



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาโครงสร้างทางอนุวิทยาของ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression Analyses of Caspase-3 and Granzyme Genes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

นามผู้วิจัย นางสาวอังคณาลักษณ์ แจ่มอนันต์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาโครงสร้างทางอนุวิทยาของ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน
Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression Analyses of
Caspase-3 and Granzyme Genes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

โดย

นางสาวอังคณาลักษณ์ แจ่มอนันต์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ (Full-length) ของ Complementary DNAs (cDNAs) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ Apoptosis (Program cell death) ในระบบภูมิคุ้มกันของปลาไนล์ 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 ของปลาไนล์ 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 ของปลาไนล์ 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 มีการแสดงออกมากที่สุดไตในเม็ดเลือดขาวในเลือด (Peripheral blood leukocytes: PBLs) และมีการแสดงออกเบาบางในไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลังเท่านั้น และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิด ในปลาไนล์ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 3 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Casp3-TL ไม่มีความแตกต่างกับปลาปกติ ขณะที่ ยีน Granz-TL มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในสมอง ไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลัง ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษากการแสดงออกโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ยังพบว่า ปลาไนล์ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *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 ($P > 0.05$)

Angkanalak Janganan 2010: Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression Analyses of Caspase-3 and Granzyme Genes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoom, Ph.D. 178 pages.

Two full lengths of complementary DNAs (cDNAs) involved in program cell death (apoptosis) (caspase-3 and granzyme genes) of Nile tilapia immune system were discovered by searching in a Nile tilapia cDNA library and 5' Rapid Amplification cDNA Ends techniques. The full-length of a cDNA encoded for Nile tilapia caspase-3 (Casp3-TL) was 2,612 bp containing 5' and 3' untranslated region of 79 and 1,684 bp respectively. Open reading frame (ORF) of this cDNA was identified to be 846 bp or 282 amino acid residues. Structural analysis of Casp-TL revealed that this protein contained prodomain, large subunit and small subunit without a putative hydrophobic leader sequence. Important motifs indicating the caspase-3 characteristics which were found in caspase-3 genes of other organisms were well conserved. Besides, the full length of Nile tilapia granzyme cDNA (Granz-TL) was also cloned and characterized. The Granz-TL consisted of 1,412 bp which donated to 125 and 519 bp of 5' and 3' UTR. The ORF of Granz-TL was 765 bp long and equal to 255 amino acids. Mature protein of Granz-TL was identified to possess 3 different active sites or catalytic tracts (His_{67} - Asp_{110} - Ser_{208}) of serine protease signature motifs. Phylogenetic and multiple sequence analyses indicated that Granz-TL was placed at the same group as granzyme A/K of fish and granzyme A and granzyme K of higher vertebrates. Expression analysis by RT-PCR exhibited a very low expression of Casp3-TL transcripts in every determined tissue of a normally experimental fish. On the other words, the highest expression level of Granz-TL was observed in peripheral blood leukocytes (PBLs), while mild expression levels were shown in head kidney, spleen and trunk kidney. No changes in expression levels of Casp3-TL mRNAs were determined in experimental fish injected with viable *Streptococcus agalactiae*. However, highly up-regulated transcripts of Granz-TL mRNA were clearly found in brain, head kidney, spleen and trunk kidney of *S. agalactiae* stimulated fish. Additionally, expression analysis by quantitative real-time RT-PCR also indicated that fish intraperitoneally injected with *S. agalactiae* 1×10^7 and 1×10^9 CFU/ml were not significantly changed in Casp3-TL mRNAs, but Granz-TL transcriptional levels were obviously up-regulated with 11- and 3- fold changes at hour 24 compared to control *S. agalactiae* uninjected fish ($P < 0.05$). *In vitro* experiment was also carried out, PBLs of Nile tilapia were separately incubated with two different stimuli, *Aeromonas hydrophila* and concanavalin A. Suppressed expression of Casp3-TL was recorded at hour 48 in PBLs exposed to viable *A. hydrophila* and down-regulated was also determined in concanavalin A exposed PBLs at 48 and 72 hours after incubating. Unexpectedly, control PBLs, PBLs together incubated with *A. hydrophila* and concanavalin A were simultaneously exhibited high up-regulated expression of Granz-TL at 48 and 72 hours of experimental period and no significant differences of fold changes were evaluated at every time of quantitative real-time PCR detection ($P > 0.05$).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีชน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่
กรุณาให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัยตลอดจนการแก้ไขตรวจทาน
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุริยัน ชาญกิจจงกิจ อาจารย์ประธานการ
สอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย น. สพ. ดร. ประพฤติธิ์ ปิยะวิริยะกุล อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการ
สอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยใน
การสอบประมวลความรู้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ ณ นคร เป็นอย่างสูงที่เอื้อเฟื้อ ห้อง
ปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ตลอดจนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำวิจัยเพื่อ
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ
ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน ๆ มินกร 52 ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ
และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อวิสันต์ คุณแม่สุเมตตา เจ้จ๋อนันต์ และพี่น้องรวมทั้ง
ทุกคนในครอบครัว ที่คอยให้ความรัก กำลังใจและให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจน
สำเร็จลุล่วงด้วยดีตลอดมา

อังคนาลักษณ์ เจ้จ๋อนันต์

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	38
อุปกรณ์	38
วิธีการ	43
ผลและวิจารณ์	66
ผล	66
วิจารณ์	134
สรุปและข้อเสนอแนะ	153
สรุป	153
ข้อเสนอแนะ	154
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	155
ภาคผนวก	173
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	178

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	42
2	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีค่า <i>E-value</i> สูงสุด 5 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม Blast X	72
3	การเปรียบเทียบโครงสร้างที่เป็น Catalytic domain และบริเวณกรดอะมิโนของตำแหน่งตัด (Active site) ของกลุ่ม Caspase family และยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) กับยีน Caspase-3 ของปลาชนิดต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม PROSITE predictions	74
4	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีค่า <i>E-value</i> สูงสุด 5 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม Blast X	81
5	การเปรียบเทียบโครงสร้างที่เป็น Catalytic domain และบริเวณกรดอะมิโนของตำแหน่งตัด (Active site) ของกลุ่ม Serine protease ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) กับยีน Granzyme ในปลาชนิดต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม PROSITE predictions	82
6	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ	99
7	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ	112

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในการตายของเซลล์แบบ Apoptosis	16
2	ปัจจัยต่าง ๆ ที่เป็นตัวกระตุ้นและทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis)	18
3	การส่งสัญญาณของสารเคมีจากภายในเซลล์ (Intracellular signals) ไปยังไมโทคอนเดรียที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis จากการหลั่งของ Cytochrome C	22
4	โครงสร้างจำลองของ Caspase-3 ในรูป Proenzyme ที่ประกอบด้วย Prodomain ที่อยู่ทางด้านปลาย N-terminal และมีส่วนของ Large subunit ขนาดประมาณ 20 kDa ส่วนของ Small subunit ประมาณ 10 kDa ตำแหน่งที่ถูกตัดบริเวณจำเพาะเจาะจงในตำแหน่ง Arginine-9 (D9) หรือ Arginine-28 (D28)	26
5	กลไกการเกิด Apoptosis โดยอาศัย Caspase-3 เป็นตัวรับตัวสุดท้ายใน Cascade ของกลุ่มโปรตีน Caspases	27
6	การจัดกลุ่มของยีน Granzymes ตามโครงสร้างของ Catalytic active site	31
7	กลไกการทำงานของ Granzyme A และ B ในการเกิด Apoptosis ภายในเซลล์ โดยผ่านทาง Cytotoxic T lymphocytes ในกระบวนการ Cell mediated immune responses	34
8	บทบาทของ Granzyme B ในกลไก Apoptosis	35
9	แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในตำแหน่ง Polylinker ของ pGEM-T Easy vector	48
10	ขนาดของชิ้น Insert ของ cDNA โคลน HK 115 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> I และ <i>Eco</i> RI บน Agarose gel โดยที่ M คือ 100 bp DNA Ladder	67
11	แบบแผนการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL)	68
12	ขนาดของชิ้น Insert ของ cDNA โคลน HK 28 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> I และ <i>Eco</i> RI บน Agarose gel โดยที่ M คือ 100 bp DNA Ladder	69
13	แบบแผนการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme (Granz-TL) ในปลานิล	70

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ของปลานิล (Casp3-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานไว้ใน GenBank database โดยใช้โปรแกรม Blast X	71
15	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (อักษรแถวบน) และลำดับกรดอะมิโน (อักษรแถวล่าง) ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL)	76
16	การหาตำแหน่งของ Hydrophobic leader sequence ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL)	77
17	การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL)	79
18	การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ของปลานิล (Granz-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานไว้ใน GenBank database โดยใช้โปรแกรม Blast X	84
19	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (อักษรแถวบน) และลำดับกรดอะมิโน (อักษรแถวล่าง) ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL)	85
20	การหาตำแหน่งของ Hydrophobic leader sequence ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL)	86
21	การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL)	87
22	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลานิลกับลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ	93
23	การจัดกลุ่มของยีน Caspases ในกลุ่มของปลา แบ่งตามลักษณะของ Domain บริเวณ Prodomain	97
24	โครงสร้างโมเลกุลอย่างง่ายของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Nile tilapia)	98
25	ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการระหว่างลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลานิลกับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้ใน Genbank database	103

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ของปลานิลกับลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ	108
27 ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการระหว่างลำดับกรดอะมิโน (Mature protein) ของยีน Granzyme ในปลานิล กับยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้ใน GenBank database	116
28 การแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิล	118
29 การแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิล	119
30 Amplification plot ในช่วง Exponential phase ของปฏิกิริยาจากการตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (SYBR Green I Dye) ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (Copy number เท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 และ 10^5) ของยีน Caspase-3 ในปลานิล	122
31 Amplification plot ในช่วง Exponential phase ของปฏิกิริยาจากการตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (SYBR Green I Dye) ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (Copy number เท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 และ 10^5) ของยีน Granzyme ในปลานิล	122
32 Amplification plot ในช่วง Exponential phase ของปฏิกิริยาจากการตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (SYBR Green I Dye) ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (Copy number เท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 และ 10^5) ของยีน β -actin ในปลานิล	123
33 Dissociation curve แสดงค่า Melting temperature ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของยีน Caspase-3 ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR	123
34 Dissociation curve แสดงค่า Melting temperature ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของยีน Granzyme ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR	124

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
35	Dissociation curve แสดงค่า Melting temperature ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของ β -actin ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR	124
36	Standard curve ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR	125
37	Standard curve ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR	125
38	Standard curve ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน β -actin ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR	126
39	การแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิลภายหลังจากการติดเชื้อด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร	127
40	การแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิลภายหลังจากการติดเชื้อด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร	129
41	การแสดงออกของยีน Caspase-3 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระเพาะเลือด ในหลอดทดลอง ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>A. hydrophila</i> และ Concanavalin A	131
42	การแสดงออกของยีน Granzyme ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระเพาะเลือด ในหลอดทดลอง ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ <i>A. hydrophila</i> และ Concanavalin A	133
43	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-TL กับลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme-1 ของปลานิล	141

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A ₅₆₀	=	Absorbance at 560 nanometre
Ala (A)	=	Alanine
Arg (R)	=	Arginine
Asn (N)	=	Asparagine
Asp (D)	=	Aspartic acid
bp	=	Base pair
°C	=	Degree celcius
cDNA	=	Complementary DNA
Cys (C)	=	Cysteine
CFU	=	Colony Forming Unit
Da	=	Dalton
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxynucleotide tri-phosphate
Glu (E)	=	Glutamic acid
Gln (Q)	=	Glutamine
Gly (G)	=	Glycine
His (H)	=	Histidine
Ile (I)	=	Isoleucine
Leu (L)	=	Leucine
Lys (K)	=	Lysine
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
Met (M)	=	Methionine
ml	=	Millilitre
O.D.	=	Optical density
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
Phe (F)	=	Phenylalanine
Pro (P)	=	Proline
RNA	=	Ribonucleic acid

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

Ser (S)	=	Serine
Thr (T)	=	Threonine
Trp (W)	=	Tryptophan
Tyr (Y)	=	Tyrosine
μM	=	Micromolar
μg	=	Microgram
μl	=	Microlitre
Val (V)	=	Valine
Xaa (X)	=	Unspecified / unknown amino acid

Molecular Characterization of Complementary DNAs (cDNAs) and Expression Analyses of Caspase-3 and Granzyme Genes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

ปลานิล เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงและบริโภคกันมากในประเทศไทย และพบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 เป็นต้นมา ผลผลิตปลานิลได้ครองความเป็นอันดับหนึ่งมาโดยตลอด เมื่อเปรียบเทียบกับ ปลาน้ำจืดชนิดอื่น ๆ (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2543) ปัจจุบันพบว่าปลาชนิดนี้นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายไปทั่วประเทศ โดยเฉพาะในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากมีเขื่อนและอ่างเก็บน้ำหรือแม่น้ำลำคลองเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงทั้งในกระชังและในบ่อดิน (ศิริ, 2542) อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2544 มีการแพร่ระบาดของโรคในปลานิลบริเวณพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือรวมถึงพื้นที่การเลี้ยงอื่น ๆ ทั่วทั้งประเทศ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (นิลกุล และคณะ, 2545) โดยลักษณะอาการภายนอกที่สามารถพบได้ คือปลาเสียการทรงตัว ว่ายน้ำควงส่ว้นหรือลอยนิ่งที่ผิวน้ำ ลำตัวมีสีคล้ำ ตาขุ่นและโปนข้างเดียวหรือสองข้าง มีการตกเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือกและโคนครีบ รวมทั้งมีแผลบริเวณลำตัว (ชาญณรงค์, 2550) ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวเป็นอาการของโรค Streptococcosis ซึ่งทราบภายหลังว่าเกิดจากแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Streptococcus agalactiae* เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าว เกษตรกรส่วนใหญ่ได้หันมาใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งนอกจากจะใช้ไม่ได้ผลแล้ว ยังได้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคที่ได้รับยาที่ตกค้างในตัวปลาอีกด้วย ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถลดผลกระทบที่เกิดขึ้นดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วในสัตว์หลายชนิด รวมทั้งปลาว่าการใช้วัคซีนสามารถป้องกันการเกิดโรคได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในสัตว์น้ำรวมทั้งปลาน้ำจืด การพัฒนาวัคซีนถือได้ว่ามีความก้าวหน้าน้อยกว่าสัตว์ในกลุ่มอื่นมาก สาเหตุที่เป็นอุปสรรคสำคัญประการหนึ่งนั่นก็คือการขาดความรู้ความเข้าใจในกลไกและระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานั้นเอง

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางอนุวิทยาของ Complementary DNAs (cDNAs) และการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิลหลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อโรคหรือสารกระตุ้นอื่น ๆ โดยยีนทั้งสองชนิดนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยผ่านเซลล์ (Cell-mediated immunity) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะที่ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิด เป็นตัวทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค โดยเฉพาะการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันโดยผ่านสารน้ำหรือโปรตีนในน้ำเลือด (Humoral immunity) ไม่สามารถเข้าทำลายได้ ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จะสามารถทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลานิลเพิ่มมากขึ้น และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาแนวทางป้องกัน ควบคุมและแก้ไขปัญหาของโรคที่เกิดขึ้นกับปลานิลได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการโคลนและศึกษาคุณลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Complementary DNAs (cDNAs) ของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล
2. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล ในสภาวะปกติและภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล ในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) และในหลอดทดลอง (*In vitro*) ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อโรคต่าง ๆ และสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Quantitative real-time PCR

การตรวจเอกสาร

1. ปลานิล

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในครอบครัว Cichlidae มีชื่อเรียกในภาษาอังกฤษว่า Nile tilapia และชื่อวิทยาศาสตร์เรียกว่า *Oreochromis niloticus* ซึ่งชื่อเดิมคือ *Tilapia nilotica* โดยสามารถจัดจำแนกลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลานิลได้ดังนี้

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Perciformes
Family	Cichlidae
Genus	<i>Oreochromis</i>
Species	<i>niloticus</i> (Nelson, 1994)

1.1 ลักษณะทั่วไป การแพร่กระจายและพฤติกรรมของปลานิล

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ใน Order Perciformes มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา และลุ่มน้ำจอร์แดน ปัจจุบันพบการแพร่กระจายทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ในประเทศ ชูแดน ยูกันดา แทนแกนยีกาและภาคพื้นเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น ไทย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์และอิสราเอล (วรพงษ์, 2545) ซึ่งปลาชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่าย เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเป็นอย่างดี จึงได้รับความนิยมและเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย

ปลานิลถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรก โดยเจ้าชายอาากิฮิโตะ เมื่อครั้งยังดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ซึ่งทรงจัดส่งเข้ามาทูตเกล้าฯ ๑ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 ขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 9 เซนติเมตร จำนวน 50 ตัว ซึ่งพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ในสวนจิตรลดา และทรงโปรดเกล้าให้กรมประมงนำไปเพาะขยายพันธุ์และเผยแพร่ให้แก่เกษตรกรทั่วประเทศไทยได้เลี้ยงกันมาจนถึงปัจจุบัน (ศิลปพร, 2544)

