และ 0.25% (W/W) Xylene cyanol FF) ปริมาตร 3 ไมโครลิตรลงไปในตัวอย่างแต่ละหลอด นำตัวอย่างไปโหลดลงบน 1% Formaldehyde-agarose gel ซึ่งอยู่ใน 1X MOPS (เจือจางด้วย 10X MOPS: 0.2 M MOPS, pH 7.0, 20 mM Sodium acetate และ 10 mM EDTA) นำเจลไปย้อมด้วย Ethidium bromide (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาส่องได้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation

### 1.4 การสกัด mRNA

นำ Total RNA ที่ได้จากข้อที่ 1.2 มาแยกเอา mRNA ด้วย QuickPrep micro mRNA purification kit (Amersham Biosciences) โดยเติม oligo (dT)-cellulose 1 มิลลิลิตรลงใน Microcentrifuge tube จำนวน 2 อัน นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีด้วยความเร็วสูงสุด (16,000 xg) เติม Extraction buffer (Guanidinium thiocyanate และ N-lauroyl sarcosine) 400 ไมโครลิตร และ Elution buffer 800 ไมโครลิตร (10 mM TrisHCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) ลงในหลอดที่มี Total RNA อยู่ ผสมให้เข้ากันและเทลงไปในหลอดที่มี oligo (dT)-cellulose อยู่ เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 3 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ด้านบนออก จากนั้นล้างตัวอย่างด้วย High salt buffer (10 mM TrisHCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง และนำมาละลายซ้ำใน Oligo (dT)-cellulose นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 วินาทีที่ความเร็วสูงสุดและเทส่วนใสด้านบนออก จากนั้นล้างตัวอย่างซ้ำอีก 3 ครั้งด้วย Low salt buffer (10 mM TrisHCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งในขั้นตอนการล้างครั้งที่ 3 เจลจะถูกละลายอยู่ใน Low salt buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นดูดย้ายไปใส่ใน Microspin column และวางลงบน Microcentrifuge tube ล้าง Column ด้วยการเติม Low salt buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออกแล้วนำส่วนที่เหลือไปใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ ละล้าง mRNA โดยใช้ Pre-warmed (65°C) elution buffer ปริมาตร 200

ไมโครลิตรบนของเหลวที่นอนก้นอยู่และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 วินาที mRNA ที่ถูกชะออกมาจะถูกตกตะกอนโดยการเติม Glycogen solution ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, Potassium acetate solution ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและ 95% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ  $-15^{\circ}\text{C}$  ถึง  $-30^{\circ}\text{C}$ ) นำมาวางไว้ที่อุณหภูมิ  $-15^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียส ถึง  $-30^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ตกตะกอน mRNA โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $4^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำไปเก็บที่  $-80^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ mRNA ที่ตกตะกอนแล้วจะนำมาละลายกับ DEPC-treated water ความเข้มข้นของ mRNA จะถูกนำมาวัดโดยการวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

### 1.5 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

เทคนิค RACE มีประโยชน์เพื่อโคลน Full-length cDNA ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' โดยในการทดลองนี้จะใช้ BD Smart™ RACE cDNA Amplification kit (BD Biosciences Clontech) ซึ่งใช้ mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัมที่ได้จากข้อ 1.4 เพื่อใช้สังเคราะห์ First strand cDNA โดยเตรียม Microcentrifuge tube จำนวน 2 หลอด หลอดแรกทำ 5'-RACE-Ready cDNA ซึ่งประกอบด้วย mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม, BD Smart II A oligo (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและ 5'-CDS primers (5'-(T)<sub>25</sub>V N-3', N = A, C, G or T; V = A, G or C) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรเพื่อสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' อีกหนึ่งหลอดจะทำ 3'-RACE-Ready cDNA ซึ่งประกอบด้วย mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม และ 3'-CDS primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>V N-3', N = A, C, G or T; V = A, G or C) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรเพื่อสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในแต่ละหลอดให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไปปั่นที่ 70 องศาเซลเซียส 2 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วเพื่อเก็บตัวอย่างที่อยู่บริเวณก้นหลอด ในแต่ละหลอดจะเติม 5X First-strand buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 20 mM Dithiothreitol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและ BD PowerScript Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว เพื่อเก็บตัวอย่างที่อยู่บริเวณก้นหลอด นำหลอดไปปั่นที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่งใน Hot-lid thermal cycler โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกมานำเจือจางด้วย Tricine-EDTA buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตรและนำไปปั่นที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที ตัวอย่างที่ได้จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

หลังจากทำการสังเคราะห์ 5' และ 3'-RACE-Ready cDNAs แล้วจะใช้ cDNA นี้เป็น Template เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลายด้าน 5' และ 3' ตามลำดับ โดยในการทำ RACE PCR จะประกอบด้วย PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 5' หรือ 3'-RACE-Ready cDNA ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 10X BD Advantage 2 PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10mM dNTP Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 50X BD Advantage 2 Polymerase Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X Universal Primer Mix (UPM: Long (0.4  $\mu$ M), 5'-CTAATACGAC TCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' และ Short (2  $\mu$ M), 5'-CTAAT ACGACTCACTATAGGGC-3') ปริมาตร 5 ไมโครลิตรและ 10  $\mu$ M Gene-specific primer (GSP) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยทำการออกแบบจาก Partial cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย (Accession number EB360378) ซึ่งได้จาก Liver cDNA library ของปลาดุกอุย (Panprommin *et al.*, 2008) โดยการทำ 5' RACE จะใช้ Reverse primers TfRA2 และใช้ Universal primers (UPM) ซึ่งมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 25 รอบดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาทีและการทำ 3' RACE PCR จะใช้ Forward primers TfRA1 และใช้ UPM ซึ่งมีสภาวะการทำงานเหมือนกันกับ 5' RACE PCR amplification ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบในการทำ RACE PCR แสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** Gene specific primers เพื่อใช้ในการศึกษา 3' และ 5' RACE PCR

| RACE    | Primer names | Sequences from 5' to 3'        |
|---------|--------------|--------------------------------|
| 3' RACE | TfRA1        | 5'-GCCCAGAGAAACATGAGGACATCG-3' |
| 5' RACE | TfRA2        | 5'-AGCAAATCTGAACTGGAGGAGGCG-3' |

## 1.6 การโคลน Full-length cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยและการตรวจสอบ ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 1.6.1 Gel Purification

PCR product ที่ได้จาก RACE จะนำมาทำ Gel-purification โดยใช้ Wizard® SV Gel และ PCR Clean-Up System kit (Promega, USA) โดย Product ที่ได้ทั้งหมดจะนำไปแยกบน 1% Agarose gel ใน 1X TBE buffer จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และนำไปส่องใต้แสง UV จากนั้นตัดเจลบริเวณของแถบที่เราต้องการ แล้วนำไปใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด

1.5 มิลลิลิตรและชั่งน้ำหนัก จากนั้นเติม Membrane binding solution อัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อ เจล 10 มิลลิกรัม นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส 10 นาทีจนกระทั่งเจลละลายหมด จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ใน SV Minicolumn และปั่นที่อุณหภูมิห้อง 1 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 xg 1 นาที จากนั้นดูดของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้ง ล้าง Column โดยการเติม Membrane wash solution ปริมาตร 700 ไมโครลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้ง จากนั้นล้าง Column อีกครั้งโดยการเติม Membrane wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ SV Mini-column มาวางลงบน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ จากนั้นชะล้างชิ้นส่วนของ DNA โดยการเติม Nuclease-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตรตรงกลางของ Column นำ Column และ Tube ไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 1 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที นำ DNA ที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

#### 1.6.2 การโคลน PCR products

ชิ้นส่วนของ DNA จะถูกเชื่อมต่อเข้าสู่ pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega, USA) โดยมี Ligation reaction ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 2X Rapid ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, PCR product ปริมาตร 3 ไมโครลิตรและ T4 DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตและปั่นที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน

นำ Ligation reaction ไป Transform เข้าในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ซึ่งมีความเป็น Competent cells ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยนำ Ligation reaction ปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน Competent cells ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นนำไปทำ Heat-shock ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45-50 วินาที และนำไปแช่ในน้ำแข็งในทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม Super Optimal Culture medium (SOC medium) (Bacto<sup>®</sup>-tryptone 2 กรัม, Bacto<sup>®</sup>-yeast extract 0.5 กรัม, 1 M NaCl 1 มิลลิลิตร, 1 M KCl 0.25 มิลลิลิตร, 2 M Mg<sup>2+</sup> stock 1 มิลลิลิตร, Filter-sterilized และ 2 M Glucose 1 มิลลิลิตร) 900 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงครึ่งพร้อมกับเขย่า (ประมาณ 150 รอบต่อนาที) นำส่วนผสมมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 xg 10 นาที และดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC medium ออกให้เหลือปริมาณประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วละลายให้เข้ากันโดยใช้ Micropipette จากนั้นนำไป Spread plate บน LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

แบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวจะถูกเก็บลงบน LB-ampicillin agar plates อันใหม่และนำไปป่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

### 1.6.3 การคัดเลือกโคลนของแบคทีเรียที่มี Insert (Positive clones) ด้วยเทคนิค Colony PCR

นำเอาโคโลนีสีขาวทุกโคโลนีที่ได้จากข้อ 1.6.2 มาทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการโดยใช้เทคนิค Colony PCR โดยมี PCR reaction เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1 U of *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l), 1X *Taq* buffer, 0.2 mM ของ dNTP, 0.5  $\mu$ M ของ M13 forward และ M13 reverse Primers และ 1.25 mM of  $MgCl_2$  โดยจะใช้ Micropipette tip แต่ละโคโลนีผสมเข้ากับส่วนผสมที่เตรียมไว้ และนำไปทำ PCR โดยกำหนดสภาวะการทำงานทั้งสิ้น 30 รอบ ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที PCR products ที่ได้จะนำไปแยกบน 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ และใช้ 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และนำไปส่องไฟแสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation

### 1.6.4 การเตรียม Plasmid DNA

ทำการคัดเลือก Positive clones ที่ต้องการเพื่อทำการสกัด Plasmid โดยใช้ Aurum™ Plasmid Mini kit (BIO-RAD) โดยนำโคโลนีที่เลือกแล้วมาเลี้ยงใน LB-ampicillin broth ปริมาตร 3 มิลลิตรแล้วนำไปป่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืนพร้อมเขย่าตลอดเวลา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วย Resuspension solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติม Lysis solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตรและพลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 6-8 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปผสมกับ Neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 6-8 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg 5 นาที ปิเปตสารละลายที่อยู่ด้านบนไปยัง Plasmid mini column นำ Column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน Column ลงมา จากนั้นล้าง Column ด้วยการเติม Wash solution ปริมาตร 750 ไมโครลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน Column ลงมา นำ Column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg เพิ่ม 1 นาทีเพื่อกำจัด Wash solution ที่ยังค้างอยู่ นำ Plasmid mini column ไปวางบน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติม Elution solution ปริมาตร 50

ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg 1 นาที จากนั้นจะได้ Plasmid ที่ต้องการอยู่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ไมโครลิตร

#### 1.6.5 Restriction enzyme digestion

เมื่อทำการสกัด Plasmid เป็นที่เรียบร้อยแล้ว เทคนิค Restriction enzyme digestion จะถูกใช้เพื่อยืนยันขนาดของชิ้นส่วนของ DNA ที่โคลนเข้าไปใน Cloning vector โดยจะใช้ เอนไซม์ *Eco RI* ตัด cDNA ที่เป็นชิ้น Insert ออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cloning vector โดยปฏิกิริยานี้มีปริมาตรทั้งสิ้น 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย Plasmid DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Eco RI* 0.7 ไมโครลิตร, BSA 0.7 ไมโครลิตรและ *Eco RI* buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม 6X loading dye solution ลงไป 4 ไมโครลิตรแล้วนำไปแยกแแถบ DNA บน 1.5% agarose gel ใน 1X TBE ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ใช้ 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และนำไปส่องใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation

#### 1.6.6 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ Plasmid DNA ที่มีชิ้น Insert จากข้อ 1.6.5 ปริมาตร 3 ไมโครลิตรไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech; Macrogen, Inc.) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ M 13 forward และ M 13 reverse เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งด้านปลาย 3' และ 5' ของ cDNA ตามลำดับ หลังจากตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ทำการตัดส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นของ Vector ออกด้วยโปรแกรม Genetyx version 7.0 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนโดยใช้ BLAST programs (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1990) ซึ่ง BLASTN programs ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และ BLASTX programs จะใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

## 2. การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้างของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย

2.1 การเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนทั้งหมด (Full-length) มาตัดส่วนที่เป็น 5' และ 3' UTR ออกก่อนโดยใช้โปรแกรม Genetyx version 7.0 แล้วนำมาหาค่า Percent identity และ Similarity เปรียบเทียบกับยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ด้วยโปรแกรม MatGAT 2.01 จากนั้นนำมาตัด Leader sequence ออกด้วยโปรแกรม DAS-Transmembrane prediction server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)

2.2 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยโดยนำลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยมาทำ Multiple sequence alignment เปรียบเทียบกับยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ด้วยโปรแกรม Clustal W จากนั้นสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA version 3.1 และกำหนดค่า Bootstrap ที่ 1000 replicates

## 3. การศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin โดยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของปลาดุกอุย

3.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ และการสกัด Total RNA

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุยเพศเมียและเพศผู้อย่างละ 1 ตัว อายุประมาณ 1 ปี น้ำหนักประมาณ 180 กรัม มีลักษณะแข็งแรงไม่ปรากฏอาการของโรคต่าง ๆ โดยอวัยวะที่เก็บได้แก่ หัวอก ลำไส้ ไตส่วนหน้า ไตส่วนหลัง ตับ กล้ามเนื้อ ไข่, Peripheral blood leukocytes (PBLs) ผิวหนังและม้าม จากนั้นทำการสกัด Total RNA โดยนำเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ เหล่านี้มาบดด้วย TRIzol reagent (Molecular Research Center) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น

แยกส่วนใดซึ่งประกอบด้วย RNA ไปยังหลอด Eppendorf ใหม่ จากนั้นเติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันด้วยมือ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวของ RNA อยู่บริเวณก้นหลอด ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิตรและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ การวัดคุณภาพของ RNA ทำได้โดยนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และทำ Electrophoresis โดยใช้ 1% Formaldehyde-agarose gel

### 3.2 การวัดคุณภาพ Total RNA ด้วย Formaldehyde-agarose gel electrophoresis

เตรียมตัวอย่าง Total RNA ที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ โดยผสม Total RNA ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตรจาก Total RNA ความเข้มข้น 10-20 ไมโครกรัมด้วย DEPC-treated water, 50% Formamide ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 2.2 M Formaldehyde ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 10X MOPS ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที เติม 10X Formaldehyde gel loading buffer (50% Glycerol, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% (W/V) Bromophenol blue และ 0.25% (W/V) Xylene cyanol FF) ปริมาตร 3 ไมโครลิตรลงไปในตัวอย่างแต่ละหลอด นำตัวอย่างไปแยก RNA บน 1% Formaldehyde-agarose gel ซึ่งอยู่ใน 1X MOPS (เจือจางด้วย 10X MOPS: 0.2 M MOP, pH 7.0, 20 mM Sodium acetate และ 10 mM EDTA) นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและนำมาส่องใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation

### 3.3 การสังเคราะห์ First strand cDNA synthesis

นำ Total RNA ที่เก็บใน 75 % Ethanol จากข้อ 3.1 มาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลาย จากนั้นนำไปเขย่าโดยใช้ Vortex mixture แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที จากนั้นดูด 75 % Ethanol ทิ้ง แล้วตากตะกอนที่อุณหภูมิห้องอย่าให้แห้งมาก เติม DEPC treated water ประมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ละน้อยเพื่อให้ตะกอนละลายจนหมด ปิเปต Total RNA มา 2 ไมโครลิตร ผสมกับ DEPC treated water 68 ไมโครลิตรแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตรซึ่งใช้ DEPC treated water เป็น Blank เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของ Total RNA เป็นหน่วยไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นใช้ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อแต่ละอวัยวะความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมมาสังเคราะห์ First strand cDNA โดยใช้ iScript™ select cDNA synthesis kit (BIO-RAD) เพื่อใช้เป็น Template ในการทำ RT-PCR ซึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 7.5 ไมโครลิตร

ซึ่งประกอบด้วย Nuclease-free water, Oligo(dT)<sub>20</sub> primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่น้ำแข็งประมาณ 60 วินาที เตรียม Master mix ซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 5X iScript select reaction mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ iScript reverse transcriptase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที เพื่อยับยั้งเอนไซม์ Reverse transcriptase เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปทำ RT-PCR ต่อไป

### 3.4 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

First strand cDNA ที่ได้จากแต่ละอวัยวะในข้อ 3.3 จะใช้เป็น Template ในกระบวนการ PCR ซึ่งในการทำ PCR amplification จะใช้ Gene-specific primers ของยีน Transferrin ที่ออกแบบมาจาก Partial cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย (EB360378) 2 คู่ โดยคู่ที่ 1 ได้แก่ TfF1 และ TfR1 ซึ่งเป็น Forward และ Reverse primer ตามลำดับ และคู่ที่ 2 ได้แก่ TfF2 และ TfR2 ซึ่งเป็น Forward และ Reverse primers ตามลำดับ และใช้ Gene-specific primer ของยีน  $\beta$ -actin ซึ่งได้แก่ BF และ BR ซึ่งเป็น Forward และ Reverse primers ตามลำดับ เป็น Internal control (ตารางที่ 3) โดยมีปริมาตรของ PCR reaction ทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X *Taq* buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10  $\mu$ M ของ Forward และ Reverse primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 0.5 U/ $\mu$ l *Taq* DNA polymerase (Fermentas) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ 0.5  $\mu$ l ของ First strand cDNA โดย PCR amplification มีสภาวะการทำงานทั้งหมด 25 รอบ ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที หลังจากนั้นเปิด PCR product ที่ได้มา 10 ไมโครลิตรผสมกับ Loading dye แล้วนำไปทำ Electrophoresis บน 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้ 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide และนำไปส่องได้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation

ตารางที่ 3 Gene specific primers เพื่อใช้ในการศึกษา RT-PCR

| Gene name      | Primer names | Sequences from 5' to 3'            | PCR product size |
|----------------|--------------|------------------------------------|------------------|
| Transferrin    | TfF1         | 5'-GCCCAGAGAAACATGAGGACATCG-3'     | 199 bp           |
|                | TfR1         | 5'-AGCAAATCTGAACTGGAGGAGGCG-3'     |                  |
|                | TfF2         | 5'-GTGGGAAGAAGTCCTGTCACACTGGTTT-3' | 976 bp           |
|                | TfR2         | 5'-AGGACTCTGACTTGACCTGGGATACGCT-3' |                  |
| $\beta$ -actin | BF           | 5'-AGAGAGAAATTGTCCGTGACATC-3'      | 414 bp           |
|                | BR           | 5'-CTCCGATCCAGACAGAGTATTTG-3'      |                  |

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

##### 4.1 สัตว์ทดลอง

นำลูกปลาดุกอุยอายุ 2 เดือน มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 20 กรัม มีลักษณะแข็งแรง ไม่ปรากฏอาการของโรคต่าง ๆ จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาเลี้ยงในตู้กระจกปริมาตร 40 ลิตร จำนวน 9 ตู้ ๆ ละ 10 ตัว ในห้องทดลองเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ระหว่างนี้ทำการให้อาหารสำเร็จรูปในอัตรา 5% ของน้ำหนักตัวโดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง

##### 4.2 การทดลองกระตุ้นปลาดุกอุยด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

นำปลาที่เตรียมไว้มาแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตู้ โดยกลุ่มที่ 1 (Treatment 1) เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งฉีดน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว กลุ่มที่ 2 (Treatment 2) ฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ความเข้มข้น  $10^7$  CFU/ml ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร/ตัว และกลุ่มที่ 3 (Treatment 3) ฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ความเข้มข้น  $10^9$  CFU/ml ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว โดยทุกกลุ่มการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ

#### 4.3 การสกัด Total RNA และกระบวนการสังเคราะห์ First Strand cDNA

ทำการเก็บเนื้อเยื่อเฉพาะอวัยวะตับจากปลาทั้ง 3 Treatment ซ้ำละ 1 ตัวที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ จากนั้นนำเนื้อเยื่อตับทั้งหมดมาทำการสกัด Total RNA ด้วย TRIzol reagent (Molecular Research Center) โดยใช้วิธีเดียวกันกับข้อ 3.1 และตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและทำ Electrophoresis บน 1.0% Formaldehyde-agarose gel จากนั้นนำ Total RNA มาทำการสังเคราะห์ First strand cDNA โดยใช้ RevertAid™ Firststrand cDNA synthesis kit (Fermentas) ซึ่งประกอบด้วย Total RNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม, Oligo (dT18) primer 0.5 ไมโครลิตรและเติม DEPC-treated water ปรับจนมีปริมาตรรวมเท่ากับ 7.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นตกตะกอน 3-5 วินาทีที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็ง เติม Master mix ซึ่งมีปริมาตรรวมเท่ากับ 3.5 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 5X reaction buffer 2 ไมโครลิตร, Ribolock™ Ribonuclease inhibitor 0.5 ไมโครลิตรและ 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำมาผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเติม Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcriptase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

#### 4.4 การวิเคราะห์ Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR)

ในการทดลองนี้จะใช้ชุด Brilliant® II SYBR® Green QPCR (Stratagene) ซึ่งมี Reaction เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย First strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, SYBR Green Master mix 12.5 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 9.5 ไมโครลิตร และใช้ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ซึ่งได้แก่ Tff 1qf: 5'-TTAACACACTGAAGGGCAAGGGTC-3' และ Tfr 1qf: 5'-CTACATCTTCCTGGGAGCAGAGTA-3' ตามลำดับ และระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของตัวอย่างจะถูก Normalize กับ Housekeeping gene คือ 16S ribosomal RNA (Accession number EB360569) ซึ่งมีไพรเมอร์ Forward และ Reverse ดังนี้ 16Sf qf: 5'-AACAGCGCAATCCTCTTC CAGAGT-3' และ 16Sr qr: 5'-ATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTT-3' (ตารางที่ 4) โดยสภาวะของปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ Melting

curve โดยดำเนินต่อเนื่องไปโดยมีสภาวะของปฏิกิริยาคือ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที ปฏิกิริยา PCR จะดำเนินการโดยเครื่อง Real time รุ่น MxPro-Mx3000P (Stratagene)

**ตารางที่ 4** Gene specific primers เพื่อใช้ในการทำ Real-time PCR

| Gene Names        | Primer names | Sequences from 5' to 3'        | Amplicon size (bp) |
|-------------------|--------------|--------------------------------|--------------------|
| Transferrin       | Tff 1 qf     | 5'-TTAACACACTGAAGGGCAAGGGTC-3' | 133                |
|                   | Tff 1 qr     | 5'-CTACATCTTCCTGGGAGCAGAGTA-3' |                    |
| 16s ribosomal RNA | 16Sf qf      | 5'-AACAGCGCAATCCTCTTCCAGAGT-3' | 97                 |
|                   | 16Sr qr      | 5'-ATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTT-3' |                    |

#### 4.5 การวิเคราะห์ Relative quantification ของ mRNA ของยีน Transferrin

การวิเคราะห์ข้อมูลจากการทำ Real-time PCR นั้นมี 2 วิธี ซึ่งได้แก่ Absolute quantification และ Relative quantification (Livak and Schmittgen, 2001) สำหรับวิธี Absolute quantification จะทำการวิเคราะห์ Transcript copy number โดยการสร้างเส้น Standard curve ซึ่งเป็นการ Plot ค่า log แบบเส้นตรงของ Initial copy number สำหรับชุดของ Standard เทียบกับค่า Threshold cycle ( $C_t$  value) โดยจะมีการวัดค่า  $C_t$  ของ Unknown gene และ Standard curve จะใช้เพื่อวิเคราะห์ Copy number เบื้องต้นและ Relative quantification จะใช้อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับ Reference group บางกลุ่ม เช่น Internal หรือ Untreated control เพื่อ Normalize จำนวนของ Target transcript ซึ่งวิธีนี้อยู่บนพื้นฐานของ Equal PCR efficiencies สำหรับ Target และ Internal control mRNAs

Relative copy number ของ mRNA ของ Transferrin จะถูกคำนวณตามวิธี  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001) ค่าความแตกต่างของ Threshold cycle ( $\Delta C_t$ ) ระหว่าง mRNA ของ Transferrin ซึ่งเป็น Target gene กับ 16S ribosomal RNA ซึ่งเป็น Internal control ของแต่ละปฏิกิริยาจะใช้เพื่อ Normalize ระดับการแสดงออกของ mRNA ดังสมการ

$$\Delta CT = CT(TF) - CT(16S \text{ ribosomal RNA})$$

ค่านี้จะคำนวณในแต่ละ Unknown sample โดย mRNA ของ Transferrin จะถือว่ามีความสัมพันธ์กับ Total RNA ค่า  $\Delta CT$  ในแต่ละตัวอย่างจะตรงกันกับ Relative quantification ของ mRNA ของ Transferrin และ Relative copy number จะถูกนำมาคำนวณโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{Copy number} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{โดย } \Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{Unknown sample}) - \Delta CT(\text{Reference sample})$$

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ การวิเคราะห์ Melt curve สามารถใช้ยืนยันว่าเป็น Product ที่เราต้องการเท่านั้นที่ถูก Amplify ไม่ใช่มาจาก PCR product ที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงหรือจาก Primer-dimer จับกันเอง อุณหภูมิสำหรับ Melting ที่แตกต่างกันจะสามารถสังเกตได้ระหว่าง Product ที่มีความจำเพาะเจาะจงหรือไม่มีความจำเพาะเจาะจง โดย Melt curve จะได้จากการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ของปฏิกิริยา PCR จนกระทั่ง 95 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นขณะที่มีการเก็บข้อมูล

#### 4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลของการแสดงออกของยีน Transferrin จะแสดงในรูปของ Means  $\pm$  standard deviation และความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มจะวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $\alpha=0.05$ )

### 5. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## 6. ระยะเวลาทำการวิจัย

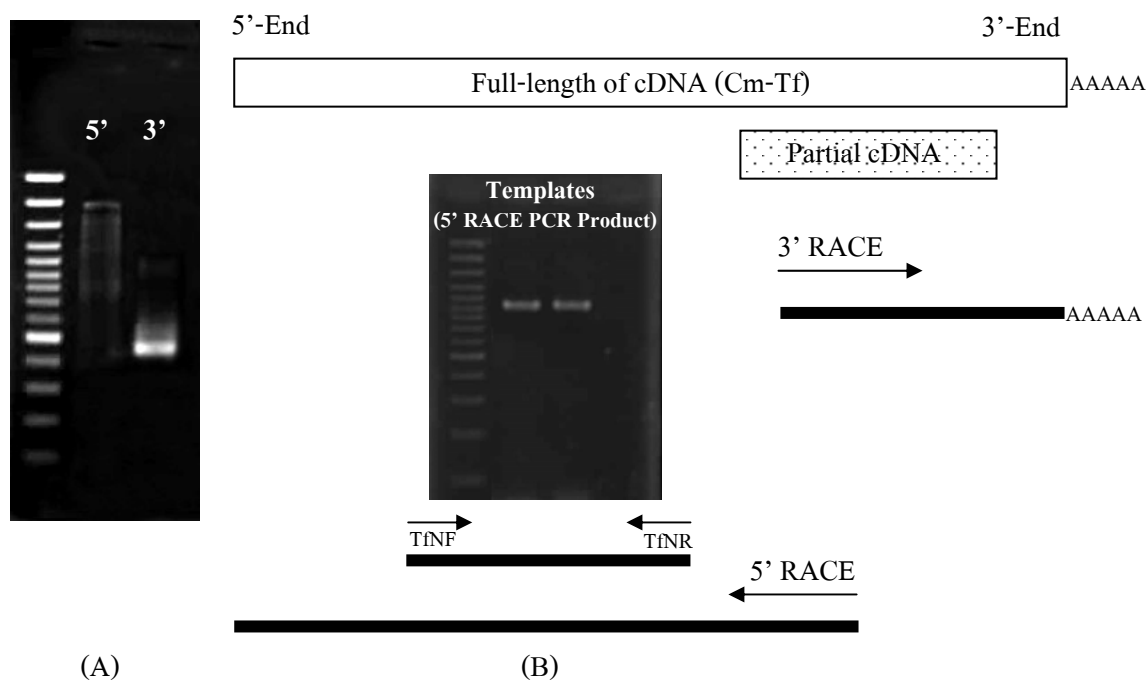
ใช้ระยะเวลาทำการวิจัยทั้งสิ้น 17 เดือน (เดือนมิถุนายน 2550-ตุลาคม 2551)

