การแสดงออกของยีน GnRH จะมีความจำเพาะต่ออวัยวะและช่วงเวลา (site and time specific) (Amano และคณะ, 2004; Andersson และคณะ, 2001) และจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Parhar และคณะ, 1996) ในกลุ่มปลาที่มี GnRH 2 ชนิด จะมีรูปแบบหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของต่อมพิทูอิทารี่ และ cGnRH-II ที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด โดยอาจทำหน้าที่เป็น neurotransmitter และ/หรือ neuromodulator (Samoza และคณะ, 2002) สำหรับหน้าที่หลักของ sGnRH ที่แสดงออกที่ terminal nerve ganglia จะมีความแตกต่างกัน โดยมีการแสดงออกภายในสมอง แต่ไม่พบในต่อมพิทูอิทารี่ (Oka, 1992) ในเบื้องต้น หน้าที่ของ sGnRH อาจจะเป็นการทำงานร่วมกับระบบการดมกลิ่นและการมองเห็นเพื่อประโยชน์ของระบบสืบพันธุ์ (Kudo และคณะ, 1996; Parhar และคณะ, 1994)

วิธีการ In situ hybridization ในปลา barfin flounder (*Verasper moseri*) พบว่า sGnRH แสดงออกบริเวณ ventromedial olfactory bulbs และ terminal nerve ganglion สำหรับ cGnRH-II แสดงออกที่ midbrain tegmentum และ sbGnRH แสดงออกที่บริเวณ preoptic จากข้อมูลนี้จะชี้ให้เห็นว่า มีเพียง sbGnRH เท่านั้น ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งฮอร์โมน gonadotropin (Amano และคณะ, 2002) ทั้งนี้ ระดับของ sGnRH และ cGnRH-II จะต่ำเมื่อเทียบกับระดับของ sbGnRH และไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Amano และคณะ, 2004) สำหรับในปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) cGnRH-II จะถูกพบในสมอง ในขณะที่ sbGnRH และ sGnRH จะถูกพบบริเวณต่อมพิทูอิทารี่ โดยทั้ง sGnRH และ sbGnRH จะมีความหลากหลายเกิดขึ้นในระหว่างฤดูวางไข่ (Andersson และคณะ, 2001)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1.ตัวอย่างปลาดุกอุย

-นำพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดอุบลราชธานีมาทำการเพาะพันธุ์จำนวน 20 คู่ และทำการเลี้ยงแบบรวมเพศในบ่อดินขนาดประมาณ 200 ตารางเมตร

-เมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 6 เดือน จึงเริ่มทำการศึกษา โดยสุ่มจับปลาเพศเมียและเพศผู้ อย่างละ 3 ตัว มาทำการชั่งน้ำหนักลำตัวและอวัยวะสืบพันธุ์ และ วัดความยาว ทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน

-ตัวอย่างปลาจะถูกนำมาแยกเนื้อเยื่อ ได้แก่ สมอง ต่อมใต้สมอง และ อวัยวะสืบพันธุ์ ทำการแช่แข็งในตู้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทุกเดือน

2.การศึกษาองค์ประกอบของยีน *GnRH*

2.1.<u>การสกัด Total RNA จากเนื้อเยื่อปลาดุกอุย</u>

- นำเนื้อเยื่อน้ำหนัก 50 มิลลิกรัมทำการบดด้วยไนโตรเจนเหลว
- เติมน้ำยาไทรซอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- นำสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ และเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- ทำการปั่นเหวี่ยงแรง เป็นเวลา 15 นาที และ พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
- นำสารละลายส่วนใส (ด้านบน) ใส่ในหลอดใหม่ และเติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร
- ทำการหมุนกลับไปมา และ พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ทำการล้างด้วย 75% เอธานอล 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เทสารละลายทิ้ง และทำการตากแห้ง เป็นเวลา 10 นาที
- ทำการละลายตะกอนด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

2.2.<u>การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ total RNA</u>

- ในการวัดปริมาณของ total RNA จะนำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วนของ total RNA 2 μL และ น้ำ 98 μL (1:50) มาวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) จากนั้น จะได้ความเข้มข้นของ total RNA ซึ่งมีหน่วยเป็น ng/uL
- ในการตรวจสอบคุณภาพของ total RNA จะใช้ตัวอย่างปริมาณ 3 μL มาผสมกับ loading dye เพื่อให้เกิดสีปริมาณ 2 μL จากนั้น นำตัวอย่างลงเครื่องอิเลคโตโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 50 นาที

2.3.<u>การศึกษาองค์ประกอบของยีน GnRH โดยวิธีการ 3'-RACE PCR และ 5'-RACE PCR</u>

ในการทำ 3'RACE ได้ใช้ชุดคิทของบริษัท Invitrogen ดำเนินการดังนี้

-นำ total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อสมองของปลาดุกอุยเพศเมียในเดือนเมษายน ปริมาตร 1 ไมโครกรัม ผสมกับน้ำเพื่อให้ได้ปริมาตร 11 ไมโครลิตร

-เติมสารละลาย 10 μM AP 1 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน

-ให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารดังตาราง

รีเอเจนท์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	2
25 mM $MgCl_2$	2
10 mM dNTP mix	2
0.1 M DTT	2

-ผสมสารให้เข้ากัน และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

-เติม SuperScript II RT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที

-หยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

-วางบนน้ำแข็ง และเติม RNase H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำไปให้ความร้อนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

-เก็บตัวอย่างไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

2.3.การทำปฏิกิริยาสายลูกโซ่ (polymerase chain reaction)