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) มีลักษณะเด่นคือ ลำตัวสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะทั่วไปจะมีรูปร่างคล้ายปลาหมอเทศ แต่แตกต่างกันที่ปลานิลมีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว มีลายสีดำและจุดสีขาวสลับกันไปบริเวณครีบหลัง ครีบกันตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม มีลายดำพาดขวางตามลำตัว (มารุต, 2539) ปลานิลจะสมบูรณ์พันธุ์เมื่อมีอายุประมาณ 4 เดือนโดยมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 11 เซนติเมตร ซึ่งปลาชนิดนี้จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูง เลี้ยงง่าย แข็งแรง และอดทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปีใช้เวลา 2-3 เดือนต่อครั้ง แต่ถ้าอาหารเพียงพอและเหมาะสม ภายในระยะเวลาเพียง 1 ปี จะผสมพันธุ์ได้ถึง 6 ครั้ง ปลาชนิดนี้ สามารถกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ (Omnivorous) หลากหลายชนิด เช่น พวกไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลง เป็นต้น (เจษฎา, 2540) ปลานิลสามารถอาศัยอยู่ได้ในช่วงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้าง ซึ่งอยู่ระหว่าง 11-42 องศาเซลเซียส และในช่วงของ pH ระหว่าง 4-11 แต่ช่วงอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่สุดจะอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส และ 7-10 ตามลำดับ โดยปลานิลสามารถทนต่อสภาวะการละลายของออกซิเจนต่ำได้ถึง 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาไม่นานนัก แต่ถ้าปริมาณการละลายของออกซิเจนต่ำกว่า 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโตของปลาได้ (วรพงษ์, 2545)

1.2 โรคที่พบในปลานิล

ปลานิลเป็นปลาที่ตลาดทั้งในและต่างประเทศมีความต้องการสูงขึ้นตามแนวโน้มของจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่จึงเร่งเพิ่มกำลังการผลิตต่อหน่วยพื้นที่ให้สูงขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงระบบการเลี้ยงเป็นระบบหนาแน่นคือ มีการปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นสูง ทั้งการเลี้ยงในบ่อดินและเลี้ยงในกระชัง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการอยู่อาศัย ทำให้ปลาเกิดความเครียดและอ่อนแอ จึงส่งผลทำให้เกิดโรคได้ง่ายขึ้นตามไปด้วย (นนทวิทย์, 2547) โดยโรคที่สำคัญได้แก่

1.2.1 โรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตภายนอก

ปรสิตภายนอกที่ทำอันตรายต่อปลานิลมีหลายชนิด โดยปรสิตจะเข้าเกาะในบริเวณเหงือก ผิวหนังและครีบ ทำให้ปลาเกิดความระคายเคืองเกิดบาดแผล ส่วนพวกที่เกาะบริเวณเหงือกจะทำให้มีผลต่อระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซ ทำให้ปลาเกิดปัญหาขาดออกซิเจนได้ โดยมีชนิดของปรสิตภายนอก ดังนี้คือ

1.2.1.1 โปรโตซัว (Protozoa) พยาธิในกลุ่มนี้จะสร้างความเสียหายในลูกปลามากกว่าปลาขนาดใหญ่ ชนิดของโปรโตซัวที่พบบ่อย ได้แก่ *Trichodina* sp., *Ichthyophthirius multifiliis*, *Epistylis* sp., *Scyphidia* sp., *Apiosoma* sp. และ *Ichtyobodo* sp. เป็นต้น โดยโปรโตซัวกลุ่มนี้ สามารถสร้างความรำคาญให้ปลา เนื่องจากการเกิดกร่อนของผิวหนังหรือเนื้อเยื่อ ซึ่งจะพบได้ในบริเวณที่ปรสิตเหล่านี้ยึดเกาะ ปลาจึงแสดงอาการว่ายน้ำโดยถูลำตัวกับข้างบ่อหรือวัตถุในน้ำ ทำให้ผิวหนังเป็นแผลและถลอก ส่งผลให้เชื้อโรคชนิดอื่น เช่น เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย

1.2.1.2 ปลิงใส (Monogenea) เป็นปรสิตภายนอก ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *Gyrodactylus* sp. และ *Dactylogyrus* sp. ปรสิตกลุ่มนี้จะมีตั้งแต่ขนาดเล็กที่มองเห็นด้วยตาเปล่าไม่เห็น จนถึงขนาดใหญ่มากกว่า 3 มิลลิเมตร โดยอวัยวะที่พบปรสิตกลุ่มนี้มากที่สุดคือ เหงือก เนื่องจากเป็นบริเวณที่เหมาะสมและเป็นแหล่งแลกเปลี่ยนของออกซิเจนของปลา ซึ่งมีความสำคัญในการดำรงชีพของปรสิตเช่นกัน (Lindenström *et al.*, 2004) จากนั้นจึงดูดกินเนื้อเยื่อและของเหลวจากเซลล์ในตัวปลา ทำให้เกิดอันตรายต่อเนื่องบริเวณที่เกาะ ส่งผลต่อเนื่องให้จุลินทรีย์อื่น ๆ สามารถเข้าไปในร่างกายทางบริเวณที่เกิดบาดแผลได้เช่นกัน

1.2.1.3 ครัสเตเชียน (Crustacean) ได้แก่ *Argulus* sp., *Ergasilus* sp., *Lernaea* sp. และ *Lamproglana* sp. ปรสิตในกลุ่มนี้ จะใช้ส่วนของอวัยวะที่มีปลายแหลมฝังเข้าไปในเนื้อปลา เพื่อช่วยในการยึดเกาะและหรือกินเซลล์หรือเลือดของปลาเป็นอาหาร ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายต่อปลาอย่างรุนแรง ก่อให้เกิดบาดแผลขนาดใหญ่และสูญเสียเลือดได้ ถ้ามีในปริมาณมากจะทำให้ปลาตายอย่างรวดเร็ว ปรสิตกลุ่มนี้มักพบในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังเป็นส่วนใหญ่ (คณิต และอนุชา, 2551)

1.2.2 โรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตภายใน

ปรสิตกลุ่มนี้มักพบอยู่ในทางเดินอาหารและไม่ทำอันตรายต่อปลามากนัก ซึ่งได้แก่

1.2.2.1 โปรโตซัว (Protozoa) ชนิดที่พบในลำไส้ ได้แก่ *Eimeria* sp. ปรสิตชนิดนี้ ถ้ามีเป็นจำนวนมาก จะทำให้ปลาพองได้ ส่วนอีกชนิดพบในระบบหมุนเวียนโลหิต ได้แก่ *Trypanosoma* sp. ปรสิตชนิดนี้แม้จะตรวจพบในระบบเลือดของปลานิลแต่ยังไม่มีรายงานแน่ชัดว่าทำให้ปลานิลป่วยหรือตายได้

1.2.2.2 เมตาซัว (Metazoa) ได้แก่กลุ่มของ Digene, Trematodes, Cestodes, Nematodes และ Acanthocephalan โดยลักษณะการก่อโรคของปรสิตเหล่านี้ พบได้ในอวัยวะภายใน เช่น ลำไส้ ทางเดินอาหาร กระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี กระเพาะปัสสาวะ เลือด ตับ เป็นต้น และมีบางชนิดที่ฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดเป็นตุ่มหรือก้อน (Cyst) ที่บุคโปนขึ้นทั่วลำตัว ถ้าพบในปริมาณไม่มากนักและเกิดในปลาตัวเต็มวัย จะมีผลกระทบในระยะยาว เช่น ทำให้ปลาพอมโตช้า ทำให้ปลามีน้ำหนักน้อย เนื่องจากปรสิตเหล่านี้จะไปขัดขวางระบบการดูดซึมสารอาหาร ถ้ามีปรสิตชนิดนี้ในปริมาณมากและอาศัยอยู่บริเวณกล้ามเนื้อหรือผิวหนัง จะทำให้เกิดอาการระคายเคือง (จิตพร, 2542)

1.2.3 โรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย

1.2.3.1 โรคตัวดำ ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Flexibacter columnaris* พบในปลานิลที่เลี้ยงน้ำจืด ส่วนปลานิลที่เลี้ยงน้ำกร่อยจะเป็นชนิด *F. maritimus* โรคนี้มักพบในช่วงที่อากาศมีการเปลี่ยนแปลงกะทันหัน เช่น ในช่วงอากาศเย็น ในช่วงฝนตกหนักและหลังจากการขนย้ายปลา ปลาที่พบว่ามีอาการตัวดำมักตายในเวลาอันรวดเร็ว ถ้าไม่รีบทำการรักษาให้ทันท่วงที อัตราการตายอาจสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.2.3.2 โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* เป็นเชื้อก่อโรคที่เรียกว่า Motile aeromonas disease เชื้อ *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้นตรง เคลื่อนที่ได้โดยใช้ Flagella เจริญได้ทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน การติดเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นการติดเชื้อในระบบภายใน โดยที่เชื้อจะเข้าสู่ปลาทางปาก ทางผิวหนังหรือเหงือกที่เกิดบาดแผล ในสภาพปกติเชื้อจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่เมื่อปลาอ่อนแอเชื้อจะเพิ่มจำนวนในร่างกายของปลาและบริเวณที่เข้าไปต่อจากนั้นเชื้อก็แพร่เข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งก่อให้เกิดอาการของโรคดังนี้คือ ปลาจะมีบาดแผลตามลำตัว ครีบกร่อน ตกเลือดหรือมีแผลหลุม ท้องบวมมีเลือดปนน้ำเหลืองในช่องท้อง ตับไตและม้ามโตผิดปกติ เป็นต้น (ชาญณรงค์, 2550)

1.2.3.3 โรคสเตรปโตคอคโคซิส (Streptococcosis) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วโลกในปลาหลายชนิดได้แก่ ปลาเทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*), ปลาคาร์ฟ (*Cyprinus carpio*) และปลานิลลูกผสม (*O. aureus* x *O. niloticus*) โดยเฉพาะในระบบการเลี้ยงปลาแบบหนาแน่น ซึ่งโรคนี้ทำให้เกิดความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาของโลกคิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่า 150 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกาต่อปี

เชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ก่อโรคในปลา มีอยู่หลายชนิด โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกัน กลุ่มแรกคือ Cool-water streptococcosis คือเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ก่อโรคในสภาวะที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ได้แก่เชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum* และ *Carnobacterium piscicola* กลุ่มที่สองคือ Warm-water streptococcosis คือเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ก่อโรคในสภาวะที่น้ำมีอุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ซึ่งได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae* และ *Streptococcus agalactiae* (วิเศษ และคณะ, 2550) การแพร่ระบาดของโรคที่ติดเชื้อมีสาเหตุจากโรคโคโรนาในประเทศไทย พบทั้งการเลี้ยงปลานิลในบ่อดินและในกระชังทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นิลบล และคณะ, 2545) และเช่นเดียวกับ Areechon *et al.* (2005) ได้รายงานการแพร่ระบาดของโรคชนิดนี้ในการเลี้ยงปลานิลแถบภาคกลาง รวมทั้งในเขตพื้นที่ภาคใต้ด้วย (นเรศ และคณะ, 2548)

เชื้อแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคในปลาส่วนใหญ่ มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ ได้แก่ การทำให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์ (β -haemolytic) การทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้บางส่วน (α -haemolytic) และชนิดที่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (γ -haemolytic หรือ Non-haemolytic) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้ปลาตายได้ (นงลักษณ์, 2544) เชื้อในสกุลนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งก่อให้เกิดโรคทั้งแบบเรื้อรังและเฉียบพลัน โดยทำให้เกิดการอักเสบและเกิดบาดแผลตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย (Inflammatory และ Granulomatous lesions) การแพร่กระจายเข้าสู่ตัวปลาเกิดขึ้น โดยการสัมผัสของเสียจากปลาที่ป่วย ซึ่งลักษณะอาการของโรคจะแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา แต่จะมีลักษณะร่วมที่เห็นได้ชัดเจนคือจะว่ายน้ำเชื่องช้า สีตัวเข้มขึ้น ตาโปนตกลูกหรือขาวขุ่น มีการตกเลือดบนแผ่นปิดเหงือกและที่ฐานครีบ พบบาดแผลตามลำตัว แต่ในปลาบางชนิดที่มีความไวต่อเชื้อมาก เช่น ปลาสลิดหิน โดยเฉพาะเมื่อปลาที่ติดเชื้อมีแล้วตาย แพทย์จะไม่พบอาการภายนอกให้เห็น จะมีเพียงบาดแผลที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งส่วนใหญ่จะกลายเป็นแผลเปิดมีขอบนูนและมีสีเข้มรอบ ๆ มักพบบริเวณส่วนบนของลำตัว แผ่นปิดเหงือก รอบปากหรือบริเวณช่องขั้วของเสีย ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* นี้ในระยะเริ่มแรกจะมีการตาโปน และมีเลือดคั่งหรือตกเลือดในตาบริเวณ Retina ซึ่งจะลุกลามจนกระทั่งเป็นแผลเปิดที่กระจกตาในที่สุด และอาจพบเลือดคั่งในเส้นเลือดบริเวณเหงือกและจะพบเซลล์ Macrophage รวมตัวกันอยู่ในบริเวณนี้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อของเหงือก ในลำไส้จะมีเลือดคั่ง เยื่อชั้น Mucosa หลุดออกมาอยู่ภายในช่องว่าง อวัยวะภายในที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดคือ ม้ามและตับ รองลงมาคือหัวใจและไต บริเวณตับของปลาที่ป่วยอาจพบการตายของเซลล์เกิดขึ้น ม้ามโตและมีสีซีด สำหรับปลานิลซึ่งเป็นปลาที่มีความไวต่อ

โรคนี้ จะมีอาการภายนอกที่สังเกตเห็นได้ชัดเจนคือ ตาโปน ท้องบวมน้ำ ซึ่งภายในมีของเหลว รอบช่องขับถ่ายของเสียอีกเสบและบวมแดง ที่บริเวณคอดหางจะบวม ถ้ากดจะนึ่มเหลว เมื่อใช้ มีดกรีดลงไปจะมีหนองสีเหลืองข้นทะลักออกมา อาการบวมจะพบได้ทั่วไปตามลำตัว และเมื่อผ่าดูจะพบหนองภายในกล้ามเนื้อ โดยลักษณะอาการดังกล่าวจะพบมากในปลาขนาดตลาดหรือใกล้ระยะที่กำลังจะจับขาย (นิลบล, 2544)

1.2.4 โรคที่เกิดจากเชื้อราในปลานิล

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคที่พบได้ส่วนใหญ่ ได้แก่ *Aphanomyces* sp. และ *Achlya* sp. ลักษณะอาการที่สำคัญของโรคนี้คือทำให้ปลาเกิดแผลและบริเวณแผลจะมีเส้นสีขาว คล้ายขนขึ้นฟูเป็นกระจุก ปลาป่วยจะกินอาหารน้อยลง ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้มีลักษณะคล้ายราน้ำ อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำทั่วไป เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส โดยคุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อราในกลุ่มนี้คือ สามารถซ่อนไซเข้าไปในกล้ามเนื้อ ทะลุเข้าไปถึงอวัยวะภายในของปลาได้ กลไกการเกิดโรคค่อนข้างสลับซับซ้อน และบางครั้งอาจพบเชื้อโรคชนิดอื่น ๆ เช่น ปรสิต แบคทีเรียและไวรัสร่วมด้วย ส่งผลให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น (กิจการ และคณะ, 2539)

2. ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีจำนวนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ โดยมีความหลากหลายถึง 24,000 ชนิด (วิน, 2548) และยังถูกจัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vertebrate) ขั้นต่ำสุด ที่มีระบบภูมิคุ้มกันที่พัฒนาล้ำคลึงกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) ในหลาย ๆ ส่วน โดยสามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันของปลาออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ ดังนี้คือ

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่เกิด (Innate immunity)

ปลากระดูกแข็งเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ระบบภูมิคุ้มกันแบบ Innate immunity ของสัตว์ในกลุ่มนี้ถือว่ามีความสำคัญต่อความอยู่รอดอย่างมาก เนื่องจากปลาทั้งหลายอาศัยอยู่ในตัวกลางที่เป็นของเหลว ซึ่งเป็นแหล่งแพร่กระจายและเป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อโรคหลากหลายชนิด (Jones, 2001) ดังนั้นการตอบสนองแบบ Innate immunity จะเป็นปราการด่านแรกของการป้องกันที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการ

ตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจงและมีการจดจำได้บ้างบางส่วน (Bols *et al.*, 2001) ซึ่งกลไกที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายในระบบนี้ ได้แก่

2.1.1 กลไกการป้องกันตัวโดยใช้โครงสร้างทางกายภาพ (Physical defenses) ซึ่งได้แก่

2.1.1.1 ผิวหนัง (Skin) ถือเป็นด่านแรกที่ใช้ป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายไม่ให้เข้าตัวปลา ซึ่งโดยทั่วไปแบ่งเป็น 4 ชั้น ได้แก่ Cuticle, Epidermis, Dermis และ Hypodermis โดยชั้น Cuticle จะอยู่นอกสุดมีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นเมือก (Mucus) ที่ถูกขับออกมาจากเซลล์ชนิด Mucus หรือ Goblet cell สำหรับชั้น Epidermis ในปลาบางชนิดจะมีผิวหนังที่ค่อนข้างหนา และแข็งแรงทำให้ยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคและในปลากลุ่ม Catfish จะมีเซลล์ชนิดพิเศษที่เรียกว่า Alarm substance cell ในชั้น Epidermis ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเตือนภัย (Alarm substance) ออกมาเมื่อมีการบุกรุกหรือถูกทำร้ายด้วยศัตรู (Ellis, 2001)