## ผลและวิจารณ์

### ผล

#### 1. การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA ของยีน Transferrin ในปลาตุ๊กต๋อ

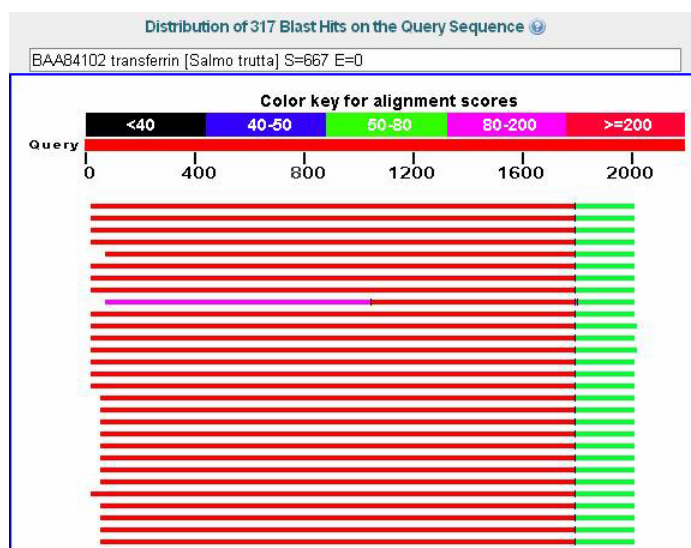
จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของ cDNA ของยีน Transferrin ในปลาตุ๊กต๋อโดยใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) โดยเริ่มต้นจากการออกแบบ Gene-specific primers ซึ่งได้แก่ TfRA2 และ TfRA1 (ตารางที่ 2) ตามลำดับจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Partial cDNA ของยีน Transferrin (EB360378) ที่มีความยาวเท่ากับ 384 bp ซึ่งได้จากการสร้างห้องสมุด cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อตับ (Liver cDNA library) ของปลาตุ๊กต๋อ (Panprommin *et al.*, 2008) โดยผลจากการโคลน cDNA ของยีน Transferrin ในปลาตุ๊กต๋อโดยใช้เทคนิค RACE พบว่า PCR products ของทั้งสอง Fragments จากการทำ 5' และ 3' RACE เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Gel electrophoresis แล้วจะปรากฏแถบ PCR Product บนเจลมีขนาดประมาณ 1,900 bp และ 450 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 2A) ในเบื้องต้นจึงสามารถประมาณขนาดของ Full-length ได้ประมาณ 2,150 bp และเมื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ทั้งสอง Fragments พบว่ามีความยาวที่แท้จริงเท่ากับ 1,984 bp และ 399 bp ตามลำดับ เนื่องจาก PCR fragment ที่ได้จากการทำ 5' RACE มีขนาดใหญ่เกินกว่าจะทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงทำการออกแบบ Gene-specific primers ซึ่งได้แก่ TfNF และ TfNR เป็น Forward และ Reverse primers (ตารางที่ 5) แล้วทำการ Amplify และ Clone จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เหลืออยู่ซึ่งมีขนาดประมาณ 950 bp (ภาพที่ 2B) ซึ่งภายหลังจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่ามีขนาด 976 bp จึงนำมาเชื่อมต่อกันกับส่วนของ Fragments ทั้งหมดจนได้ Full-length cDNA ของยีน Transferrin ของปลาตุ๊กต๋อ ซึ่งใช้ชื่อว่า "Cm-Tf" (ภาพที่ 2B) และเมื่อนำ Cm-Tf มาเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนกับยีน Transferrin ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในฐานข้อมูล โดยใช้ BLASTX program พบว่า Cm-Tf มีความคล้ายคลึงกับยีน Transferrin ของปลา Brown trout (*Salmo trutta*) มากที่สุด (ภาพที่ 3) โดยมีค่า Score ของความคล้ายคลึงและ E-value สูงสุดเท่ากับ 667 และ 0.0 ตามลำดับ และภายหลังลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Cm-Tf ได้ถูกบันทึกไว้แล้วในฐานข้อมูล GenBank database โดยมี Accession number เป็น ES610848



**ภาพที่ 2** ภาพและแผนผังการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาตุ๊กตา โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' RACE (A) ขนาดของ PCR product ของ 5' และ 3' RACE ซึ่งมีขนาดประมาณ 1900 และ 450 bp ตามลำดับ (B) แผนผังการโคลน Full-length cDNA ของยีน Transferrin (Cm-Tf) โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' RACE

**ตารางที่ 5** Gene specific primers เพื่อใช้ Amplify และการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA fragment ที่ได้จาก 5' RACE PCR products

| Gene name   | Primer names | Sequences from 5' to 3'            | PCR product size |
|-------------|--------------|------------------------------------|------------------|
| Transferrin | TfNF         | 5'-GTGGGAAGAAGTCCTGTCACACTGGTTT-3' | 976 bp           |
|             | TfNR         | 5'-AGGACTCTGACTTGACCTGGGATACGCT-3' |                  |



Sequences producing significant alignments:

|                                 |                                           | Score<br>(Bits) | E<br>Value |
|---------------------------------|-------------------------------------------|-----------------|------------|
| <a href="#">dbj BAA84102.1 </a> | transferrin [Salmo trutta]                | <u>667</u>      | 0.0        |
| <a href="#">dbj BAA84100.1 </a> | transferrin [Salvelinus fontinalis]       | <u>663</u>      | 0.0        |
| <a href="#">dbj BAA84099.1 </a> | transferrin [Salvelinus pluvius]          | <u>664</u>      | 0.0        |
| <a href="#">gb ACI33444.1 </a>  | Serotransferrin-1 precursor [Salmo salar] | <u>661</u>      | 0.0        |
| <a href="#">gb ACC55225.1 </a>  | transferrin [Salmo trutta]                | <u>658</u>      | 0.0        |

**ภาพที่ 3** การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลด้วย BLASTX programs

## 2. การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้างของ cDNA ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุย

เมื่อนำ Full-length cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยมาศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้าง พบว่า cDNA ของยีน Transferrin ที่มีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 2,183 bp ประกอบด้วย Open reading frame (ORF) ขนาด 1,884 bp (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ cDNA ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยยังประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น 5' และ 3' Untranslated region ซึ่งมีความยาวเท่ากับ 26 bp และ 270 bp ตามลำดับ โดย cDNA ของยีนชนิดนี้สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (Amino acid) ได้เท่ากับ 628 Residues ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น Leader peptide จำนวน 14 Residues และ 614 Residues เป็น Mature protein โดย cDNA ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยนั้นจะประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ATG และ TAG ซึ่งเป็น Start codon และ Stop codon ณ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 28 และ 1,911 ตามลำดับ และทางด้านปลาย 3' ยังพบตำแหน่ง

Polyadenylation site (AATAAA) จำนวน 1 ตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2,133 เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของโปรตีน cDNA ของยีน Transferrin ของปลาตุ๊กตานั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 Lobes คือ N-lobe และ C-lobe โดยลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-lobe เริ่มต้นจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 23 และสิ้นสุดที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 323 รวมความยาวทั้งหมดเท่ากับ 301 Residues ส่วนด้าน C-lobe เริ่มต้นจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 330 และสิ้นสุดที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 628 รวมความยาวทั้งหมดเท่ากับ 299 Residues และพบว่ายีน Transferrin ของปลาตุ๊กตาทองทั้งสอง Lobes จะเชื่อมกันด้วย Interdomain bridge (Hinge region) คือลำดับกรดอะมิโน SDSSKK ตำแหน่งที่ 324-329 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของทั้ง C-lobe และ N-lobe มาเปรียบเทียบกับพบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่ Conserved กันหลายตำแหน่ง (ภาพที่ 5) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเท่ากับ 48.6% และ 32.4% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโน Cysteine เป็นองค์ประกอบอยู่ใน Mature protein ทั้งหมด 29 ตำแหน่ง ซึ่งมีตำแหน่งตรงกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ถึง 21 ตำแหน่ง และพบตำแหน่งของ Glycosylation sites (NXT หรือ NXS) จำนวน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ กรดอะมิโน Asparagine 609-Serine 610-Serine 611 และ Asparagine 616-Valine 617-Serine 618 นอกจากนี้ยังพบว่า Full-length cDNA ของยีน Transferrin ในปลาตุ๊กตาก็ยังมีตำแหน่งของกรดอะมิโนซึ่งใช้จับกับไอออนเหล็ก (Iron-binding ligand) เป็นองค์ประกอบอยู่จำนวน 8 ตำแหน่ง (N-lobe จำนวน 4 ตำแหน่ง และ C-lobe จำนวน 4 ตำแหน่ง) นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งของ Second shell-hydrogen-binding network และ Dilysine trigger จำนวน 8 ตำแหน่ง (N-lobe จำนวน 4 ตำแหน่ง และ C-lobe จำนวน 4 ตำแหน่ง) และ 4 ตำแหน่ง (N-lobe จำนวน 2 ตำแหน่ง และ C-lobe จำนวน 2 ตำแหน่ง) ตามลำดับ (ภาพที่ 4) นอกจากนี้เมื่อใช้โปรแกรม the Compute pI/Mw tool, [http://www.expasy.org/tools/pi\\_tools.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tools.html) ในการตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีนพบว่า โปรตีนของยีน Transferrin ของปลาตุ๊กตานั้นน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 6.06 และเมื่อทำการพิจารณาโครงสร้างลำดับที่สองของโปรตีนของยีน Transferrin ของปลาตุ๊กตาก็โดยใช้ PSIPRED Protein Structure Prediction Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) พบว่าโปรตีนของยีน Transferrin ของปลาตุ๊กตานั้นประกอบด้วย  $\alpha$ -helix จำนวน 24 ส่วน,  $\beta$ -strand จำนวน 20 ส่วน นอกนั้นจะเป็นส่วนของ Random coil (ภาพที่ 6)

|       |                                                                                             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|-------|
| 1     | GCGGGGGCTGCATCCAGGAGTCCAGGATGAGCTCTTCATCATCTGTGGCGTCTCTCCTGCCTGCCTTCGTGCAAGGCTGAACCCCAAGC   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 90   |   |       |
| (1)   | M K L F I I C G V L S C L A F V Q A E P Q                                                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | (21) |   |       |
| 91    | CAGTCAGATGGTGTTTAAAGTCAGATCAAGAGTTTAATAAATGCCAGACGCTTAAACCACTAGTCTGCGTGCAGAAAGCCGGGAACATGG  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 180  |   |       |
| (22)  | P                                                                                           | V | R | W | C | L | K | S | D | Q | E | F | N | K | C | Q | T | L | K | P | L | V | C | V | Q | K | P | G | T    | M | (51)  |
| 181   | ACTGCATCAAAGCCATTGAGAATGGTGAAGCAGATGCCATCACTCTGGATGGAGGAGATATCTACACAGCTGGTCTCCTGCCCCATAACC  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 270  |   |       |
| (52)  | D                                                                                           | C | I | K | A | I | Q | N | G | E | A | D | A | I | T | L | D | G | G | D | I | Y | T | A | G | L | L | P | H    | N | (81)  |
| 271   | TTCACCCCATCTCGCAGAAGTTTACGGGCACACAAGAGTCATGCTACTACGCTGTAGCTGTAGCAAAAGAAAGGCACTGACTTTAATATCA |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 360  |   |       |
| (82)  | L                                                                                           | H | P | I | L | A | E | V | Y | G | T | Q | E | S | C | Y | Y | A | V | A | V | A | K | K | G | T | D | F | N    | I | (111) |
| 361   | ATGGGCTTCGTGGGAAGAAGTCTGTACACTGGTTTGGGGAAAAATGCACGCTGGAACATCCCATCGGCACTCTCGTCGAAATGGGAC     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 450  |   |       |
| (112) | N                                                                                           | G | L | R | G | K | K | S | C | H | T | G | L | G | K | T | A | R | W | N | I | P | I | G | T | L | V | E | M    | G | (141) |
| 451   | AGATTACATGGGGTGGCATCGATGAGAAACCTCTGCAGGATGCGGTGGCAGAATTCTTCTCAGCGAGCTGTGTGCCAGAAGCAACAAACC  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 540  |   |       |
| (142) | Q                                                                                           | I | T | W | G | G | I | D | E | K | P | L | Q | D | A | V | A | E | F | F | S | A | S | C | V | P | E | A | T    | N | (171) |
| 541   | CAAACTGTGCCAGCTGTGTAAGAACAAGTGCCAGCCCTCTAAACACGAGCCGTATTCTAATTACCATGGAGCTTTCAGTGCCTGAAGG    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 630  |   |       |
| (172) | P                                                                                           | K | L | C | Q | L | C | K | N | K | C | Q | P | S | K | H | E | P | Y | S | N | Y | H | G | A | F | Q | C | L    | K | (201) |
| 631   | ATGGAGTTGGAGACGTGGCGTTTGTGAAGCAAGACACAGCAATCAATGACGGGGACAATTACGAGCTGCTGTGTACAGAGCGCACAGGA   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 720  |   |       |
| (202) | D                                                                                           | G | V | G | D | V | A | F | V | K | Q | D | T | A | I | N | D | G | D | N | Y | E | L | L | C | T | D | G | T    | R | (231) |
| 721   | AGCCTGTTACTGAGTATAAACCTGCAACTGGGCCCAAGTTCTCTGCTCACGCCGTCGTGAGTCGCTTTGACAGAGACCTGGCCGACCGTA  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 810  |   |       |
| (232) | K                                                                                           | P | V | T | E | Y | K | T | C | N | W | A | Q | V | P | A | H | A | V | V | S | R | F | D | R | D | L | A | D    | R | (261) |
| 811   | TCGATAATGTTCTTAACACACTGAAGGGCAAGGGTCTGTTCTCTCTGATGGCCAGTGAAAGACCTAATGTTTAAAGACTCAACGACGG    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 900  |   |       |
| (862) | I                                                                                           | D | N | V | L | N | T | L | K | G | K | G | L | F | S | S | D | G | P | V | K | D | L | M | F | K | D | S | T    | T | (291) |
| 901   | ACCTGCAGAGGCTCTCAGAGCTCACCACTCTCATCTTCTCTGGGAGCAGAGTACTGGAACGCCGTCCACTCACTCAAGAGGGAAAAAA    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 990  |   |       |
| (292) | D                                                                                           | L | Q | R | L | S | E | L | T | T | S | Y | I | F | L | G | A | E | Y | W | N | A | V | H | S | L | K | R | E    | K | (321) |
| 991   | CATCTAGTGATTCTGCTAAGAAGATTAGATGGTGCACTGTGGGTTAGATCAGTCAGGATCCTGTGATGCATGGAGCACATCCCTCAGTG   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1080 |   |       |
| (322) | T                                                                                           | S | S | D | S | S | K | K | I | R | W | C | T | V | G | S | D | Q | S | G | S | C | D | A | W | S | T | S | L    | S | (351) |

**ภาพที่ 4** Full-length ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาตุ๊กตุย โดย Start (ATG) และ Stop codons (TAG) อยู่ในกรอบสีเขียว ตำแหน่งของ Leader peptide จะขีดเส้นใต้ 1 เส้น ตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine ที่ตรงกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จำนวน 21 ตำแหน่งอยู่ภายในวงกลม ตำแหน่งของ Polyadenylation site (AATAAA) จะเป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้สองเส้น ตำแหน่งของ N-glycosylation sites (NXT หรือ NSX) จะขีดเส้นใต้สองเส้น ตำแหน่งของ Iron-binding ligand จะขีดเส้นใต้และมีสีชมพู ส่วนตำแหน่งของ Second shell-hydrogen-binding network จะขีดเส้นใต้และมีสีฟ้า ตำแหน่ง Dilysine trigger จะขีดเส้นใต้และมีสีแดง ตำแหน่ง Carbonate-binding site จะอยู่ในกรอบสีเขียวเข้ม ตำแหน่งของ Interdomain bridge จะอยู่ในกรอบสีเขียว ส่วนบริเวณที่มีสีเทาและมีลูกศรกำกับด้านบนแสดงถึงตำแหน่งของ Gene-specific primers ที่ใช้ในการทำ 5' และ 3' RACE PCR ตัวเลขและตัวเลขในวงเล็บแสดงลำดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนตามลำดับ

|       |                                                                                             |       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1081  | ATGATGATGGCAACAGCAGGCTCGAGTGTGAAACCGGCAAAACGGTGCAAGATTGCATCAAAAAGATCATGTATGATCAGGCCGATGCTA  | 1170  |
| (352) | D D D G N S R L E C E T G K T V Q D C I K K I M Y D Q A D A                                 | (381) |
| 1171  | TTTCCGTTGATGGAGGAGAAGTGTACACTGCTGGAACGTGTGGTCTGGTGCCGCCATAGTGGAGCAATACGATGAAGCAGATGTACAC    | 1260  |
| (382) | I S V G E V Y T A G T C G L V P A I V E Q Y D E A Q C T                                     | (411) |
| 1261  | CAGGTGCAACTGTTTCAGGAGACGCCGCTCTATTACGCAGTAGCTGTAGTGACAAGGACTCTGACTTGACCTGGGATACGCTGCAAG     | 1350  |
| (412) | P G A T V S G D A A S Y Y A V A V V H K D S D L T W D T L Q                                 | (441) |
| 1351  | GCAAGACGTCGTGTACACTGCAGTGGGTCGTACAGCAGGCTGGAACATTCCCATGGGTCCTCCATGAGAAATACAAACGCTGTGACT     | 1440  |
| (442) | G K T S C H T A V G R T A G W N I P M G L L H E K Y K R C D                                 | (471) |
| 1441  | TCTCAACGTACTTCAGTAAAAGCTGTGCTCCTGGTGCAGATCCTGATTCAACCTGTGTGCATTGTGTAAAGGAGGTGAAGCTGGCAAAG   | 1530  |
| (472) | F S T Y F S K S C A P G A D P D S T L C A L C K G G E A G K                                 | (501) |
| 1531  | GCAAAATGTAAAGCCAGCAGCGATGAGCCTTATTACGGCTACAGTGGAGCCTTCAGGTGTTTGGCTGAAGGTGCTGGTGCAGTGGCCTTTA | 1620  |
| (502) | G K C K A S S D E P Y Y G Y S G A F R C L A E G A G A V A F                                 | (531) |
| 1621  | TTAAGCAAACACAGTAGCAGAAAACACAGACGGCAATGGACCAGACTGGGCTAAGAGTTTCAAGTCATCAGACTATAAACTCATCTGCC   | 1710  |
| (532) | I K Q T T V A E N T D G N G P D W A K S F K S S D Y K L I C                                 | (561) |
| 1711  | CCAGTGGCTCTGCTGCAATTAATGAGTATGAGCAGTGAATTTAGCCAAAGTTCAGCTCACGCCGTCGCTACTGCCAGAGAAACATGA     | 1800  |
| (562) | P S G S A A I N E Y E Q C N L A K V P A H A V V T A Q R N M                                 | (591) |
| 1801  | GGACATCGTGTCTTCTCAAGAACCAGCAGATTAATTTCCACCTCAAACTCTTCAGAGAAATCCACAAAATGTCTCAAGAAGTTCTG      | 1890  |
| (592) | R T S C R S S R T S R L I S P P Q N S S E N P Q N V S K K F                                 | (621) |
| 1891  | AAAATCCTATCAGGAGTTCTAGSACAAAAATATGTAATCCATAAAGTCCAGCACATGTGTGGGAGAGCAAACTCTGAAGTGGAGGA      | 1980  |
| (622) | E N P I R S S *                                                                             | (628) |
| 1981  | GGCGTGCAGGCTCGCTCGTGTCCAGCCACGGCCTAAATGGTCCAGTTTCACACAACCCCTGTGGATCTCTCTCACTTCATCTCAGTTT    | 2070  |
| 2071  | CTGACCTTTCTGGAATTAATCACACCTTGGTGTCTCGATTTCACCCCTGTTAGTTGTCTGAATAATAATATTAGAACCAAAAAAAA      | 2160  |
| 2161  | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2183                                                                  |       |

#### ภาพที่ 4 (ต่อ)

|              |     |                                                               |     |
|--------------|-----|---------------------------------------------------------------|-----|
| Cm-Tf N-Lobe | 1   | -----VWCLKSDQEFNKCQTLKPLVVCVQKPGTMDCIKAIQNGEADAITLDGGDI       | 50  |
| Cm-Tf C-Lobe | 1   | IRWCTVGSQSGSCDAWSTSLSDDDGNSRLFCETGKTVQDCIKKIMYDQADAIISVDGGEV  | 60  |
| Cm-Tf N-Lobe | 51  | YTAG---LLP-----HNLHPILAEVYGTQESCYYAVAVAKKGTDFNINGLRGGKSSCHTG  | 101 |
| Cm-Tf C-Lobe | 61  | YTAGTCGLVPAIVEQYDEAQCTPGATVSGDAASYYAVAVVHKDSDLTWDTLQGTSCHTA   | 120 |
| Cm-Tf N-Lobe | 102 | LKGTARWNIPHTLVMGQITWGGIDKPLQDAVAEFSASCVEEAT-NPKLCCQCK---      | 157 |
| Cm-Tf C-Lobe | 121 | VGRTAGWNIPMGLLHEK-----YKR--CDFSTYFSKSCAPGADPDSTLCAKCKGGE      | 169 |
| Cm-Tf N-Lobe | 158 | ---NKCQPSKHEPYSNTHGAFQCLKDGVDVAFVKQ---DTAINDGD-----NVE        | 201 |
| Cm-Tf C-Lobe | 170 | AGKGCKKASSDEPYYGYSGARCLAEAGAVAFIKQTTVAENTDGNPDMWAKSFKSSDYK    | 229 |
| Cm-Tf N-Lobe | 202 | LLCTDGTTRKPVTEYKTCNMAQVPAHAVVSRFDRDLADRIDNVLNTLKGKGLFSSDGPVKD | 261 |
| Cm-Tf C-Lobe | 230 | LICPSGS-AAINEYEQCENLAKVPAHAVVTAQRNMRTSCRSSRSLISPPQNSSENPPQNV  | 288 |
| Cm-Tf N-Lobe | 262 | LMFKDSTTDLQRLSELTTSYIFLGAEYWNVAVHSLKREKTS                     | 301 |
| Cm-Tf C-Lobe | 289 | SKKFENPIRSS-----                                              | 299 |

#### ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้าน N-lobe และ C-lobe ของ cDNA ของโปรตีนของ ซิน Transferrin ในปลาฉลาม

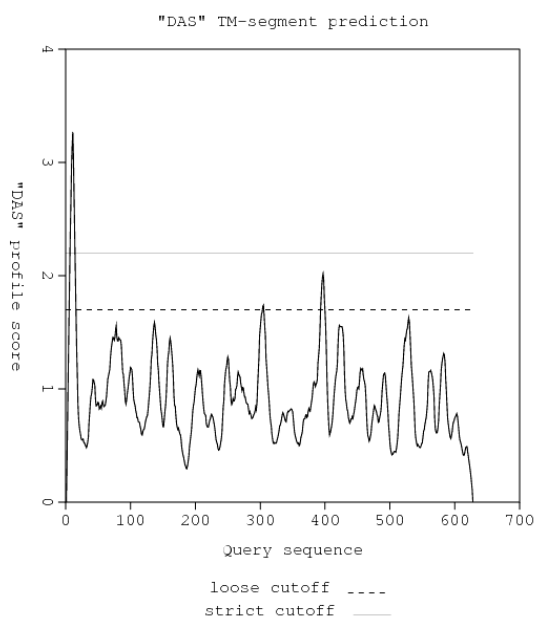


(Fish), สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Amphibian), หนู (Rodent), สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูง (Higher mammals), และแมลง (Insects) พบว่าค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ของปลาคูอุยมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มปลาอยู่ในช่วง 50.5-60.8%, คล้ายคลึงกับกบ (African clawed frog) ซึ่งเป็นตัวแทนของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เท่ากับ 46.6%, คล้ายคลึงกับกลุ่มของหนู ในช่วง 50.5-50.9%, คล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูง 51.4-53.0% และมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของแมลงอยู่ในช่วง 41.5-46.6% และเมื่อนำลำดับของกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาคูอุยมาเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนของยีน Transferrin ในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของปลาในช่วง 37.7-51.8%, คล้ายคลึงกับกบ (African clawed frog) เท่ากับ 37.9%, คล้ายคลึงกับกลุ่มของหนูในช่วง 39.6-40.3%, คล้ายคลึงกับกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูงเท่ากับ 39.9-42.4% และมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของแมลงเท่ากับ 21.2-30.7% จากนั้นนำทั้งลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ของปลาคูอุยมาหาค่าเปอร์เซ็นต์ Similarity พบว่ามีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของปลาอยู่ในช่วง 51.9-64.7% , คล้ายคลึงกับกบ (African clawed frog) เท่ากับ 50.2%, คล้ายคลึงกับกลุ่มของหนูอยู่ในช่วง 53.7-54.2%, คล้ายคลึงกับกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูงในช่วง 52.4-54.2 และคล้ายคลึงกับกลุ่มของแมลงในช่วง 33.8-42.9% (ตารางที่ 6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาคูอุยนั้น มีความคล้ายคลึงกับยีน Transferrin ในกลุ่มของปลาสูงที่สุดและต่ำที่สุดในกลุ่มของแมลง (ตารางผนวกที่ 1 และ 2)

**ตารางที่ 6** ค่าคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Transferrin ในปลาคูอุยกับยีน Transferrin ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

| Organisms      | Identity (%) |            | Similarity (%) |
|----------------|--------------|------------|----------------|
|                | Nucleotide   | Amino acid | Amino acid     |
| Fish           | 50.5-60.8    | 37.7-51.8  | 51.9-64.7      |
| Frog           | 46.6         | 37.9       | 50.2           |
| Rodent         | 50.5-50.9    | 39.6-40.3  | 53.7-54.2      |
| Higher mammals | 51.4-53.0    | 39.9-42.4  | 52.4-54.2      |
| Insects        | 41.5-46.6    | 21.2-30.7  | 33.8-42.9      |

**หมายเหตุ:** รายละเอียดของการเปรียบเทียบแสดงไว้ในตารางผนวก ที่ 1 และ 2



| Potential transmembrane segments |      |        |   |        |
|----------------------------------|------|--------|---|--------|
| Start                            | Stop | Length | ~ | Cutoff |
| 6                                | 15   | 10     | ~ | 1.7    |
| 7                                | 14   | 8      | ~ | 2.2    |
| 304                              | 305  | 2      | ~ | 1.7    |
| 394                              | 399  | 6      | ~ | 1.7    |

