การศึกษาองค์ประกอบของยีน Gonadotropin releasing hormone (*GnRH*) ในรูปแบบ cDNA และการแสดงออกในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ในรอบปี

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปลาดุกอุย (walking catfish, *Clarias macrocephalus*) เป็นปลาที่อาศัยอยู่ตามแม่น้ำ ลำคลอง หนอง บึง ท้องทุ่งนา แพร่กระจายเกือบทุกภาคของประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง ได้แก่ มาเลเซีย อินโดยนีเซีย ฟิลิปปินส์ พม่า และบังคลาเทศ ฯลฯ นิสัยการกินอาหารของปลาดุกอุยจะกินได้ทั้งพืชและสัตว์ สัตว์หน้าดิน อาหารที่เหลือจากครัวเรือน ปลาดุกอุยเป็นปลาที่สามารถอยู่ในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำได้ดี นอกจากนี้ปลาดุกอุยยังเป็นปลาที่มีความสมบูรณ์เพศค่อนข้างเร็ว

ปลาดุกอุยเพศเมียถูกนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์เพื่อผสมพันธุ์กับปลาดุกเทศเพศผู้ (*C. gariepinus*) เพื่อให้ได้ลูกปลาดุกอุย-เทศหรือบิ๊กอุย ในประเทศไทยมาเป็นเวลานาน (Na-Nakorn, 1999) เนื่องจากปลาดุกลูกผสมที่ได้จะเติบโตเร็ว มีความต้านทานโรคสูง รูปร่างสีสันดีและเนื้อมีรสชาดใกล้เคียงกับปลาดุกอุย Chong และคณะ (2004) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแม่พันธุ์ปลา swordtails กับลูกปลาที่ผลิตขึ้น จะพบว่า ความสมบูรณ์ของแม่พันธุ์ปลาจะมีผลต่อจำนวนของลูกปลา ดังนั้น ในการเลือกใช้แม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่มีความสมบูรณ์เพศจึงมีผลต่อลูกปลาที่ผลิตขึ้น

Tan-Fermin และคณะ (1997) ได้ศึกษาช่วงเวลาการวางไข่ของปลาดุกอุย พบว่า ปลาดุกอุยจะมีอัตราการฟักไข่ในช่วงเดือนพฤษภาคม สิงหาคม และพฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูวางไข่สูงกว่าเดือนกุมภาพันธ์ (ช่วงก่อนฤดูวางไข่) และเมื่อใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRH analogue) ร่วมกับ pimozide พบว่า สามารถกระตุ้นให้ปลามีการวางไข่ได้ตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งจะดีกว่าในการใช้ LHRH analogue หรือ pimozide เพียงอย่างเดียว เนื่องจากในช่วงของการพัฒนาของเซลสืบพันธุ์ การตกไข่ การเพิ่มของระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin, GTH) และสเตอรอยด์ฮอร์โมน จะเป็นผลมาจากการทำงานของฮอร์โมน (Tan-Fermin, 1992) โดยเฉพาะฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่ง (Gonadotropin releasing hormone, GnRH) ที่มีหน้าที่ในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ของปลา (Kumakura และคณะ, 2004; Kim และคณะ, 2006) โดย Heyrati และคณะ (2007) พบว่า ระดับ GnRH analogue ที่แตกต่างกัน จะมีผลต่อการวางไข่และช่วงเวลาพักหลังจากการฉีดฮอร์โมน (latency period)

ในการศึกษาครั้งนี้ จะประกอบด้วยการศึกษาองค์ประกอบของยีนที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์ในปลาดุกอุย ได้แก่ GnRH gene และการแสดงออกของยีน GnRH ในแต่ละช่วงฤดูผสมพันธุ์ ช่วงก่อนและหลังฤดูผสมพันธุ์ของแม่พันธุ์ เพื่อให้ได้ทราบถึงช่วงเวลาของการกระตุ้นและการพัฒนาของระบบ

สืบพันธุ์ ที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนผสมพันธุ์ของปลาดุกอุยและบิ๊กอุยได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.เพื่อศึกษาองค์ประกอบของยีน Gonadotropin releasing hormone (*GnRH*) ในปลาดุกอุยทุกรูปแบบ

2.เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *GnRH* ในอวัยวะต่างๆ ของปลาดุกอุย ได้แก่ สมอง ต่อมใต้สมอง และ รังไข่ ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ ช่วงก่อนและหลังฤดูผสมพันธุ์