2.1.1.2 เมือก (Mucus) จัดเป็นองค์ประกอบที่อยู่นอกสุดของผิวหนัง ซึ่งสัมผัสกับสภาพแวดล้อมโดยตรง ด้วยคุณสมบัติที่เหนียวและเป็นเมือกลื่น จึงสามารถดักจับเชื้อโรคได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจงและพบว่าปลาสามารถขับเมือกได้ตลอดเวลา ทำให้เชื้อโรคที่ติดกับเมือกหลุดออกไปได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเคลื่อนตัวไปมาของโปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดที่สำคัญบางชนิดซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันระหว่างชั้นผิวหนังของปลาและชั้นเยื่อเมือกอีกด้วย (Ellis, 2001)

2.1.1.3 เกล็ด (Scales) มีต้นกำเนิดอยู่ที่ผิวหนังชั้นใน (Dermis) เป็นสิ่งห่อหุ้มและปกคลุมตัวปลา เนื่องจากลูกปลาเกิดใหม่แรก ๆ จะมีผิวหนังที่เรียบ ต่อมาเกล็ดจะเริ่มพัฒนาจากแผ่นเล็ก ๆ กลม ๆ ไปเป็นเกล็ดที่สมบูรณ์ขึ้นตามอายุ เกล็ดจึงถือเป็นโครงสร้างพิเศษของปลาที่ใช้เพื่อป้องกันอันตรายต่าง ๆ ที่เป็นทั้งของแข็งและเชื้อโรครวมถึงสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆ เพราะมีลักษณะแข็ง ซึ่งทำให้ยากต่อการบุกรุก (Magnadottir, 2006)

2.1.2 กลไกการป้องกันตัวโดยใช้เซลล์ (Cellular defenses)

กลไกนี้ถือเป็นส่วนสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ภายหลังจากที่เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ผ่านกลไกทางกายภาพเข้ามาแล้ว โดยที่เซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบนี้ ได้แก่ Phagocytes ต่าง ๆ เช่น Macrophage และ Polymorphonuclei (PMN) cell ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ Neutrophil cell ของสัตว์ชั้นสูง ซึ่งเซลล์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการกลืน (Engulfment) เชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยกระบวนการกิน Phagocytosis ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้สิ่งแปลกปลอมถูกย่อยสลาย จากกลไกภายในเซลล์ หลังจากทำการย่อยแล้ว เซลล์ก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายออกมานอกเซลล์ (Elimination) อย่างไรก็ตามในสัตว์ชั้นสูงรวมทั้งปลา ยังพบว่าเซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการจดจำการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้อีกด้วยและเซลล์กลุ่มนี้ยังทำหน้าที่ในการเตรียมแอนติเจนสำหรับเซลล์บางกลุ่มเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจง จึงเรียกเซลล์กลุ่มนี้โดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่ม Macrophage ว่า “Antigen presenting (producing) cell (APC)” (Evans *et al.*, 2001)

2.1.3 กลไกการป้องกันตัวโดยผ่านสารน้ำ (Humoral defenses)

นอกจากการตอบสนองโดยใช้เซลล์ในการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงแล้ว ปลายังมีการหลั่งสารโปรตีนที่สำคัญหลายชนิด ออกมาในระบบหมุนเวียนเลือดเช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูง สารโปรตีนดังกล่าวสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้ ได้แก่ กลุ่มแรกทำให้เซลล์แปลกปลอมถูกจับเป็นกลุ่ม และเกิดการตกตะกอนได้ (Agglutinin และ Precipitin) เช่น Lectin like, C-type lectin และ Pentraxins (C-reactive protein; CRP) กลุ่มที่สองจะพบว่ามีความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Lytic enzymes) เช่น Lysozymes, Chitinases และ Cathepsins กลุ่มที่สามทำหน้าที่ในกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือไวรัส (Growth inhibitors) เช่น Transferrin (Iron binding protein), Interferon (IFN) และ Mx protein เป็นต้น และกลุ่มสุดท้ายคือพวก Protease inhibitors ได้แก่ α -2 Macroglobulin ซึ่งมีหน้าที่ครอบคลุมกว้าง ๆ โดยรวมถึง Encapsulation ใน Protease ด้วย (Whyte, 2007) นอกจากนี้ ยังมีสารอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก ถูกสร้างขึ้นในกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน นั่นคือกลุ่มโปรตีนของ Cytokines และ Chemokines ซึ่งถือได้ว่าเป็นตัวควบคุม (Control) และเป็นตัวส่งสัญญาณของ โมเลกุล (Signaling molecules) ในการทำงานร่วมกันระหว่างระบบภูมิคุ้มกันแบบ Innate immunity และระบบภูมิคุ้มกันแบบ Adaptive หรือ Acquired immunity อีกด้วย (Secombes *et al.*, 1999)

2.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับภายหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม

(Adaptive หรือ Acquired immunity)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบนี้ถือว่าการพัฒนาที่ดีที่สุด สามารถพบได้ตั้งแต่ปลากระดูกอ่อนทั้งหลายไปจนถึงมนุษย์ ซึ่งยังไม่ปรากฏพบในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) ในส่วนของแมลงและสัตว์จำพวกกุ้งหรือปู (Pasquier, 2001) ระบบการตอบสนองแบบนี้จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม (Antigen) และการตอบสนองจะมีความรุนแรงและรวดเร็วกว่าการตอบสนองในครั้งแรกโดย Antigen ตัวเดิม ซึ่งเป็นการทำงานที่มีความสามารถในการจดจำและความจำเพาะเจาะจงสูงมาก การตอบสนองในระบบนี้จะอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิด และจะอาศัยโปรตีนบนผิวของเซลล์เป็นสื่อกลางในการติดต่อสื่อสารเพื่อการจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย (Miller and Clem, 1984; Abbas *et al.*, 2000) ระบบการตอบสนองแบบนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ

2.2.1 การตอบสนองโดยผ่านสารน้ำหรือของเหลวในเลือด (Humoral immune response)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocytes) หลายชนิดร่วมกันทำงาน ซึ่งผลของการตอบสนองจะมีการสร้างโปรตีนชนิดที่สำคัญออกมาเรียกว่า “Antibody หรือ Immunoglobulin (Ig)” ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะแบ่ง Ig ออกเป็น 5 ชนิดได้แก่ IgM, IgD, IgG, IgA และ IgE แต่ในปลากระดูกแข็งพบการรายงานการสร้าง Ig เพียงแค่ 2 ชนิดเท่านั้นคือ IgM และ IgD (Warr, 1995) ที่มีลักษณะคล้าย IgM และ IgD ในสัตว์ชั้นสูง นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีรายงาน Ig ชนิดใหม่ที่พบในปลากระดูกแข็งนั่นคือ IgT ที่พบใน Rainbow trout (Hansen *et al.*, 2005) และ IgZ ที่ได้จาก Zebra fish (Danilova *et al.*, 2000) โดยในระบบนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิดที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดนี้ซึ่งได้แก่

2.2.1.1 Antigen presenting cell (APC) ในสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไปเซลล์ในกลุ่มนี้ได้แก่ Monocytes หรือ Macrophages และ Dendritic cell ซึ่งจะทำหน้าที่ในการดักจับและกลืนกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกายด้วยกระบวนการ Phagocytosis (Secombes *et al.*, 1999) แล้วจึงย่อยและตกแต่งโครงสร้างของ Antigen โดยจะเลือกเอาเฉพาะส่วนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดเรียกว่า “Epitope หรือ Antigenic determinant” ไปแสดงไว้ที่ผิวเซลล์โดยอาศัย Surface protein ที่เรียกว่า “Histocompatibility complex (MHC) class II” เพื่อเป็นสื่อกลางให้ T cell

(Helper T cell) เข้ามาจดจำภายหลังซึ่งเมื่อ Helper T cell ตรวจพบ Epitope ของสิ่งแปลกปลอมแล้ว จะปลดปล่อยสารบางอย่างที่เรียกว่า “Cytokine” ออกมาเพื่อกระตุ้นให้กลุ่มของ APC มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและยังกระตุ้นให้ APC มีการตอบสนองได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และบางส่วนจะพัฒนาตัวไปเป็น Memory APC เพื่อการตอบสนองและจดจำ Antigen ตัวเดิมในครั้งต่อไป (Dixon and Stet, 2001)

2.2.1.2 Lymphocytes เซลล์เหล่านี้จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการตอบสนองอย่างจำเพาะเจาะจง ในสัตว์ชั้นสูงสามารถแยกกลุ่มของ Lymphocytes ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

(1) B Lymphocytes หรือ B cells สำหรับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงนั้น B cell มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการสร้างสารที่ทำหน้าที่ในการจดจำและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า Antibody โดย B cells เพียงหนึ่งกลุ่ม สามารถสร้าง Antibody ต่อ Antigen หนึ่งชนิดเท่านั้น และปกติแล้ว B cell ยังมีส่วนทำหน้าที่เป็น APC ซึ่งเมื่อ B cell พบกับ Antigen ที่จำเพาะเจาะจงเป็นครั้งแรกจะมีที่รับ Antigen ที่จำเพาะบนผิว B cell นั่นคือ IgM ที่อยู่ในรูป Membrane form ซึ่งจะจับตัวพา Antigen เข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ Endocytosis (Abbas *et al.*, 2000) จากนั้น B cell จึงย่อยสลาย Antigen เพื่อให้ได้ Epitope ที่พร้อมจะกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมี MHC class II เป็นตัวพา Epitope ไปไว้ที่ผิวเซลล์เมื่อ Helper T cell ที่มีความจำเพาะต่อ Epitope ชนิดนั้นมาจับและตรวจพบจึงจะหลั่งสารสำคัญหลายชนิดออกมาเช่น Interleukin II เพื่อทำให้ B cell แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (Proliferation) และมีการเปลี่ยนแปลง (Differentiation) เพื่อกำหนดหน้าที่ในการสร้างชนิดของ Ig ที่จำเพาะและพัฒนาตัวเองไปเป็น Plasma B cell ที่สามารถสร้าง Antibody ที่อยู่ในรูป Secreted form ออกไปสู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อตอบสนองต่อ Antigen ชนิดนั้น ๆ ในกระแสเลือดหรืออวัยวะอื่นที่มี Antigen ชนิดนั้น ๆ อยู่ (Kaiser *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า B cell บางส่วนมีการพัฒนาไปเป็น Memory B cell เพื่อการจดจำและตอบสนองต่อ Antigen ตัวเดิมในครั้งต่อไป เราเรียการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ Antigen ในครั้งแรกว่า “Primary immune response” โดยผลของการตอบสนองจะสร้าง Ig ออกมาในระดับที่ไม่มากนักและการตอบสนองจะเกิดค่อนข้างช้า แต่จะพบว่าการสร้างเซลล์ที่มีความจำเพื่อรองรับการเข้ามาอีกครั้งของ Antigen ตัวเดิม

(2) T Lymphocytes หรือ T cells ในสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไปแล้ว

สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ Helper T cell, Cytotoxic T cell และ Suppressor T cell แต่ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Ig คือ Helper T cell โดยมีหน้าที่จดจำ Epitope ของ Antigen ที่แสดงโดย MHC class II บนผิวเซลล์ของ B cell คือ APC ตัวอื่น หลังจากตรวจพบ Epitope ที่จำเพาะแล้วจะหลั่งสารจำพวก Cytokine ออกมา ซึ่งจะมีผลทำให้ B cell เกิดการพัฒนาตัวเปลี่ยนแปลงหน้าที่และผลิต Ig ออกมาในที่สุด Helper T cell จะสามารถจดจำต่อ Antigen ที่จำเพาะได้ จะต้องมีการจับบนผิวเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เรียกว่า T cell receptor (TCR) โดยจะจดจำอย่างจำเพาะเจาะจงกับ Antigen ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยลำพังไม่ได้ TCR จะต้องจำโครงสร้างที่เป็น Complex ซึ่งเกิดจาก MHC class II ของ APC ทั้งหลายกับ Epitope โดยจะทำงานร่วมกันเป็นกลุ่มของเซลล์ (Clone) กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเท่านั้น ผลของการตอบสนองดังกล่าวยังทำให้ APC มีการหลั่งสารจำพวก Interleukin I ออกมา ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาตัวและความอยู่รอดของทั้ง B และ T cells (Klein and Horejsi, 1997)

2.2.2 การตอบสนองโดยผ่านเซลล์ (Cell-mediated immune response)

การตอบสนองประเภทนี้มีความสำคัญอย่างมากในกรณีที่มีการติดเชื้อภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไวรัสและเซลล์ที่มีการพัฒนาผิดปกติเช่น Tumor หรือ Cancer โดยมี Cytotoxic T cell (T killer cell) และจะอาศัย MHC class I ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกชนิด เป็นตัวช่วยหรือสื่อกลางในการจดจำ โดยทั่วไปเมื่อเซลล์ถูกบุกรุกด้วยไวรัส (Viral infection) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์จะมีกลไกในการตัดและแตกแต่งอนุภาคของไวรัส (Viral particles) ให้อยู่ในรูปที่เป็น Epitope ที่เหมาะสมแล้วจึงมี MHC class I มาจับอย่างจำเพาะเจาะจงในรูป Complex แล้วนำ Epitope ไปวางบนผิวเซลล์ เพื่อรอให้ Cytotoxic T cell ที่มี T cell receptor (TCR) ที่จำเพาะมาตรวจจับ เมื่อได้รับการจดจำด้วย Cytotoxic T cell อย่างจำเพาะเจาะจงแล้ว Cytotoxic T cell จึงหลั่งสารพิษ (Toxin) ออกมาเพื่อทำลายหรือฆ่าเซลล์ที่มี Epitope ของสิ่งแปลกปลอมหรือไวรัสอย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้เซลล์ตายและมีผลต่อเนื่อง ทำให้ไวรัสที่อาศัยอยู่ในเซลล์ตายและไม่สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ (Klein and Horejsi, 1997)

3. โปรแกรมเซลล์ตาย (Apoptosis)

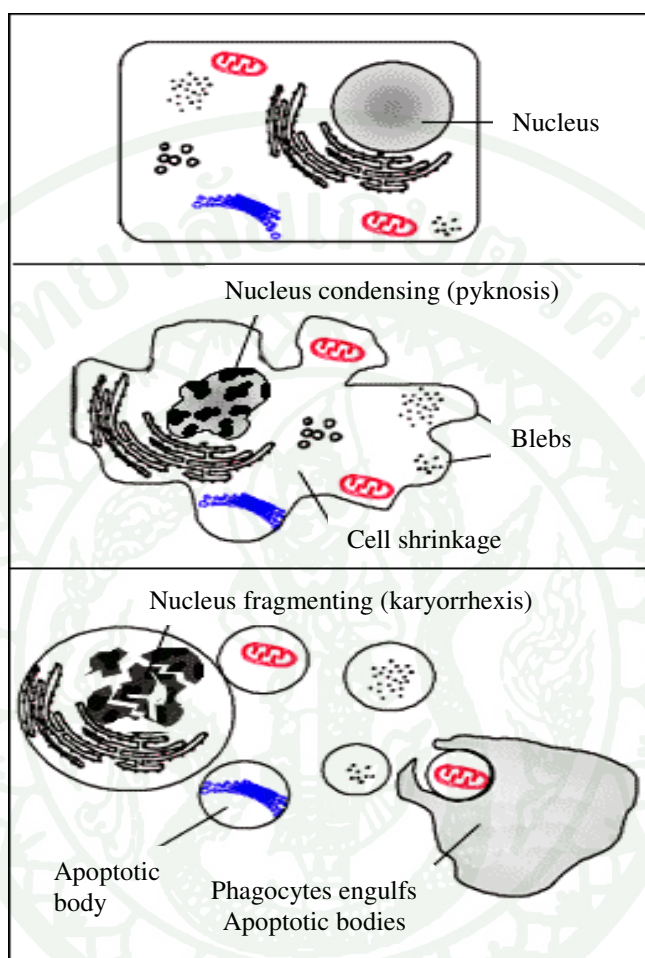
โปรแกรมเซลล์ตาย (Apoptosis หรือ Program cell death) คือกลไกภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่กำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการ หรือเป็นกลไกที่ทำลายตัวเองเพื่อรักษาโครงสร้างหรือรักษาระดับการคงสภาพของเซลล์โดยใช้โมเลกุลต่าง ๆ ที่มีอยู่ในเซลล์ ซึ่งในทางชีวเคมีมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เกี่ยวข้องกับหลายกลไกและหลายปัจจัย โดยลักษณะของเซลล์ที่เกิด Apoptosis เริ่มต้นคือการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสัณฐาน (Morphology) ของเซลล์ คือมีการหดตัวของทั้งเซลล์ได้แก่ ภายในไซโตพลาซึม เนื่องจากเกิดการกระตุ้นผ่านทางโปรตีน Protease ส่งผลให้เกิดการแตกหักของโครงสร้าง (Cytoskeletal) ภายในเซลล์ จากนั้นเกิดการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane) ผลคือทำให้ผนังเซลล์โป่งพอง (Membrane blebbing) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของ Phosphatidyl serine จากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ และการเสียสภาพของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane) แล้วจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในนิวเคลียส เกิดการหดตัวของ Oligonucleosome และ DNA fragmentation และการหดตัวของโครมาติน (Chromatin condensation) ซึ่งทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า “Pyknotic nuclei” สุดท้ายจึงเกิดการแตกตัวของเซลล์ออกเป็น Apoptotic body หรือ Fragmented body (ภาพที่ 1) ในที่สุดจึงไม่สามารถรักษาสภาพที่มีชีวิตของเซลล์ไว้ได้ (รัตน, 2548)