ภาพที่ 7 การหาตำแหน่ง Hydrophobic leader peptide โดยใช้โปรแกรม DAS Transmembrane prediction

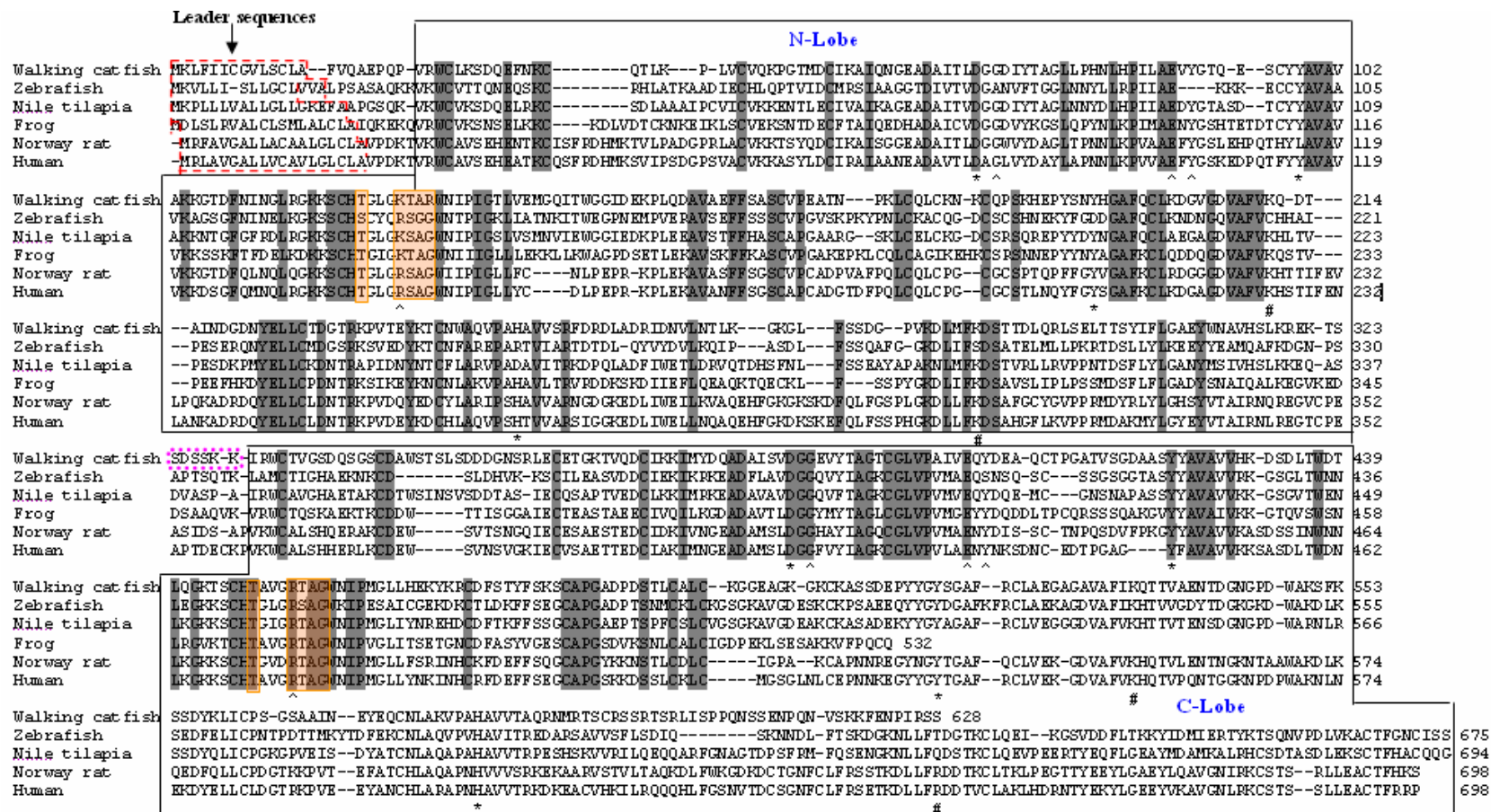
### 3.2 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ของปลาดุกอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

เมื่อนำลำดับของกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาดุกออกมาทำ Multiple sequence alignment เปรียบเทียบกับยีน Transferrin ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ซึ่งได้แก่ปลา Zebrafish (*Danio rerio*) (BK001559), Human (*Homo sapiens*) (DQ923758), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (DQ272465), Norway rat (*Rattus norvegicus*) (D38380) และ African clawed frog (*Xenopus laevis*) (BC054950) โดยใช้โปรแกรม Clustal W ปรากฏว่ามีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ Conserved กันทั้งหมด 117 ตำแหน่ง ซึ่งในจำนวนนี้เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine จำนวน 21 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งการ Conserved ของกรดอะมิโนที่สำคัญได้แก่ Ala 99-Val 100-Ala 101, Ser 119-Cys 120-His 121, Gly 195-Ala 196-Phe 197, Val 207-Ala 208-Phe 209-Val

210, Tyr 222-Glu 223-Leu 224-Leu 225-Cys 226, Asp 385-Gly 386-Gly 387, Cys 395-Gly 396-Leu 397-Val 398-Pro 399, Ala 425-Val 426-Ala 427, Cys 446-His 447-Thr 448, Ala 454-Gly 455-Trp 456 และ Cys 480-Ala 481-Pro 482-Gly 483 ซึ่งจากการทำ Multiple sequence alignment เปรียบเทียบในสิ่งมีชีวิตทั้ง 6 ชนิด ทำให้ทราบว่าลำดับของกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของ African clawed frog มีความยาวสั้นที่สุดคือ 532 Residues รองลงมาคือปลาคอกุยซึ่งมีความยาวเท่ากับ 628 Residues และพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ Transferrin ทั้ง Norway rat และ Human มีความยาวมากที่สุดคือ 698 Residues ซึ่งทั้งสองชนิดมีความยาวเท่ากัน นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง Iron-binding ligand จำนวน 8 ตำแหน่ง โดยอยู่ในส่วนของ N-lobe และ C-lobe อย่างละ 4 Residues (ภาพที่ 8 , ตารางที่ 7 และตารางที่ 8) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ในปลาคอกุยมาเปรียบเทียบกับเฉพาะกลุ่มปลาด้วยกันจำนวน 14 ชนิด ได้แก่ Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (D89084), Cherry salmon (*Oncorhynchus masou*) (D89087), Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (D89083), Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) (D89085), Amago (*Oncorhynchus rhodurus*) (D89086), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (DQ272465), Japanese medaka (*Oryzias latipes*) (D64033), Red seabream (*Pagrus major*) (AY335444), Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) (D88801), Atlantic salmon (*Salmo salar*) (L20313), Brown trout (*Salmo trutta*) (D89091), Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) (D89089), Lake trout (*Salvelinus namaycush*) (D89090) และ Iwana (*Salvelinus leucomaenis pluvius*) (D89088) พบว่ามีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ Conserved กันทั้งสิ้น 177 ตำแหน่ง โดยลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ในปลาคอกุยจะมีความยาวสั้นที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ตำแหน่ง Thr 411-Pro 412-Gly 413 ในส่วนของ C-lobe ของยีน Transferrin ในปลาคอกุยจะมีความยาวของลำดับกรดอะมิโนมากกว่ายีน Transferrin ในปลาชนิดอื่น ๆ ที่ตำแหน่งเดียวกัน (ภาพที่ 9)

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA version 3.1 และกำหนดค่า Bootstrap ที่ 1000 replicates จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ในปลาคอกุยที่ทำการศึกษาและจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อีก 34 ชนิด ซึ่งได้จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ได้แก่ Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (D89084), Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (D89083), Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) (D89085), Cherry salmon (*Oncorhynchus masou*) (D89087), Amago (*Oncorhynchus rhodurus*) (D89086), Iwana (*Salvelinus leucomaenis pluvius*) (D89088), Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) (D89089), Lake trout (*Salvelinus namaycush*) (D89090), Atlantic salmon (*Salmo salar*) (L20313), Brown trout (*Salmo trutta*) (D89091), Bastard halibut

(*Paralichthys olivaceus*) (D88801), Red seabream (*Pagrus major*) (AY335444), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (DQ272465), Japanese medaka (*Oryzias latipes*) (D64033), African clawed frog (*Xenopus laevis*) (BC054950), House mouse (*Mus musculus*) (BC092046), Norway rat (*Rattus norvegicus*) (D38380), Cattle (*Bos taurus*) (BC122602), Horse (*Equus caballus*) (M69020), Human (*Homo sapiens*) (DQ923758), Woodchuck (*Marmota monax*) (AY288100), Tsetse (*Glossina morsitans morsitans*) (AF368908), Flesh fly (*Sarcophaga peregrine*) (D28940), Bean bug (*Riptortus clavatus*) (AF046126), Honey bee (*Apis mellifera*) (AY217097), Red fire ant (*Solenopsis invicta*) (AY940116), Domestic silkworm (*Bombyx mori*) (DQ375762), Tobacco hornworm (*Manduca sexta*) (M62802), Striped riceborer (*Chilo suppressalis*) (AB158473), Mulberry longicorn (*Apriona germari*) (DQ386641), White-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis*) (DQ882181), Eastern lubber grasshopper (*Romalea microptera*) (AY362358), Tropical cockroach (*Blaberus discoidalis*) (L05340), Giant northern termite (*Mastotermes darwiniensis*) (AF535146) โดยพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของความสัมพันธ์ออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 2 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ กลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังและกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีเฉพาะ Transferrin ในกลุ่มของแมลง (Insects) โดยในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังยังสามารถแบ่งความสัมพันธ์ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มของปลา (Fish) และกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) ที่รวมอยู่กับสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (African claw frog) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ในกลุ่มของปลาพบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 1 นั้นจะเป็นกลุ่มที่มีสมาชิกเป็นยีน Transferrin ของปลาในกลุ่ม Salmonids ทั้งหมด กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของปลา Bastard halibut, Red seabream, Nile tilapia และ Japanese medaka และกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีเฉพาะ Transferrin ของปลาคูเกอยเท่านั้น (ภาพที่ 10)



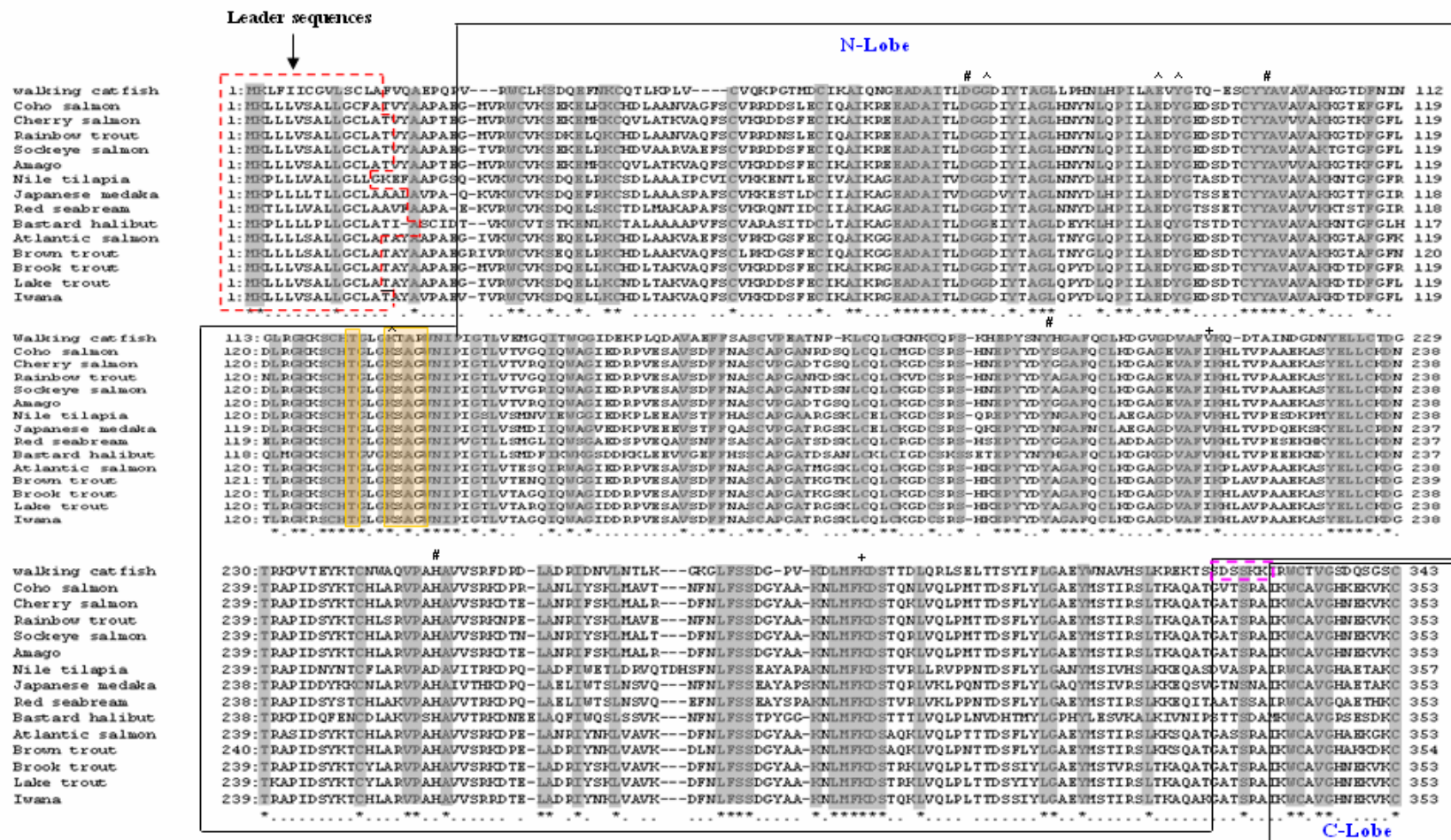
ภาพที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาดุกอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยที่ลำดับกรดอะมิโนที่ Conserved กันจะมีสีทึบ  
 สัญลักษณ์ดอกจัน(\*) แสดงถึงตำแหน่งที่เป็น Iron-binding ligand, สัญลักษณ์ ^ แสดงถึงตำแหน่ง Second shell-hydrogen-binding network,  
 สัญลักษณ์ # แสดงถึงตำแหน่ง Dilysine trigger, เครื่องหมายขีด (-) แสดงถึงช่องว่าง (Gaps) ตัวอักษรในกรอบสี่เหลี่ยมประหลิดชมพูแสดงถึงตำแหน่ง  
 Hinge region, N- และ C-lobe แสดงภายในกรอบตำแหน่ง CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> binding-sites อยู่ภายในกรอบสี่เหลี่ยม

ตารางที่ 7 ตำแหน่ง Iron binding ของยีน Transferrin ในปลาตุกอุยเปรียบเทียบกับของมนุษย์

| Human   |         |                                       | Walking catfish |         |
|---------|---------|---------------------------------------|-----------------|---------|
| Residue |         | Reported function                     | Residue         |         |
| N-Lobe  | C-Lobe  |                                       | N-Lobe          | C-Lobe  |
| Asp-63  | Asp-392 | Iron-binding ligand                   | Asp-54          | Asp-371 |
| Gly-65  | Gly-394 | Second shell-hydrogen-binding network | Gly-56          | Gly-373 |
| Glu-83  | Glu-410 | Second shell-hydrogen-binding network | Glu-74          | Glu-389 |
| Tyr-85  | Tyr-412 | Second shell-hydrogen-binding network | Tyr-76          | Tyr-391 |
| Tyr-95  | Tyr-426 | Iron-binding ligand                   | Tyr-83          | Tyr-409 |
| Arg-124 | Arg-456 | Second shell-hydrogen-binding network | Lys-112         | Arg-438 |
| Tyr-188 | Tyr-517 | Iron-binding ligand                   | Tyr-179         | Tyr-501 |
| Lys-206 | Lys-534 | Dilysine trigger                      | Lys-197         | Lys-519 |
| His-249 | His-585 | Iron-binding ligand                   | His-234         | His-568 |
| Lys-296 | Arg-632 | Dilysine trigger                      | Lys-273         | Arg-626 |

**ตารางที่ 8** ตารางแสดงตำแหน่งของ Iron-binding ligand ของยีน Transferrin ของปลาคูยกูยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

|                 | ตำแหน่ง Iron binding ligand |            |             |             |             |             |             |             |
|-----------------|-----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                 | ← N-Lobe →                  |            |             |             | ← C-Lobe →  |             |             |             |
|                 | ตำแหน่งที่                  |            |             |             |             |             |             |             |
|                 | 1                           | 2          | 3           | 4           | 5           | 6           | 7           | 8           |
| Walking catfish | Asp (D)-54                  | Tyr (Y)-83 | Tyr (Y)-179 | His (H)-234 | Asp (D)-371 | Tyr (Y)-409 | Tyr (Y)-501 | His (H)-568 |
| Zebrafish       | Asp (D)-58                  | Tyr (Y)-85 | Asp (D)-183 | Arg (R)-239 | Asp (D)-369 | Tyr (Y)-404 | Tyr (Y)-499 | His (H)-571 |
| Nile tilapia    | Asp (D)-61                  | Tyr (Y)-92 | Tyr (Y)-188 | Asp (D)-244 | Asp (D)-385 | Tyr (Y)-420 | Tyr (Y)-515 | His (H)-583 |
| Frog            | Asp (D)-61                  | Tyr (Y)-94 | Tyr (Y)-193 | His (H)-249 | Asp (D)-385 | Tyr (Y)-424 | -           | -           |
| Norway rat      | Asp (D)-64                  | Leu (L)-97 | Tyr (Y)-189 | His (H)-250 | Asp (D)-392 | Tyr (Y)-429 | Tyr (Y)-518 | His (H)-586 |
| Human           | Asp (D)-63                  | Tyr (Y)-95 | Tyr (Y)-188 | His (H)-249 | Asp (D)-392 | Tyr (Y)-426 | Tyr (Y)-517 | His (H)-585 |



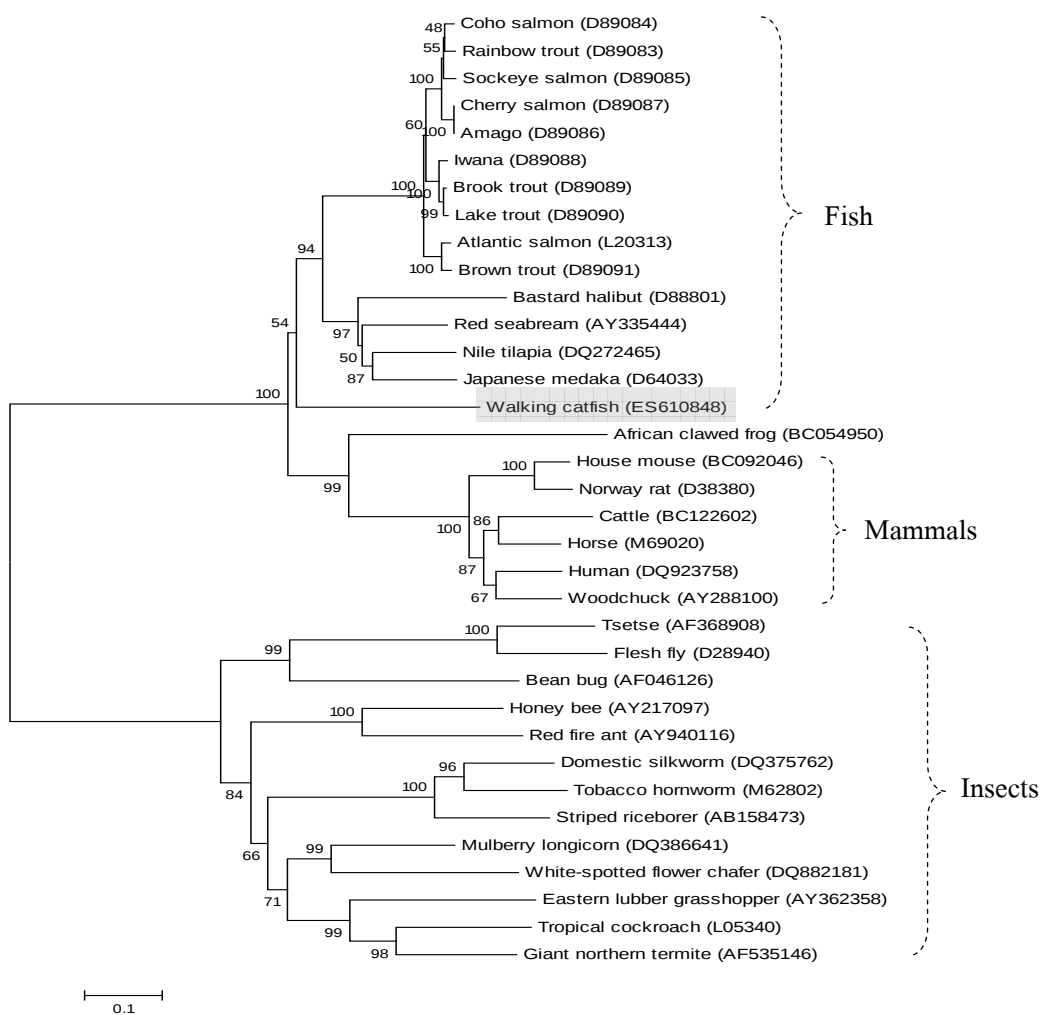
ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาคูอุยกับยีน Transferrin ของปลาชนิดอื่น ๆ โดยที่ลำดับกรดอะมิโนที่ Conserved กันจะมีสีที่บวมและมีสัญลักษณ์ดอกจัน (\*), #; Iron binding ligand, ^; Second shell-hydrogen binding network, +; Dilysine trigger, ตำแหน่ง  $\text{CO}_3^{2-}$ -binding sites อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยม

人 人 人

|      |         |             |           |                       |                      |                                                     |     |
|------|---------|-------------|-----------|-----------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|-----|
| 344: | DAMSTIN | LDDGDSRIE   | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDAVR  | --SAPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 463 |
| 344: | DAMSTIN | -ITD-GDSRIE | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDAVR  | --SAPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -ITD-GDSRIE | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDAVR  | --SAPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -FTD-GDSRIE | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDAVR  | --SAPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -FTD-GDSRIE | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDAVR  | --SDPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -ITD-GDSRIE | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDAVR  | --SAPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -VSDTASIE   | CQSAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDHM   | --GNENAPASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI   | 473 |
| 344: | DAMSTIN | -VTDDTAATIE | CQNAPSVEE | CIQCKHKKKADAMAIDCGVVY | TACKCGLVVAHVBOYDAHL  | --SSSQGGASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI   | 469 |
| 344: | DAMSTIN | -HTDGTDTIE  | CQNAATVEE | CIQCKHKKKADAMAIDCGVVY | TACKCGLLIAMHBOYDAQO  | --STTGCTASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI   | 469 |
| 344: | DAMSTIN | -LVQDGTITIE | CIGNTVD   | CIQCKHKKKADAMAIDCGVVY | TACKCGLVVAHVBOYDGQC  | --SAPGA--ARLYFAVAVVKRGSCLTWTKLNPKRSGCHGLRTAGNIPHGLI | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -FADGESKIE  | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDADLC | --SAPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -FADGESKIE  | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDADLC | --SAPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 469 |
| 344: | DAMSTIN | -FADGESKIE  | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDADLC | --STPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -FADGESKIE  | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDADLC | --STPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |
| 344: | DAMSTIN | -FADGESKIE  | CQDAPTVDE | CIQCKHKKKADAIAVDCGVVF | TACKCGLVVAHVBOYDADLC | --STPGE--ASSYFAVAVVKRGSCLTWTKLKGRSGCHGLRTAGNIPHGLI  | 468 |

[illegible]

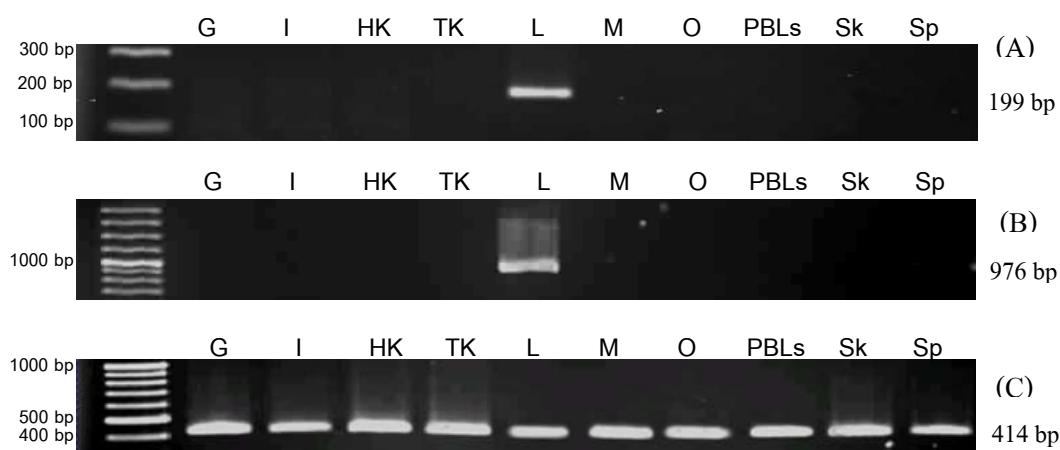
579:VPAHAVVTRPESRCEVVSILLEQARFGSSGSDSSFMHFPQDVGQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSC--- 628  
589:VPAHAVITRPESRCEVVSILLEQARFGSSGSDSSFMHFPQDVGQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSC--- 687  
589:VPAHAVITRPESRCEVVSILLEQARFGSSGSDSSFMHFPQDVGQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
589:VPAHAVITRPESRCEVVSILLEQARFGSSGSDSSFMHFPQDVGQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
589:VPAHAVITRPESRCEVVSILLEQARFGSSGSDSSFMHFPQDVGQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
589:VPAHAVITRPESRCEVVSILLEQARFGSSGSDSSFMHFPQDVGQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
593:APAHAVVTRPESRCKVVRILLEQARFGCNACTDPSFMHFPQSENGQNLFFQDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 694  
589:VPAHAVVTRPESRCKVVRILLEQARFGCNACTDPSFMHFPQSENGQNLFFQDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 690  
589:VPAHAVVTRPESRCKVVRILLEQARFGCNACTDPSFMHFPQSENGQNLFFQDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
585:VMAHAVVTRPEIRTKVTVLNNQKHFNGSNASESFMHFPSPDGENLLFKYSTHCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 685  
588:VPAHAVITRPETRGCVVSILLEQAKFGSSGSDSSFMHFPQSSVGEQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 690  
589:VPAHAVITRPETRGCVVSILLEQAKFGSSGSDSSFMHFPQSSVGEQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
589:VPAHAVITRPETRGCVVSILLEQAKFGSSGSDSSFMHFPQSSVGEQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
589:VPAHAVITRPETRGCVVSILLEQAKFGSSGSDSSFMHFPQSSVGEQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691  
589:VPAHAVITRPETRGCVVSILLEQAKFGSSGSDSSFMHFPQSSVGEQNLFFKDSKCLQRIKPTKQDFGLCEEYHIAHQSLRCCSNSTSDLEKACTFHSCQQRK 691



ภาพที่ 10 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ในปลาตู้กูด  
เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อีก 34 ชนิด

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin โดยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุย

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ในเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุยทั้งสิ้น 10 อวัยวะ ได้แก่ เหงือก (Gills), ลำไส้ (Intestine), ไตส่วนหน้า (Head kidney), ไตส่วนหลัง (Trunk kidney), ตับ (Liver), กล้ามเนื้อ (Muscle), รังไข่ (Ovary), Peripheral blood leukocytes (PBLs), ผิวหนัง (Skin) และม้าม (Spleen) ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ Gene-specific primers 2 คู่ โดยคู่ที่ 1 คือ TfF1 และ TfR1 เป็น Forward และ Reverse primers ตามลำดับ และคู่ที่ 2 คือ TfF2 และ TfR2 เป็น Forward และ Reverse primers ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ผลปรากฏว่าเกิด Band ของ PCR product ขนาด 199 bp เมื่อใช้ Primer คู่ที่ 1 (ภาพที่ 11A) และ 976 bp เมื่อใช้ Primer คู่ที่ 2 ตามลำดับ (ภาพที่ 11B) เฉพาะในเนื้อเยื่อที่ได้จากตับเท่านั้น สำหรับยีน  $\beta$ -actin ซึ่งเป็น House keeping gene ที่ใช้เป็น Internal control พบว่าเกิด Band ของ PCR product ขนาด 414 bp (ภาพที่ 11C) ซึ่งมีความหนาใกล้เคียงกันในทุกอวัยวะ



**ภาพที่ 11** การแสดงออกของยีน Transferrin ในเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุยโดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย A) PCR product ขนาด 199 bp จากการใช้ Primer TfF1 และ TfR1, B) PCR product ขนาด 976 bp จากการใช้ Primer TfF2 และ TfR2 และ C) PCR product ของยีน  $\beta$ -actin ขนาด 414 bp ซึ่งใช้เป็น Internal control (G; Gills, I; Intestine, HK; Head kidney, TK; Trunk kidney, L; Liver, M; Muscle, O; Ovary, PBLs; Peripheral blood leukocytes, Sk; Skin, Sp; Spleen)

## 5. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยภายหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยภายหลังการได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับคือ  $10^7$  CFU/ml (Treatment ที่ 1) และ  $10^9$  CFU/ml (Treatment ที่ 2) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl (Control) และทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน Transferrin โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR ซึ่งใช้ Gene specific primers ได้แก่ Tff 1 qf และ Tfr 1 qr เป็น Forward และ Reverse primers ตามลำดับและใช้ยีน 16s ribosomal RNA เป็น Internal control (ตารางที่ 4) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ระดับการแสดงออก ซึ่งมี 2 ขั้นตอนได้แก่ Absolute quantification และ Relative quantification ตามวิธีของ Livak and Schmittgen (2001)

การวิเคราะห์ Absolute quantification จะทำการวิเคราะห์ Transcript copy number โดยการสร้างเส้น Standard curve เป็นการ Plot ค่า log แบบเส้นตรงของ Initial copy number ของ Standard เทียบกับค่า Threshold cycle ( $C_t$  value) โดยจะวัดค่า  $C_t$  ของ Transferrin gene และ Standard curve เพื่อใช้วิเคราะห์ Copy number เบื้องต้น โดย Amplification plot ในภาพที่ 12 แสดงถึงการเพิ่มสูงขึ้นของการจับกันระหว่าง Fluorescent dye กับ Amplified PCR products ของ Standard เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่ง Curve ที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่าง Standard ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย เทียบกับค่า Threshold cycle ( $C_t$  value)

การวิเคราะห์ Relative quantification จะใช้อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับ Reference group บางกลุ่ม เช่น Internal หรือ Untreated control เพื่อ Normalize จำนวนของ Target transcript ซึ่งวิธีนี้อยู่บนพื้นฐานของ Equal PCR efficiencies สำหรับ Target และ Internal control mRNAs โดย Relative copy number ของ mRNA ของ Transferrin จะถูกคำนวณตามวิธี  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001)

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ของแต่ละยีนนั้น การวิเคราะห์ Melt curve ซึ่งจะสามารถยืนยันว่าเป็น Product ที่เราต้องการเท่านั้นที่ถูก Amplify ไม่ใช่มาจาก PCR product ที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงหรือจาก Primer dimer ซึ่งเกิดจากการจับกันเองของ Primers ที่ใช้ในการทดสอบ อุณหภูมิสำหรับ Melting ที่แตกต่างกันจะสามารถสังเกตได้ระหว่าง PCR product ที่มี ความจำเพาะเจาะจงหรือไม่มีความจำเพาะเจาะจง โดย Melting curve จะได้จากการเปลี่ยนอุณหภูมิ

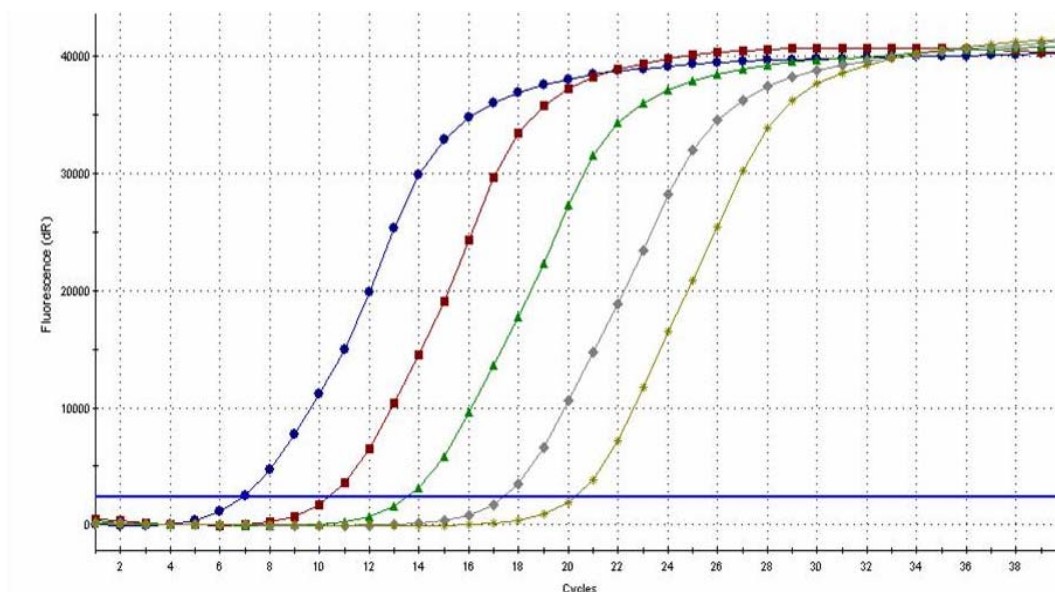
อย่างช้า ๆ ของปฏิกิริยา PCR จนกระทั่ง 95 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเวลาขณะที่มีการเก็บข้อมูล จาก ภาพที่ 13 จะแสดงถึงรูปแบบของ Melt temperature ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า PCR Product ที่ถูก Amplify นั้น คือยีน Transferrin ของปลาดุกอุยที่ทำการศึกษาและ Primer จะ Amplify เฉพาะยีน Transferrin ของ ปลาดุกอุยที่ทำการศึกษาเท่านั้น นอกจากนี้ค่า Real-Time PCR Efficiency ของยีนที่ทำการศึกษาก็จะ สามารถคำนวณได้จาก Standard curve ของยีนนั้น ๆ จากสูตร

$$\text{Real-Time PCR Efficiency (E)} = 10^{(-1/\text{slope})}$$

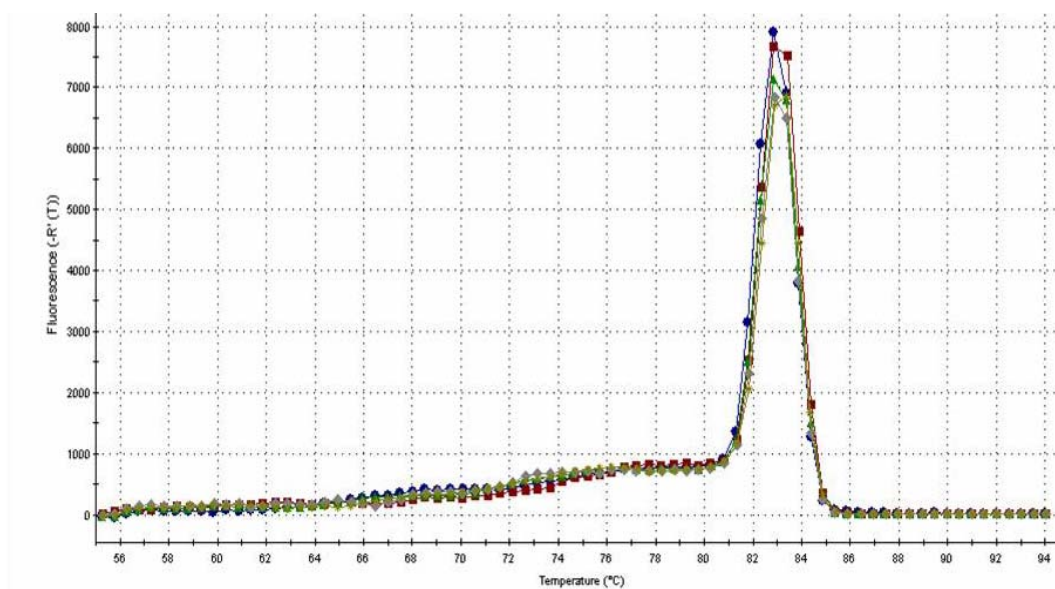
โดยค่า Real-Time PCR Efficiency ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยจะคำนวณจาก Standard curve ของยีน Transferrin (ภาพที่ 14) ซึ่งค่าที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 1.98 ซึ่งโดยทั่วไป Real-Time PCR Efficiency ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.60-2.10 (Pfaffi, 2004)

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยภายหลัง การกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* สองระดับความเข้มข้น พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยใน Treatment ที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 12 จะพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* นั้นจะลดต่ำลง (Down-regulated) ประมาณ 1.4 และ 5.6 เท่าใน Treatment ที่ 1 และ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุมตามลำดับ อย่างไรก็ตามมีเพียง Treatment ที่ 2 เท่านั้นที่ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยลดต่ำลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งเป็น Treatment ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ในระดับความเข้มข้น สูงกว่า Treatment ที่ 1 นอกจากนั้นในชั่วโมงที่ 24 จะพบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออก ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุย ซึ่งพบว่าใน Treatment ที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยจะเพิ่มสูงขึ้น (Up-regulated) ประมาณ 1.5 เท่า ขณะที่ใน Treatment ที่ 2 ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยจะลดลง (Down-regulated) ประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ แต่ทั้งสอง Treatment นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับกลุ่มควบคุม แต่ที่พบว่าปลาในกลุ่ม Treatment ที่ 2 นั้นมีระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ต่ำกว่า Treatment ที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนถึง ชั่วโมงที่ 72 พบว่าทั้ง Treatment ที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม และเป็น ที่น่าสังเกตว่าอย่างไรก็ตาม ในชั่วโมงที่ 96 พบระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุก อุยเพิ่มสูงขึ้น (Up-regulated) ใน Treatment ที่ 1 และ 2 ประมาณ 5 และ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ

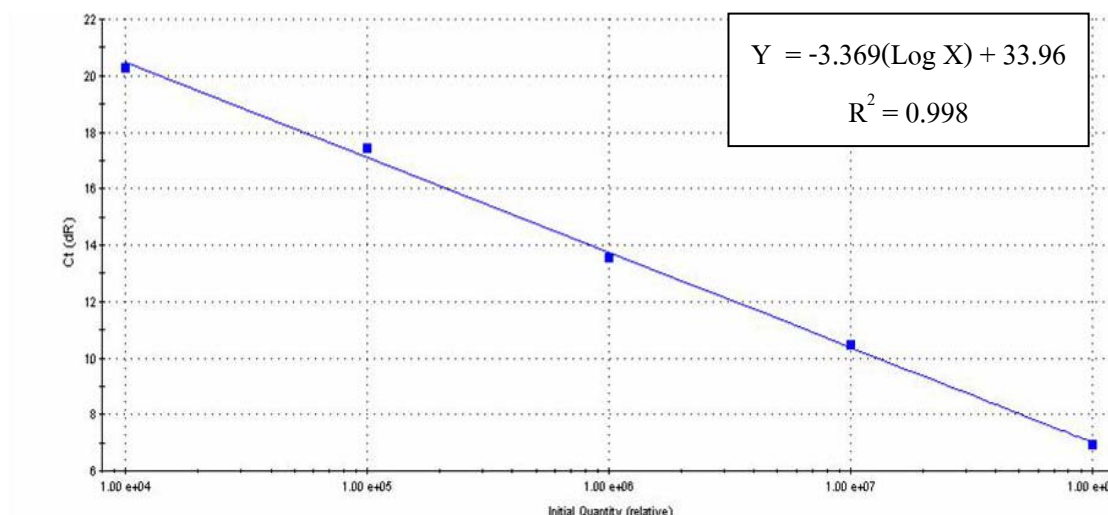
กลุ่มควบคุมตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบแล้วพบว่ามีเพียง Treatment ที่ 1 เท่านั้นที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ภาพที่ 15)



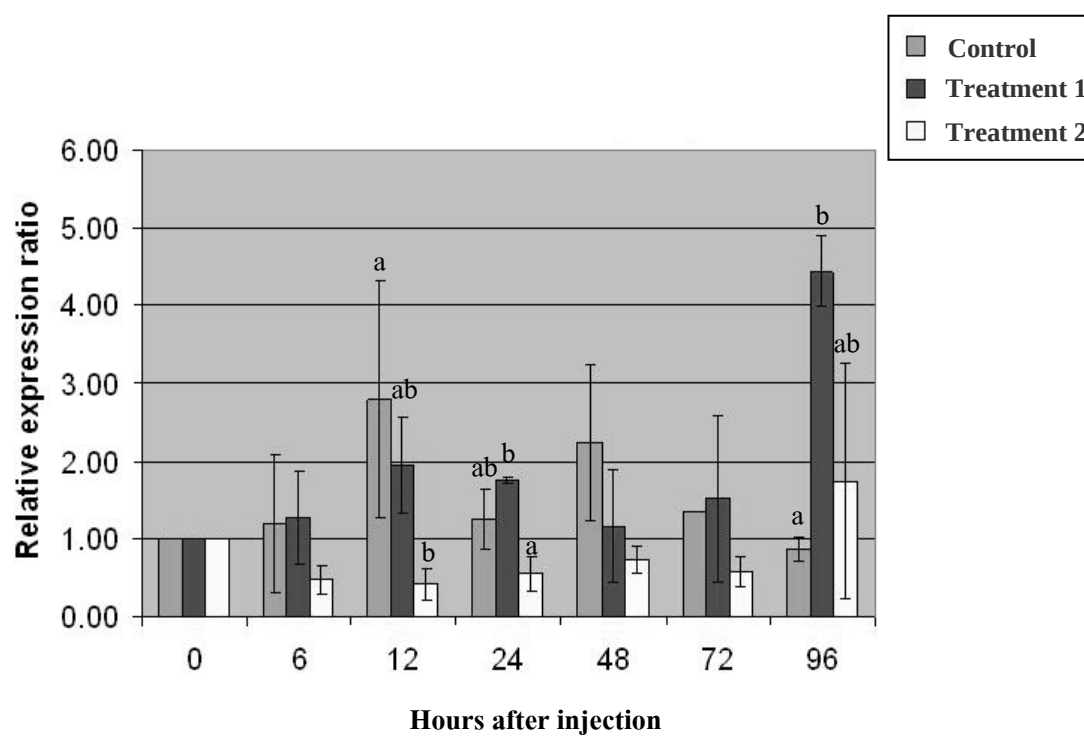
ภาพที่ 12 Amplification plot เพื่อการสร้าง Standard curve ของยีน Transferrin ของปลาคุกอุย



ภาพที่ 13 Melting curves ของ Primers ที่ใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาคุกอุย



ภาพที่ 14 Standard curve ของการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลาคูกอุย



ภาพที่ 15 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาคูกอุยภายหลังจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ในระยะเวลาที่แตกต่างกันโดยเทคนิค Real-time PCR อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่กำกับในแต่ละแท่งของกราฟในชั่วโมงต่าง ๆ แสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

## วิจารณ์

### 1. การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุย

จากผลการศึกษาการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของ cDNA ของยีน Transferrin (Cm-Tf) ในปลาดุกอุย ซึ่งออกแบบ Primers จาก Partial cDNA ของยีน Transferrin (EB360378) ของปลาดุกอุยที่มีความยาวเท่ากับ 384 bp ซึ่งได้จากการสร้างห้องสมุด cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อตับ (Liver cDNA library) ของปลาดุกอุย (Panprommin *et al.*, 2008) โดยใช้เทคนิค 5' และ 3' RACE พบว่า Full-length “Cm-Tf” มีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 2,183 bp (2.183 kb) และ Full-length ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังมีความยาวใกล้เคียงกับการศึกษา cDNA ของยีน Transferrin ในกลุ่มปลา Salmonids จำนวน 7 ชนิด ของ Lee *et al.* (1998) ซึ่งได้แก่ Kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*), Amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawa*), Masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*), Japanese char (*Salvelinus pluvius*), Brook trout (*Salvelinus fontinalis*), Lake trout (*Salvelinus namaycush*) และ Brown trout (*Salmo trutta*) พบว่า Full-length ของ cDNA ของยีน Transferrin ในกลุ่มปลา Salmonids จะมีความยาวอยู่ในช่วง 2.2-2.4 kb ขณะที่ Transferrin ของปลาและสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นจะมีความยาวอยู่ในช่วง 2.1-2.5 kb ส่วน cDNA ของ Transferrin ของแมลงนั้นจะมีความยาวตั้งแต่ 2.0-2.5 kb ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วพบว่า Full-length ของ cDNA “Cm-Tf” และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ รวมทั้งสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกแมลงจะมีขนาดความยาวของ cDNA ของยีน Transferrin ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 9)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงขนาดของ ORF ยังพบว่า Cm-Tf ของปลาดุกอุยมีขนาดความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 628 Residues ซึ่งน้อยกว่า ORF ของ Transferrin ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ทั้งหมดประมาณ 60 Residues ยกเว้น Transferrin ของ African clawed frog ซึ่งมีขนาดของ ORF เท่ากับ 532 Residues เท่านั้น โดยพบว่ากลุ่มของปลามีความยาวระหว่าง 685-694 Residues ส่วน Mammals มีความยาวระหว่าง 697-706 Residues และกลุ่มของแมลงมีความยาวเท่ากับ 629-728 Residues ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้เพราะบริเวณ C-lobe ของ Cm-Tf นั้นจะสั้นกว่า C-lobe ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของ ORF ของยีน Transferrin ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดจะพบว่า ORF ของยีน Transferrin ของปลาดุก (Giant northern termite, *Mastotermes darwiniensis*) จะมีขนาดยาวที่สุดคือ 728 Residues (Thompson *et al.*, 2003) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 คุณลักษณะของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาตู้กอยและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

| Organisms                                         | Accession number | Full-length | Open reading frame (ORF) |                       | Total cysteines/ in mature protein<br>(Residues) | Iron binding ligand<br>(Residues) |
|---------------------------------------------------|------------------|-------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|
|                                                   |                  | Nucleotide  | Nucleotide               | Amino acid (Residues) |                                                  |                                   |
|                                                   |                  | (bp)        | (bp)                     |                       |                                                  |                                   |
| Walking catfish ( <i>Clarias macrocephalus</i> )  | ES610848         | 2,183       | 1,884                    | 628                   | 31/29                                            | 8                                 |
| Coho salmon ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )       | D89084           | 2,504       | 2064                     | 687                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )      | D89083           | 2,634       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Sockeye salmon ( <i>Oncorhynchus nerka</i> )      | D89085           | 2,429       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Cherry salmon ( <i>Oncorhynchus masou</i> )       | D89087           | 2,153       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Amago ( <i>Oncorhynchus rhodurus</i> )            | D89086           | 2,153       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Iwana ( <i>Salvelinus leucomaenis pluvius</i> )   | D89088           | 2,437       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Brook trout ( <i>Salvelinus fontinalis</i> )      | D89089           | 2,431       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Lake trout ( <i>Salvelinus namaycush</i> )        | D89090           | 2,421       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )            | L20313           | 2,557       | 2,073                    | 690                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Brown trout ( <i>Salmo trutta</i> )               | D89091           | 2,437       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |
| Bastard halibut ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) | D88801           | 2,296       | 2,058                    | 685                   | 34/33                                            | 8                                 |
| Red seabream ( <i>Pagrus major</i> )              | AY335444         | 2,444       | 2,076                    | 691                   | 33/32                                            | 8                                 |

ตารางที่ 9 (ต่อ)

| Organisms                                      | Accession number | Full-length | Open reading frame (ORF) |                       | Total cysteines/ in mature protein<br>(Residues) | Iron binding sites<br>(Residues) |
|------------------------------------------------|------------------|-------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|
|                                                |                  | Nucleotide  | Nucleotide               | Amino acid (Residues) |                                                  |                                  |
|                                                |                  | (bp)        | (bp)                     |                       |                                                  |                                  |
| Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )  | DQ272465         | 2,226       | 2,085                    | 694                   | 33/33                                            | 8                                |
| Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )     | D64033           | 2,352       | 2,073                    | 690                   | 33/32                                            | 8                                |
| African clawed frog ( <i>Xenopus laevis</i> )  | BC054950         | 2,344       | 1,599                    | 532                   | 30/28                                            | 6                                |
| House mouse ( <i>Mus musculus</i> )            | BC092046         | 2,335       | 2,094                    | 697                   | 38/36                                            | 8                                |
| Norway rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )        | D38380           | 2,293       | 2,097                    | 698                   | 39/37                                            | 8                                |
| Cattle ( <i>Bos taurus</i> )                   | BC122602         | 2,584       | 2,115                    | 704                   | 38/36                                            | 8                                |
| Horse ( <i>Equus caballus</i> )                | M69020           | 2,310       | 2,121                    | 706                   | 39/37                                            | 8                                |
| Human ( <i>Homo sapiens</i> )                  | DQ923758         | 2,160       | 2,097                    | 698                   | 40/38                                            | 8                                |
| Woodchuck ( <i>Marmota monax</i> )             | AY288100         | 2,300       | 2,085                    | 694                   | 40/38                                            | 8                                |
| Tsetse ( <i>Glossina morsitans morsitans</i> ) | AF368908         | 2,064       | 1,893                    | 630                   | 21/20                                            | 4                                |
| Flesh fly ( <i>Sarcophaga peregrina</i> )      | D28940           | 2,054       | 1,890                    | 629                   | 20/20                                            | 4                                |
| Bean bug ( <i>Riptortus clavatus</i> )         | AF046126         | 2,169       | 1,959                    | 652                   | 23/23                                            | 4                                |

ตารางที่ 9 (ต่อ)

| Organisms                                                    | Accession number | Full-length     | Open reading frame (ORF) |                       | Total cysteines/ in mature | Iron binding sites (Residues) |
|--------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|
|                                                              |                  | Nucleotide (bp) | Nucleotide (bp)          | Amino acid (Residues) | protein (Residues)         |                               |
| Honey bee ( <i>Apis mellifera</i> )                          | AY217097         | 2,326           | 2,139                    | 712                   | 25/24                      | 7                             |
| Red fire ant ( <i>Solenopsis invicta</i> )                   | AY940116         | 2,436           | 2,109                    | 702                   | 24/24                      | 7                             |
| Domestic silkworm ( <i>Bombyx mori</i> )                     | DQ375762         | 2,171           | 2,046                    | 681                   | 26/24                      | 8                             |
| Tobacco hornworm ( <i>Manduca sexta</i> )                    | M62802           | 2,183           | 2,046                    | 681                   | 25/24                      | 8                             |
| Striped riceborer ( <i>Chilo suppressalis</i> )              | AB158473         | 2,248           | 1,935                    | 644                   | 22/22                      | 8                             |
| Mulberry longicorn ( <i>Apriona germari</i> )                | DQ386641         | Not completed   | 2,169                    | 722                   | 26/26                      | 8                             |
| White-spotted flower chafer ( <i>Protaetia brevitarsis</i> ) | DQ882181         | 2,338           | 2,166                    | 721                   | 27/26                      | 8                             |
| Eastern lubber grasshopper ( <i>Romalea microptera</i> )     | AY362358         | 2,513           | 2,196                    | 731                   | 26/26                      | 8                             |
| Tropical cockroach ( <i>Blaberus discoidalis</i> )           | L05340           | 2,380           | 2,181                    | 726                   | 28/27                      | 8                             |
| Giant northern termite ( <i>Mastotermes darwiniensis</i> )   | AF535146         | 2,531           | 2,187                    | 728                   | 25/25                      | 8                             |
| Bumblebee ( <i>Bombus ignitus</i> )                          | EU144233         | 2,340           | 2,121                    | 706                   | 25/25                      | 8                             |

## 2. การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้างของ cDNA ของยีน Transferrin ในปลาอุกอุย

การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้าง cDNA ของยีน Transferrin ของปลาอุกอุยซึ่งพบว่า ยีน Transferrin ของปลาอุกอุยมีความยาวทั้งหมด (Full-length) เท่ากับ 2,183 bp ประกอบด้วย Open reading frame (ORF) ขนาด 1,884 bp โดยแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เท่ากับ 628 Residues ประกอบด้วยตำแหน่งของ Leader peptide จำนวน 14 Residues เป็น Mature protein จำนวน 614 Residues ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ cDNA ของยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เช่น การศึกษาของ Kvingedal *et al.* (1993) ซึ่งพบว่า Full-length cDNA ของยีน Transferrin ในปลา Atlantic salmon มีความยาวของ ORF เท่ากับ 2,070 bp โดยสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เท่ากับ 690 Residues โดยมีส่วนของ Leader sequence 18 Residues และเป็นส่วนของ Mature protein เท่ากับ 672 Residues ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Tange *et al.* (1997) ที่พบว่า cDNA ของยีน Transferrin ในปลา Rainbow trout มีขนาดของ ORF เท่ากับ 2,073 bp ซึ่งเป็นส่วนของ Leader sequence และ Mature protein เท่ากับ 15 และ 676 Residues ตามลำดับ นอกจากนี้ Escrivá *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษา cDNA ของยีน Transferrin ใน mammary-gland ที่ได้จากหนูพบว่ามีความยาวทั้งหมด เท่ากับ 2,275 bp ประกอบด้วยกรดอะมิโน 695 Residues ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Signal sequence จำนวน 19 Residues และเป็น Mature protein จำนวน 676 Residues

ในกลุ่มของโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Transferrin superfamily ซึ่งได้แก่ Serum transferrin, Ovotransferrin, Lactotransferrin และ Melanotransferrin โดยทั่วไปทั้งหมดจัดเป็นไกลโคโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นสายยาว ทำหน้าที่หลักในการขนส่งเหล็กในกระแสเลือดไปยังเซลล์หรืออาจทำหน้าที่ช่วยควบคุมปริมาณธาตุเหล็กในร่างกายในระบบของเหลวต่าง ๆ ให้อยู่ในสมดุล นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของ Transferrin ยังพบว่า เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเฉพาะที่ประกอบด้วย Peptide chain ที่มีความคล้ายคลึงกันจำนวน 2 Lobes บนโครงสร้าง ซึ่งได้แก่ N-lobe และ C-lobe ที่เชื่อมต่อกันด้วย Peptide สายสั้น ๆ ที่เรียกว่า “Short hinge region” โดยเมื่อโปรตีน Transferrin ถูกขับออกนอกเซลล์จะต้องมีการตัด N-terminal signal peptide region ออกก่อน และเมื่อพิจารณากลไกการทำงานของโปรตีนชนิดนี้พบว่าทั้ง N-lobe และ C-lobe สามารถจับกับ ไอออนของเหล็กในรูป Ferric ion ( $Fe^{3+}$ ) ได้เช่นเดียวกัน โดยทั้ง N- และ C-lobe จะมีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ใช้จับกับไอออนของเหล็กที่ Conserved กันจำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่ง He and Mason (2002) ได้เป็นผู้พิสูจน์คุณสมบัติดังกล่าวโดยใช้เทคนิค Site-directed mutagenesis แต่ก็พบว่า C-lobe นั้นจะจับไอออนของเหล็กได้แข็งแรงและปลดปล่อยเหล็กได้ช้ากว่าด้วย (Aisen *et al.* 1978) ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ ทางด้าน N-lobe ประกอบด้วย Asp-63, Tyr-95, Tyr-188 และ His-249 (ตัวเลขเป็น

ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิงตาม Human serum transferrin) จะจับกับไอออนเหล็ก  $\text{Fe}^{3+}$  โดยจะทำงานร่วมกันกับไอออนลบ (Synergistic anion) ซึ่งปกติคือ  $\text{CO}_3^{2-}$  ปฏิกริยาการให้โปรตอน ( $\text{H}^+$ ) กับ  $\text{CO}_3^{2-}$  จะทำให้ความสามารถการจับไอออนเหล็กของโปรตีนลดลง เป็นผลทำให้เกิดการปล่อยไอออนเหล็กเป็นอิสระ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ บนโครงสร้างของโปรตีน Transferrin ก็สามารถใช้ในการจับและปล่อยไอออนเหล็กได้เช่นเดียวกัน ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะรวมถึง Dilysine trigger (He *et al.* 1999) และ Second shell residues ชนิดอื่น ๆ (He *et al.* 1998) ซึ่งตำแหน่งของกรดอะมิโนของแต่ละ Lobe จะมีตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับ  $\text{CO}_3^{2-}$  ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยในการยึดจับกับเหล็กที่เรียกว่า “Carbonate anion ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) binding site” บนโครงสร้าง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญและจำเพาะที่ไม่พบในกลุ่มของโปรตีนที่สามารถจับกับธาตุเหล็กในกลุ่มอื่นได้ (Baker, 1994) นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine ซึ่งโดยทั่วไป Transferrin ของสิ่งมีชีวิตที่มีการรายงานจะมีจำนวนประมาณ 20-38 residues ซึ่งสามารถฟอร์มตัวกันเป็น Disulfide bridges ได้เป็นคู่ ๆ 10-19 คู่พันธะ

การศึกษครั้งนี้พบว่าโครงสร้าง cDNA ของยีน Transferrin ในปลาคูกอยมีกรดอะมิโน Cysteine เป็นองค์ประกอบอยู่ทั้งหมด 31 ตำแหน่ง ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าปลาชนิดอื่น ๆ ที่สามารถพบตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine ได้ถึง 33 ตำแหน่ง แต่ยกเว้นในปลา Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) ที่สามารถพบได้ถึง 34 ตำแหน่ง (ตารางที่ 9) โดยตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine ที่อยู่ใน Mature protein เท่านั้นที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิด Disulfide bridges ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่มีความแข็งแรงระหว่าง Sulfhydryl group จำนวน 2 ตำแหน่ง และพันธะนี้จะมี ความสำคัญเกี่ยวข้องกับการม้วนพับตัว (Folding), โครงสร้าง (Structure) และหน้าที่การทำงาน (Function) ของโปรตีน โดยพันธะ Disulfide bridge 1 พันธะเกิดจากกรดอะมิโน Cysteine จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งโดยทั่วไปตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine เหล่านี้จะมีความ Conserved กันสูงมาก ทั้งที่อยู่ในตำแหน่งของ N- และ C-lobe (Ciurazskiewicz *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ในโครงสร้าง cDNA ของยีน Transferrin ในปลาคูกอยยังพบตำแหน่งของ Glycosylation site ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Sugar chain ของ Glycoprotein ที่มีความสำคัญที่ทำให้ Glycoprotein ทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งรวมถึงคุณสมบัติด้าน Stability, Biological activity และ Binding affinity (Satomi *et al.*, 2004) จำนวน 2 ตำแหน่งในส่วน of C-lobe ซึ่งได้แก่ Asparagine 609-Serine 610-Serine 611 และ Asparagine 616-Valine 617-Serine 618 ขณะที่ cDNA ของยีน Transferrin ในมนุษย์จะพบ Glycosylation site motif ที่เป็นแบบ Asparagine-Xaa-Cysteine จำนวน

2 ตำแหน่งเฉพาะในส่วนของ C-lobe เช่นเดียวกัน ซึ่งได้แก่ ตำแหน่งที่ Asparagine413-Xaa-Cysteine และ Asparagine611-Xaa-Cysteine (Satomi *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ Lee *et al.* (1998) และ Bergen *et al.* (2001) รายงานว่า สามารถพบตำแหน่ง Glycosylation binding ligand ของ กรดอะมิโน Aspartic ของยีน Transferrin ได้ทั้ง 2 Lobe (Amino-lobe และ Carboxyl-lobe) ในปลา Coho salmon, Rainbow trout, Kokanee salmon, Lake trout, Amago salmon และ Brown trout และยังพบว่าตำแหน่งของ Glycosylation site จะมีความจำเพาะสำหรับ Transferrin ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งในหนูนั้นจะพบใน C-terminal domain ตำแหน่งเดียวที่ Asparagine 492-X-Threonine 494 เท่านั้น (Hoshino *et al.*, 1996) นอกจากนี้ใน Ovotransferrin ของ Turkey และ Ostrich ซึ่งเป็น Transferrin superfamily จะสามารถพบตำแหน่งของ N-glycosylation sites ได้จำนวน 2 ตำแหน่ง (Asn 473 และ Asn 618) และ 3 ตำแหน่ง (Asn52, Asn471 และ Asn557) ตามลำดับ (Ciuraszkiewicz *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากข้อมูลในปัจจุบันแล้วพบว่ายีน Transferrin ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังมักจะไม่มีพบการขาดหายไปของตำแหน่ง Glycosylation site โดย Ciuraszkiewicz *et al.* (2006) พบว่ามีเพียงยีน Transferrin ของ African toad (P20233) และปลา Medaka (P79819) เท่านั้นที่ไม่พบตำแหน่งของ Glycosylation site นอกจากนี้ในสัตว์เลื้อยคลาน (Red-eared turtle) พบว่าลำดับของกรดอะมิโนของยีน Transferrin มีการขาดหายไปของ N-glycosylation consensus motif (Asn-Xaa-Ser/Thr) ของยีน Ovotransferrin เช่นกัน ซึ่งการที่ตำแหน่งของ Glycosylation site ของ Red-eared turtle ขาดหายไปอาจจะมีสาเหตุจากตำแหน่ง Glycosylation site ของยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่มีความจำเป็นต่อการทำงานของโปรตีนในระดับโมเลกุล

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโปรตีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ Full-length “Cm-Tf” ของ Transferrin ในปลาตุ๊กตาสามารถแบ่งโครงสร้าง cDNA ของยีนออกได้เป็น 2 Lobes คือ N-lobe และ C-lobe คล้ายกับ Transferrin ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงโดยทั่วไป โดยทางด้าน N-lobe เริ่มต้นจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 23 และสิ้นสุดที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 323 รวมความยาวทั้งหมดเท่ากับ 300 Residues ส่วนด้าน C-lobe เริ่มต้นจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 330 และสิ้นสุดที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 624 รวมความยาวทั้งหมดเท่ากับ 306 Residues ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ford *et al.* (1999) ที่พบว่า Transferrin ทุกชนิดประกอบด้วย Peptide chain จำนวน 2 Lobes ที่คล้ายคลึงกันและแต่ละ Lobe จะมีความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 335 Residues เช่นเดียวกับรายงานของ Liu *et al.* (2006) ที่พบว่า Transferrin ในมนุษย์เป็น Single peptide chain ซึ่งมีการเรียงออกเป็น 2 Domains ได้แก่ N-terminal ตั้งแต่ Residue ที่ 1–336 และ C-terminal ตั้งแต่ Residue 337–679 ซึ่งแต่

ละ Domain หรือ Lobe จะประกอบด้วยตำแหน่ง Metal binding site ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับไอออนของโลหะชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากไอออนของเหล็ก นอกจากนี้ในโครงสร้าง cDNA ยีน Transferrin ของปลาฉลามยังพบตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ Conserved กันของทั้ง C-lobe และ N-lobe และเมื่อนำมาหาค่าความคล้ายคลึงกันพบว่ามีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนมีค่าเท่ากับ 48.6% และ 32.4% ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความคล้ายคลึงกันระหว่าง C- และ N-lobe ของ Transferrin ที่พบในปลวกซึ่งมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนเท่ากับ 31% (Thompson *et al.*, 2003) นอกจากนี้ Abe *et al.* (2001) ได้ศึกษาความคล้ายคลึงของยีนของยีน Transferrin ใน Ascidian (*Halocynthia roretzi*) พบว่าประกอบด้วยโครงสร้างของ Lobe เพียง 1 Lobe เท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับยีน Transferrin ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงที่พบจำนวน 2 Lobes โดยความคล้ายคลึงกันของ C- และ N-lobe ของ Transferrin มีสาเหตุมาจากการเกิด Gene fusion และ Duplication ระหว่างการเกิดวิวัฒนาการ (Lambert *et al.*, 2005b; Abe *et al.*, 2001; Ciuraszkiewicz *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน Transferrin ทั้ง 2 Lobes ของปลาฉลามจะพบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันเพื่อใช้จับกับไอออนเหล็ก (Iron binding ligand) รวมทั้งสิ้น 8 ตำแหน่ง โดยทางด้าน N-lobe ประกอบด้วยกรดอะมิโน Aspartic (D) 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Tyrosine (Y) 2 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Histidine (H) 1 ตำแหน่ง โดยอยู่ในตำแหน่งที่ Asp (D) 54, Tyr (Y) 83, Tyr (Y) 179 และ His (H) 234 (ตารางที่ 8)

ส่วนด้าน C-lobe ก็ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ใช้ในการจับไอออนของเหล็กเช่นเดียวกับที่พบใน N-lobe ซึ่งได้แก่ Aspartic (D) 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Tyrosine (Y) 2 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Arginine (R) 1 ตำแหน่งและกรดอะมิโน Histidine (H) 1 ตำแหน่ง (ตารางที่ 8) ซึ่งเหมือนกับกรดอะมิโนตำแหน่ง Iron-binding ligand ของมนุษย์ทุกประการ ซึ่งสอดคล้องกับ Chen *et al.* (2009) ที่ได้รายงานการศึกษา Transferrin ในปลา Ayu (*Plecoglossus altivelis*) ว่ามีโครงสร้างแบ่งออกเป็น C-lobe และ N-lobe ที่พบตำแหน่ง Iron-coordinating residues ในทั้ง 2 Lobes ที่มีกรดอะมิโนที่ Conserved กัน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด Aspartic 1 ตำแหน่ง กรดอะมิโน Tyrosine 2 ตำแหน่งและกรดอะมิโน Histidine 1 ตำแหน่ง โดยทางด้าน N-lobe ได้แก่ Asp73, Tyr101, Tyr197 และ His253 ส่วนทางด้าน C-lobe ได้แก่ Asp393, Tyr431, Tyr526 และ His594

ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของยีน Transferrin ในพวก Ascidian (*Halocynthia roretzi*) ที่พบว่าโครงสร้างของ Transferrin จะประกอบด้วยตำแหน่งที่ใช้กับไอออนเหล็กมีความคล้ายคลึงกับยีน Transferrin ในมนุษย์เช่นเดียวกัน (Abe *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของแมลงบางชนิด Transferrin ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย N- และ C-lobe ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับ

ไอออนของเหล็กเช่นเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงโดยทั่วไป เช่น ที่พบในแมลงสาบ ปลวก และตั๊กแตน แต่ก็มียางานว่าในแมลงบางชนิด ลำดับกรดอะมิโนในส่วน C-lobe จะไม่พบกรดอะมิโนที่ใช้ในการจับกับไอออนเหล็กเหมือนกับที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่น ในการศึกษาของ Magalhaes *et al.* (2008) ซึ่งได้รายงานไว้ว่า Transferrin ในยุง (Mosquito) ประกอบด้วยตำแหน่งที่ใช้จับกับไอออนเหล็กทางด้าน N-terminal lobe เท่านั้น ซึ่งการที่ Transferrin ของยุงไม่พบตำแหน่งของ Iron-binding protein ในส่วนของ C-terminal domain Yoshiga *et al.* (1997) ได้สันนิษฐานว่าคุณสมบัติของ Transferrin ดังกล่าวจะทำให้เกิดข้อได้เปรียบในการลดโอกาสในการถูกบุกรุกและทำลายร่างกายโดยกลุ่มของเชื้อโรคที่ต้องการไอออนของเหล็กเพื่อการเจริญเติบโต

นอกจากตำแหน่งของ Iron-binding ligand ข้างต้นแล้ว บนโครงสร้างของยีน Transferrin โดยทั่วไปยังประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนที่สามารถจับกับไอออนเหล็กหรือไอออนของธาตุโลหะชนิดอื่น ๆ ได้ ซึ่งได้แก่ตำแหน่งที่เรียกว่า Second shell residues และ Dilysine trigger residues ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าลำดับกรดอะมิโนของ Second shell residues และ Dilysine trigger residues ที่พบใน Transferrin ของปลาดุกก็มีความเหมือนกันกับ Second shell residues และ Dilysine trigger residues ที่พบใน Transferrin ของมนุษย์ทุกประการ (ตารางที่ 7)

นอกจากนี้กลุ่มของลำดับกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ในการจับกับ  $\text{CO}_3^{2-}$  anion 2 ตำแหน่งที่พบในมนุษย์ (TXXXRSAG และ TXXXRTAG) ยังสามารถพบได้ในบนโครงสร้างของโปรตีน Transferrin ในปลาดุกอยู่แต่ในส่วน Motif แรกของ Transferrin ของปลาดุกจะแตกต่างจากที่พบในมนุษย์เล็กน้อยโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TXXXKTAR ส่วน Motif ที่ 2 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันมากทั้งในกลุ่มของปลาและสัตว์เลื้อยคลานก็พบว่ามีความ Conserved กันสูง (Lambert *et al.*, 2005b) เนื่องจาก Transferrin ของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดจะมีลำดับกรดอะมิโนของ Motif นี้เป็น TXXXRTAG รวมทั้ง Transferrin ของปลาดุกที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ด้วย

### 3. การศึกษาความคล้ายคลึงและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ของปลาดุกเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

จากการศึกษาความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ในปลาดุกเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ พบว่า Transferrin ของปลาดุกมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของปลามากที่สุด โดยพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 50.5-60.8% และ 51.9-64.7% ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของแมลงน้อยที่สุดระหว่าง 41.5-46.6% และ 33.8-42.9% ตามลำดับ ซึ่ง

สอดคล้องกับ การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จำนวน 34 ชนิดโดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vertebrates) และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) โดยกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้นยังสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มของปลา (Fish) และกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) รวมอยู่กับสัตว์เลื้อยคลาน ส่วนในกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะได้แก่พวกแมลง (Insects) โดยจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ายีน Transferrin ของปลาดุกอุยจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับปลา ซึ่งแสดงว่ายีน Transferrin ของปลาดุกอุยมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับกลุ่มของปลามากที่สุด อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเฉพาะในกลุ่มของปลาจะพบว่ายีน Transferrin ของปลาดุกอุยนั้นมีความสัมพันธ์กับปลาภายในกลุ่มน้อยโดยสังเกตจากยีน Transferrin ของปลาดุกอุยที่จะแยกออกจากยีน Transferrin ของปลาชนิดอื่น ๆ ภายในกลุ่ม อย่างไรก็ตาม ภายในกลุ่มของปลาจะพบว่ายีน Transferrin ของปลาดุกอุยจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลานิล (Nile tilapia) และปลา Japanese medaka ซึ่งจัดอยู่ใน Order Perciformes และ Order Belontiiformes มากที่สุดตามลำดับ และพบว่ายีน Transferrin ของปลาดุกอุยมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับกลุ่มของปลากลุ่ม Salmonids ซึ่งจัดอยู่ใน Order Salmoniformes น้อยที่สุด (ภาพที่ 10)

นอกเหนือจากโปรตีน Transferrin ที่ถูกค้นพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังแล้วยังมีรายงานเกี่ยวกับ Partial sequences ที่มีโครงสร้างที่จัดเป็น Transferrin-like proteins อีกหลายชนิด เช่น Saxiphilin ซึ่งจัดเป็น Saxitoxin-binding protein ใน Bullfrog (*Rana catesbeiana*; Morabito and Moczydlowski, 1994; Lenarcic et al. 2000) ซึ่งพบว่าโปรตีนชนิดนี้มีขนาดประมาณ 90-kDa ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 844 Residues ที่มี N-lobe ของ Transferrin ซึ่งประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนที่เรียกว่า Tandem thyroglobulin module domain จำนวน 2 Domains จำนวน 143 Residues แทรกอยู่ โดยเมื่อตัดส่วนลำดับกรดอะมิโนที่แทรกอยู่นี้และตำแหน่งของ Signal peptide ออก พบว่าโมเลกุลที่เหลืออยู่จะมีค่าความคล้ายคลึงกับ Transferrin ของ *Xenopus* ถึง 53% นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งที่ใช้จับกับไอออนเหล็กและไอออนลบของ Saxiphilin มีความ Conserved กับยีน Transferrin ของ *Xenopus* สูงถึง 6 ตำแหน่งจาก 8 ตำแหน่ง

นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงโปรตีนที่คล้ายกับ Saxiphilin ใน *Xenopus* ซึ่ง ได้แก่ Major yolk protein ถึง 4 ชนิดที่พบในเม่นทะเล (Sea urchin) (Shyu et al. 1987; Brooks and Wessel, 2002; Yokota et al. 2003) หรือมีชื่ออีกอย่างหนึ่งว่า “Toposome” ซึ่งได้จาก Hawaiian urchin (*Tripneustes gratilla*) ซึ่งมี Domain ของ Transferrin จำนวน 2 ชุด แต่พบว่ามีกรดอะมิโนจำนวนมากแทรกอยู่ใน

Domain ที่ 2 ประมาณ 275 Residues อย่างไรก็ตามจากการพิจารณาตำแหน่งของกรดอะมิโนทำให้ทราบว่า มีกรดอะมิโนอย่างน้อย 2 ใน 4 ตำแหน่งที่สามารถในการจับกับไอออนเหล็กได้ จากหลักฐานดังกล่าวทำให้เชื่อได้ว่าสัตว์ในกลุ่มนี้ยังคงมีโปรตีนที่ทำหน้าที่คล้ายกับ Transferrin ของสัตว์ชั้นสูง (Brooks and Wessel, 2002)

Pacifastin ก็เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่สามารถจับกับไอออนเหล็กได้ซึ่งได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ Serine proteinase inhibitor ซึ่งถูกค้นพบใน Freshwater crayfish (*P. leniusculus*) (Liang *et al.* 1997) เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของ Pacifastin จะพบว่าโปรตีนชนิดนี้จะประกอบด้วย Peptide chains จำนวน 2 สายที่เรียกว่า Heavy chain ที่มีน้ำหนักประมาณ 105 kDa ซึ่งจะมีความคล้ายคลึงกับยีน Transferrin ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นถึง 3 Lobes ที่แตกต่างกัน และยังพบว่า Lobe ที่ 1 และ Lobe ที่ 3 จะมีความคล้ายคลึงกันกับ N-lobe ของ Transferrin ของแมลง ขณะที่ Lobe ที่ 2 ที่อยู่ตรงกลางนั้นจะมีความคล้ายคลึงกับ C-lobe ของ Transferrin ของแมลง และเป็นที่น่าสนใจว่าใน Lobe ที่ 2 และ 3 จะมีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ใช้ในการจับกับไอออน 5 ใน 6 ตำแหน่งที่มีความคล้ายกันกับตำแหน่งของ Iron-binding site ของสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไป

นอกจากนี้จากการรายงานของ Fisher *et al.* (1998); Schwarz *et al.* (2003) ที่ค้นพบโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Transferrin อย่างน้อย 2 ชนิด (TTF1 และ idi100) ในสาหร่ายทะเล 2 ชนิด คือ *Dunaliella salina* และ *D. tertiolecta* จากข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวน่าจะเป็นส่วนที่จะแสดงและสนับสนุนให้เห็นว่ายีน Transferrin นั้น น่าจะมีลำดับวิวัฒนาการที่ยาวนานที่มีการพัฒนาในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ทั้งสัตว์ที่มีวิวัฒนาการต่ำ เช่น สัตว์ในกลุ่มที่ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูงในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพื่อทำหน้าที่สำคัญที่คล้ายคลึงกันในการควบคุมและรักษาระดับของธาตุเหล็กในกระบวนการ Metabolism และกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต รวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน (Immunity) ด้วย

#### 4. การศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin โดยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุย

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ในเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอุย ซึ่งได้แก่ เหงือก (Gills), ลำไส้ (Intestine), ไตส่วนหน้า (Head kidney), ไตส่วนหลัง (Trunk kidney), ตับ (Liver), กล้ามเนื้อ (Muscle), รังไข่ (Ovary), Peripheral blood leukocytes (PBLs), ผิวหนัง (Skin) และม้าม (Spleen) ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน Transferrin มีการ

แสดงออกในเนื้อเยื่อที่ได้จากตับเท่านั้น ในขณะที่ยีน  $\beta$ -actin ของปลาดุกอุยซึ่งเป็น House keeping gene ที่ถูกใช้เป็น Internal control จะพบการแสดงออกในเนื้อเยื่อจากทุกอวัยวะ (ภาพที่ 11) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับ Sahoo *et al.* (2008) ที่ได้รายงานการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลา *Cirrhinus mrigala* ในอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ ตับ ไต ม้าม สมอง กล้ามเนื้อ หัวใจ ทางเดินอาหาร เหนือกและครีบของปลาที่มีสุขภาพดีด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า Transferrin จะมีการแสดงออกที่ชัดเจนที่สุดเฉพาะในตับเท่านั้น อย่างไรก็ตามก็พบการแสดงออกอย่างเบาบางในส่วน of เนื้อเยื่อที่ได้จากสมองด้วย นอกจากนี้ Idzerda *et al.* (1986) ได้รายงานว่าในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากหนูปกติ ตับจะเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน Transferrin มากที่สุดเป็น  $6534 \pm 376$  โมเลกุลต่อเซลล์ รองลงมาคือ Testis, สมอง, ม้าม, ไต, ลำไส้เล็ก และเซลล์เยื่อเมือกที่มีระดับการแสดงออกเป็น  $114 \pm 3$ ,  $83 \pm 9$ ,  $11 \pm 1$ ,  $5 \pm 1$ ,  $<3$  และ  $<2$  โมเลกุลต่อเซลล์ตามลำดับ นอกจากนี้ Ghareeb *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Transferrin ในหนูพบว่า Transferrin มีการแสดงออกอย่างค่อนข้างจำเพาะใน Mammary gland และในส่วนของไต อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของ Transferrin ยังสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของตับและสมองเช่นกัน ซึ่งการแสดงออกแบบนี้จะพบในสิ่งมีชีวิตจำพวกปลากระดูกแข็ง (Teleosts) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) บางชนิดเท่านั้น (Denovan-Wright, 1996) ซึ่งจากการศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยในครั้งนี้ทำให้ทราบว่ายีน Transferrin จัดเป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างจำเพาะในตับเท่านั้น โดยไม่พบที่มีการแสดงออกในอวัยวะอื่นเลย ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยจัดเป็น Tissue species-specific ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้

##### 5. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยภายหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR

โดยทั่วไปแล้วระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลัง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ คือระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงหรือ Innate immunity และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงหรือ Adaptive immunity ซึ่งในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงจะมีกลไกที่เรียกว่า Humoral defense ซึ่งใช้สารน้ำหรือโปรตีนในน้ำเลือดในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบว่า Humoral defense นั้นประกอบไปด้วยโปรตีนที่สำคัญหลากหลายชนิด และพบว่าในจำนวนนี้มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไอออนเหล็กที่สำคัญอยู่ 2 ชนิดคือ Transferrin และ Ferritin โดยพบว่า 0.2% ของปริมาณไอออนเหล็กที่มีอยู่ในร่างกายทั้งหมดจะสามารถจับกับโปรตีน Transferrin ที่อยู่ในน้ำเลือด และอีกประมาณ 25% ของไอออนเหล็กที่มีอยู่ในร่างกายทั้งหมดจะถูกเก็บสะสม

ภายในเซลล์ ในรูปของ Ferric-Ferritin complex (ประมาณ 2 ใน 3 ส่วน) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วไอออนเหล็กที่เข้าสู่ภายในร่างกายจะมาจากอาหารที่ถูกย่อยแล้วในลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนเหล็กในร่างกายยังมาจากการสลายตัวของเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุได้อีกด้วย ซึ่งเมื่อไอออนเหล็กถูกปลดปล่อยเข้าไปในกระแสเลือดในท้ายที่สุดก็จะถูก Transferrin เข้ามาจับเพื่อนำไปเก็บไว้ภายในเซลล์ชนิดต่าง ๆ ต่อไป

โดยทั่วไป Transferrin ที่หมุนเวียนอยู่ในกระแสเลือด (Plasma หรือ Serum transferrin) จะทำหน้าที่ขนส่งและควบคุมปริมาณไอออนเหล็กภายในร่างกาย โดยการกักเก็บไอออนเหล็กส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นใน Parenchima และ Macrophage ของตับ, กล้ามเนื้อ และในเซลล์ของ Reticuloendothelial system ของม้าม (Spleen) และไขกระดูก (Bone marrow) รวมทั้งเม็ดเลือดแดงด้วย แต่เมื่อใดก็ตามที่พบว่ามีปริมาณของไอออนเหล็กเกินพอในกระแสเลือด ไอออนเหล็กบางส่วนจะถูกเก็บไว้ในส่วน Duodenal mucosa ของระบบทางเดินอาหารและจะไม่ถูกปลดปล่อยเข้าไปในกระแสเลือด และเมื่อผนังเซลล์ Mucosal tissue หลุดลอกออกไป ไอออนเหล็กที่เก็บไว้จะถูกขับถ่ายออกมาพร้อมกับสิ่งขับถ่าย (Faeces) ซึ่งจำนวนนี้จะเป็นเพียงครึ่งหนึ่งของไอออนเหล็กที่ถูกขับถ่ายออกไป ส่วนอีกครึ่งหนึ่งที่จะถูกขับออกไปจะมาจากเซลล์ที่ตายแล้ว และปลดปล่อยออกไปในรูปของเหงื่อ (Sweat), ปัสสาวะ (Urine) หรือน้ำดี (Bile)