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปลาดุกอุย (walking catfish, *Clarias macrocephalus*) ถูกจัดอยู่ในอันดับ Siluriformes เป็นปลาไม่มีเกล็ด รูปร่างเรียวยาว ด้านข้างแบน หัวแบนลง กะโหลกท้ายทอยป้านและโค้งมน เงี่ยงที่ครีบหูมีฟันเลื่อยด้านนอกและ ด้านในครีบหลัง ครีบก้น ครีบหางแยกจากกัน ปลายครีบหางกลมมน มีหนวด 4 คู่ มีอวัยวะพิเศษช่วยในการหายใจอยู่บริเวณช่องเหงือก ปลาดุกอุยจัดเป็นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยถูกนำมาเป็นแม่พันธุ์ เพื่อใช้ในการผสมพันธุ์กับปลาดุกเทศเพศผู้ (*C. gariepinus*) จะได้ลูกปลาดุกอุย-เทศหรือบิ๊กอุย ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาดุกอุย และยังคงคุณภาพเนื้อที่ดีของปลาดุกอุยไว้ได้ (สุจินต์ และคณะ, 2533)

ในการผสมเทียม พ่อและแม่พันธุ์ปลาจะถูกกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ และมีการสร้างสเตอรอยด์ฮอร์โมน โดยการฉีดฮอร์โมนในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ ฮอร์โมน GTH ที่สกัดจากปลาไน (carp pituitary extract) ซึ่งอาจจะให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร (Drori และคณะ, 1994) หรือฮอร์โมน GnRHa (GnRH agonists) ที่กระตุ้นให้มีการหลั่ง GTH (Zohar and Mylonas, 2001) ร่วมกับ สารดอมเพอริโดน (domperidone) จากผลการศึกษาของ Heyrati และคณะ (2007) พบว่า การใช้ GnRHa จะให้ประสิทธิภาพในการวางไข่ของแม่ปลาดีกว่าการใช้ฮอร์โมน GTH ที่สกัดจากปลาไน นอกจากนี้ในปลา grouper เพศเมียที่ถูกเลี้ยงในบ่อคอนกรีตจะมีเพียงการสะสมของสาร vitellogenin แต่ไม่พบการเจริญของเซลสืบพันธุ์ระยะสุดท้าย การตกไข่ และการวางไข่ จนกระทั่งมีการฉีด GnRHa (Hassin และคณะ, 1997)

Gonadotropin releasing hormone (GnRH=LHRH) เป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งหมด โดยการกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมน Gonadotropin จากต่อมพิทูอิทารี (Pituitary gland) (Millar, 2003) GnRH จะเป็นเปปไทด์ (peptide) ที่มีลักษณะที่บางส่วนจะเหมือนกัน (conserved peptide) และบางส่วนที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด (Gopinath และคณะ, 2004) รูปแบบของ GnRH ทั้งหมดที่พบ จะมี 16 ชนิด จะพบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง 14 ชนิด และ

โปรโตคอร์เดท (protochordate) 2 ชนิด (Samoza และคณะ, 2002) ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลัง จะพบว่า ปลากระดูกแข็งจะเป็นตัวแทนของกลุ่มที่มีความหลากหลายของ GnRH ที่มากที่สุด รูปแบบที่พบ ได้แก่ mammalian, chicken, catfish, pejerey, seabream, salmon, herring, medaka และ whitefish GnRH (Lethimonier และคณะ, 2004) โดยบางชนิดอาจพบได้ 2 หรือ 3 ชนิด (Zmora และคณะ, 2002) ชนิดปลาที่พบได้ 2 ชนิด ได้แก่ goldfish (*Carassius auratus*) (Klausen และคณะ, 2001) ชนิดปลาที่พบได้ 3 ชนิด ได้แก่ tilapia (*Oreochromis mossambicus*), sockeye (*Oncorhynchus nerka*), turbot (*Scophthalmus maximus*) และ barfin flounder (*Verasper moseri*) (Parhar et al., 1996; Andersson และคณะ, 2001; Amano และคณะ, 2002)

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนของ GnRH (Dubois และคณะ, 2002)