การตายแบบ Apoptosis จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสโดยเฉพาะ นั่นคือ Genomic DNA จะถูกทำลายโดยโครโมโซมจะถูกตัดเป็นชิ้น ๆ แต่การตายนี้จะไม่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ (Inflammatory) เนื่องจากเซลล์ที่ตายจะถูกทำลายจากเซลล์ Macrophage โดยอาศัยกระบวนการจับกิน (Phagocytosis) ภายในเซลล์และไม่ก่อให้เกิดการเสียสมดุลของร่างกาย เพราะจำนวนเซลล์ที่ตายมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดในร่างกาย

3.1 กระบวนการที่เกี่ยวข้องในการเกิด Apoptosis

Apoptosis จะสามารถเกิดในหลาย ๆ กระบวนการเช่น กระบวนการพัฒนาไปทำหน้าที่ของเซลล์ (Differentiation) กระบวนการพัฒนาของเซลล์ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายของสิ่งมีชีวิต กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (Proliferation) เป็นต้น และมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดการถูกกระตุ้น ได้แก่ Cytotoxic T lymphocytes (CTL) ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการของระบบภูมิคุ้มกัน, Anti cancer drugs, γ หรือ UV irradiation, โปรตีนในกลุ่มของ Cytokines ที่เรียกว่า “Death factors” และการขาดสารที่เป็นปัจจัยสำคัญของการอยู่รอด (Deprivation of survival factors) (ภาพที่ 2) โดยปัจจัย

เหล่านี้ล้วนแล้วแต่สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้ (Nagata, 1997) และสามารถพบการตายแบบ Apoptosis ในกระบวนการดังต่อไปนี้คือ



ภาพที่ 1 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในการตายของเซลล์แบบ Apoptosis

ที่มา: Farmer (2006)

3.1.1 Cell termination

กระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์ถูกทำลายและยากต่อการซ่อมแซม หรือเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสหรือตกอยู่ภายใต้สภาวะไม่เหมาะสมหลายอย่างเช่น การขาดอาหารหรือ การเกิดความเสียหายต่อ DNA จาก Ionizing radiation หรือ Toxic chemicals ซึ่งปัจจัยดังที่กล่าวมา สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยผ่านทาง Tumor-suppressing gene (p53) ซึ่งยีน p53 หรือยับยั้งการเกิดมะเร็ง เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการถอดรหัส

(Transcription) (รัตนา, 2548) การตายของเซลล์แบบ Apoptosis สามารถเกิดด้วยได้ด้วยตัวเอง เนื่องจากเนื้อเยื่อบริเวณรอบ ๆ หรือจากเซลล์ที่เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน ในกรณีนี้หน้าที่ของ Apoptosis จะเป็นตัวเคลื่อนย้ายหรือทำลายเซลล์ที่เสียหาย เพื่อป้องกันตัวเอง ไม่ให้ร่างกายอ่อนแอและยับยั้งการขยายตัวของการติดเชื้อไวรัส

การตายของเซลล์แบบ Apoptosis มีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็ง (Cancer) ซึ่งถ้าหากเซลล์ไม่สามารถปรับตัวได้ภายใต้การตายแบบ Apoptosis จะส่งผลให้เกิดการกลาย (Mutation) หรือการยับยั้งของสารชีวเคมี (Biochemical inhibition) ภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะสามารถแบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นเนื้องอก (Tumor) ได้ เช่นการเกิดติดเชื้อไวรัส Papilloma จะทำให้ยีนของไวรัสบางชนิดมีการแสดงออกและเข้าไปรบกวนการทำงานของโปรตีน p53 ที่อยู่ภายในเซลล์ โดยโปรตีนนี้เป็นสมาชิกที่สำคัญใน Apoptotic pathway ซึ่งการรบกวนในครั้งนี้ อาจทำให้เซลล์พัฒนาจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด (Thompson, 1995)

3.1.2 Homeostasis

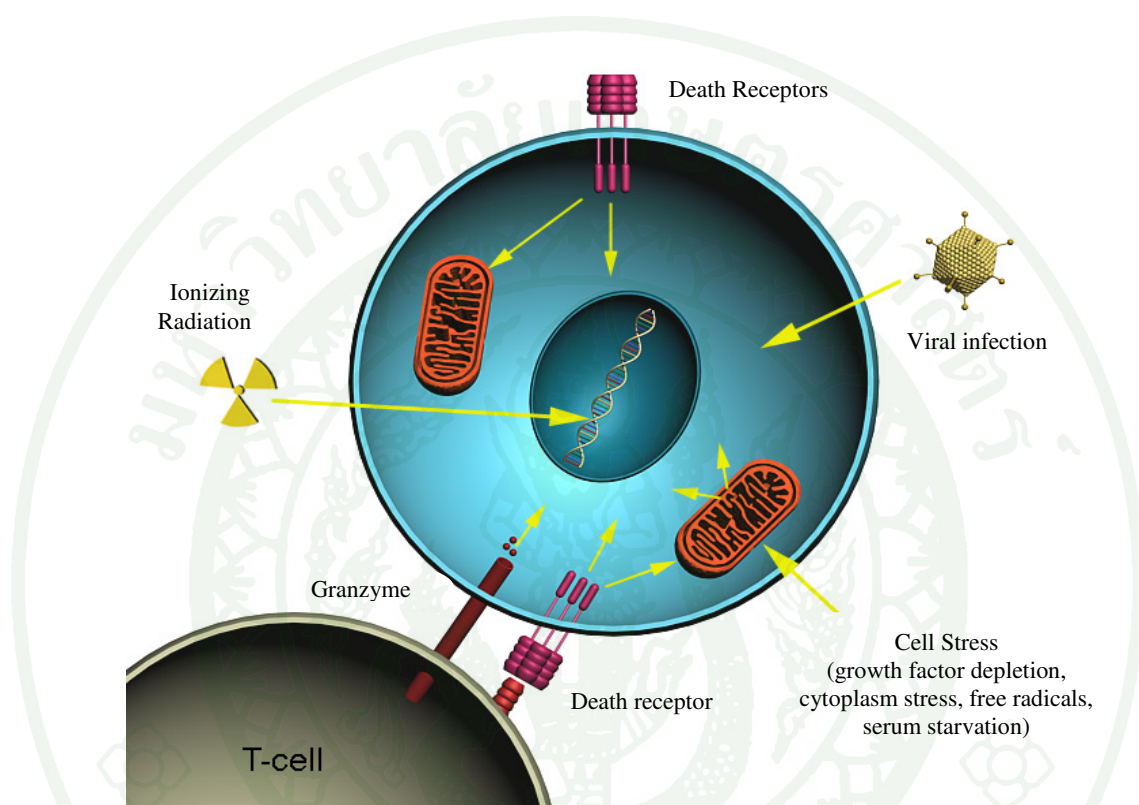
ในสิ่งมีชีวิตที่โตเต็มที่ จะมีการรักษาระดับและปริมาณของเซลล์ที่มีอยู่ให้เท่ากับเซลล์ที่ตาย มีการแบ่งเซลล์เข้ามาแทนที่ได้ทันเมื่อเกิดโรค และมีการชดเชยให้กับเซลล์ที่ตาย กระบวนการรักษาสสมดุล (Balancing) ของเซลล์นี้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการ Homeostasis ซึ่งจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่ของสิ่งมีชีวิต เพื่อรักษาระดับความสมดุลต่าง ๆ ภายในเซลล์

Homeostasis จะเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ก็ต่อเมื่ออัตราการแบ่งเซลล์ (Rate of mitosis) ในเนื้อเยื่อนั้นสมดุลกับเซลล์ตาย ถ้าสมดุลนี้ถูกรบกวนจากปัจจัยที่มีผลจำเพาะบางอย่างที่จะสามารถทำให้เกิดอันตรายหรือเกิดโรคขึ้นได้ ซึ่งได้แก่ ปัจจัยที่หนึ่ง คือมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นเนื้องอก (Tumor) ได้ ปัจจัยที่สอง คือการแบ่งเซลล์ที่ช้ามาก ทำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างหรืออวัยวะนั้น ๆ ได้ ซึ่งสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเป็นขั้นตอน เพื่อควบคุมให้เกิดกระบวนการ Homeostasis อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อรักษาการมีชีวิตอยู่ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ นั้นเอง (Thompson, 1995)

3.1.3 Development

โปรแกรมเซลล์ตายเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาเนื้อเยื่อทั้งพืชและสัตว์ โดยการพัฒนาของอวัยวะและเนื้อเยื่อจะต้องเริ่มเป็นอันดับแรก หลังจากนั้นจึงเริ่มการแบ่งเซลล์และเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง เป็นผลให้เกิดการตัดองค์ประกอบที่ไม่จำเป็นบางส่วน (Pruned) ออกไปทำให้

เกิดความถูกต้องในอวัยวะนั้น ๆ โดยใช้การตายแบบ Apoptosis ซึ่งจะไม่เหมือนกับการตายของเซลล์ที่เกิดจากการบาดเจ็บแต่การตายแบบ Apoptosis จะทำให้เซลล์เกิดการหดตัว (Shrinkage) และการแตกหักของ DNA จากกระบวนการนี้ ร่างกายยอมให้เกิดการจับกิน (Phagocytosis) โดยเซลล์ Macrophage ซึ่งเซลล์และเนื้อเยื่อรอบ ๆ จะไม่ได้รับอันตราย (Guerrero and Altaba, 2003)



ภาพที่ 2 ปัจจัยต่าง ๆ ที่เป็นตัวกระตุ้นและทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis)

ที่มา: Dash (2009)

3.1.4 Lymphocyte interaction

เป็นกระบวนการสร้างและพัฒนาของ B lymphocytes และ T lymphocytes ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โดยเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและเป็นจุดเริ่มต้นของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย โดยกระบวนการนี้ ต้องอาศัยกระบวนการเกิดเซลล์ตายแบบ Apoptosis ซึ่งเป็นกลไกภายในร่างกายที่ทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์ที่ไม่ดีหรือเซลล์ที่เสียหาย ที่เกิดในส่วนที่ไม่ต้องการหรือจำเป็นต้องทำลาย

เซลล์นั้น ๆ ได้ (Werlen *et al.*, 2003) โดยอาศัยกลุ่มเซลล์จาก T lymphocytes ซึ่งเป็นชนิดที่เรียกว่า “Cytotoxic T cell” ในการทำหน้าที่ดังกล่าวนี้

Cytotoxic T cell เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง ที่เกี่ยวข้องโดยตรงในการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ Apoptosis จากการตอบสนองต่อจุลชีพต่าง ๆ โดยเฉพาะการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไวรัส โดยมีหน้าที่ในการทำลายเซลล์ ที่มีแอนติเจน (Antigen) บนผิวเซลล์ของสิ่งแปลกปลอม ซึ่งอยู่ภายในไซโตพลาซึมของเซลล์ผ่านทางโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด Major histocompatibility complex (MHC) class I ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกชนิดและอาศัย CD8 ซึ่งเป็น Receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ Cytotoxic T cell เป็นตัวจดจำอย่างจำเพาะเจาะจง จากนั้นจึงกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Apoptosis โดยเริ่มต้นจากการเกิดรู (Pore) บนผิวของเซลล์ เป้าหมายที่ถูกสร้างจาก Perforin (Russell and Ley, 2002) จากนั้นมีการหลั่งของสารเคมีที่สำคัญจาก Cytotoxic T cell ภายใน Granules ที่บรรจุโปรตีนจำพวก Granzyme B ผ่านรูที่มีอยู่ ซึ่ง Granzyme B เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ Serine protease ทำหน้าที่ในการกระตุ้นเอนไซม์ Caspases ที่อยู่ในไซโตพลาซึมของเซลล์เป้าหมาย แล้วจึงเกิดกระบวนการอย่างเป็นขั้นลำดับจากกลุ่มของ Caspases ส่งผลให้เกิดการแตกหักของ DNA ภายในนิวเคลียสของเซลล์เป้าหมาย ในที่สุดจึงเกิดการตายของเซลล์ขึ้น

3.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Apoptosis

กระบวนการเกิด Apoptosis สามารถเกิดขึ้นได้หากมีการส่งสัญญาณของสารเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งสารสื่อสัญญาณเหล่านี้ พบได้ทั้งจากภายนอกเซลล์ (Extracellularly หรือ Extrinsic inducers) และทั้งจากภายในเซลล์ (Intracellularly หรือ Intrinsic inducers)

การส่งสัญญาณของสารเคมีจากภายนอกเซลล์ (Extracellular signals) จะประกอบไปด้วยกลุ่มของฮอร์โมน (Hormones) ที่เกี่ยวข้องในการส่งสัญญาณระยะไกล, Growth factors ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการเจริญเติบโต, Nitric oxide คือกลุ่มของก๊าซ ซึ่งทำหน้าที่ในการเป็นสารสื่อประสาทระหว่างเซลล์ภายในร่างกาย (Brune, 2003) และกลุ่มของ Cytokines ที่เป็นสารน้ำต่าง ๆ และหลั่งออกมาโดยเซลล์ภายในร่างกายและส่วนใหญ่จะถูกสร้างจาก T lymphocytes เช่น Interferon gamma (IFN- γ) เป็นต้น และจำเป็นต้องมีตัวรับสัญญาณซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์เป้าหมาย ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารสื่อสัญญาณในแต่ละชนิด การชักนำของสารสื่อสัญญาณนี้สามารถเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง ในกระบวนการของ Apoptosis ได้

การส่งสัญญาณของสารเคมีจากภายในเซลล์ (Intracellular signals) มีจุดเริ่มต้นจากการตอบสนองจากเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียด (Stress) ซึ่งท้ายที่สุดผลที่เกิดขึ้นคือเซลล์นั้น ๆ จะถูกทำลายลง สำหรับการเข้าจับของ Nuclear receptors ใน Intracellular signals นี้ เกิดขึ้นโดยอาศัยปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายชนิด ซึ่งประกอบด้วยกลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoids), ความร้อน (Heat), รังสี (Radiation), การขาดสารอาหาร (Nutrient deprivation), การติดเชื้อไวรัส (Viral infection) และการขาดออกซิเจน (Hypoxia) ซึ่งปัจจัยสำคัญต่าง ๆ เหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดการหลั่งของ Intracellular apoptotic signals จากเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย แต่ภายในเซลล์นั้น ๆ ก็มีโปรตีนที่สำคัญอยู่คือ Poly ADP ribose polymerase (PARP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการรักษาสภาพของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวซ่อมแซม DNA ที่เสียหาย แต่ถ้าหาก PARP ถูกย่อยสลายด้วย Caspases ทำให้กลไกการซ่อมแซมและรักษาสภาพเซลล์หยุดชะงักลง ในที่สุดจึงเกิดการตายของเซลล์ขึ้น (Chiarugi and Moskowitz, 2002)

3.3 บทบาทของไมโทคอนเดรียที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิด Apoptosis

ไมโทคอนเดรียเป็น Organelle หนึ่งที่สำคัญต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต พบได้เฉพาะในไซโทพลาซึมของเซลล์ในกลุ่ม Eukaryote ที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจ หน้าที่หลักของไมโทคอนเดรีย คือเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ โดยใช้ Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งพลังงานอิสระในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และในกระบวนการตายแบบ Apoptosis ไมโทคอนเดรียเป็นองค์ประกอบหนึ่งซึ่งทำหน้าที่โดยตรงในการเกิด Intracellular signals ดังนี้คือ

เมื่อ Cytochrome C ถูกปลดปล่อยออกมาจากไมโทคอนเดรีย Cytochrome C จะไปจับกับโปรตีน Apaf-1 หรือ Apoptosis peptidase activating factor-1 (เป็น Homolog กับ CED-4 ใน *Caenorhabditis elegans*) แล้วเกิดโครงสร้างใหม่เพื่อไปจับกับ Procaspase-9 ที่อยู่ในไซโทพลาซึม จึงได้สารที่มีโครงสร้างใหม่อีกครั้ง ที่เรียกว่า “Apoptosome complex” (Adams and Cory, 2001) ซึ่งจะเป็นจุดเริ่มต้นของการเข้าสู่วิถีของ Caspases ของเซลล์ (ภาพที่ 3) โดยกระบวนการนี้จะเกิดอย่างเป็นลำดับขั้นไปเรื่อย ๆ จนได้ผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายคือ Caspase-3 ซึ่งจะเป็นตัวไปตัด Substrate ที่เกี่ยวข้องในการซ่อมแซม DNA, โปรตีน โครงสร้างและ Endonuclease ผลิตสุดท้ายคือทำให้เกิดการตายของเซลล์โดยอาศัย Caspase-3 (Executioner caspases) เป็นตัวการสำคัญ