Gomme and McCann (2005) รายงานว่ากลไกการจับไอออนเหล็กของ Transferrin นั้นเริ่มต้นจากไอออนของเหล็กที่ถูกเก็บกักไว้ในลำไส้หรือจากการสลายตัวของเม็ดเลือดแดงถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือด จากนั้น Apotransferrin ซึ่งเป็น Transferrin ที่ยังไม่ได้จับกับไอออนเหล็กซึ่งหมุนเวียนอยู่ภายในกระแสเลือดอยู่แล้วนั้นจะมาจับกับไอออนเหล็กที่ถูกปล่อยออกมา จากนั้นจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างปิดเรียกว่า Holotransferrin โดยถ้า Transferrin จับกับไอออนเหล็กจำนวน 1 ตัวจะเรียกว่า Monoferric holotransferrin แต่ถ้าจับกับไอออนเหล็กจำนวน 2 ตัวจะถูกเรียกว่า Diferric holotransferrin จากนั้น Holotransferrin จะไหลเวียนไปจับกับ Transferrin receptor ที่อยู่บริเวณผิวของเซลล์เกิดเป็น Transferrin-Transferrin receptor complex (Tf-TfR complex) จากนั้น Tf-TfR complex จะถูกนำเข้าไปใน Endosome ซึ่งจะมี ATP-dependent protein ทำหน้าที่ปรับให้ pH ภายใน Endosome ลดต่ำลงถึง 5.5 ไอออนเหล็กก็จะถูกปล่อยออกมา โดยเมื่อไอออนเหล็กที่ถูกปล่อยออกมาไปจับกับ Low-molecular-weight carrier molecule ซึ่งช่วยในการขนส่งไอออนเหล็กเข้าไปในบริเวณต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น Mitochondria เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ Heme (Heme biosynthesis) หรือเก็บสะสมไว้ใน Organelle ต่าง ๆ โดยการใช้โปรตีน Ferritin โดยเมื่อ Holotransferrin ปล่อยไอออนเหล็กออกไปแล้วนั้น Receptor ที่จับอยู่กับ Apotransferrin จะวนกลับ

ขึ้นสู่ผิวเซลล์อีกครั้ง ซึ่งที่บริเวณผิวเซลล์นี้จะมี pH เป็นกลาง ซึ่งจะทำให้ Apotransferrin และ Receptor หลุดออกจากกัน Apotransferrin จึงออกมาหมุนเวียนอยู่ในกระแสเลือดอีกครั้ง นอกจากคุณสมบัติเด่นของ Transferrin ที่มีความสามารถในการจับกับไอออนเหล็ก (Iron binding protein) แล้วนั้น Transferrin ยังสามารถทำให้เกิดสถานะการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า โรคที่ใช้ไอออนเหล็กในการเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้ Transferrin ยังมีคุณสมบัติเป็น Acute phase proteins (APPs) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายอันเป็นผลมาจากการเกิดโรคที่เป็นแบบ Septicemia ในระยะเริ่มแรกได้ ซึ่ง Bayne and Gerwick (2001) รายงานว่า APR นั้นจะเป็นการตอบสนองทางสรีรวิทยาของร่างกายที่ใช้ตอบสนองต่อ ความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการเกิดบาดแผล (Injury), การได้รับบาดเจ็บ (Trauma) หรือเกิดการติดเชื้อ (Infection) ซึ่งเรียกการตอบสนองอย่างผิดปกตินี้ว่า Acute phase response (APR) โดยการเกิด APR นั้นจะต้องมีการตอบสนองผ่านเนื้อเยื่อของตับ, Neuroendocrine, Hematopoietic, Musculo-skeletal และระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) ภายในร่างกาย ซึ่ง APR จะถูกเหนี่ยวนำโดย Plasma-borne signals ที่เรียกว่า Pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1, IL-6 และ TNF $\alpha$  โดย Pro-inflammatory cytokines จะไปเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการสังเคราะห์โปรตีนในน้ำเลือด (Plasma protein) ซึ่งโปรตีนในน้ำเลือดจะถูกสังเคราะห์ในเซลล์ของตับเป็นส่วนใหญ่ รวมถึงการสังเคราะห์นอกเซลล์ตับซึ่งได้แก่ สมอง (Brain) และเม็ดเลือดขาว (Leukocytes) โดยเมื่อเกิด APR แล้วพบว่าโปรตีนในน้ำเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น 25% หรือมากกว่า การตอบสนองในลักษณะนี้จะถูกเรียกว่า Positive APP และหากลดลงต่ำกว่า 25% หรือมากกว่าจะถูกเรียกว่า Negative APP อย่างไรก็ตาม APP ที่ถูกสร้างขึ้นสามารถจัดเป็นกลุ่ม ๆ ตามระดับความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งได้แก่ ระดับการเปลี่ยนแปลงน้อย (Minor), ปานกลาง (Intermediate) และเปลี่ยนแปลงมาก (Major) หรืออาจบอกทิศทางของการเปลี่ยนแปลงที่เป็นบวก (Positive) หรือลบ (Negative) เมื่อเกิด APR ซึ่งโดยทั่วไป APP นั้นจะสามารถพบได้ทั้งในปลากระดูกอ่อน (Elasmobranchs) และปลากระดูกแข็ง (Teleosts) ซึ่งในปลากระดูกแข็งบางชนิดพบว่าโปรตีนในน้ำเลือดจะมีระดับเพิ่มสูงขึ้นเพื่อตอบสนองต่อ Inflammatory stimuli เช่นเดียวกับที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง

จากการจัดกลุ่มของ APP ตามระดับความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในน้ำเลือดพบว่าโดยทั่วไป Transferrin จัดอยู่ในกลุ่มของ Negative APP ซึ่งหมายความว่าเมื่อเกิด APR โปรตีน Transferrin ในน้ำเลือดจะลดต่ำกว่า 25% ขึ้นไป ในทางตรงกันข้าม Transferrin ในกระต่าย (Rabbits) และหนู (Rats) จะเป็นแบบ Positive APP และพบว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) บางชนิดจะเป็นแบบ Negative APP ซึ่งในกลุ่มของปลาที่รายงานไว้โดย Bayne and Gerwick

(2001) ที่พบว่ายีน Transferrin ใน Rainbow trout จะมีการตอบสนองต่อการเกิด APR เป็นแบบ Positive APP

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาคูอุยภายหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่สองระดับความเข้มข้นคือ  $10^7$  (Treatment ที่ 1) และ  $10^9$  CFU/ml (Treatment ที่ 2) ด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Tff 1 qf และ Tfr 1 qr เป็นไพรเมอร์ Forward และ Reverse ตามลำดับ ในครั้งนี้พบว่าภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ชั่วโมงที่ 6 ทั้ง Treatment ที่ 1 และ 2 ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาคูอุยไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 12 ภายหลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบว่าใน Treatment ที่ 2 ซึ่งได้รับเชื้อที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ  $10^9$  CFU/ml มีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาคูอุยลดลง (Down-regulated) ประมาณ 5.6 และ 1.4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและ Treatment ที่ 1 ตามลำดับ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุมเท่านั้น โดยผลการศึกษาที่ได้ให้ผลใกล้เคียงกับ Neves *et al.* (2009) ที่ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลา Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ภายหลังจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Photobacterium damsela* โดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ในตับจะลดต่ำลงประมาณ 100, 30 และ 10 เท่า เมื่อเกิดการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ในทางตรงข้ามกลับพบว่ายีน Transferrin ในสมองจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin จะเพิ่มขึ้นในตับเมื่อร่างกายของปลาเกิดการขาดแคลนไอออนของเหล็กอีกด้วย

นอกจากนี้ในชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการทดลองในการศึกษากครั้งนี้ยังพบว่าใน Treatment ที่ 2 นั้น Transferrin ของปลาคูอุยยังคงมีการแสดงออกในระดับต่ำอย่างต่อเนื่อง หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 96 ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาคูอุยใน Treatment ที่ 1 ที่ได้รับแบคทีเรียในระดับ  $10^7$  จะเพิ่มสูงขึ้น (Up-regulated) ทั้งใน Treatment ที่ 1 และ 2 ประมาณ 5 และ 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ แต่ก็พบว่ามีเพียง Treatment ที่ 1 เท่านั้นที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับ Yoshiga *et al.* (1997) ที่ได้ศึกษาถึงระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin ในเซลล์ของ *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* ซึ่งกระตุ้นด้วย Heat-killed bacteria โดยใช้เทคนิค Northern blot พบว่าระดับ mRNA ของยีน Transferrin จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจาก 6 ชั่วโมงและเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง

พบว่าระดับ mRNA ของยีน Transferrin จะเพิ่มสูงขึ้นจากชั่วโมงที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Yoshiga *et al.* (1999) ได้ศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin ภายหลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *Escherichia coli* ใน *Drosophila melanogaster* โดยใช้เทคนิค Northern blot พบว่าระดับ mRNA ของยีน Transferrin ของ *D. melanogaster* มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน *D. melanogaster* เพศเมียที่ชั่วโมงที่ 6 และในเพศผู้ชั่วโมงที่ 24 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะสนับสนุนว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ที่เพิ่มสูงขึ้น (Up-regulation) มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของแมลง ซึ่งให้ผลคล้ายกับ Thompson *et al.* (2003) ที่ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลวก (*Mastotermes darwiniensis*) ภายหลังจากการกระตุ้นด้วย *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) ซึ่งเป็น Enteropathogenic fungus ที่ใช้ในทางการค้าเพื่อกำจัดสัตว์จำพวก Termite ด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลวกที่กระตุ้นด้วย *M. anisopliae* จะเพิ่มสูงขึ้น (Up-regulated) ประมาณ 2.5-3.5 เท่าในชั่วโมงที่ 84 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

เช่นเดียวกับการรายงานของ Ampasala *et al.* (2004) ที่ได้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ใน Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) โดยทำการกระตุ้นด้วยเชื้อโรคจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus licheniformis*) แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*) และเชื้อรา (*Botrytis cineria*) ซึ่งทำการทดสอบทั้งใน *in vivo* (ระยะตัวอ่อน) และ *in vitro* (Cell-line) โดยใช้เทคนิค Northern blot ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin ใน Spruce budworm สูงขึ้นภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งระดับการแสดงออกจะยังคงอยู่ในระดับนี้เป็นอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ใน Spruce budworm จากการกระตุ้นโดยใช้แบคทีเรียทั้งสองชนิดจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าการกระตุ้นด้วยเชื้อราจะไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin ใน Spruce budworm นอกจากนี้การทดสอบใน *in vitro* ถึงการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin ใน Spruce budworm ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Heat killed *E. coli* พบว่าระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin จะถูกกระตุ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และสูงขึ้นจนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lee *et al.* (2006) ที่รายงานว่า Transferrin จัดเป็น Acute-phase protein โดยทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin ใน Beetle (*Apriona germari*) พบว่าเมื่อเกิดการติดเชื้อจุลินทรีย์ โดยการนำเอาตัวอ่อนของ Beetle มากระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *E. coli*

และเชื้อรา (*B. bassiana*) พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ใน Beetle เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดการติดเชื้อทั้งแบคทีเรียและรา นอกจากนี้ระดับ mRNA ของยีน Transferrin ในตัวอ่อน Beetle ที่เกิดบาดแผลจากการติดเชื้อก็พบว่าการแสดงออกเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกระคาย

นอกจากนี้ Guz *et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ภายหลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *Escherichia coli* และปรสิต Trypanosome ใน Tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans*) โดยใช้เทคนิค Quantitative RT-PCR พบว่ามีเพียง Tsetse fly กลุ่มที่กระตุ้นด้วย *E. coli* เท่านั้นที่มีระดับการแสดงออกของยีน Transferrin เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $T\text{-test score} < 0.05$ ) โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์ทั้ง Quantitative RT-PCR และ Northern blot จะแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ใน Tsetse fly ภายหลังจากกระตุ้นให้เกิดการติดเชื้อที่ตำแหน่งลำไส้ส่วนกลางจะมีระดับการแสดงออกลดลงประมาณ 11 และ 8 เท่าตามลำดับ

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการใช้แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้น  $10^7$  CFU/ml ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำจะสามารถกระตุ้นระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ในปลาได้มากกว่าการใช้แบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับ  $10^9$  CFU/ml ซึ่งเป็นระดับที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งจะมีผลในการยับยั้งหรือลดอัตราการแสดงออกของยีน Transferrin โดยผ่านกลไกต่าง ๆ ซึ่ง Tang *et al.* (1998) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดยทั่วไปแล้วจะสามารถสร้าง Siderophores ซึ่งจัดเป็นโปรตีนที่มี Iron-sequestering  $\text{Fe}^{3+}$  ligand ที่สามารถช่วยเพิ่มความรุนแรงให้กับแบคทีเรียชนิดนี้ได้ โดยการไปแย่งจับไอออนเหล็กกับ Transferrin ของปลาได้ นอกจากนี้ยังพบว่า Transferrin ในปลาส่วนใหญ่จะสามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ Protease ที่สร้างจากแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้ นอกจากนี้จากการรายงานของ Angka *et al.* (1995) ที่พบว่าเชื้อ *A. hydrophila* นั้นจัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสูงต่อปลาในกลุ่ม Catfish หลายชนิด อันเป็นผลเนื่องมาจากความสามารถในการสร้างสารพิษ Hemolysin ที่มีคุณสมบัติในการทำลายเม็ดเลือดแดง (RBC) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสอดคล้องกับ Majumdar *et al.* (2006) ที่รายงานว่าสารที่แบคทีเรีย *A. hydrophila* สร้างขึ้นและทำให้เชื้อมีความรุนแรงมากได้แก่ Haemolysin, เอนไซม์ Protease, Cholinesterases, Enterotoxin, Endotoxin และ Adhesins ดังนั้นเมื่อกระตุ้นปลาทดลองด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสูง ( $10^9$  CFU/ml) แบคทีเรียจึงน่าจะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงกว่า นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าแบคทีเรีย *A. hydrophila* จะมีอวัยวะเป้าหมายหลักในการทำลายคือ ตับ (Liver), ม้าม (Spleen), ไต (Kidney)

ซึ่งเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาทั้งสิ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตับ ซึ่งเป็นอวัยวะหลักที่มีการสังเคราะห์ Transferrin ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับไอออนเหล็กที่แบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ใช้ในการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน ดังนั้นเมื่อเซลล์ตับถูกทำลายก็เท่ากับว่าปริมาณ Transferrin ที่สังเคราะห์ได้จากเซลล์ของตับย่อมจะต้องลดน้อยลงไปด้วย นอกจากนี้สาเหตุอีกประการหนึ่งที่มีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 72 ภายหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* อาจเนื่องมาจากเมื่อเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียภายในร่างกายของปลาดุกอูย ปลาจะใช้โมเลกุลของโปรตีน Transferrin ที่หมุนเวียนอยู่ในน้ำเลือดตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยการไปแย่งจับกับไอออนเหล็กในน้ำเลือดจากแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ไอออนเหล็กนี้ในการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนจนหมดก่อน จึงจะเกิดการสังเคราะห์โปรตีน Transferrin ขึ้นมาทดแทนใหม่ในอวัยวะตับในภายหลัง

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาจากระดับการแสดงออกของ Transferrin ของปลาดุกอูยภายหลังกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ทั้ง 7 ช่วงเวลา พบว่ายีน Transferrin ของปลาดุกอูยนั้น จะมีคุณสมบัติเป็น Positive acute phase protein (Positive APP) เช่นเดียวกับการศึกษา Transferrin ใน Rainbow trout ซึ่งพบว่า ยีน Transferrin ของปลาชนิดนี้จะมีการตอบสนองในลักษณะที่เพิ่มขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อ ซึ่งทำให้สามารถจัดชนิดของ Transferrin ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อเป็นแบบ Positive APP (Bayne and Gerwick, 2001) โดยความเป็น Positive APP ของ Transferrin สามารถอธิบายได้จากช่วงแรกภายหลังจากการกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *A. hydrophila* จะพบว่าปลาดุกอูยจะมีระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ในอวัยวะตับอยู่ในระดับสูง เมื่อได้รับเชื้อแล้วเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งจะพบว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาดุกอูยในอวัยวะตับได้เพิ่มสูงขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ปลาได้รับเชื้อแบคทีเรียในปริมาณสูง การตอบสนองของ Transferrin ก็อาจเป็นแบบ Negative APP ได้ ดังจะเห็นได้จากปลาในกลุ่มที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียในปริมาณสูงจะมีการแสดงออกของยีน Transferrin ลดต่ำลงอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 15)

Han *et al.* (2004) ได้รายงานว่าระดับการแสดงออกของ Transferrin ในสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปจะสามารถถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้โดยการได้รับสารจำพวก Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งจัดเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและเซลล์แบคทีเรียแกรมลบในปริมาณที่เหมาะสมได้โดยตรง นอกจากนี้ปัจจัยที่อาจมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงต่อการแสดงออกของยีน Transferrin ได้ถูกรายงานในหลาย ๆ การศึกษา เช่น

McKnight *et al.* (1980) ได้รายงานว่ากระบวนการสังเคราะห์ Transferrin เมื่ออยู่ในสภาวะขาดไอออนเหล็กจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ระดับ mRNA ของยีน Transferrin เพิ่มขึ้นหรือทำให้การ Translation ของ Pre-existing mRNA มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้การศึกษาอัตราการสังเคราะห์ Transferrin mRNA โดยอาศัยเทคนิค cDNA hybridization พบว่า ยีน Transferrin นั้นจะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เท่าเมื่อใช้เวลาในการให้สัตว์ทดลองอยู่ในสภาพขาดไอออนของเหล็กเป็นเวลา 3 สัปดาห์

Tuill *et al.* (1985) ได้ศึกษาระดับ Transcription rate ของยีน Transferrin ในตับของหนู โดยทำการเหนี่ยวนำสัตว์ทดลองให้อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณของไอออนเหล็กมากและน้อยจนเกินไป การทำหมัน (Castration), การเหนี่ยวนำด้วย Sexual steroid hormones, Glucagon และ Cyclic AMP ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าระดับ mRNA ของยีน Transferrin จะลดลง 50% ภายหลังจากการเหนี่ยวนำด้วย Glucagon และ Cyclic AMP ที่ 12 ชั่วโมง และพบว่าอัตราการแสดงออกของยีน Transferrin ในกระบวนการ Transcription จะเพิ่มสูงขึ้นถึง 95% ในนาทีที่ 30 ภายหลังจากการเข้สารดังกล่าว และจะมีอัตราการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอีกครั้ง หากใช้เวลาในการเข้ที่นานขึ้น

Kvingedal *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Transferrin ในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) โดยการให้อาหารที่ผสมด้วยไอออนเหล็กที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 310, 65 และ 40 ppm เป็นเวลา 26 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาระดับโปรตีนของยีน Transferrin ใน Serum พบว่าในปลากลุ่มที่ได้รับธาตุเหล็กในอาหารเพียง 40 ppm จะแสดงอาการขาดธาตุเหล็กอย่างชัดเจน และยังพบว่าค่าเฉลี่ยของไอออนเหล็กที่สะสมอยู่ในตับจะลดลงจาก 84 mg/kg เป็น 12 mg/kg และไอออนเหล็กในน้ำเลือดลดลงจาก 2.3 mg/kg เป็น 1.6 mg/kg เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมธาตุเหล็กในระดับ 310 ppm อย่างไรก็ตามกลับพบว่าระดับ mRNA ของยีน Transferrin ระหว่างปลา Salmon ปกติและปลาที่แสดงอาการขาดธาตุเหล็กที่ทำการศึกษา ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ mRNA ของยีน Transferrin ในกลุ่มของปลา Salmon ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของไอออนเหล็กที่สะสมไว้ (Stored iron)

Hardiman and Gannon (2007) ทำการศึกษาการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีน Transferrin ของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ในระยะที่อยู่ในน้ำจืด (Freshwater parr) และระยะที่ลงสู่ทะเล (Seawater smolts) และพบว่าปลา Salmon ในระยะ Seawater smolts จะมีระดับ mRNA ของยีน Transferrin สูงกว่าในระยะ Freshwater smolt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน

Transferrin อาจจะมีบทบาทสำคัญในการปรับตัวเพื่อให้สามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มแตกต่างไปจากสถานะน้ำจืดปกติได้

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

1. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Complementary DNA ของยีน Transferrin ในปลาดุกอุยพบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 2,183 bp ซึ่งประกอบด้วย Open reading frame ขนาด 1,884 bp โดยแปลเป็นกรดอะมิโนได้เท่ากับ 628 Residues เป็นส่วนของ Leader peptide และ Mature protein จำนวน 14 และ 614 Residues ตามลำดับ และมีส่วนของ 5' และ 3' UTR มีความยาวเท่ากับ 26 และ 270 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งของ Polyadenylation signal 1 ตำแหน่ง และ Glycosylation site 2 ตำแหน่ง และเมื่อพิจารณาทั้งโครงสร้างโปรตีนจาก cDNA ของยีน Transferrin สามารถแบ่งโครงสร้างออกได้เป็น 2 ส่วนคือ N-และ C-Lobes โดยทั้งสอง Lobes นี้สามารถพบตำแหน่ง Iron-binding ligand จำนวน 8 ตำแหน่ง (Lobe ละ 4 ตำแหน่ง) ตำแหน่งของ Second shell-hydrogen-binding network จำนวน 8 ตำแหน่ง (Lobe ละ 4 ตำแหน่ง) ตำแหน่งของ Dilysine trigger จำนวน 4 ตำแหน่ง (Lobe ละ 2 ตำแหน่ง) และตำแหน่งของ Carbonate-binding site จำนวน 2 ตำแหน่ง (Lobe ละ 1 ตำแหน่ง) นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteine ทั้งหมดจำนวน 31 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตรงกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ จำนวน 21 ตำแหน่งอีกด้วย

2. การศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยมีความคล้ายคลึงกับยีน Transferrin ในกลุ่มของปลากระดูกแข็งมากที่สุด โดยค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับปลากระดูกแข็งจะอยู่ในช่วง 50.5-60.8% ขณะที่ค่าความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับปลากระดูกแข็งจะอยู่ในช่วง 37.7-51.8% และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน Transferrin ในกลุ่มของแมลงน้อยที่สุด

3. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Transferrin ของปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่ายีน Transferrin ของปลาดุกอุยถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน Transferrin ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งอยู่ร่วมกลุ่มเดียวกันกับยีน Transferrin ของปลา ซึ่งแยกจากกลุ่มของยีน Transferrin ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมซึ่งรวมอยู่กับสัตว์เลื้อยคลานที่เป็นกลุ่มย่อยอีกกลุ่มหนึ่งอย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มของปลาจะพบว่ายีน

Transferrin ของปลาตุกอุยจะแยกออกจากยีน Transferrin ของปลาชนิดอื่น ๆ อย่างชัดเจนแสดงว่า ยีน Transferrin ของปลาตุกอุยนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับยีน Transferrin ของปลาภายในกลุ่มเลย

4. การศึกษาการแสดงออกของยีน Transferrin ในเนื้อเยื่อที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาตุกอุยได้แก่ เหงือก ลำไส้ ไตส่วนหน้า ไตส่วนหลัง ตับ กล้ามเนื้อ ไข่, Peripheral blood leukocytes (PBLs) ผิวหนังและม้าม โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ายีน Transferrin มีการแสดงออกเฉพาะในเนื้อเยื่อที่ได้จากตับเท่านั้น ซึ่งในเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่ายีน Transferrin ในปลาตุกอุยจัดเป็นยีนที่มีการแสดงออกเป็นแบบ Tissue-specific ในตับเท่านั้น

5. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาตุกอุยภายหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ความเข้มข้น  $10^7$  และ  $10^9$  CFU/ml ที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ของปลาตุกอุยไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อชั่วโมงที่ 12 พบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้น  $10^9$  CFU/ml จะมีระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำให้ Transferrin ของปลาตุกอุยมีการตอบสนองแบบ Negative APR และยังพบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน Transferrin อีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งพบว่าระดับการแสดงออกของยีน Transferrin ภายหลังจากกระตุ้นด้วยแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้น  $10^7$  CFU/ml จะมีระดับการแสดงออกของยีน Transferrin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งทำให้การตอบสนองของยีน Transferrin ในช่วงนี้เป็นแบบ Positive APR

### ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนทั้งหมดของ cDNA ของยีน Transferrin รวมถึงรูปแบบการแสดงออกของยีน Transferrin ทั้งในสภาวะปกติและที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาคุกอย ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่ทำให้เรามีความเข้าใจถึงการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของปลาคุกอยได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นกับปลาคุกอย โดยการใช้ความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาโมเลกุล เช่น การผลิตโปรตีน Transferrin ของปลาคุกอย โดยใช้เทคนิคการผลิต Recombinant protein หรือศึกษาหน้าที่ (Functional analysis) โดยการใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) รวมทั้งการนำเอาคุณสมบัติของยีน Transferrin ที่มีความเป็น Polymorphism สูงมาใช้ในการคัดสายพันธุ์ปลาคุกอยที่มีความต้านทานโรคสูง ซึ่งจะเป็นการสร้างแนวทางในการป้องกันและแก้ไขปัญหาโรคต่าง ๆ ในปลาคุกอยได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เจดั่น อมาตยกุล, สืบพงษ์ นัตรมลัย, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์, ประดิษฐ์ ศรีภัทรประสิทธิ์, ยรรยง ตันตาปกุล, สันติชัย รังสียาภิรมย์, สง่า ลีสง่า, อัญชลี ตันติกุล, สุภรณ์ กิมสงวน และ วัชรินทร์ รัตนชู. 2538. **ปลาอุก**. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- วิเศษ อัครวิทยากุล. 2534. **การเพาะพันธุ์ปลาอุกโดยวิธีการผสมเทียม**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, กรุงเทพฯ.
- สุปราณี ชินบุตร เต็มดวง พึ่งขจรบุญ และ สมเกียรติ์ กาญจนาคาร. 2535. **โรคติดเชื้อในปลาอุก**  
**ลูกผสม**. บทความงานวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. แหล่งที่มา:  
[http://www.nicaonline.com/articles10/site/view\\_article.asp?idarticle=2619](http://www.nicaonline.com/articles10/site/view_article.asp?idarticle=2619), 7 ตุลาคม 2551.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2544. **ปลาอุก**. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Abe, Y., R. Nagata, Y. Hasunuma and H. Yokosawa. 2001. Isolation, characterization and cDNA cloning of a one-lobed transferrin from the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** 128: 73-79.
- Aisen, P. 2004. Transferrin receptor 1. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 36: 2137-2143.
- \_\_\_\_\_, A. Leibman and J. Zweier. 1978. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. **J. Biol. Chem.** 253: 1930-1937.
- Altschul, S. F., W. Gish., W. Miller., E. W. Myers and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410.
- Ampasala, D. R., S. -C. Zheng, A. Retnakaran, P. J. Krell, B. M. Arif and Q. -L. Feng. 2004. Cloning and expression of a putative transferrin cDNA of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 34: 493-500.

- Angka, S. L., T. J. Lam and Y.M. Sin. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture** 130: 103-112.
- Baker, E. N. 1994. Structure and reactivity of transferrins. **Adv. Inorg. Chem.** 41: 398-463.
- Bayne, C. J. and L. Gerwick. 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 725-743.
- Bergen, H. R., J. M. Lacey, J. F. O'Brien and S. Naylor. 2001. Online single-step analysis of blood proteins :The Transferrin Story. **Anal. Biochem.** 296: 122-129.
- Bols, N. C., J. L. Brubacher, R. C. Ganassin and L. E. J. Lee. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 853-873.
- Brooks, J. M. and G. M. Wessel. 2002. The major yolk protein in sea urchins is a transferrin-like, iron binding protein. **Dev. Biol.** 245: 1-12.
- Ciurazskiewicz, J., M. Biczyski, A. Manuta and S. Martin. 2007. Reptilian transferrins: evolution of disulfide bridges and conservation of iron-binding center. **Gene** 396: 28-38.
- \_\_\_\_\_, M. Olczak and W. Watorek. 2006. Isolation, cloning and sequencing of transferrins from red-eared turtle, African ostrich, and turkey. **Comp. Biochem. Physiol., Part B** 144: 301-310.
- Chen, J., H. Y. Yang, Y. H. Shi and M. Y. Li. 2009. An interaction between leukocyte cell-derived chemotaxin 2 and transferrin of ayu, *Plecoglossus altivelis*. **Fish Shellfish Immunol.** In Press.

