

อังคนาลักษณ์ แจ่มอนันต์ 2553: การศึกษาโครงสร้างทางอนุวิทยาของ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริระภูมิ, Ph.D. 178 หน้า

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ (Full-length) ของ Complementary DNAs (cDNAs) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ Apoptosis (Program cell death) ในระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ Caspase-3 (Casp3-TL) และ Granzyme (Granz-TL) ได้ถูกโคลนโดยการสืบค้นและการใช้เทคนิค 5' Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) PCR พบว่า Full-length ของ cDNA ของยีน Casp3-TL มีขนาด 2,612 bp ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (Untranslated region; UTR) ทางด้านปลาย 5' และ 3' เป็น 79 และ 1,684 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (Open reading frame: ORF) มีความยาวเท่ากับ 846 bp คิดเป็นสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนความยาว 282 Residues เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของโปรตีนพบว่า Casp3-TL ของปลานิล ประกอบด้วย Prodomain, Large และ Small subunit ซึ่งไม่พบว่ามีส่วนของ Hydrophobic leader sequence อยู่เลย ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ขณะที่ Full-length ของ cDNA ของยีน Granz-TL มีขนาด 1,412 bp ซึ่งประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 5' และ 3' UTR เป็น 125 และ 519 bp ตามลำดับ และมี ORF ความยาว 765 bp คิดเป็นกรดอะมิโนความยาว 255 Residues เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของ Mature โปรตีนพบว่า Granz-TL ของปลานิล ประกอบด้วยบริเวณ Active site 3 ตำแหน่ง (His₆₇-Asp₁₁₀-Ser₂₀₈) ซึ่งเป็นลักษณะเอกลักษณ์ของยีนในกลุ่ม Serine protease ที่เรียกว่า Catalytic triads การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ Phylogenetic tree พบว่า Granz-TL ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีน Granzyme A/K ของปลาและ Granzyme A และ K ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอย่างชัดเจน ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าในปลาปกติ ยีน Casp3-TL มีการแสดงเบาบางในทุก ๆ อวัยวะ ขณะที่ ยีน Granz-TL มีการแสดงออกมากที่สุดในเม็ดเลือดขาวในเลือด (Peripheral blood leukocytes: PBLs) และมีการแสดงออกเบาบางในไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลังเท่านั้น และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิด ในปลานิลที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 3 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Casp3-TL ไม่มีความแตกต่างกับปลาปกติ ขณะที่ ยีน Granz-TL มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในสมอง ไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลัง ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษากการแสดงออกโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ยังพบว่า ปลานิลที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร มีการแสดงออกของยีน Casp3-TL ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลาตั้งแต่ 1 จนถึง 96 ชั่วโมง ($P > 0.05$) ซึ่งต่างจากยีน Granz-TL ที่พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียมีการแสดงออกของยีนชนิดนี้เป็น 11 และ 3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบใน PBLs ของปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ Concanavalin A (*In vitro*) พบว่าการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาที่ถูกกระตุ้นด้วย *A. hydrophila* จะถูกยับยั้งในชั่วโมงที่ 48 ขณะที่กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Concanavalin A มีการแสดงออกลดลงเช่นเดียวกัน ในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ตามลำดับ ขณะที่ ยีน Granz-TL ใน PBLs ของปลาทุกกลุ่มมีแนวโน้มของการแสดงออกเพิ่มขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ตามลำดับ แต่ก็ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นกับกลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลาของการทดลองแต่อย่างใด ($P > 0.05$)