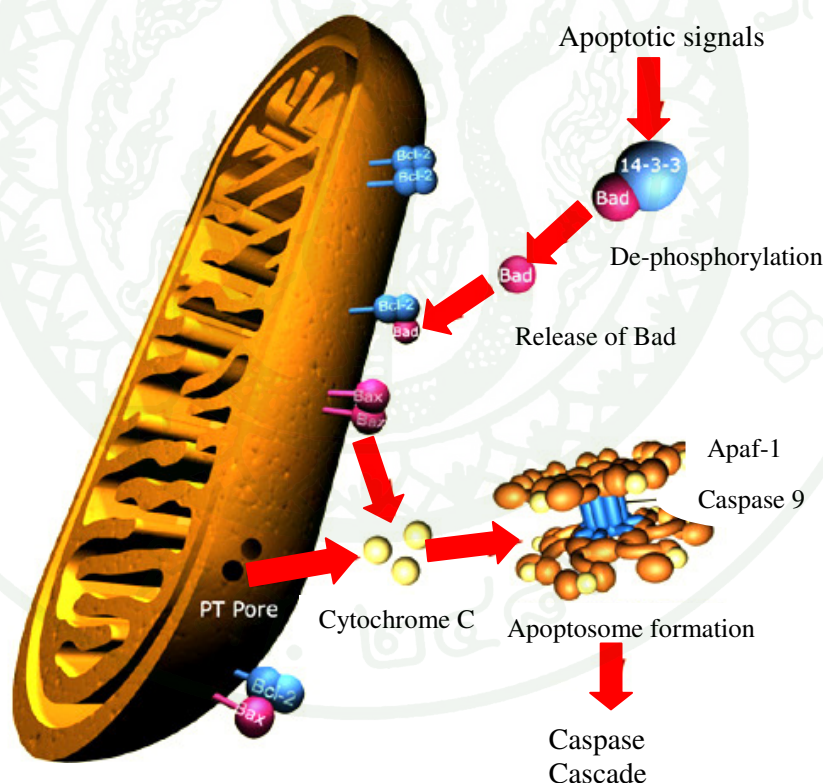
ไมโทคอนเดรียสามารถสร้างโปรตีนตัวอื่น ๆ เช่น Second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC), Direct IAP-binding protein with low pI (DIABLO) ที่มีหน้าที่ในการยับยั้ง X-linked inhibitor of apoptosis (XIAPs) และ Apoptosis inducing factor (AIF) ซึ่งมีหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ Apoptosis ซึ่งอาจจะอาศัยวิถีของ Caspases หรือไม่ได้ การสร้างความเสียหายให้กับไมโทคอนเดรียสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น Vesicular stomatitis virus (VSV), Ceramide, แสงอัลตราไวโอเล็ต, ยา เช่น Etoposide และ Staurosporin หรือการเปลี่ยนแปลงของ pH ภายในไซโตพลาซึมหรือในไมโทคอนเดรียเอง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยของ Cytochrome C จากรูบริแวน Membrane ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดกระบวนการของ Apoptosis อีกกระบวนการหนึ่ง (Bras *et al.*, 2005)

โปรตีนกลุ่ม Anti-apoptosis เช่น Bcl-2 และ Bcl-XL และโปรตีนกลุ่ม Apo-apoptosis เช่น Bad และ Bax ที่อยู่ในไซโตพลาซึม โปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้จัดเป็นสมาชิกของ Bcl family โดยหน้าที่ของโปรตีน Bcl family เกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อการเกิด Apoptosis ซึ่งมีความสามารถทั้งในการกระตุ้นและยับยั้งการเกิด Apoptosis เพื่อให้เกิดสมดุลภายในเซลล์เอง โดยปกติ Bcl-2 และ Bcl-XL จะทำหน้าที่ในการปกป้องรูบริแวนผิวของไมโทคอนเดรีย ถ้าหากไมโทคอนเดรียถูกกระตุ้นจากปัจจัยต่าง ๆ กลุ่มโปรตีนของ Apo-apoptosis ได้แก่ Bad และ Bax จะสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Membrane ของไมโทคอนเดรีย ผลคือทำให้ขนาดของรูที่เรียกว่า “PT pore” (Permeability transition pore) ขยายตัวมากขึ้น จากนั้น Cytochrome C จึงถูกปลดปล่อยออกมา (Tan *et al.*, 2000) เพื่อเข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ต่อไป (ภาพที่ 3) ดังนั้นปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหาย ก็จะสามารถทำให้เกิดกระบวนการตายแบบ Apoptosis ของเซลล์ตามมาได้เช่นกัน

มีรายงานการศึกษาการเกิด Apoptosis ส่วนใหญ่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่นมนุษย์และหนู ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งสิ้น และสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยจากรายงานของ Kurobe *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการเกิด Apoptosis ที่ถูกกระตุ้นจากยีน Fas ligand ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของ Tumour necrosis factor (TNF) ที่ทำหน้าที่เป็น Cytokines พบว่าการแสดงออกของยีน JF-Fas ligand ในปลา Japanese flounder สามารถชักนำและเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยอาศัย Cytotoxic T cell ทำหน้าที่ในการไปยับยั้ง Cell line HINA-E โดยการทำลาย Genomic DNA ภายในเซลล์นั้น ๆ และยังมีรายงานของ Praveen *et al.* (2006b) ที่ค้นพบยีน Cellular apoptosis susceptibility (CAS) จาก Non-specific cytotoxic cells

(NCC) ในปลานิล ซึ่งยีนชนิดนี้เป็นตัวควบคุม (Regulation) ในกลไกที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิด Apoptosis ภายในเซลล์ของปลานิล และจากรายงานของ Chang *et al.* (2006) ที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) จากอวัยวะต่าง ๆ ใน Grass carp

โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน TRAIL ได้แก่ เหงือก ตับ ไตส่วนหลัง ไตส่วนหน้า ลำไส้และม้าม ซึ่งพบว่าเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งสิ้น นอกจากนี้ Evans *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาผลของการตอบสนองของ Non-specific cytotoxic cells (NCC) ในปลานิลต่อการกระตุ้นด้วยการฉีดวัคซีนจากเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* จากการวัดค่า Cytotoxicity activity ได้ที่ พบว่า Cytotoxicity activity ของ NCC มีค่าเพิ่มขึ้นเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดเท่านั้น



ภาพที่ 3 การส่งสัญญาณของสารเคมีจากภายในเซลล์ (Intracellular signals) ไปยังไมโทคอนเดรีย ที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis จากการหลั่งของ Cytochrome C

ที่มา: Dash (2009)

4. Caspases

Caspases (Cysteine aspartyl-specific proteases) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic enzyme) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกลไกการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดย Caspases เป็นเอนไซม์ที่มี Cysteine residue ตรงตำแหน่งสำหรับทำปฏิกิริยา (Active site) เพื่อทำหน้าที่จำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาของ Aspartate residue หรือ Specific aspartate residues นอกจากนี้ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบโดยอาศัยกลุ่มของ Cytokines อีกด้วย (Leeuwenburgh, 2003)

จากการศึกษาโครงสร้างยีนในหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* ทำให้มีการค้นพบยีน CED-3 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโปรตีนในมนุษย์ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เรียกว่า “Interleukin-1 β converting enzyme (ICE)” และมีลักษณะที่คล้ายกับเอนไซม์ในกลุ่มของ Caspases โดยโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เป็น Pro-enzyme มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30-60 กิโลดาลตัน ถูกสร้างอยู่ตลอดเวลาภายในเซลล์ (Kumar, 1997) ซึ่งในสภาพปกติ Caspases จะอยู่ในรูปที่เป็น Inactivate ที่พบในไซโตพลาซึม โดยยังไม่สามารถที่จะทำงานได้ แต่จะสามารถทำงาน (Active) ได้ เมื่อจับตัวรวมกันมากขึ้นเป็น Heterodimer ซึ่งจะให้มีบริเวณของ Active sites มากขึ้น จากนั้นจึงถูก Caspase ตัวอื่น ตัวมันเองหรือจะเป็นเอนไซม์ชนิดอื่น เข้ามากระตุ้นในกระบวนการ Proteolysis ซึ่งจะทำให้ Procaspase เปลี่ยนเป็นเอนไซม์ Caspase ที่สมบูรณ์ที่พร้อมจะทำหน้าที่ได้ต่อไป

เป้าหมายในการทำงานของ Caspases ที่สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ ได้แก่ การย่อยทำลาย Poly ADP ribose polymerase (PARP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายและปกป้องนิวเคลียสจากการแตกหักของ DNA โดย Caspases จะย่อย DNA-Dependent protein kinase (DNA-PK) ซึ่งจะมีผลไปกระตุ้นการทำงานของ DNA fragmentation factor (DFF) ส่งผลทำให้เกิดการย่อยสลาย DNA ในนิวเคลียสนั้น ๆ และยังส่งผลต่อเนื่องให้เซลล์ไม่สามารถซ่อมแซม DNA ภายในเซลล์ได้หรือทำให้เกิดการแยกสลาย (Disassemble) โครงสร้างคำจุนภายในของเซลล์โดยตรง เช่น แยกสลายโครงสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียส การปรับเปลี่ยนการจัดเรียงตัวและแยกสลายโครงสร้าง (Cytoskeleton) ของเซลล์ การทำให้เกิดการเสียดสภาพ (Inactivate) ของโปรตีน เช่น การเสียดสภาพของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ไม่ให้เกิดการตายแบบ Apoptosis และสุดท้ายโปรตีน Caspases สามารถย่อยสลายเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดโครงสร้างที่เรียกว่า “Apoptotic bodies” ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ (Inflammatory) เพราะมีการกระตุ้นให้เซลล์ที่จะเกิด Apoptosis ส่งสารสื่อสัญญาณให้เซลล์ Macrophage มาที่เซลล์

เป้าหมายเพื่อทำหน้าที่ในการจับกิน (Phagocytosis) เพื่อกำจัดเซลล์ที่ตายเหล่านี้ได้อย่างทันทั่วทั้งที่ (Leeuwenburgh, 2003; Shi, 2004)

4.1 ชนิดของ Caspases

ปกติแล้ว Caspases จะอยู่ในรูป Proenzyme (Pro-caspases) โดยมีโครงสร้างหลักประกอบด้วย Prodomain (Pro) ทางด้านปลาย N-terminal และหน่วยย่อย (Subunit) มีส่วน Large subunit ขนาดประมาณ 20 kDa (กิโลดาลตัน) และ Small subunit มีขนาดประมาณ 10 kDa ซึ่งบริเวณ Large subunit จะมีตำแหน่งกระตุ้น (Active site) ที่เป็น Cysteine residue ที่มีลำดับของกรดอะมิโน (Pentapeptide sequence) บริเวณ Active site ซึ่งเป็นแบบ Conserved QACXG motif โดยที่ Q คือ Glutamin (Gln), A คือ Alanine (Ala), C คือ Cysteine (Cys), X คือกรดอะมิโนชนิดใดในสามชนิดนี้ ได้แก่ Arginine (Arg), Glutamine (Gln) หรือ Glycine (Gly) และสุดท้าย G คือ Glycine (Gly)

ปัจจุบันกลุ่มเอนไซม์ของ Caspases ที่มีรายงานใน Mammals มีจำนวนรวม 14 ชนิด สามารถแบ่งชนิดตามหน้าที่และการทำงานออกเป็น 2 กลุ่ม ได้ดังนี้คือ

4.1.1 Initiator caspases หรือ Apical caspases เป็นกลุ่มเอนไซม์ Caspases ที่มี Prodomain ขนาดใหญ่กว่า 100 Amino acid residues ได้แก่ Caspase-1, Caspase-2, Caspase-4, Caspase-5, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-10 และ Caspase-12 สำหรับ Prodomain ของ Caspase ในแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างพิเศษ (Structural motifs) เช่นใน Caspase-8 และ Caspase-10 มีส่วนที่เรียกว่า “Dead effector domain” (DED) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุม (Regulator) การเกิด Caspases หรือใน Caspase กลุ่มอื่นเช่น Caspase-4, Caspase-5 และ Caspase-9 จะมีโครงสร้างที่เรียกว่า “Caspases recruitment domain (CARD)” สำหรับใช้ในการจับกับ Adaptor molecule นั่นก็คือ Fas-associated death domain (FADD) หรือ Apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) เพื่อใช้ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของ Effector caspases ต่อไป (Chen and Wang, 2002)

4.1.2 Effector caspases หรือ Executioner caspases เป็นกลุ่มเอนไซม์ Caspases ที่มีขนาดของ Prodomain น้อยกว่า 30 กรดอะมิโน ประกอบไปด้วย Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7 และ Caspase-14 โดยมีหน้าที่หลักในการแยกย่อยสารที่เรียกว่า “Death substrates” ซึ่งมีความสามารถในการต่อต้านกลไกการรอดชีวิตของเซลล์ โดยการย่อยสลายโปรตีนโครงสร้างต่าง ๆ

ได้แก่ Actin, Fodrin และ Lamin จากนั้นจึงกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแยกตัวและทำให้นิวเคลียสหดตัว ซึ่งทั้งหมดสามารถส่งเสริมการทำงานของ Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor (CAD/DFF) ได้ สุดท้ายจึงเกิดการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) จากการสลายตัวของเอนไซม์ Poly ADP ribose polymerase (PARP) ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA และทำลาย Caspase-activated DNase Inhibitor (ICAD) และเอนไซม์กลุ่มนี้ยังสามารถย่อยโปรตีนในกลไกการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งทำให้การทำงานในระบบต่าง ๆ ของเซลล์ต้องหยุดลง (Rehm *et al.*, 2006)

4.2 Caspase-3

เอนไซม์ Caspase-3 หรือที่รู้จักกันในชื่อ CPP32, Apopain หรือ Yama เป็นหนึ่งในสมาชิกของเอนไซม์ Caspases และอยู่ในกลุ่มของ Effector caspases หรือ Executioner caspases ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในกลไกการเกิด Apoptosis ภายในเซลล์ ซึ่งจะพบว่ามีแสดงออกมาเป็นจำนวนมาก ในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของพวก T lymphocytes หรือ T cells (Fernandes *et al.*, 1994)

โดยทั่วไปแล้ว Procaspase-3 จะถูกตัดที่ตำแหน่ง Arginine-9 หรือ Arginine-28 (ภาพที่ 4) จากนั้นจะรวมกัน (Dimerization) เป็นเฮเทอโรไดเมอร์ไรเซชัน (Heterodimerization) ซึ่งประกอบด้วย Large subunit 2 ส่วน และ Small subunit 2 ส่วน โดยมีตำแหน่งกระตุ้น (Active sites) อยู่ที่บริเวณ Large subunit และ Small subunit ทำให้เกิดโครงสร้างแบบ Heterotetrameric ที่มีความสำคัญต่อการทำงานอย่างมาก (Pokpong *et al.*, 2007)

4.3 บทบาทของ Caspase-3 ใน Apoptosis

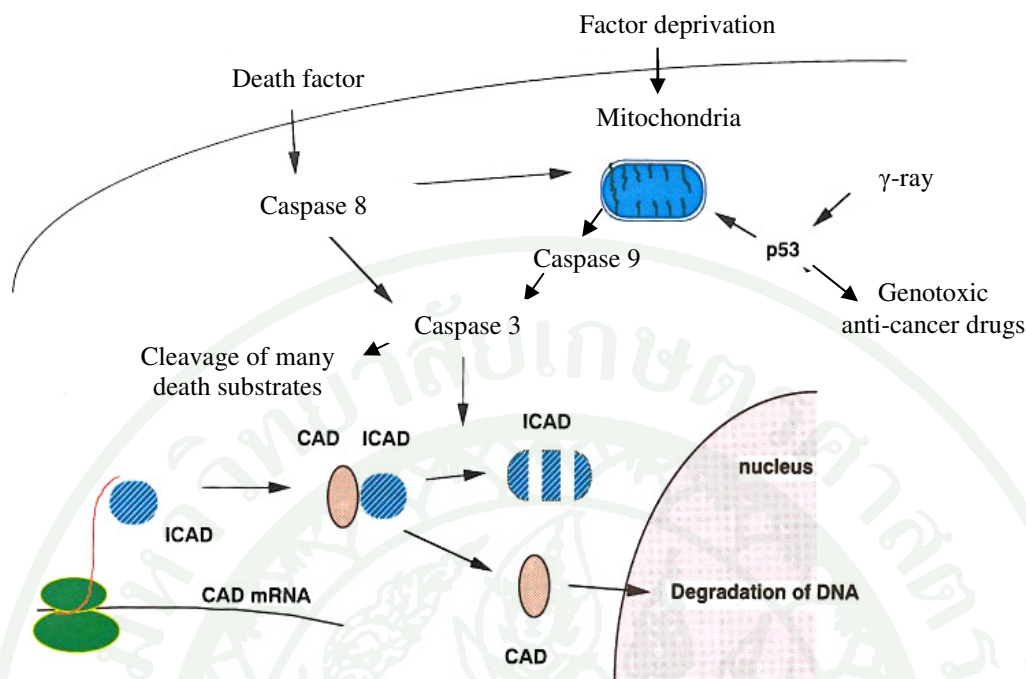
ลักษณะการแตกหักของ DNA ที่อยู่ภายในนิวเคลียส จากกลไก Apoptosis จำเป็นต้องมี Caspase-activated DNase (CAD) ซึ่งทำหน้าที่ในการตัด DNA บนโครโมโซม กระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ Caspase-3 เป็นตัวรับตัวสุดท้ายของ Cascade ในกลุ่มของ Caspases (ภาพที่ 5) เมื่อการสังเคราะห์โปรตีน CAD ที่ได้จากไรโบโซมเสร็จสิ้น โปรตีน Caspase-activated DNase Inhibitor (ICAD) จะเข้าจับกับโปรตีน CAD เพื่อทำให้การพับตัว (Folding) ของโปรตีนเกิดขึ้นอย่างถูกต้อง จึงได้โปรตีนที่มีโครงสร้างเชิงซ้อน เรียกว่า “DNA Fragmentation factor (DFF) หรือ CAD/ICAD complex” เมื่อการกระตุ้นเกิดขึ้นจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น Death factor, γ -ray, Genotoxic anti-cancer drug หรือ Factor deprivation กลไกการเกิด Apoptosis ภายในเซลล์จึงเริ่มการทำงานขึ้น โดยกลุ่ม