- Chiotoglou, I., T. Smilevska, M. Samara, S. Likousi, C. Belessi, I. Athanasiadou, N. Stavroyianni, S. Samara, N. Laoutaris, N. Vamvakopoulos, A. Anagnostopoulos, A. Fassas, K. Stamatopoulos and P. Kollia. 2008. Predominantly post-transcriptional regulation of activation molecules in chronic lymphocytic leukemia: The case of transferrin receptors. **Blood Cells Mol. Dis.** 41: 203-209.
- Danilova, N., J. Bussmann, K. Jekosch and L. A. Steiner. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. **Nat. Immunol.** 6: 295-302.
- Denovan-Wright, E. M., N. Bruce Ramsey, C. J. McCormick, C. B. Lazier and J. M. Wright. 1996. Nucleotide sequence of transferrin cDNAs and tissue-specific expression of the transferrin gene in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 269-273.
- Ellis, A. E. 1999. Immunity to bacteria in fish. **Fish Shellfish Immunol.** 9: 291-308.
- Ervasti, M., I. Matinlauri and K. Punnonen. 2007. Quantitative flow cytometric analysis of transferrin receptor expression on reticulocytes. **Clin. Chim. Acta** 383: 153-157.
- Escrivá, H., A. Pierce, B. Coddeville, F. González, M. Benaissa, D. Leger, J. M. Wieruszeski, G. Spik and M. Pamblanco. 1995. Rat mammary-gland transferrin : nucleotide sequence, phylogenetic analysis and glycan structure. **Biochem. J.** 307: 47-55.
- Fisher, M., A. Zamir and U. Pick. 1998. Iron uptake by the halotolerant alga *Dunaliella* is mediated by a plasma membrane transferrin. **J. Biol. Chem.** 273: 17553-17558.
- Flesland, O., A. K. Eskelund, A. B. Flesland, D. Falch, B. G. Solheim and J. Seghatchian. 2004. Transferrin receptor in serum. A new tool in the diagnosis and prevention of iron deficiency in blood donors. **Transfus. Apher. Sci.** 31: 11-16.

- Ford, M. J., P. J. Thornton and L. K. Park. 1999. Natural selection promotes divergence of transferrin among salmonid species. **Mol. Ecol.** 8: 1055-1061.
- Ghareeb, B. A. A., D. Thépot, C. Puissant, M. Cajero-Juarez and L. M. Houdebine. 1998. Cloning, structural organization and tissue-specific expression of the rabbit transferrin gene. **Biochim. Biophys. Acta** 1398: 387-392.
- Gomme, P. T. and K. B. McCann. 2005. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discov. Today** 10: 267-273.
- Graham, R. M., G. M. Reutens, C. E. Herbison, R. D. Delima, A. C. G. Chua, J. K. Olynyk and D. Trinder. 2008. Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. **J. Hepatol.** 48: 327-334.
- Guz, N., G. M. Attardo, Y. Wu and S. Aksoy. 2007. Molecular aspects of transferrin expression in the tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans*). **J. Insect Physiol.** 53: 715-723.
- Haber, A., H. Agadjanian, L. K. M. Kauwe and Z. Gross. 2008. Corroles that bind with high affinity to both apo and holo transferrin. **J. Inorg. Biochem.** 102: 446-457
- Han, J., K. P. Nam, S. J. Seo and C. Y. Yun. 2004. Molecular cloning and characterization of transferrin from wax moth (*Galleria mellonella*). **Entamol. Res.** 34:139-145.
- Hansen, J. D., E. D. Landis and R. B. Phillips. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 102: 6919-6924.
- Hardiman, G. and F. Gannon. 2007. Differential transferrin gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) freshwater parr and seawater smolts. **J. Appl. Ichthyol.** 12: 43-47.

- He, Q. Y., A. Mason. 2002. Molecular aspects of release of iron from transferrin, pp. 95-123. *In* D. Templeton (ed.). **Molecular and Cellular Iron Transport**. Marcel Dekker, New York.
- \_\_\_\_\_, B. M. Tam, R. T. MacGillivray, R. C. Woodworth. 1999. Dual role of Lys206-Lys296 interaction in human transferrin N-lobe: iron-release trigger and anion-binding site. **Biochemistry** 38: 9704-9711.
- \_\_\_\_\_, R. C. Woodworth, B. M. Tam, R. T. MacGillivray and J. K. Grady, N. D. Chasteen. 1998. Mutation at nonliganding residues Tyr-85 and Glu-83 in the N-lobe of human serum transferrin. **J. Biol. Chem.** 273: 17018-17024.
- Hoshino, A., S. Hisayasu and T. Shimada. 1996. Complete sequence analysis of rat transferrin and expression of transferrin but not lactoferrin in the digestive glands. **Comp. Biochem. Physiol. Part B** 113: 491-497.
- Idzerda, R. L., H. Huebers, C. A. Finch and G. S. McKnight. 1986. Rat transferrin gene expression: Tissue-specific regulation by iron deficiency. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 83: 3723-3727.
- James, N. G. and A. B. Mason. 2008. Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron-containing transferrins. **Anal. Biochem.** 378: 202-207.
- Jansson, E., T. Hongslo, A. Johannisson, L. Pilstrom, S. Timmusk and L. Norrgren. 2003. Bacterial kidney disease as a model for studies of cell mediated immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immunol.** 14: 347-362.
- Jones, S. R. M. 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 841-852

- Kibel, A., T. Belovari and I. Drenjancevic-Peric. 2008. The role of transferrin in atherosclerosis. **Med. Hypotheses** 70: 793-797.
- Kim, B. Y., K. S. Lee, Y. M. Choo, I. Kim, Y. H. Je, S. D. Woo, S. M. Lee, H. C. Park, H. D. Sohn and B.R. Jin. 2008. Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. **Comp. Biochem. Physiol.** 150: 161-169.
- Kim, T. J. and J. I. Lee. 2006. Cloning and expression of genes encoding transferrin-binding protein A and B from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. **Protein Expr. Purif.** 45: 235-240.
- Krewulak, K. D. and H. J. Vogel. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochim. Biophys. Acta.** 1778 (9): 1781-1804.
- Kvingedal, A. M., A. Dehli and K. Rørvik. 1996. Transferrin mRNA in relation to liver iron storage in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiol. Biochem.** 15: 317-322.
- \_\_\_\_\_, K. A. Rørvik and P. Alestrøm. 1993. Cloning and characterization of Atlantic salmon (*Salmo salar*) serum transferrin cDNA. **Mol. Marine Biol. Biotechnol.** 2(4): 233-238.
- Lambert, L. A., H. Perri and T. J. Meehan. 2005a. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. **Comp. Biochem. Physiol.** 140: 11-25.
- \_\_\_\_\_, P. J. Halbrooks and A. B. Mason. 2005b. Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. **Comp. Biochem. Physiol, Part B** 142: 129-141.
- Lee, J. Y., T. Tada., I. Hirono and T. Aoki. 1998. Molecular cloning and evolution of transferrin cDNAs in salmonids. **Mol. Marine Biol. Biotechnol.** 7(4): 287-293.

- Lee, K. S., B. Y. Kim, H. J. Kim, S. J. Seo, H. J. Yoon, Y. S. Choi, I. Kim, Y. S. Han, Y. H. Je, S. M. Lee, D. H. Kim, H. D. Sohn and B. R. Jin. 2006. Transferrin inhibits stress-induced apoptosis in a beetle. **Free Radic. Biol. Med.** 41: 1151-1161.
- Lenarcic, B., G. Krishnan, R. Borukhovich, B. Ruck, V. Turk and E. Moczydlowski. 2000. Saxiphilin, a saxitoxin-binding protein with two thyroglobulin type I domains, is an inhibitor of papain-like cysteine proteinases. **J. Biol. Chem.** 275: 15572-15577.
- Liang, Z., L. Sottrup-Jensen, A. Aspan, M. Hall, K. Soderhall. 1997. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 94: 6682-6687.
- Liu, X., Y. Sun, D. Song, Q. Zhang, Y. Tian and H. Zhang. 2006. Enhanced optical immuosensor based on surface plasmon resonance for determination of transferrin. **Talanta** 68: 1026-1021.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. **Methods** 25: 402-408.
- Lorenzen, K. 1993. Acquired immunity to infectious diseases in fish: implication for the interpretation of fish disease surveys. **J. Anim. Ecol.** 63: 183-196.
- Magalhaes, T., I. F. Oliveira, M. A. V. Melo-Santos, C. M. F. Oliveira, C. A. Lima and C. F. J. Ayres. 2008. Expression of defensin, cecropin, and transferrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. **Exp. Parasitol.** 120: 364-371.
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 137-151.

- Majumdar, T., S. Ghosh, J. Pal and S. Mazumder. 2006. Possible role of a plasmid in the pathogenesis of a fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture** 256: 95-104.
- McKnight, G. S., D. C. Lee, D. Hemmaplardh, C. A. Finch and D. Richard. 1980. Transferrin gene expression. **J. Biol. Chem.** 255: 144-147.
- Morabito, M. A. and E. Moczydlowski. 1994. Molecular cloning of bullfrog saxiphilin: a unique relative of the transferrin family that binds saxitoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91: 2478-2482.
- Nelson, J. S. 1994. **Fish of the World**. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York. 600p.
- Neves, J. V., J. M. Wilson and P. N. S. Rodrigues. 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. **Dev. Comp. Immunol.** (In Press).
- Panprommin, D. 2008. **Analysis of expressed sequence tags in liver and muscle tissues of Günther's walking catfish**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Peng, J. L., S. Wu, X. P. Zhao, M. Wang, W. H. Li, X. Shen, J. Liu, P. Lei, H. F. Zhu and G. X. Shen. 2007. Downregulation of transferrin receptor surface expression by intracellular antibody. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 354: 864-871.
- Pfaffi, M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR, pp. 87-112. In S. A. Bustin, eds. **A-Z of quantitative PCR**. International University Line, La Jolla, California.
- Randelli, E., V. Scala, D. Casani, S. Costantini, A. Facchiano, M. Mazzini, G. Scapigliati and F. Buonocore. 2008. T-cell receptor beta chain from sea bream (*Sparus aurata*): Molecular cloning, expression and modeling of the complexes with MHC class I. **Mol. Immunol.** 45: 2017-2027.

- Raida, M. K. and K. Buchmann. 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. **Dev. Comp. Immunol.** 33(1): 35-45.
- Rengmark, A. H. and F. Lingass. 2007. Genomic structure of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) transferrin gene and a haplotype associated with saltwater tolerance. **Aquaculture** 272: 146-155.
- Reynaud, S. and P. Deschaux. 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. **Aquat. Toxicol.** 77: 229-238.
- Sahoo, P. K., B. R. Mohanty, J. Kumari, A. Barat and N. Sarangi. 2008. Cloning, nucleotide sequence and phylogenetic analyses, and tissue-specific expression of the transferrin gene in *Cirrhinus mrigala* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** (In Press).
- Satomi, Y., Y. Shimonishi and T. Takao. 2004. N-glycosylation at Asn491 in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin. **FEBS Lett.** 576: 51-56.
- Schwarz, M., N. Sal-Man, A. Zamir and U. Pick. 2003. A transferrin-like protein that does not bind iron is induced by iron deficiency in the alga *Dunaliella salina*. **Biochim. Biophys. Acta** 1649: 190-200.
- Secombes, C. J., T. Wang, S. Hong, S. Peddie, M. Crampe, K. J. Laing, C. Cunningham and J. Zou. 2001. Cytokines and innate immunity of fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 713-723.
- Sergeant, C., M. H. Vesvres, G. Devès, B. Baron and F. Guillou. 2003. Iron, transferrin and myelinogenesis. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B** 210: 349-353.

- Shyu, A. B., T. Blumenthal and R. A. Raff. 1987. A single gene encoding vitellogenin in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*: sequence at the 5' end. **Nucleic Acids Res.** 15: 10405-10417.
- Stafford, J. L. and M. Belosevic. 2001. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 101-115.
- \_\_\_\_\_. 2003. Transferrin and innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. **Dev. Comp. Immunol.** 27: 539-554.
- Tang, F., X. Zhu, H. Long and Y. Zeng. 1998. The role of *Aeromonas hydrophila* Protease in the utilization of fish serum iron in vitro. **Asian Fish. Sci.** 10:317-321.
- Tange, N., L. Jong-Young, N. Mikawa, I. Hirono and T. Aoki. 1997. Cloning and characterization of transferrin cDNA and rapid detection of transferrin gene polymorphism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Mol. Marine Biol. Biotechnol.** 6(4): 351-356.
- Teixeira, A. S., A. Jamieson and J. C. P. Raposo. 2002. Transferrin polymorphism in central Amazon populations of pescada, *Plagioscion squamosissimus*. **Genet. Mol. Res.** 1: 216-226.
- Thompson, G. J., Y. C. Crozier and R. H. Crozier. 2003. Isolation and characterization of a termite transferrin gene up-regulated on infection. **Insect Mol. Biol.** 12(1): 1-7.
- Trinder, D. and E. Baker. 2003. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 35: 292-296.

- Tuil, D., S. Vaulont, M. J. Levin, A. Munnich, M. Moguilewsky, M. M. Bouton, P. Brissot, J. Dreyfus and A. Kahn. 1985. Transient transcriptional inhibition of the transferrin gene by cyclic AMP. **Eur. J. Biochem.** 189: 310-314.
- Yada, T. 2007. Growth hormone and fish immune system. **Gen. Comp. Endocrinol.** 152: 353-358.
- Yokota, Y., T. Unuma, A. Moriyama and K. Yamano. 2003. Cleavage site of a major yolk protein (MYP) determined by cDNA isolation and amino acid sequencing in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 135: 71-81.
- Yoshiga, T., T. Georgieva, B. C. Dunkov, N. Harizanova, K. Ralchev and J. H. Law. 1999. *Drosophila melanogaster* transferrin Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. **Eur. J. Biochem.** 260: 414-420.
- Yoshiga, T., V. P. Hernandez, A. M. Fallon and J. H. Law. 1997. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 94: 12337-12342.
- Wojtczak, M., G. J. Dietrich, I. Irnazarow, P. Jurecka, M. Slowinska and A. Ciereszko. 2007. Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: Relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. **Comp. Biochem. Physiol.** 148: 426-431.
- Zatta, P., L. Messori, P. Mauri, S. J. V. Rensburg, J. V. Zyl, S. Gabrielli and C. Gabbiani. 2005. The C2 variant of human serum transferrin retains the iron binding properties of the native protein. **Biochim. Biophys. Acta** 1741: 264-270.

ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**

สารเคมีที่ใช้สำหรับงานทางด้าน Molecular Techniques

### 1. 1.5% Agarose Gel

ชั่ง Agarose ใส่บัฟเฟอร์ TBE (1X) ให้ได้ความเข้มข้น 1.5% ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเทลงบน Gel chamber ที่มี Comb อยู่แล้ว วางทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึง Comb ออก

### 2. 10X MOP Buffer

200 mM [N-Morpholino] propanesulfonic acid

50 mM Sodium acetate

10 mM EDTA

ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.5-7.0 ด้วย NaOH

### 3. 5X TBE (Tris-Borate-EDTA) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris base 54.0 กรัม

Boric acid 27.5 กรัม

EDTA (pH 8.0) 20.0 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปมาเชื่อมด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

### 4. 1.0 M IPTG

2.38 กรัมของ Isopropylthio- $\beta$ -D-thiogalactoside

น้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

## 5. X-gal

100 มิลลิลิตรของ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

2 มิลลิลิตรของ dimethyl-formamide

## 6. LB (Luria-Bertani) Agar (1 ลิตร)

NaCl 10 กรัม

Tryptone 10 กรัม

Yeast extract 5 กรัม

Agar 20 กรัม

## 7. LB (Luria-Bertani) Broth

NaCl 10 กรัม

Tryptone 10 กรัม

Yeast extract 5 กรัม

## 8. Marker 100 bp ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

100 bp DNA Ladder plus (Fermentas) 10 ไมโครลิตร

6X Loading dye solution 10 ไมโครลิตร

Distilled water 40 ไมโครลิตร

## 8. 10X Loading dye

Ficol 400 7.5 กรัม

Bromphenol blue 0.125 กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50.0 มิลลิลิตร

**ภาคผนวก ข**

การปั่นแยกเม็ดเลือดขาว (Peripheral blood leukocytes)

1. นำ Histopaque-1077 จากตู้เย็นมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเปิดมา 3 มิลลิลิตรใส่ใน Conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรและนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่าให้ถูกแสงอย่างน้อย 30 นาทีก่อนใช้
2. นำเลือดที่ได้จากปลาตัวอย่างที่ผสมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาเจือจางด้วย RPMI-1640 ในอัตราส่วน 1:2 (เลือดปลา 1 ส่วนผสมกับ RPMI-1640 2 ส่วน) เปิดเบาๆให้เข้ากัน
3. ตัดปลายปิเปต Tip ให้มีรูขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อป้องกันเซลล์เม็ดเลือดแตก จากนั้นเปิดเลือดปลาที่ทำการเจือจางแล้วมา 3 มิลลิลิตรใส่ลงใน Conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี Histopaque-1077 อยู่แล้วในข้อ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรอย่างเบา ๆ
4. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ Swing rotor ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ความเร็วรอบ 400 xg เป็นเวลา 30 นาที
5. หลังจากปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้วจึงค่อย ๆ ใช้ปิเปตดูดเฉพาะส่วนที่เป็นชั้นของ PBLs (A band) มา 3 มิลลิลิตรใส่ใน Conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่
6. ทำการล้างเซลล์โดยการเติม PBS 6 มิลลิลิตร ลงใน Conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรที่มี PBLs อยู่ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ Swing rotor ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ด้วยความเร็วรอบ 250 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสออกและเติม PBS จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเดิมจนครบ 3 ครั้ง
7. หลังจากปั่นเหวี่ยงครบ 3 ครั้งแล้วดูดส่วนใสออกจากนั้นเติม PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปจนกว่าจะนำไปใช้

### ภาคผนวก ค

การเตรียม Competent cells

1. เชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรีย JM 109 ลงใน LB broth (Drug free) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เป็น Pre-culture
2. นำ Pre-culture product จากข้อ 1 ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร (ประมาณ 5% ของทั้งหมด) มาใส่ลงใน LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
3. จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งประมาณ 5 นาทีและแบ่งใส่ Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. ใช้ปิเปตดูดส่วนใสออกให้หมดและเติม 100 mM  $\text{CaCl}_2$  ไป 625 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต
6. นำ Eppendorf tube ที่ได้ไปวางบนน้ำแข็ง 30 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
8. ใช้ปิเปตดูดส่วนใสออกให้หมด จากนั้นเติม 100 mM  $\text{CaCl}_2$  ซึ่งมีส่วนผสมของ Glycerol อยู่ 15 % ลงไป 375 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต
9. แบ่ง Suspension ของสารที่เตรียมลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

#### ภาคผนวก ง

ค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (Identity และ Similarity) ของยีน  
Transferrin ของปลาดุกอุยเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

ตารางผนวก ที่ 1 ค่า Identity และ Similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Transferrin ปลาอุกอุยเปรียบเทียบกับยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

|                                            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. Honey bee (AY217097)                    |      | 54.9 | 54.6 | 53.8 | 48.6 | 52.1 | 46.8 | 47.7 | 47.6 | 50.3 | 47.9 | 53.7 | 47.6 | 54.1 | 47.9 | 49.3 | 47.9 | 48.2 |
| 2. Mulberry big borer (DQ388641)           | 56.2 |      | 61.3 | 55.5 | 49   | 53.9 | 45.8 | 48.3 | 48.2 | 49.8 | 48.8 | 54.4 | 47.8 | 60.3 | 48.6 | 49.8 | 49.3 | 49.2 |
| 3. Tropical cockroach (L05340)             | 56   | 62.1 |      | 54.4 | 49.8 | 53.7 | 46.9 | 47.3 | 49.9 | 49.2 | 48.9 | 54.6 | 49   | 71.2 | 49.1 | 49.5 | 49.7 | 49.3 |
| 4. Domestic silkworm (DQ375762)            | 54.9 | 56.5 | 55.4 |      | 47.4 | 70.9 | 47.1 | 47.9 | 47.9 | 51.7 | 48.4 | 76.4 | 48.8 | 53.6 | 48   | 47.3 | 48.3 | 47.4 |
| 5. Cattle (BC122602)                       | 52.1 | 51.5 | 52.9 | 50   |      | 49   | 50.6 | 53.8 | 78.8 | 47.7 | 76.6 | 48.2 | 74.9 | 48.7 | 70.4 | 57.2 | 56.7 | 56.9 |
| 6. Striped rice borer (A1188473)           | 52.9 | 54.8 | 54.3 | 70.9 | 51.5 |      | 47.4 | 47.9 | 48.4 | 50.4 | 48.3 | 70.8 | 47.6 | 53   | 47.6 | 48.3 | 47.1 | 47.8 |
| 7. Grass carp (AY383546)                   | 48.2 | 47.4 | 48.1 | 48.8 | 52.2 | 50.8 |      | 71.6 | 51.9 | 47.2 | 51.8 | 47.3 | 51.4 | 47.1 | 53.1 | 55.7 | 56.1 | 55.9 |
| 8. Zebrafish (F1001559)                    | 50.7 | 50.8 | 49.3 | 52.2 | 56.5 | 50.7 | 72.1 |      | 52.8 | 47   | 53.4 | 47.9 | 53.9 | 48.8 | 53.5 | 57.4 | 57.4 | 57.2 |
| 9. Horse (M69020)                          | 51.3 | 50.7 | 53.3 | 50.9 | 79   | 51   | 53.2 | 55.4 |      | 46.5 | 79.4 | 48.1 | 77.8 | 49.3 | 74.2 | 57.7 | 57.8 | 57.5 |
| 10. Tsetse (AF368908)                      | 51.4 | 50.8 | 50.2 | 52.9 | 49.9 | 53.5 | 50.1 | 49.4 | 47.9 |      | 46.6 | 51.8 | 47.7 | 49.3 | 46.9 | 46.2 | 46.6 | 46.3 |
| 11. Human (DQ923758)                       | 51.4 | 51.6 | 51.7 | 52.2 | 77   | 50.8 | 54   | 56.1 | 79.5 | 47.9 |      | 48.7 | 82.3 | 49.2 | 76.8 | 57.3 | 57.4 | 57.7 |
| 12. Tobacco hornworm (M62802)              | 54.8 | 55.2 | 54.9 | 76.4 | 51   | 70.9 | 48.8 | 51.7 | 50.8 | 53.5 | 52.4 |      | 48.3 | 54.1 | 48.4 | 47.8 | 48.1 | 47.6 |
| 13. Woodchuck (AY288100)                   | 50.4 | 50   | 51.5 | 52.9 | 75.3 | 49.9 | 52.8 | 57.1 | 78.1 | 49.6 | 82.4 | 51.7 |      | 49.7 | 79   | 57.4 | 57.7 | 57.6 |
| 14. Giant northern termite (AF535146)      | 55.7 | 60.9 | 71.4 | 54.4 | 51.2 | 53.8 | 48.5 | 51.3 | 52   | 50.4 | 51.7 | 55   | 52.1 |      | 50.2 | 50.3 | 50.2 | 50.2 |
| 15. House mouse (BC092046)                 | 50.9 | 51.3 | 51.9 | 51.2 | 71   | 49.7 | 55.5 | 56.1 | 75   | 48.4 | 77.5 | 51.9 | 79.4 | 52.7 |      | 56   | 56   | 55.6 |
| 16. Coho salmon (D89084)                   | 52.3 | 52.6 | 51.5 | 50.3 | 59.2 | 51.5 | 56.7 | 59.9 | 59.7 | 48.3 | 59.8 | 51.5 | 60.2 | 53.1 | 58.5 |      | 95.5 | 96.2 |
| 17. Cherry salmon (D89087)                 | 51.1 | 52.5 | 52.2 | 52.2 | 59   | 50.6 | 57   | 59.7 | 60.2 | 48   | 60.1 | 51.5 | 61   | 53.1 | 58.8 | 95.7 |      | 96.1 |
| 18. Rainbow trout (D89083)                 | 51.4 | 52.3 | 51.6 | 51.1 | 59.4 | 51   | 56.7 | 59.5 | 60   | 47.6 | 60.5 | 50.9 | 60.7 | 53.3 | 58.2 | 96.4 | 96.1 |      |
| 19. Sockeye salmon (D89085)                | 51.6 | 53.3 | 52.3 | 51.6 | 59.6 | 50.9 | 57.1 | 59.9 | 60.3 | 48.6 | 60.8 | 51.4 | 60.5 | 52.9 | 58.5 | 96   | 95.4 | 96.4 |
| 20. Amago (D89086)                         | 51.1 | 52.5 | 52.2 | 52.2 | 59   | 50.6 | 57   | 59.7 | 60.2 | 48   | 60.1 | 51.5 | 61   | 53.1 | 58.8 | 95.7 | 100  | 96.1 |
| 21. Nile tilapia (DQ272465)                | 52.5 | 52.4 | 52.7 | 51.6 | 57.9 | 50.6 | 55.9 | 58.7 | 59.5 | 47.6 | 60.7 | 51.6 | 59.7 | 52.1 | 61.1 | 70.3 | 70.2 | 70.6 |
| 22. Japanese medaka (D64033)               | 51.8 | 53.4 | 52.8 | 51.3 | 57.6 | 50.2 | 57.4 | 59   | 59.6 | 47.9 | 60   | 52.3 | 60.1 | 52.8 | 60   | 69.6 | 70.8 | 69.8 |
| 23. Red seabream (AY335444)                | 51.3 | 52.3 | 51.4 | 51   | 58.6 | 50.6 | 55.7 | 58.6 | 59.2 | 48.8 | 59.5 | 51.9 | 61   | 52.6 | 60.3 | 71.6 | 71.9 | 72.2 |
| 24. Bastard killifish (D88801)             | 51.8 | 50.5 | 52.9 | 51.9 | 56.6 | 51.1 | 55.8 | 57.8 | 57.8 | 48.4 | 57.6 | 51.7 | 58.6 | 51.5 | 58.8 | 65.9 | 65.6 | 65.8 |
| 25. White-spotted flower cunner (DQ882181) | 56.5 | 67.7 | 58.4 | 55.1 | 52.5 | 53.9 | 48.4 | 51.5 | 51.7 | 50.9 | 51.9 | 54.7 | 51.6 | 60   | 51.6 | 51   | 51.5 | 51.7 |
| 26. Norway rat (D38380)                    | 49.7 | 50.5 | 51.5 | 50.2 | 71.4 | 50.8 | 54.6 | 56.3 | 74.9 | 47.7 | 77.5 | 51.8 | 78.6 | 52.2 | 89.7 | 58.8 | 59.6 | 59.3 |
| 27. Bear big (AF046126)                    | 54.6 | 54   | 53.7 | 55.4 | 50.5 | 55.2 | 50.9 | 51.2 | 49.3 | 56   | 50.2 | 54.4 | 49.4 | 53.5 | 50.2 | 49.3 | 49.3 | 49.8 |
| 28. Eastern lubber grasshopper (AY362358)  | 54.7 | 60   | 63.2 | 53.8 | 51.4 | 53.4 | 47.7 | 49.8 | 51.6 | 49.1 | 52   | 55.5 | 52.2 | 64.2 | 52.2 | 51.1 | 51   | 51.9 |
| 29. Atlantic salmon (L20313)               | 52.2 | 52.4 | 51.3 | 50.9 | 59.7 | 50.9 | 58   | 59.9 | 59.8 | 48.7 | 60.7 | 50.9 | 61.5 | 52.6 | 59.2 | 92   | 92.1 | 92.9 |
| 30. Brown trout (D89091)                   | 51.9 | 52.3 | 51.7 | 51.1 | 59.5 | 51.3 | 57.9 | 60.1 | 59.9 | 48.2 | 60.7 | 50.8 | 60.9 | 53   | 59.5 | 91.5 | 92   | 92.8 |
| 31. Brook trout (D89089)                   | 51.6 | 52.7 | 51.9 | 52.2 | 59.5 | 51   | 56.8 | 59.9 | 60.6 | 47.2 | 61.2 | 52.2 | 60.4 | 52.5 | 59.6 | 92.6 | 93.4 | 93.9 |
| 32. Lake trout (D89090)                    | 50.6 | 52.2 | 51.6 | 50   | 59.5 | 50.8 | 57   | 59.6 | 60.7 | 48.1 | 60.9 | 52   | 60.9 | 52.7 | 59.4 | 92.7 | 93.5 | 93.7 |
| 33. Waka (D89088)                          | 50.7 | 52.1 | 51.9 | 51.8 | 59.2 | 51.7 | 57   | 59.5 | 60.5 | 47   | 61.5 | 50.9 | 61.1 | 52.3 | 59.4 | 92.5 | 93.3 | 93.9 |
| 34. Flea beetle (D28940)                   | 52   | 50.7 | 50.4 | 52.5 | 49.3 | 53.7 | 49.3 | 47.8 | 48.5 | 76   | 48.4 | 53.6 | 49.9 | 49.2 | 47.5 | 48.7 | 50   | 48.2 |
| 35. Red fire ant (AY940116)                | 68   | 55.6 | 57.1 | 54.8 | 53.2 | 53.9 | 48.3 | 50.4 | 51.5 | 50.4 | 51.7 | 55.4 | 51.9 | 56.3 | 50.5 | 51.9 | 51.3 | 51.4 |
| 36. African clawed frog (BC054950)         | 45.3 | 43.5 | 44.5 | 45.1 | 46.4 | 47.2 | 46.7 | 45.6 | 47.3 | 48   | 45.9 | 44.5 | 47.5 | 44.8 | 47.8 | 48.1 | 47.8 | 47.5 |
| 37. Walking catfish (ES610848)             | 48.9 | 49.2 | 49.3 | 50.2 | 54.7 | 50.4 | 57.5 | 56.7 | 55.2 | 51   | 56.8 | 49.7 | 56.5 | 50.7 | 54.8 | 60.6 | 60.5 | 60.5 |