GnRH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Mammalian	pGlu	His	Trp	Ser	**Tyr**	Gly	**Leu**	**Arg**	Pro	Gly-NH_2	Baba และคณะ, 1971
Chicken II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH_2	Miyamoto และคณะ, 1984
Rana	pGlu	His	Trp	Ser	**Tyr**	Gly	**Leu**	**Trp**	Pro	Gly-NH_2	Yoo และคณะ., 2000
Catfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH_2	Bogerd และคณะ, 1994
Salmon	pGlu	His	Trp	Ser	**Tyr**	Gly	Trp	**Leu**	Pro	Gly-NH_2	Sherwood และคณะ, 1986
Herring	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	**Leu**	**Ser**	Pro	Gly-NH_2	Carosfeld และคณะ, 2000
Medaka	pGlu	His	Trp	Ser	**Phe**	Gly	**Leu**	**Ser**	Pro	Gly-NH_2	Okubo และคณะ, 2000
Seabream	pGlu	His	Trp	Ser	**Tyr**	Gly	**Leu**	**Ser**	Pro	Gly-NH_2	Powell และคณะ, 1994
Dogfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	**Leu**	Pro	Gly-NH_2	Lovejoy และคณะ, 1992
Lamprey I	pGlu	His	**Tyr**	Ser	**Leu**	**Glu**	Trp	**Lys**	Pro	Gly-NH_2	Sower และคณะ, 1993
Lamprey III	pGlu	His	Trp	Ser	His	**Asp**	Trp	**Lys**	Pro	Gly-NH_2	Sower และคณะ, 1993
Tunicate I	pGlu	His	Trp	Ser	**Asp**	Tyr	**Phe**	**Lys**	Pro	Gly-NH_2	Di Fiore และคณะ, 2000
Tunicate II	pGlu	His	Trp	Ser	**Leu**	**Cys**	**His**	**Ala**	Pro	Gly-NH_2	Di Fiore และคณะ, 2000

โครงสร้างของ GnRH ประกอบด้วย 1) signal peptide ที่ N-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 23 ตัว 2) GnRH decapeptide จะเป็นบริเวณ bioactive peptide ที่จะถูกต่อด้วย cleavage site (Gly-Lys-Arg) และ 3) GnRH associated peptide (GAP) ที่ C-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 60 ตัว (Zmora และคณะ, 2002) บริเวณ amide-donating site และ processing site ของ GnRH จัดเป็น conserved peptide (Bogerd และคณะ, 1994) ความหลากหลายของ GnRH แต่ละรูปแบบ จะมีโครงสร้างพื้นฐานที่เหมือนกัน คือจะประกอบด้วย intron 3 ตำแหน่ง และ exon 4 ตำแหน่ง โดยที่ exon แรกจะเป็นบริเวณ 5'-UTR region exon ที่ 2 เป็น signal peptide (GnRH peptide) cleavage site และ N-terminal ของ GAP และ exon สุดท้าย จะเป็น C-terminus ของ GAP และ UTR region (Suzuki และคณะ, 2000)

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

-นำพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดอุบลราชธานีมาทำการเพาะพันธุ์ จำนวน 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 ที่ได้ผสมยาปฏิชีวนะปริมาตร 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	

การวิเคราะห์ข้อมูล

1.น้ำหนัก ความยาว และ ดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาดุกอุยในรอบปี

น้ำหนัก ความยาว และ ดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาดุกอุยในรอบปี ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี one-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 และถูกนำมาจัดคลัสเตอร์ (cluster) ด้วยโปรแกรม R-package จากนั้น ความแตกต่างของข้อมูลในรอบปีจะถูกวิเคราะห์ด้วย Tukey's multiple range test

2.ความสัมพันธ์ของน้ำหนัก และความยาว กับ ดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาดุกอุยในรอบปี

ความสัมพันธ์ระหว่าง น้ำหนัก และความยาว กับ ดัชนีความสมบูรณ์เพศ จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0

3.ความสัมพันธ์ของยีน *CH-GnRH* ของปลาดุกอุยกับปลาชนิดอื่น

ลำดับเบสของยีน *CH-GnRH* ของปลาดุกอุย จะถูกนำมาทำแผนผังทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA 3.0 เพื่อเทียบกับลำดับเบสของปลาชนิดอื่น โดยอ้างอิงจาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov

4.การแสดงออกของยีน *CH-GnRH* ในเนื้อเยื่อของปลาดุกอุย

การแสดงออกของยีน *CH-GnRH* ในเนื้อเยื่อสมอง ต่อมใต้สมอง และ อวัยวะสืบพันธุ์ในรอบปี จะทำการเทียบกับยีน *beta actin* (house keeping gene)