เอนไซม์ Caspases จะทำงานอย่างต่อเนื่องและเป็นลำดับขั้นตอน ในขั้นแรกคือ Death factor เช่น Fas ligand จะเข้าจับกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ที่เรียกว่า “Fas receptor” จึงเกิดโครงสร้างใหม่เป็น Death induced signaling complex (DISC) ที่มีตัวกลาง (Adaptor) เรียกว่า “Fas-associated death domain/Mediator of receptor-induced toxicity-1 (FADD/MORT1)” ทำให้เอนไซม์ Caspase-8 (Procaspase-8) ที่อยู่ในรูป Inactive ถูก Autoactivated จาก DISC ให้ได้ Caspase-8 ที่พร้อมทำหน้าที่ โดยแบ่งการทำงานเป็น 2 แบบ ซึ่งแบบแรกจะเริ่มการตัดเอนไซม์ Caspase-3 ที่อยู่ในรูปของ Procaspase-3 จากนั้น Caspase-3 ซึ่งมีหน้าที่ในการเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน จึงเริ่มทำหน้าที่ของมันเอง ด้วยการไปตัดโปรตีน DFF หรือ CAD/ICAD complex โปรตีน CAD จึงถูกปลดปล่อยและผ่านเข้าไปภายใน Nuclear membrane ไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบภายในนิวเคลียส เช่น Topoisomerase II (Gyrase) ซึ่งหน้าที่หลักของ Gyrase คือการตัด DNA ทำให้เกิดการหลุดตัวของโครมาตินให้สามารถพันตัวอยู่ในนิวเคลียสได้ ในที่สุดจึงเกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ขึ้น สำหรับหน้าที่ของ Caspase-8 แบบที่สองคือการไปตัดโปรตีน Bid เพื่อให้เริ่มทำงานโดยเป็นตัวไปกระตุ้นไมโทคอนเดรียให้ปลดปล่อย Cytochrome C ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการเกิด Apoptosis อีกทางหนึ่ง (Nagata, 2000)



ภาพที่ 4 โครงสร้างจำลองของ Caspase-3 ในรูป Proenzyme ที่ประกอบด้วย Prodomain ที่อยู่ทางด้านปลาย N-terminal และมีส่วนของ Large subunit ขนาดประมาณ 20 kDa ส่วนของ Small subunit ประมาณ 10 kDa ตำแหน่งที่ถูกตัดบริเวณจำเพาะเจาะจงในตำแหน่ง Arginine-9 (D9) หรือ Arginine-28 (D28)

ที่มา: Pokpong *et al.* (2007)



ภาพที่ 5 กลไกการเกิด Apoptosis โดยอาศัย Caspase-3 เป็นตัวรับตัวสุดท้ายใน Cascade ของกลุ่มโปรตีน Caspases

ที่มา: Nagata (2000)

จากรายงานของ Cheah *et al.*, (2005) ซึ่งได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของ Neutrophil กับการทำงานของ Nuclear factor-kappa B (NF-KB) พบว่าการใช้เอนไซม์ Caspase-3 สามารถกระตุ้น Neutrophil ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้ โดยทดลองในทารกแรกเกิดพบว่าหาก Neutrophil ทำงานล่าช้าลง จะสามารถชักนำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังในตับ ไปเป็นโรคตับได้ และจากการทำงานที่ผิดปกติของ Neutrophil ในลักษณะเช่นนี้มีผลเช่นเดียวกับการใช้ NF-KB เป็นตัวไปกระตุ้น Neutrophil โดยส่งผลให้ Neutrophil ทำงานได้อย่างล่าช้าเช่นเดียวกัน

มีรายงานการพบเอนไซม์ Caspase-3 จากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดรวมทั้งในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่นปลา Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) โดย Reis *et al.*, (2007) ได้ทำการศึกษาการโคลนและศึกษาคุณลักษณะของ cDNA ของ Caspase-3 ในปลาชนิดนี้ จากการใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกอย่างหลากหลายในอวัยวะต่าง ๆ จากปลาที่ไม่ได้ถูก

กระตุ้น โดยมีการแสดงออกอย่างเบาบางเท่านั้นในโทมัสและหัวใจ และหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเฉพาะในไตส่วนหน้าเท่านั้น สำหรับผลของการศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก Open reading frame (ORF) มีความยาวเท่ากับ 281 Residues โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับปลา *Takifugu rubripes* หรือปลา *Fugu* มากที่สุด และยังมี Pentapeptide active-site motif คือ QACRG ซึ่ง Motif ดังกล่าวนี้นำหน้าที่เป็นตำแหน่ง Active site ของเอนไซม์ Caspase-3 นั่นเอง และยังมีตำแหน่ง GSWFI และ RGD motif ที่เป็น Protein binding domain อีกด้วย สำหรับรายงานของ Yabu *et al.*, (2001) ซึ่งได้ทำการศึกษาคูณลักษณะของ Caspase-3 ใน Zebra fish (*Danio rerio*) โดยอาศัย Ceramide เป็นตัวกระตุ้นให้เกิด Apoptosis ผลการศึกษาสามารถพบ Caspase-3 ในเอมบริโอที่ 12 ชั่วโมง ภายหลังปฏิสนธิของปลาชนิดนี้ โดยการใช้ Ceramide เป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ขึ้นในกระบวนการพัฒนาตัวของตัวอ่อนของ Zebra fish ซึ่งปกติแล้ว Ceramide จะทำหน้าที่เป็น Signalling pathway ผ่านเอนไซม์ในกลุ่ม Caspases โดยมีลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก ORF มีความยาวเท่ากับ 282 Residues และมีลักษณะของ Pentapeptide active-site motif คือ QACRG เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาการโคลนและศึกษาคูณลักษณะของยีน Executioner Caspases เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Hyperthermia) ในเอมบริโอของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) ผลการศึกษาพบว่าสามารถค้นพบยีน Caspase ได้ 5 ชนิด ด้วยกัน ได้แก่ Caspase-3A, Caspase-3B, Caspase-6A, Caspase-6B และ Caspase-7 สามารถค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นเต็มของ Caspase-3B ได้ โดยมี ORF ของ Proenzyme เท่ากับ 279 Residues แต่ใน Caspase-3A พบเพียงบางส่วนของ Sequence เท่านั้น และมี ORF ของ Caspase-7 เท่ากับ 245 Residues ซึ่งขาดกรดอะมิโนบางส่วนของ Prodomain กับ Large subunit สำหรับ ORF ของ Caspase-6A และ Caspase-6B เท่ากับ 294 และ 302 Residues ตามลำดับ ซึ่งพบว่าในระยะการพัฒนาของตัวอ่อน (Embryogenesis) ของปลาหากมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำอย่างผิดปกติ จะสามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้ ซึ่งจะก่อให้เกิดความพิการในลูกปลาวัยอ่อนได้ (Takel *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กุ้งขาว หรือ White shrimp (*Penaeus merguensis*) มีการศึกษาการโคลนและการแสดงออกของ Caspase-3 จากเม็ดเลือด (Haemocytes) ของกุ้งขาว โดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนทั้งสิ้น 320 Residues และมี Conserved pentapeptide เป็น QACRG ซึ่งทำหน้าที่เป็นบริเวณจดจำ Active site ของ Caspases เช่นเดียวกัน และผลจากการฉีดกระตุ้นด้วย White spot syndrome virus (WSSV) นาน 24 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีนชนิดนี้มากทั้งในกุ้งปกติและกุ้งที่ฉีดด้วย WSSV สำหรับกุ้งที่ใกล้ตาย (Moribund) สามารถพบการ

แสดงออกของยีน Caspase-3 ได้อย่างเบาบางไปจนถึงไม่มีการแสดงออกเลย (Phongdara *et al.*, 2006)

5. Granzyme

เอนไซม์ Granzymes โดยทั่วไปแล้วจะถูกสร้างจาก Cytotoxic T cells และ Natural killer cells ที่เป็นการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive or Acquired immunity) โดยผ่านเซลล์ (Cell-mediated immune response) ซึ่ง Granzymes สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยในกลไกที่มี Granzyme ภายในเซลล์นั้นเราจะเรียกว่า “Granzyme-mediated pathways” ที่ตอบสนองการกระตุ้นจากจุลชีพที่อาศัยอยู่ในเซลล์ ได้แก่ ไวรัสและแบคทีเรียบางชนิด

Granzymes เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ Serine proteases ซึ่งปลดปล่อยมาจาก Cytoplasmic granules ของ Cytotoxic T cells และ Natural killer cells หน้าที่หลักของเซลล์เหล่านี้คือสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ในเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไวรัสหรือแบคทีเรีย (Obligate intracellular microbes) บางชนิด (Bots and Medema, 2006) เซลล์เป้าหมายจะถูกทำลายโดย Cytotoxic T cells และ Natural killer cells จากการสร้างโปรตีนที่เรียกว่า “Perforin” ในขั้นต้นเมื่อ Perforin ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ดังกล่าวนี้ Perforin จะมีหน้าที่หลักในการสร้างรูบนพื้นผิวของเซลล์เป้าหมายแล้วจึงปลดปล่อย Granzymes เช่น Granzyme B ที่บรรจุอยู่ใน Granules จากนั้น Granzyme B ซึ่งเป็นเอนไซม์ Serine protease จะกระตุ้นเอนไซม์ในกลุ่มของ Caspases ที่มีอยู่หลายตัวด้วยการตัดในส่วนที่เป็น Aspartate residues (Buzza and Bird, 2006) แล้วจึงเกิด Cascade ของ Caspases ไปจนถึง Caspases ตัวสุดท้ายนั่นคือ Caspase-3 ในที่สุดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis จึงเกิดขึ้น

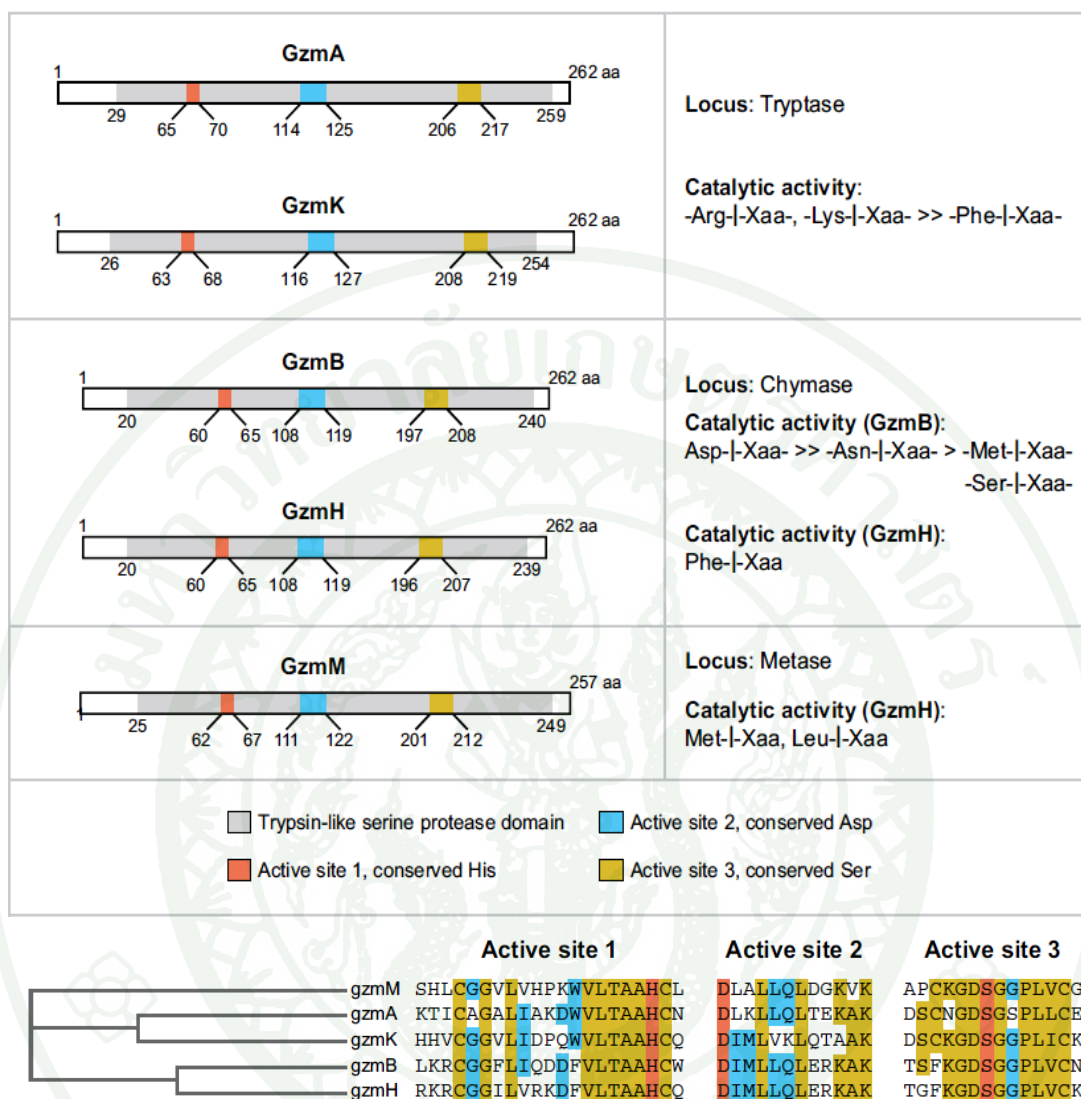
5.1 ชนิดของ Granzymes

ในปัจจุบันในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้น จะสามารถแบ่งกลุ่มของ Granzymes ได้เป็น 5 กลุ่มตามชนิดของ Substrate ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยรายงานที่พบในมนุษย์ ได้แก่ Granzyme A, Granzyme B, Granzyme H, Granzyme K และ Granzyme M และในหนูสามารถแบ่งได้ 4 ชนิด ได้แก่ Granzyme A, Granzyme B, Granzyme K และ Granzyme M ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ Granzymes ในมนุษย์ (Grossman *et al.*, 2003) สำหรับ Granzyme C จากหนูจะมีโครงสร้างคล้าย

กับ Granzyme H ในมนุษย์มากที่สุด โดย Granzyme จากหนูที่มีรายงานทั้งสิ้นถึง 10 ชนิด สำหรับชนิดที่เหลือได้แก่ Granzyme E, Granzyme F, Granzyme G และ Granzyme N นั้น ยังไม่ทราบหน้าที่และการทำงานที่ชัดเจน แต่พบการแสดงออกใน Cytotoxic T lymphocytes จาก Testis ของหนูเช่นเดียวกัน (Bots and Medema, 2006)

โดยอาศัย Substrate ของโปรตีน Granzyme ทำให้สามารถนำมาจัดกลุ่มของ Granzyme ตาม Locus ที่พบ (ภาพที่ 6) แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ซึ่งพบได้ทั้งในมนุษย์และหนู (Chowdhury and Lieberman, 2008) ได้แก่ Locus tryptase ที่ประกอบด้วยกลุ่มของ Granzyme A และ K ที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 5 (มนุษย์) กับโครโมโซมแท่งที่ 13 (หนู) มีหน้าที่สำคัญเป็นสารเคมีในการก่อภูมิแพ้ที่สร้างมาจาก Mast cell ซึ่งทำหน้าที่ในการไปทำลายเนื้อเยื่อและยับยั้งการผลิตโปรตีนที่สำคัญบางชนิด เพื่อใช้สำหรับการพัฒนาตัวอ่อน (Embryo), Locus chymase ซึ่งได้แก่ กลุ่มของ Granzyme B และ H บนโครโมโซมแท่งที่ 14 (มนุษย์) ถูกสร้างมาจาก Mast cell เช่นเดียวกันแต่ทำงานร่วมกับ Granulocytes ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อจุลชีพหรือปรสิตต่าง ๆ (Caughey, 2007) และ Locus metase บนโครโมโซมแท่งที่ 19 (มนุษย์) กับโครโมโซมแท่งที่ 10 (หนู) จัดอยู่ใน Granzyme M ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางให้เกิดการชักนำการตายของเซลล์ ผ่านทางวิถีของ Caspases (Kelly *et al.*, 2004)

ในขั้นตอนที่ Granzyme ผ่านเข้าไปในเซลล์เป้าหมายโดยอาศัย Receptor ที่มี Electrostatic interactions กับ Heparan sulphate ซึ่งเป็น Proteoglycans โดยมี Receptor ที่เรียกว่า “Mannose-6-phosphate” ที่อยู่บนผิวเซลล์ เมื่อ Granzyme เข้าไปในไซโตพลาซึมโดยอาศัยโปรตีน Perforin ที่มีลักษณะเป็น Pore-forming molecule สามารถทำให้เกิด Permeabilization ที่เยื่อหุ้มเซลล์ จนเกิดรูของ Perforin จะเป็นช่องทางให้ Granzyme ผ่านเข้าไปในเซลล์เป้าหมาย โดยรูจะนี้อยู่ได้ระยะหนึ่งโดยในส่วนของขั้นตอนการเกิดรูนั้น Perforin จะจับรวมตัวกัน (Perimerizes) ในสภาพที่มี Calcium เป็น Cofactor ซึ่งจะทำให้ได้โครงสร้างที่คล้ายกับ Complement C9 ซึ่งเซลล์เป้าหมายจะสูญเสียความสามารถของการควบคุมน้ำและเกลือแร่ไป หลังจากนั้น Plasma membrane ของเซลล์ จะทำการซ่อมแซมตัวเองอีกครั้ง (Catalfamo and Henkart, 2003)