ในการออกแบบไพรเมอร์ของปฏิกิริยาสายลูกโซ่ จะมีการนำยีน *GnRH* จากปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) blue catfish (*I. furcatus*) (Lamkom, 2008) และ African catfish (*Clarias gariepinus*) จากฐานข้อมูล ncbi มาทำการเทียบกัน (alignment) เพื่อหาตำแหน่งที่เหมือนกันมากที่สุด (conserved region)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับ chicken type II GnRH

Forward primer	Reverse primer
5′-CATGGCTGGTATCCTGGAGGAAAG-3′	5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′

เตรียมปฏิกิริยาโดยใช้รีเอเจนท์ ดังนี้

รีเอเจนท์	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer	1x
25 mM $MgCl_2$	1.0 mM
10 mM dNTPs	0.2 mM dNTPs
10 µM forward primer	0.2 µM
10 µM reverse primer	0.2 µM
Taq DNA polymerase	1 unit

จากนั้นนำเข้าเครื่องทำปฏิกิริยาสายลูกโซ่ (thermal cycler) ตามปฏิกิริยา ดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา	จำนวนรอบ
94	3 นาที	
94 60 72	30 วินาที 30 วินาที 1 นาที	35
72	5 นาที	
พักไว้ที่ 4		

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากเครื่องมาหยอดในอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ใช้กำลัง 100 โวลท์ ที่เวลา 50 นาที และนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

เมื่อผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาสายลูกโซ่ถูกตรวจสอบได้จากการใช้แสงอัลตราไวโอเลต และใช้ 100 bp เป็นสารมาตรฐาน จะทำการตัดชิ้นส่วนเจล เพื่อนำมาสกัดผลผลิตออกจากเจลด้วยชุดคิท Gel extraction kit (Qiagen) จากนั้นผลผลิตดังกล่าว จะถูกนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ดังตาราง

รีเอเจนท์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x reaction buffer	5
pGEM-T vector	1
T4 DNA ligase	1
PCR product	3
รวมทั้งหมด	**10**

นำสารละลายที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ หรือผ่านขบวนการ ligation แล้ว มาแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมนำเข้าแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในที่นี้ใช้สายพันธุ์ DH5α ของบริษัท Invitrogen โดยเริ่มจากการนำแบคทีเรียมาวางไว้ให้ละลายบนน้ำแข็ง แล้วนำสารละลายจากขบวนการ ligation เติมลงไปในสารละลายแบคทีเรีย ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งแบคทีเรียไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำหลอดแบคทีเรียมาวางไว้ในอ่างแช่ (incubator) ที่ปรับระดับความร้อนไปที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และรีบนำหลอดมาแช่ในน้ำแข็งนาน 2 นาที

ในการทำโคลนนิ่ง (cloning) จะนำสารละลายแบคทีเรียที่มีเวคเตอร์มาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillun) ซึ่งมีการเติมสารละลาย IPTG และ X-gal ไว้

แล้ว เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อตรวจสอบอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบโคโลนีสีขาว และอาจพบโคโลนีสีฟ้าร่วมกัน ทำการนำเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในการเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ จะมีการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียสีขาว มาประมาณ 3 โคลนต่อยีนที่ทำการศึกษา นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ได้ผสมยาปฏิชีวนะ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 18 ชั่วโมง และมีการเขย่าหลอดแบคทีเรีย เมื่อครบเวลา จะนำแบคทีเรียออกมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดคิท plasmid purification (Qiagen) ซึ่งมีปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมแบ่งพลาสมิดดีเอ็นเอ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อเตรียมหาลำดับเบส (sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับเวคเตอร์ที่ทำการศึกษา ในที่นี้ใช้ Sp6

เมื่อได้ลำดับเบสมา จะใช้โปรแกรม Chromas 2.13 ในการตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับเบส และทำการตัดเวคเตอร์ด้วยโปรแกรม vector contamination ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล http://www.ncbi.nlm.nih.gov และตรวจสอบความเหมือนของลำดับเบสด้วยโปรแกรม BlastX จากนั้นนำลำดับเบสของยีนมาทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

3.การแสดงออกของยีน *GnRH*

1.การสกัด total RNA

โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อสมอง ต่อมใต้สมอง และ อวัยวะสืบพันธุ์ (รังไข่และอัณฑะ) ของปลาดุกอุยในทุกเดือน มาทำการสกัด total RNA และทำ first strand cDNA

2.นำ total RNA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ของเนื้อเยื่อในแต่ละเดือนมาศึกษาการแสดงออกด้วย reverse transcriptase PCR (One-step SuperScript III, Invitrogen)

3.นำชิ้นส่วนของยีนที่ได้จาก 3'RACE-PCR มาทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์สำหรับการแสดงออกของยีน chicken type II GnRH (*CH-GnRH*)

Forward primer	Reverse primer
5'-CATGGCTGGTATCCTGGAGGAAAG-3'	5'- GTGGCCTCAGATAGCTGCATTCTC -3'

จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา ดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา	จำนวนรอบ
55	30 นาที	
94	2 นาที	
94 58 68	15 วินาที 30 วินาที 1 นาที	40 รอบ
68	5 นาที	

โดยใช้ยีน β-*actin* เป็นยีนมาตรฐาน (house keeping gene) สำหรับการศึกษาแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อสมอง ต่อมใต้สมอง และ อวัยวะสืบพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์สำหรับการแสดงออกของยีน β-*actin*

Forward primer	Reverse primer
5′- AGAGAGAAATTGTCCGTGACATC-3′	5′- CTCCGATCCAGACAGAGTATTTG-3′

จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีน β-*actin* ด้วยปฏิกิริยา ดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ช่วงเวลา	จำนวนรอบ
55	30 นาที	
94	2 นาที	
94 56 68	15 วินาที 30 วินาที 1 นาที	40 รอบ
68	5 นาที	