ตารางผนวก ที่ 1 (ต่อ)

|                                            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. Honey bee (AY217097)                    | 48.3 | 47.9 | 48.5 | 48.1 | 47.8 | 48.2 | 54.9 | 46.8 | 53.2 | 53.1 | 48.3 | 48.2 | 48   | 47.3 | 47.5 | 51.1 | 67.1 | 44.9 | 47.8 |
| 2. Mulberry longicorn (DQ386641)           | 49.9 | 49.3 | 49.5 | 50.4 | 49.5 | 48.2 | 67.3 | 48.3 | 53.5 | 59   | 49.5 | 49.4 | 49.5 | 49.3 | 49.2 | 49.8 | 54.3 | 43   | 48.2 |
| 3. Tropical cockroach (L05340)             | 50   | 49.7 | 50   | 50.2 | 48.9 | 50.6 | 57.8 | 48.7 | 53   | 62.3 | 49   | 49.4 | 49.6 | 49.3 | 49.6 | 49.5 | 55.6 | 44.1 | 48   |
| 4. Domestic silkworm (DQ375762)            | 48   | 48.3 | 48.1 | 47.7 | 47.4 | 48.1 | 54.4 | 47.5 | 54   | 52.9 | 47.1 | 47.5 | 48.2 | 47.3 | 48.4 | 51.4 | 53.4 | 44.5 | 48.2 |
| 5. Cattle (BC122602)                       | 57   | 56.7 | 56   | 55.7 | 56.5 | 54.9 | 49.9 | 70.9 | 48   | 48.9 | 57.1 | 57.1 | 57   | 56.9 | 56.8 | 47.6 | 49.1 | 45.7 | 53.3 |
| 6. Striped riceborer (AB158473)            | 48   | 47.1 | 47.7 | 47.7 | 47.6 | 48   | 53.2 | 48.5 | 52.7 | 52.8 | 47.7 | 48.1 | 48.1 | 47.7 | 48.2 | 51   | 52.9 | 46.6 | 48.1 |
| 7. Grass carp (AY383546)                   | 56.2 | 56.1 | 55.2 | 56.3 | 55.1 | 54.6 | 46.9 | 52.3 | 48.1 | 46.1 | 57.3 | 57.1 | 56   | 56.1 | 56.2 | 46.4 | 47   | 45.8 | 52.7 |
| 8. Zebrafish (BK001559)                    | 57.6 | 57.4 | 56.8 | 56.7 | 56.5 | 55.3 | 48.7 | 53.5 | 47.7 | 47.7 | 57.9 | 58.2 | 57.7 | 57.5 | 57.2 | 46.3 | 47   | 44.6 | 55.2 |
| 9. Horse (M69020)                          | 57.7 | 57.8 | 57.4 | 57.7 | 57.4 | 56   | 49.1 | 74.2 | 46.8 | 48.8 | 57.7 | 57.6 | 58.1 | 58.1 | 58   | 47.1 | 47.9 | 46.2 | 53.7 |
| 10. Tsetse (AF368908)                      | 47   | 46.6 | 46.1 | 46.1 | 47   | 46.6 | 50.1 | 46.2 | 54.4 | 48.1 | 46.7 | 46.5 | 45.8 | 46.6 | 45.8 | 76   | 49.5 | 47.3 | 47.8 |
| 11. Human (DQ923758)                       | 57.7 | 57.4 | 58.1 | 57.3 | 56.9 | 55.7 | 49   | 77   | 47.6 | 49.5 | 57.6 | 57.9 | 58   | 58.1 | 58.3 | 46.9 | 48   | 44.8 | 54.9 |
| 12. Tobacco hornworm (M62802)              | 47.6 | 48.1 | 48.3 | 48.3 | 48.1 | 47.8 | 54.1 | 48.4 | 53.5 | 54.5 | 47.8 | 47.6 | 48.2 | 48.3 | 47.6 | 52   | 53.8 | 43.9 | 48.1 |
| 13. Woodchuck (AY288100)                   | 57.3 | 57.7 | 57.1 | 57.4 | 58.2 | 56.4 | 48.8 | 78.5 | 47.2 | 49.2 | 58.1 | 57.8 | 57.5 | 57.6 | 58   | 48.3 | 48.3 | 46.5 | 54.2 |
| 14. Giant northern termite (AF535146)      | 50   | 50.2 | 49.4 | 50.6 | 49.8 | 48.7 | 59.4 | 49.3 | 52.7 | 63.4 | 50.1 | 50.2 | 50.1 | 49.9 | 49.6 | 48.4 | 55.1 | 44.4 | 49.5 |
| 15. House mouse (BC092046)                 | 55.8 | 56   | 58.1 | 57.8 | 57.7 | 56.6 | 49.2 | 89.5 | 47.1 | 49.5 | 56.4 | 56.6 | 56.6 | 56.4 | 56.5 | 46.6 | 46.9 | 46.6 | 53   |
| 16. Coho salmon (D89084)                   | 95.9 | 95.5 | 69.9 | 69.1 | 71.1 | 65.2 | 48.8 | 56.4 | 47   | 49.1 | 91.8 | 91.4 | 92.6 | 92.7 | 92.3 | 47   | 48.5 | 46.9 | 60   |
| 17. Cherry salmon (D89087)                 | 95.4 | 100  | 69.7 | 70.4 | 71.7 | 65.3 | 48.9 | 56.9 | 47.4 | 48.8 | 92   | 91.9 | 93.4 | 93.5 | 93.3 | 48.1 | 47.9 | 46.6 | 59.9 |
| 18. Rainbow trout (D89083)                 | 96.4 | 96.1 | 70   | 69.6 | 72   | 65.2 | 48.9 | 56.6 | 47.2 | 49.7 | 92.8 | 92.6 | 93.9 | 93.7 | 93.9 | 46.7 | 47.9 | 46.3 | 59.8 |
| 19. Sockeye salmon (D89085)                |      | 95.4 | 69.9 | 69.5 | 71.8 | 65.2 | 49   | 56.3 | 46.9 | 49.3 | 92.2 | 91.9 | 93   | 93   | 93.2 | 47.9 | 47.5 | 46.3 | 60.3 |
| 20. Amago (D89086)                         | 95.4 |      | 69.7 | 70.4 | 71.7 | 65.3 | 48.9 | 56.9 | 47.4 | 48.8 | 92   | 91.9 | 93.4 | 93.5 | 93.3 | 48.1 | 47.9 | 46.6 | 59.9 |
| 21. Nile tilapia (DQ272465)                | 70.3 | 70.2 |      | 78.6 | 78   | 69.8 | 50   | 57.3 | 46.9 | 49.3 | 71   | 71.2 | 70.8 | 70.7 | 70.6 | 47   | 48.3 | 44.9 | 59   |
| 22. Japanese medaka (D64033)               | 69.7 | 70.8 | 78.8 |      | 77.6 | 70.1 | 49.8 | 57.4 | 47.2 | 49.3 | 70.7 | 70.9 | 70.1 | 69.9 | 70.4 | 47.4 | 48.7 | 47   | 59   |
| 23. Red seabream (AY335444)                | 72   | 71.9 | 78.2 | 77.6 |      | 71.3 | 48.3 | 57.3 | 46.4 | 50.8 | 72.4 | 72.9 | 72.5 | 72.5 | 72.6 | 45.8 | 48.2 | 45.5 | 58.7 |
| 24. Bastard killifish (D88801)             | 65.8 | 65.6 | 70.2 | 70.5 | 71.6 |      | 48.4 | 56.3 | 47.5 | 49.8 | 65.6 | 65.5 | 65.4 | 65.5 | 65.9 | 47.9 | 49.3 | 46.6 | 58.4 |
| 25. White-spotted flower cunner (DQ882181) | 51.6 | 51.5 | 53.1 | 52.7 | 51.1 | 51.5 |      | 48.3 | 52.3 | 57.8 | 48.3 | 49.1 | 48.6 | 48.9 | 49.1 | 50.3 | 55.5 | 44.3 | 48.3 |
| 26. Norway rat (D38380)                    | 58.9 | 59.6 | 60.4 | 60   | 60   | 58.4 | 51.5 |      | 46.7 | 49.5 | 57.4 | 57.2 | 57.5 | 57.1 | 57.3 | 46.6 | 48.4 | 46.7 | 52.6 |
| 27. Bear big (AF046126)                    | 49.4 | 49.3 | 49   | 50   | 48.3 | 50.3 | 52.7 | 49.4 |      | 50.3 | 46.9 | 47.2 | 47.3 | 47   | 46.7 | 53.3 | 52.4 | 46.7 | 47.8 |
| 28. Eastern lubber grasshopper (AY362358)  | 51.7 | 51   | 52.1 | 51.4 | 53.1 | 52.3 | 58.6 | 52.3 | 51.1 |      | 49.9 | 50   | 49.5 | 49.7 | 49.5 | 49   | 53.7 | 42.6 | 47.1 |
| 29. Atlantic salmon (L20313)               | 92.4 | 92.1 | 71.4 | 71.1 | 72.6 | 66   | 51.1 | 60.5 | 48.9 | 52.2 |      | 97.5 | 94.4 | 93.9 | 94.4 | 46.7 | 48.1 | 45.9 | 60.5 |
| 30. Brown trout (D89091)                   | 92   | 92   | 71.7 | 71.2 | 73.1 | 65.7 | 52.3 | 59.7 | 49.6 | 52.1 | 97.5 |      | 94.4 | 93.7 | 94.7 | 46.2 | 47.8 | 46.3 | 60.9 |
| 31. Brook trout (D89089)                   | 93   | 93.4 | 71.2 | 70.5 | 72.7 | 65.6 | 51   | 60.4 | 49.4 | 51.7 | 94.4 | 94.6 |      | 98.3 | 97.5 | 46.6 | 48.4 | 46.3 | 60.9 |
| 32. Lake trout (D89090)                    | 93   | 93.5 | 71.2 | 70.3 | 72.7 | 66   | 51.3 | 60   | 49.6 | 51.9 | 93.9 | 93.8 | 96.3 |      | 97   | 46.7 | 48.4 | 46.7 | 61   |
| 33. Iwana (D89088)                         | 93.2 | 93.3 | 71.1 | 70.7 | 72.8 | 66.3 | 52   | 60.2 | 48.5 | 51.8 | 94.6 | 94.9 | 97.5 | 97   |      | 47.1 | 48.3 | 46.2 | 60.7 |
| 34. Flea fly (D28940)                      | 49.8 | 50   | 48.2 | 49.1 | 47.2 | 49.2 | 51.3 | 47.8 | 54.6 | 50   | 48.3 | 47.6 | 47.7 | 48   | 48.4 |      | 48.9 | 46.3 | 48.7 |
| 35. Red fire ant (AY940116)                | 51.3 | 51.3 | 52   | 52.7 | 51.7 | 53   | 56.7 | 51.8 | 53.2 | 55.3 | 51.7 | 51.4 | 52.1 | 51.9 | 51.9 | 49.7 |      | 44   | 47.9 |
| 36. African clawed frog (BC054950)         | 47.4 | 47.8 | 46.1 | 48.1 | 47   | 47.9 | 44.7 | 47.6 | 47.6 | 42.9 | 47.1 | 47.4 | 47.5 | 47.8 | 47.3 | 47   | 44.4 |      | 48   |
| 37. Walking catfish (ES610848)             | 61   | 60.5 | 59.4 | 59.6 | 59.3 | 59.3 | 49.7 | 54.5 | 50.7 | 48.2 | 61.3 | 61.6 | 61.5 | 61.7 | 61.4 | 52.4 | 49.5 | 50   |      |

ตารางผนวก ที่ 2 ค่า Identity และ Similarity ของลำดับกรดอะมิโนของยีน Transferrin ปลาตุ๊กอูยเปรียบเทียบกับยีน Transferrin ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

|                                             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. Honey bee (AY217097)                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 2. Mulberry longicorn (DQ386641)            | 63.8 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 3. Tropical cockroach (L05340)              | 63.1 | 73.3 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 4. Domestic silkworm (DQ375762)             | 58.9 | 61.2 | 61.5 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 5. Cattle (BC122602)                        | 45.5 | 45.8 | 44.9 | 42.6 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 6. Striped riceborer (AB158473)             | 57.6 | 59.6 | 59.4 | 88   | 41.5 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 7. Grass carp (AY383546)                    | 38.2 | 41.7 | 42.6 | 41.6 | 53.4 | 42.5 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 8. Zebra fish (B1001559)                    | 43.6 | 46.5 | 46.1 | 45   | 55   | 42.3 | 72.8 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 9. Horse (M69020)                           | 45.1 | 46   | 46.6 | 42.7 | 84.8 | 41.7 | 54.9 | 57.3 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10. Tsetse (AF368906)                       | 51.6 | 51.3 | 50.8 | 54.2 | 39.7 | 53.7 | 41.5 | 40.4 | 40.1 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 11. Human (DQ923758)                        | 44.3 | 44.8 | 44.9 | 44.8 | 82   | 42.4 | 54.8 | 59.8 | 81.7 | 42   |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 12. Tobacco hornworm (M62802)               | 60.3 | 62.9 | 61.4 | 94.3 | 42.6 | 87.1 | 41.6 | 43.9 | 44.6 | 53.7 | 43.4 |      |      |      |      |      |      |      |
| 13. Woodchuck (AY288100)                    | 44.6 | 45.5 | 44.4 | 42.6 | 82.1 | 41.3 | 53.8 | 58.7 | 83.7 | 40.8 | 88.7 | 42.9 |      |      |      |      |      |      |
| 14. Giant northern termite (AF535146)       | 64.3 | 72.9 | 88   | 60.8 | 46.6 | 58.9 | 41.7 | 46   | 48.1 | 49.8 | 47.4 | 61   | 46.7 |      |      |      |      |      |
| 15. House mouse (BC092046)                  | 43.5 | 45.9 | 45.1 | 43.6 | 78.2 | 42.3 | 54.9 | 57.3 | 79.8 | 37.6 | 83.4 | 43.7 | 87   | 46.3 |      |      |      |      |
| 16. Colorado salmon (D89084)                | 44   | 43.5 | 47.9 | 45   | 64   | 44.6 | 59.7 | 63   | 65.2 | 38.3 | 64.7 | 43.2 | 65.1 | 48.5 | 63.5 |      |      |      |
| 17. Cherry salmon (D89087)                  | 44.6 | 43.9 | 47.9 | 45.1 | 64.6 | 43.9 | 59.9 | 63.9 | 65.5 | 39.8 | 66.4 | 44.8 | 66   | 49.4 | 64.4 | 94.4 |      |      |
| 18. Rainbow trout (D89083)                  | 43.6 | 44.9 | 48.6 | 45.1 | 65.4 | 43.8 | 59.5 | 62.9 | 66.2 | 38.9 | 66.7 | 44.2 | 66.7 | 48.7 | 64.7 | 95.9 | 95.3 |      |
| 19. Sockeye salmon (D89085)                 | 44.5 | 44.4 | 47.8 | 44.5 | 64.6 | 43.3 | 58.7 | 64.2 | 65.6 | 39.2 | 65.8 | 44.4 | 65.4 | 49.2 | 63.8 | 95.1 | 95.3 | 95.3 |
| 20. Amago (D89086)                          | 44.6 | 43.9 | 47.9 | 45.1 | 64.6 | 43.9 | 59.9 | 63.9 | 65.5 | 39.8 | 66.4 | 44.8 | 66   | 49.4 | 64.4 | 94.4 | 100  | 95.3 |
| 21. Nile tilapia (DQ272465)                 | 45.6 | 46.2 | 46.8 | 44.6 | 64.6 | 42.6 | 58   | 62.4 | 66.2 | 38.3 | 67.1 | 43.3 | 65.3 | 48   | 64.2 | 80.8 | 80.9 | 80.9 |
| 22. Japanese medaka (D64033)                | 41.9 | 44.6 | 46.1 | 43.2 | 63.8 | 42.5 | 59.3 | 62.3 | 64.9 | 39.2 | 65.5 | 43.4 | 65.5 | 47.6 | 63.9 | 79.8 | 80.2 | 80   |
| 23. Red seabream (AY335444)                 | 44   | 45.2 | 46.1 | 43.9 | 63.6 | 42.7 | 58.8 | 63.9 | 66.6 | 40.8 | 66.7 | 43.8 | 67   | 47.7 | 64.7 | 82.6 | 83.4 | 82.7 |
| 24. Bastard killifish (D88801)              | 43.6 | 43.2 | 46.1 | 41.8 | 60.8 | 41.3 | 58.5 | 62.6 | 63.6 | 38.8 | 63.9 | 43   | 63   | 46   | 63.2 | 72.7 | 72.8 | 72   |
| 25. White-spotted flower catfish (DQ882181) | 64   | 81.4 | 71.2 | 60.1 | 47.9 | 58.8 | 43.6 | 45.5 | 48.2 | 52   | 47   | 60.9 | 47.7 | 72.3 | 45.9 | 47.3 | 48.2 | 48.2 |
| 26. Norway rat (D38380)                     | 43.9 | 44.9 | 45.4 | 43.5 | 79   | 41.2 | 52.5 | 56.9 | 79.4 | 39.1 | 82.9 | 43.1 | 86.3 | 47.4 | 93.5 | 62.5 | 62.9 | 64.4 |
| 27. Bear bug (AF046126)                     | 59   | 59.7 | 60.4 | 60.1 | 40.8 | 59.9 | 41.8 | 43.2 | 40.9 | 55.3 | 40.6 | 60.6 | 40.2 | 61   | 38.7 | 41.2 | 41.9 | 40.4 |
| 28. Eastern lubber grasshopper (AY362358)   | 64   | 71.2 | 73.6 | 58.4 | 46   | 57.5 | 41.8 | 47.7 | 47.3 | 51.2 | 48.1 | 59.1 | 48   | 74   | 47.7 | 46.1 | 47.3 | 47.8 |
| 29. Atlantic salmon (L20313)                | 42.9 | 44.5 | 46.6 | 42.9 | 64   | 42.5 | 59.9 | 65.1 | 64.7 | 39.1 | 65.2 | 43.9 | 65.4 | 48.1 | 64.1 | 90.1 | 91.3 | 92.2 |
| 30. Brown trout (D89091)                    | 43.5 | 45.2 | 46.2 | 43.3 | 64.2 | 42.4 | 59.7 | 64.1 | 65.2 | 40   | 65.5 | 44   | 65   | 47.6 | 64.4 | 89.7 | 91   | 91.9 |
| 31. Brook trout (D89089)                    | 44.2 | 45.3 | 47.3 | 43.7 | 64.5 | 43.3 | 59.8 | 63.7 | 65   | 41.1 | 65.7 | 43.7 | 64.8 | 47.4 | 63.9 | 91.4 | 92.3 | 93.4 |
| 32. Lake trout (D89090)                     | 45.2 | 44.8 | 48.2 | 43.6 | 64.2 | 44   | 59.8 | 63.4 | 65   | 40.2 | 65.8 | 44.5 | 64.8 | 48.7 | 63.5 | 91.4 | 92.8 | 93.4 |
| 33. Waka (D89088)                           | 44.5 | 45.1 | 46.3 | 43.3 | 64.2 | 42.2 | 59.6 | 63.3 | 65.5 | 40.2 | 65.7 | 43.3 | 64.8 | 47.3 | 63.8 | 90.5 | 92   | 93   |
| 34. Flea fly (D28940)                       | 53.3 | 50.4 | 50.4 | 53.8 | 38.4 | 53.6 | 42   | 40.4 | 41.2 | 90.4 | 42.3 | 54.5 | 41.1 | 49.5 | 39.9 | 38.5 | 38.8 | 39.6 |
| 35. Red fire ant (AY940116)                 | 84   | 62.4 | 62.9 | 57.1 | 44.1 | 56.3 | 38.8 | 42.3 | 43.1 | 51.9 | 42   | 58.5 | 43.3 | 63.9 | 43   | 44   | 43.6 | 42.9 |
| 36. African clawed frog (BC054950)          | 33.3 | 32.5 | 33.4 | 35.3 | 49.3 | 35.6 | 45.4 | 44.8 | 51.7 | 37.4 | 49.3 | 34.4 | 50.6 | 34.4 | 49.8 | 50.7 | 50.3 | 49.7 |
| 37. Walking catfish (ES610848)              | 41.1 | 43.1 | 45.1 | 42.3 | 56.6 | 42.9 | 57.7 | 57.8 | 57.9 | 39.9 | 56.7 | 41.2 | 57.2 | 45.5 | 57   | 64.8 | 64.8 | 66   |

ตารางผนวก ที่ 2 (ต่อ)

|                                            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. Honey bee (AY217097)                    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 2. Mulberry longhorn (DQ386641)            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 3. Tropical cockroach (L05340)             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 4. Domestic silkworm (DQ375762)            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 5. Cattle (B0122602)                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 6. Striped rice borer (A6158473)           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 7. Grass carp (AY383546)                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 8. Zebrafish (B1001559)                    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 9. Horse (M69020)                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10. Tsetse (AF368908)                      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 11. Human (DQ923758)                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 12. Tobacco hornworm (M62802)              |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 13. Woodchuck (AY288100)                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 14. Giant northern termite (AF535146)      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 15. House mouse (B0092046)                 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 16. Coho salmon (D89084)                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 17. Cherry salmon (D89087)                 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 18. Rainbow trout (D89083)                 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 19. Sockeye salmon (D89085)                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 20. Amago (D89086)                         | 95.3 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 21. Nile tilapia (DQ272465)                | 81.4 | 80.9 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 22. Japanese medaka (D64033)               | 80.2 | 80.2 | 86.9 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 23. Red seabream (AY335444)                | 83.9 | 83.4 | 84.9 | 85.8 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 24. Bastard halibut (D88801)               | 73.1 | 72.8 | 75.2 | 76.5 | 77   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25. White-spotted flower chaser (DQ882181) | 48   | 48.2 | 48.4 | 47.5 | 47.3 | 47.2 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 26. Norway rat (D38380)                    | 63.4 | 62.9 | 64.2 | 63.2 | 64.3 | 61.2 | 47.2 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 27. Bear big (AF046126)                    | 41.4 | 41.9 | 41.1 | 42.2 | 41.5 | 42.4 | 57.4 | 39   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 28. Eastern lubber grasshopper (AY362358)  | 47.1 | 47.3 | 48.1 | 47.5 | 46.8 | 46   | 71   | 49.5 | 59.2 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 29. Atlantic salmon (L20313)               | 92.2 | 91.3 | 81.4 | 80.8 | 81.7 | 71.9 | 45.8 | 62.8 | 39.6 | 46.6 |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30. Brown trout (D89091)                   | 91.6 | 91   | 81.1 | 80.8 | 81.4 | 72.1 | 45.8 | 63.1 | 41.1 | 47   | 97   |      |      |      |      |      |      |      |
| 31. Brook trout (D89089)                   | 93.9 | 92.3 | 81.5 | 79.6 | 82.7 | 73.1 | 46.6 | 63.1 | 39.1 | 46.3 | 94.7 | 93.9 |      |      |      |      |      |      |
| 32. Lake trout (D89090)                    | 93.8 | 92.8 | 81.5 | 79.5 | 83   | 73   | 46.6 | 62.6 | 40   | 46.1 | 93.9 | 93.1 | 96.2 |      |      |      |      |      |
| 33. Walleye (D89088)                       | 93.6 | 92   | 80.5 | 80   | 82.1 | 73.5 | 48.2 | 62.9 | 40.5 | 47.7 | 93   | 93.4 | 97.6 | 96.6 |      |      |      |      |
| 34. Flea beetle (D28940)                   | 39.3 | 38.8 | 37.7 | 39.4 | 40.7 | 38.5 | 50.8 | 39.6 | 54.8 | 51.1 | 38   | 38.4 | 38.8 | 38.4 | 40.7 |      |      |      |
| 35. Red fire ant (AY940116)                | 43.1 | 43.6 | 43.4 | 42   | 43.3 | 41.7 | 63.3 | 43.4 | 58.7 | 61.6 | 41.7 | 42   | 44   | 43.7 | 43.6 | 53.4 |      |      |
| 36. African clawed frog (B0054950)         | 49.6 | 50.3 | 49.5 | 49.6 | 51.8 | 50.3 | 33.3 | 47.8 | 32.8 | 34.6 | 50.1 | 50.5 | 50.2 | 50.1 | 50   | 38.6 | 32.5 |      |
| 37. Walking catfish (ES610848)             | 64.6 | 64.8 | 63.7 | 64.3 | 64.8 | 63.5 | 42.6 | 56.3 | 41.3 | 43.3 | 64.6 | 65.1 | 65.4 | 65.1 | 65.7 | 40.2 | 41.3 | 53.1 |

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

|                                |                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| ชื่อ –นามสกุล                  | อรุณศิริ ศรีบุญแสน                   |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด           | 31 พฤษภาคม 2526                      |
| สถานที่เกิด                    | กรุงเทพมหานคร                        |
| ประวัติการศึกษา                | วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน   | -                                    |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน           | -                                    |
| ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ | -                                    |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ           | -                                    |