ภาพที่ 6 การจัดกลุ่มของยีน Granzymes ตามโครงสร้างของ Catalytic active site

ที่มา: Chowdhury and Lieberman (2008)

5.2 บทบาทของ Granzyme ชนิดต่าง ๆ ในการเกิด Apoptosis ภายในเซลล์

5.2.1 Granzyme A ทำหน้าที่หลักในการเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ โดย Granzyme A เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เข้าไปตัด Single-strand DNA ในระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้การตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นจากการชักนำด้วย Granzyme A นี้ จะไม่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม Caspases และ Granzyme A ยังมีความแตกต่างจาก Granzyme B ที่

ตำแหน่งของการทำงาน นั่นคือ Granzyme A ทำให้เกิดความเสียหายในส่วนของ Inner membrane ในไมโทคอนเดรีย และปลดปล่อยสารเคมีที่ได้จากกลไกของ Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสามารถพบได้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ ส่วน Outer membrane ยังคงมีสภาพอยู่ได้ และยังมีบริเวณที่สามารถสร้างโปรตีนในกลุ่มของ Pro-apoptotic ได้แก่ Cytochrome C, High temperature required protein A2 (HtrA2) หรือเรียกว่า “Omi หรือ Second mitochondria-derived activator of Caspases/ Direct IAP-binding protein with low pI (Smac/Diablo)” ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยังไม่ได้ถูกปลดปล่อยออกมา (Chowdhury *et al.*, 2006; Martinvalet *et al.*, 2005)

จากภาพที่ 7 เป็นกลไกหนึ่งที่น่าสนใจ Cytotoxic T cells ในการกำจัดเซลล์ Tumor และเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อจากไวรัส โดยการปลดปล่อยโปรตีน Perforin ที่สร้างมาจาก Cytotoxic T cells ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่ในการจับกับผนังเซลล์ ทำให้เกิดรู จากนั้น Granzyme A และ Granzyme B จะเข้าไปภายในเซลล์ โดย Granzyme B จะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Caspases เพื่อเข้าไปตัดโปรตีน Caspase-activated DNase Inhibitor (ICAD) ที่ปลดปล่อยมาจาก DNA Fragmentation factor 40 (DFF40) จนทำให้เกิดการแตกหักของ DNA ที่อยู่ภายในนิวเคลียส สำหรับ Granzyme A นั้น เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีการปลดปล่อยออกมาในปริมาณมากจาก Cytotoxic T cells โดยกลไกที่เกิดขึ้นนั้น Granzyme A จะทำการตัด SET complex ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบไปด้วย SET, NME1, Apurinic endonuclease 1 (Ape1), pp32 และ HMG2 โดยทั้งหมดเป็น Substrate ที่มีความจำเพาะต่อ Granzyme A เท่านั้น และ พบว่ายีน NM23-H1 หรือ NME1 (ภาพที่ 7) จะเข้าไปทำลาย DNA โดยการทำให้เกิด DNA fragmentation ที่อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์เป้าหมาย โดย NME1 นี้จะเป็น Suppressor ของยีน Tumor เป็นผลทำให้การเกิด Tumor มีจำนวนลดลง (Fan *et al.*, 2003)

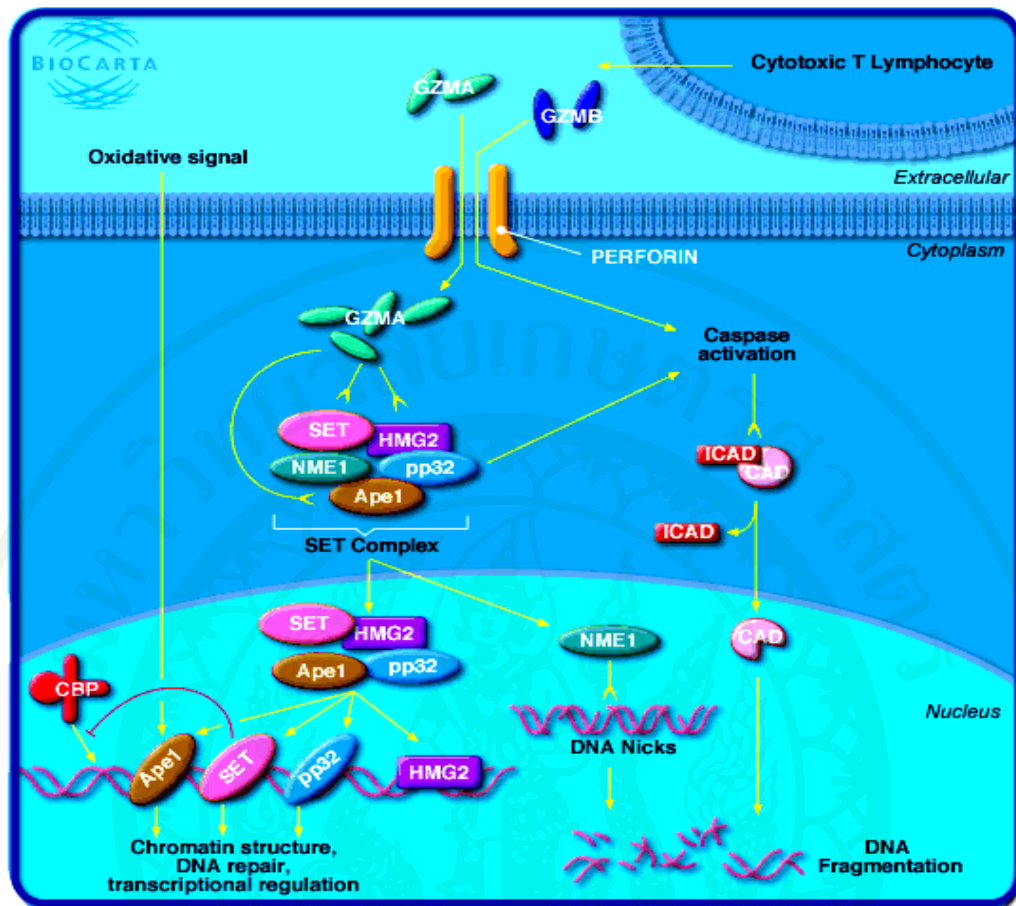
หลังจากที่โปรตีน SET complex ถูกตัดแล้วจะพบว่าโปรตีนที่หลุดออกมา จะทำหน้าที่ในการยับยั้งการถูกทำลายของ DNA ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะสามารถผ่านเข้าไปภายในนิวเคลียส และจะทำงานร่วมกับ cAMP response element binding protein (CBP) สำหรับโปรตีน Apurinic endonuclease (Ape1) เมื่อหลุดออกมาจาก SET complex จะทำหน้าที่เป็นตัวซ่อมแซมความเสียหายของ DNA เช่นเดียวกับโปรตีน HMG2 จะเข้าไปจับกับสาย DNA เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA ให้เหมาะสมจนสามารถเกิดกระบวนการ Transcription ขึ้นได้ ในขณะที่ โปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยับยั้ง NM23-H1 ที่ชื่อ SET จะทำงานร่วมกับ CBP ซึ่งเป็นตัว Coactivator ในกระบวนการ Transcription เช่นเดียวกันและสำหรับโปรตีน pp32 ทำหน้าที่ยับยั้งยีน Tumor จะสามารถกระตุ้นการเกิด Cascade ของเอนไซม์ Caspases ได้อีกทางหนึ่ง เป้าหมายต่อไปของ

Granzyme A คือโปรตีน Nuclear lamins ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในการรักษาสภาพของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear envelope) และโปรตีน Histone H1 ทำหน้าที่รักษาโครงสร้างของโครโมโซม โดย Granzyme A จะตัดโปรตีน Nuclear lamins ทำให้เกิดช่องทางการเข้าในภายในนิวเคลียส แล้ว Granzyme A จึงตัดโปรตีน Histone H1 ในที่สุดจึงเกิด DNA fragmentation ตามมา (Lieberman and Fan, 2003)

5.2.2 Granzyme B หรือ Serine protease B เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ในกลไก Apoptosis โดย Granzyme B จะไปตัดบริเวณ Carboxyl side ของ Aspartate residues ของเอนไซม์ Caspases ซึ่งเป็น Substrate ที่เฉพาะเจาะจงของ Granzyme B ซึ่งจะเริ่มต้นจากการปลดปล่อย Granzyme B ที่สร้างมาจาก Cytotoxic T cell หรือ Natural killer (NK) cell เข้าสู่เซลล์เป้าหมายผ่าน Perforin ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด Lytic ของเซลล์ (Fan and Zhang, 2005)

กลไกการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยการกระตุ้นผ่าน Granzyme B จะเกิดขึ้นเมื่อ Granzyme B เข้าสู่ภายในไซโตพลาซึมของเซลล์แล้ว Granzyme B จะไปตัดบริเวณ Aspartate residues ของเอนไซม์ Procaspases-3 ซึ่งเป็น Substrate ของ Granzyme B ให้เริ่มต้นทำงาน (Cullen and Martin, 2008) จากนั้น Caspase-3 จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ไปตัดโครงสร้างเชิงซ้อนของโปรตีน ระหว่างโปรตีน Caspase-activated DNase (CAD) กับโปรตีน Caspase-activated DNase inhibitor (ICAD) ทำให้โปรตีนทั้งสองเกิดการแยกตัวออกจากกัน จากนั้น CAD จึงเข้าไปในนิวเคลียสแล้วเริ่มทำหน้าที่ โดยจะรวมตัวเข้ากับเอนไซม์ Topoisomerase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดสาย DNA ทำให้ DNA ขาดหรือแตกหัก เกิดการหลุดตัวของโครมาติน ทำให้เกิดการแตกของสาย DNA (DNA fragmentation) ในที่สุดจึงเกิด Apoptosis ขึ้น (ภาพที่ 8)

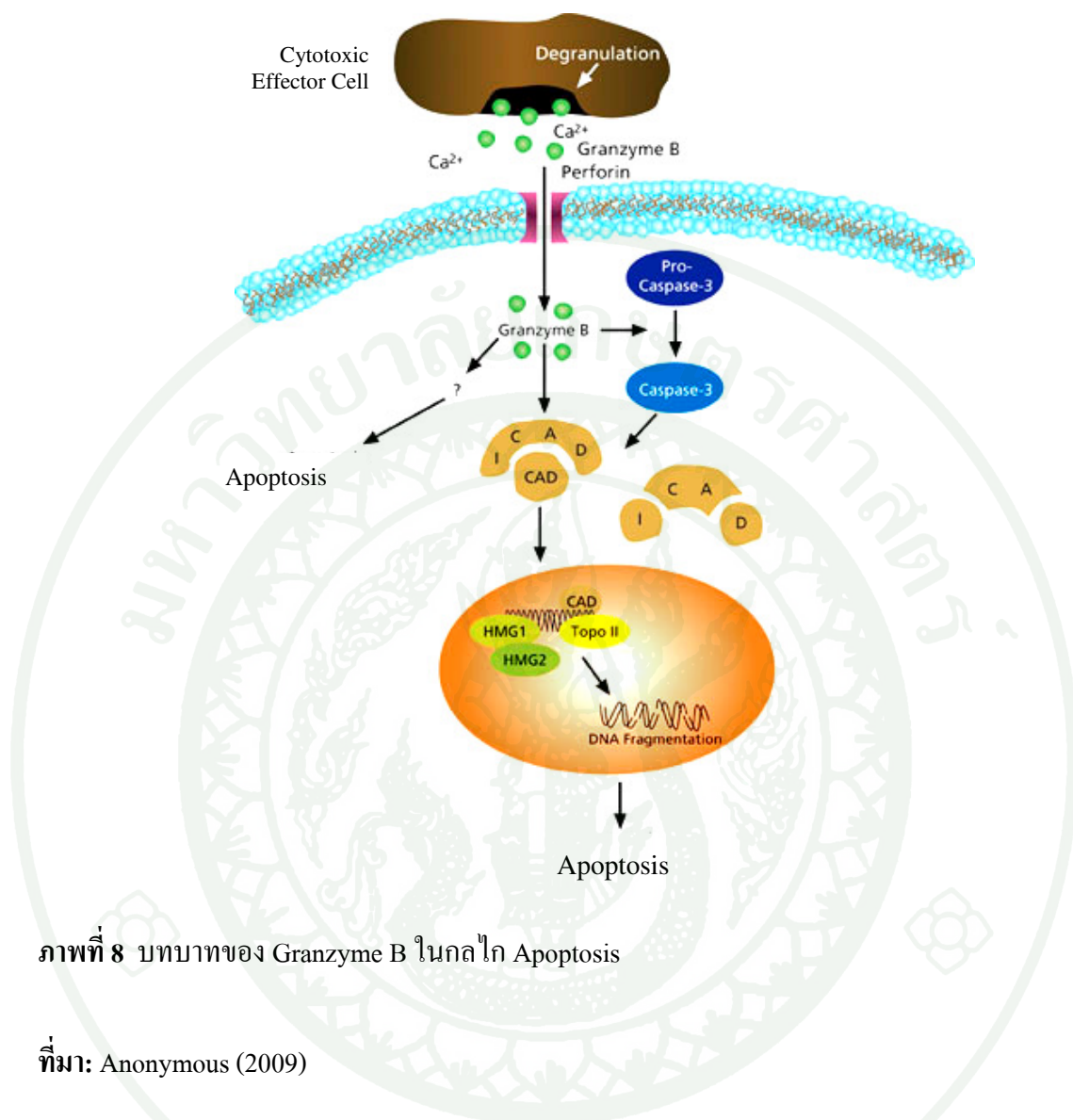
นอกจากเอนไซม์ในกลุ่มของ Caspases ที่เป็น Substrate ของ Granzyme B ยังมี Substrate ตัวอื่น ๆ ที่จำเพาะเจาะจงอีกในการถูกตัด ได้แก่ Bid ซึ่งเป็น Pro-apoptotic เมื่อ Bid ถูกตัดแล้วจะเคลื่อนตัวเองเข้าไปในไมโทคอนเดรียเพื่อจับกับ Bax หรือ Bak ที่อยู่บริเวณ Outer membrane ซึ่งผลที่ได้คือการปลดปล่อย Cytochrome C ซึ่งจะไปรวมตัวกับ Caspase-9 และกลายเป็น Apoptosome แล้วจึงไปตัดโปรตีน Procaspase-3 ที่รออยู่เพื่อกระตุ้นให้เกิด Apoptosis อีกทางหนึ่ง (Cullen and Martin, 2008)



ภาพที่ 7 กลไกการทำงานของ Granzyme A และ B ในการเกิด Apoptosis ภายในเซลล์โดยผ่านทาง Cytotoxic T lymphocytes ในกระบวนการ Cell mediated immune responses

ที่มา: Croston (2009)

5.2.3 Granzyme C และ Granzyme H ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่เรียกว่า “Orphan granzyme” เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาข้อมูลมากนัก ซึ่งมีรายงานการพบยีนกลุ่มนี้หลายชนิดในหนู ได้แก่ Granzyme C, Granzyme D, Granzyme E, Granzyme F, Granzyme G, Granzyme K, Granzyme L, Granzyme M และ Granzyme N ถ้าหากเป็นกลุ่มของ Granzyme ที่พบในมนุษย์ ได้แก่ Granzyme H, Granzyme K และ Granzyme M โดยทั่วไปแล้วกลุ่ม Granzymes ดังกล่าวพบได้ค่อนข้างน้อยถ้าเทียบกับ Granzyme A และ Granzyme B



ภาพที่ 8 บทบาทของ Granzyme B ในกลไก Apoptosis

ที่มา: Anonymous (2009)

Granzyme C เป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งในกลุ่มของ Serine proteases ที่ถูกสร้างมาจาก Cytotoxic T-cell และ Natural killer cell ของหนู ซึ่งมีชื่อเรียกอื่นว่า Cytotoxic cell protease-2 (CCP2) โดยเป็น Homolog กับยีน RNKP-4 ของหนู หน้าที่ของ Granzyme C จะเป็นตัวกระตุ้นในกลไกที่เกี่ยวข้องกับไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายบริเวณ Membrane ของไมโทคอนเดรีย ผลที่ได้คือไมโทคอนเดรียปลดปล่อย Cytochrome C ออกมากระตุ้นให้เกิดกลไกของ Apoptosis จากนั้นยังทำงานคล้ายกับ Granzyme A ตรงที่ทำให้เกิดการขาดของ Single-Stranded DNA เช่นกัน (Johnson *et al.*, 2003)

ส่วน Granzyme H นั้น จัดอยู่ในกลุ่มของ Locus chymase ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ Granzyme B แต่ส่วนใหญ่แล้วจะทำหน้าที่ใกล้เคียงกับ Granzyme C โดยหน้าที่และบทบาทยังคงไม่แน่ชัดนัก

5.2.4 Granzyme K หรือ Granzyme-3 เป็นเอนไซม์อีกตัวหนึ่งที่จัดอยู่ใน Locus tryptase ที่พบอยู่บนโครโมโซมเดียวกับ Granzyme A ซึ่งถูกค้นพบใน RNK-16 cell line ของหนูจากการเริ่มเกิด Apoptosis ที่เลี้ยงไว้นานกว่า 14 ชั่วโมง ใน Cytotoxicity assay (Shi *et al.*, 1992) โดย Granzyme K จะมีปริมาณที่พบน้อยกว่า Granzyme A อย่างไรก็ตามเอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่และทำงานโดยไม่เกี่ยวข้องกับโปรตีนในกลุ่ม Caspases ซึ่งทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบ Apoptosis แต่จะไปรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดการสร้าง Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนี้ Granzyme K ก็ไม่สามารถทำให้เกิดการชักนำให้เกิดการปลดปล่อยโปรตีนชนิด Pro-apoptotic เช่น Bid หรือ Bax ได้เช่นกัน (Grossman *et al.*, 2003)

5.2.5 Granzyme M เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ Serine protease ที่ค้นพบในมนุษย์และหนู พบว่ามีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่เกิด (Innate immunity) ซึ่งพบว่าถูกสร้างมาจาก Natural killer cells แต่จะแตกต่างจาก Granzyme ชนิดอื่นตรงตำแหน่งตัดของ Substrate เป็น Methionine หรือ Leucine residues แทน สำหรับหน้าที่และการทำงานของ Granzyme M ไม่จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนในกลุ่มของ Caspases แต่จะมีบทบาทไปรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะไม่สามารถทำให้เกิดการแตกหักของ DNA ได้ (Chowdhury and Lieberman, 2008) และจากการศึกษาของ Pao *et al.* (2005) พบว่าหากหนูขาด Granzyme M ในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงหรือการพัฒนาตัว (Development) และการรักษาระดับความสมดุลของเซลล์ (Homeostasis) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์ Tumor ได้

จากการศึกษาส่วนใหญ่แล้ว พบว่ามีรายงานการศึกษายีน Granzyme ชนิดต่าง ๆ ในมนุษย์และหนูเป็นส่วนใหญ่ โดยการศึกษาจะเกี่ยวข้องกับการรักษาโรคที่เกิดจากมะเร็งหรือเนื้องอก หรือเกิดจากการติดเชื้อภายในเซลล์ เช่น ไวรัส ซึ่งยีน Granzyme จะเป็นตัวกลางสำคัญที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ในกลไกการตายของเซลล์ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Praveen *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาลักษณะของยีน Granzyme ในปลากระดูกแข็ง (Teleost) โดยสามารถค้นพบยีนชนิดนี้ได้เป็นครั้งแรก จากการศึกษาพบว่าเป็นยีนในกลุ่ม Granzyme-like serine protease ที่ได้จาก Cytotoxic cells ที่เป็น Nonspecific cytotoxic cells (NCC) ในปลา Channel catfish หรือเรียกว่า

“Channel catfish Granzyme-1 (CFGR-1)” ซึ่งยีนชนิดนี้มีลักษณะโครงสร้างของยีนคล้ายกับยีน Granzyme A และ Granzyme K เพราะมี Substrate ที่จำเพาะเป็น Arginine หรือ Lysine residues และยังพบว่าการแสดงออกของยีนชนิดนี้มากในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระสเล็ด ใต้ส่วนหน้า และม้าม และจากการศึกษาของ Praveen *et al.* (2006a) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและลักษณะของ ยีน Granzyme อีกครั้ง โดยสามารถค้นพบยีน Granzyme ได้ในปลานิล (Nile tilapia) ซึ่งสร้างมาจาก Nonspecific cytotoxic cells (NCC) และเรียกยีนชนิดนี้ว่า “Tilapia granzyme-1 (TLGR-1)” ผลจากการศึกษาโครงสร้างของยีนพบว่าประกอบด้วย 5 Exons และ 4 Introns ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน TLGR-1 ทั้งหมด 2,541 bp โดยมีลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ใน Open reading frame (ORF) เท่ากับ 254 Residues และจากการทำ Alignment ยังพบบริเวณลำดับกรดอะมิโน IIXG motif ทางด้าน N-terminal ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในกระบวนการเกิด Apoptosis ซึ่งจำเพาะ สำหรับกลุ่มยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ด้วย (Bode *et al.*, 1989)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ตัวเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 800 กรัม จำนวน 21 ตัว และปลานิลน้ำหนักประมาณ 40 กรัม จำนวน 81 ตัว จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. อาหารเม็ดสำเร็จรูป
3. ตู้กระจกขนาด 100 ลิตร และเครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
4. เครื่องชั่ง Mettler PJ 400
5. ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Mirage)
6. ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Thermo Forma)
7. Autoclave (Hirayama)
8. Centrifuge DYNAC II (Centrifuge Clay Adams)
9. Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
10. Cylinder ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
11. Electrophoresis machine, MyRun (Bioactive)
12. Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
13. Gel documentation system (Syngene)
14. Glass/Teflon potter homogenizers
15. Green SSeriker II, VS-8480 SFN (Vision Scientific)
16. Grinder (Asahi Glass Co., Ltd.)
17. Hot air oven (Memmert)
18. Incubator (Memmert)
19. Microwave oven (Sanyo Electric Co., Ltd.)
20. Microcentrifuge Mikro 200R (Hettich)
21. Micropipette ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Costar)
22. Minicentrifuge (Profuge 6K, Korea)
23. Monovette ขนาด 92x11.5 มิลลิเมตร (Sapstedt)
24. Orbital shaker (Forma Scientific)
25. Optical cap, 8X strip Qty. 120 (Stratagene)

26. PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Costar)
27. Pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร (Gilson)
28. Plastic box for tube ขนาด 1.5/2.0 มิลลิลิตร และ 10x10 channel
29. 96 Well polypropylene plates natural, non sterile 25 plates/case (Stratagene)
30. Power supply power PAC 200 (Bio-Rad)
31. Real-time PCR machine (Mx Pro 3000P QPCR, Stratagene)
32. Spectrophotometer, Spectronic 401 (Milton Roy)
33. Spectrophotometer, Spectronic 2000 (Bausch&Lomb)
34. Syringe needle No. 20, 22 และ 24 (Nipro)
35. Takara gradient thermal cycler (Takara)
36. TOMY MX-301 High speed refrigerated microcentrifuge (Meditop)
37. Tube ขนาด 15 มิลลิลิตร (Neptune)
38. Vortex-2 genic (Scientific Industries, USA)
39. Waterbath shaker 1083 (GFL)
40. สารเคมีสำหรับงานทางอณูชีวโมเลกุล
 - Absolute ethanol; C_2H_5OH (Merck)
 - 40% Acrylamide/Bis-solution, 19:1 (Bio-Rad)
 - Agarose gel (Conda)
 - Ampicillin sodium salt (Bio Basic Inc.)
 - 5-bromo-4 chloro-3-indoyl- β -D-thiogalactoside; X-Gal (Sigma)
 - Boric acid; H_3BO_3 (Merck)
 - Brilliant[®] II SYBR Green QPCR Master mix (Stratagene)
 - Chloroform, $CHCl_3$ (Merck)
 - Concanavalin A (Bio basic Inc.)
 - 100 mM dNTP (Wardmedic)
 - Diethyl pyrocarbonate (DEPC), $C_6H_{10}O_5$ (Sigma)
 - Dimethyl sulfoxide (DMSO), $C_6H_{10}O_5$ (Amersco)
 - Ethidium bromide; EtBr (Sigma)
 - Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), disodium salt dehydrate (Fluka)
 - Fetal bovine serum, standard quality (PAA)
 - Formamide และ Formaldehyde (BDH)

- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 0.05 มิลลิกรัม (Wardmedic)
- Glycerol (Bio Basic Inc.)
- Heparin sodium salt (Sigma)
- Isopropyl- β -D-thiogalactoside; IPTG (Sigma)
- Isopropanol (Merck)
- Lymphoprep (Axis-shield)
- Magnesium chloride; $MgCl_2$ (Merck)
- N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine; TEMED (Bio-Rad)
- 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid; MOPS (Bio basic Inc.)
- Penicillin/Streptomycin (PAA)
- Phosphate-buffer saline (PBS)
- RPMI medium 1640 (Gibco)
- Sodium chloride; NaCl (Merck)
- Sodium hydroxide; NaOH (Eka-Nobel)
- Sterile distilled water; dH_2O
- Tri-Sodium citrate dihydrate (Scharlau)
- Tris-base; Tris-Hydroxymethyl amino methane (Pacific science)
- Trizol reagent (Molecular Research Center)

41. ชุด Kit สำเร็จรูป

- BD Smart™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience clontech)
- Plasmid DNA Extraction Kit (Bioexcellence)
- Quick Prep® Micro mRNA Purification Kit (Amersham pharmacia biotech)
- RevertAid™ First Stand cDNA synthesis Kit (Fermentas)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

42. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) และ Cloning vector

- *Bam* HI (Fermentas)
- *Eco* RI (Fermentas)
- *Taq* DNA polymerase (Fermentas)
- *Xho* I (Fermentas)
- pGEM®-T- Easy Vector (Promega)

43. สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย
- *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109
 - *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ AQSA001
 - *Aeromonas hydrophila* สายพันธุ์ AQAH001
44. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก)
- Luria Bertani Broth (LB Broth)
 - Luria Bertani Agar (LB Agar)
 - Trypticase Soy Broth; TSB (Difco)
 - Trypticase Soy Agar; TSA (Difco)
 - Yeast extract (Scharlau)
 - Super Optimal Culture Medium (SOC Medium)
45. โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน
- BLASTN and BLASTX program
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BlastN>
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BlastX>
 - CLUSTALW program
 - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>
 - DAS transmembrane prediction program
 - <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>
 - EMBOSS Pairwise alignment algorithms
 - <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>
 - ExPASy Proteomics Server
 - <http://au.expasy.org/tools/protparam.html>
 - MatGat version 2.01
 - MEGA program version 3.0
 - MxProTM QPCR software version 4.0
 - Genetyx[®] version 7.0
 - PROSITE predictions
 - <http://au.expasy.org/prosite>
 - PSIPRED Protein Structure Prediction Server
 - <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>

- Vecscreen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Oligonucleotide primers	Sequence 5' → 3'
T3 primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7 primer	TAATACGACTCACTATAGGG
M13F primer	TTGTAAAACGACGGCCAGTG
M13R primer	CCTTTGTCGATACTGGTACT
Caspase F1 primer	GGACCTGGAGTGGACGATACA
Caspase R1 primer	AGGGGAGAAGGCGTAGAGGA
Caspase F2 primer	ACAGATCTGGATCCAGGCAT
Caspase R2 primer	ATCACTGATCCCTGAAGCCA
Caspase F3 primer	TGCAGGCAACGCCATGAGAGTATT
Caspase R3 primer	TACTGAGCCGTCCGTACCAAAGAA
Granzyme F1 primer	ACGTCGCTGATACCTGTCAAG
Granzyme R1 primer	ATGTGGTGGACTAGCCAAGTG
Granzyme F2 primer	ACAGGTATCAGCGACGTTTGTACC
Granzyme R2 primer	GACTGATGCTGGTGGTTTCACACA
β -actin F1 primer	GGTCATCACCATTGGCAATG
β -actin R1 primer	GAGTAACCGTACCGAAGTCA
β -actin F2 primer	ACAGGATGCAGAAGGAGATCACAG
β -actin R2 primer	GTACTCCTGCTTGCTGATCCACAT

วิธีการ

1. การโคลนและศึกษาคุณลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Complementary DNAs (cDNAs) ของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลตัวเต็มวัยน้ำหนักประมาณ 800 กรัม จำนวน 1 ตัว ที่ไม่มีอาการของโรคมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาดประมาณ 100 ลิตร ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อปรับสภาพปลานิลให้คุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมใหม่ โดยให้อาหารสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวัน เวลาเช้าและเย็น เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน ให้อากาศตลอดเวลาประมาณ 1 สัปดาห์

1.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและการเตรียม Total RNA

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลานิล โดยใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ล้างเนื้อเยื่อด้วย RPMI medium แล้วใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 50-100 มิลลิกรัม เติม Trizol Reagent (Molecular Research Center) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่ลงใน Glinder เพื่อทำการบดเนื้อเยื่อให้ละเอียด ทำลาย Genomic DNA โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24 คูดัชนัยประมาณ 10-15 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วจึงสกัด Total RNA ตามวิธีการของบริษัท Molecular Research Center โดยเติม Chloroform ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อปริมาตรของ Trizol Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลှุดไปมานาน 15 วินาที แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนซึ่งเป็นชั้นของ RNA ไปใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลှุดไปมา แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นเติม 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเก็บรักษา Total RNA แล้วจึงนำ Total RNA ที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.3 การวัดความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่เก็บอยู่ใน 75% Ethanol มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสของ 75% Ethanol ออก แล้วจึงเติม DEPC water เพื่อละลายตะกอน แล้วดูดสารละลาย Total RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปผสมกับ DEPC water ปริมาตร 68 ไมโครลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อวัดความเข้มข้น โดยใช้อัตราส่วน $A_{260} : A_{280}$ ถ้าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 1.65-1.85 แสดงว่ามี DNA ปนอยู่ แต่ถ้าค่าที่ได้มากกว่า 1.85 แสดงว่าได้ RNA ค่อนข้างบริสุทธิ์ แต่ถ้าได้น้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอล (Phenol) ปนอยู่ใน Total RNA ทำการคำนวณหาความเข้มข้นของ RNA ได้จากสูตร (Sambrook *et al.*, 1989)

$$\text{ความเข้มข้นของ RNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40$$

1.4 การตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยวิธี Formaldehyde agarose gel electrophoresis

เตรียม 1% Formaldehyde agarose gel ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน 1X MOPS buffer โดยการชั่ง Agarose 0.5 กรัม ละลายใน 1X MOPS buffer โดยเตรียมจาก 10X MOPS ปริมาตร 4.73 มิลลิลิตร และ DEPC ปริมาตร 42.58 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม Formaldehyde 2.68 มิลลิลิตร ลงในเจล ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในถาด ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วจึงทำการเตรียม Total RNA reaction โดยใช้ส่วนผสมดังนี้คือ Total RNA (จากข้อ 1.3) โดยใช้ Total RNA ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร เติมน้ำลงใน 50% Formaldehyde ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X MOPS ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และ 2.2 M Formaldehyde ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีในน้ำแข็ง จึงเติม Loading dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง ทำการ load Total RNA reaction ที่ได้ลงใน 1% Formaldehyde agarose gel ที่เตรียมไว้บนเครื่อง Electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 90 นาที ทำการตรวจสอบโดยการแช่เจลใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบคุณภาพโดยดูขนาดของแถบ Total RNA ภายใต้รังสี Ultraviolet บันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation system (Syngene)

1.5 การสกัด mRNA

ทำการสกัด mRNA จาก Total RNA ที่ได้ด้วย Quick Prep[®] Micro mRNA Purification Kit (Amersham pharmacia biotech) ตามวิธีการของบริษัท โดยทำการเติมสารละลาย Extraction buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน Total RNA ที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน Oligo (dT)-cellulose ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนที่เหลือด้วย High-salt buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทั้งหมด 5 ครั้ง จากนั้นล้างตะกอนด้วย Low-salt buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายเติม Low-salt buffer ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วจึงดูดสารละลายใส่ลงใน Microspin column ที่วางบน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที เทของเหลวส่วนใสด้านล่างทิ้งหมดทิ้ง แล้วเติม Low-salt buffer ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นย้าย Microspin column มาใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จะได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จึงทำการตกตะกอน mRNA ด้วยการเติมสารละลายไกลโคเจน (Glycogen solution) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต (Potassium acetate solution) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร สุดท้ายเติม 95% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

1.6 การสังเคราะห์ First strand cDNA ของ 5' RACE และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ cDNA ของยีน Caspase-3 และยีน Granzyme ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

นำ mRNA ที่ได้จากข้อ 1.5 มาเป็นต้นแบบการสังเคราะห์ First strand cDNA ของ 5' RACE ด้วย BD Smart[™] RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำ First strand cDNA ของ 5' RACE ที่ได้มาใช้เป็น Template ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของ Caspase-3 cDNA ซึ่งจะใช้ Caspase R1 primer (ตารางที่ 1) และลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของ Granzyme cDNA จะใช้ Granzyme R1 primer (ตารางที่ 1) เป็น Specific primers ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน Caspase-3 โคลน HK 115 (Accession no. FF27959755138633) และลำดับนิวคลีโอไทด์

บางส่วนของ cDNA ของยีน Granzyme โคดอน HK 28 (Accession no. FF27953355138569) จากห้องสมุด cDNA ของปลานิล (เอกพล, 2551) ร่วมกับ Universal primer ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้คือ

Takara LA <i>Taq</i>	0.25 ไมโครลิตร
10X LA Buffer	2.50 ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	2.50 ไมโครลิตร
dNTP	4.00 ไมโครลิตร
Universal primer	2.50 ไมโครลิตร
Specific primer (Caspase-3 หรือ GranzymeR1 primer)	2.50 ไมโครลิตร
น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว	13.25 ไมโครลิตร
First strand cDNA ของ 5' RACE	2.50 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	30.00 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Takara) ที่กำหนดสภาวะการทำงานดังนี้คือ ช่วงแรกของปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 30 รอบ และช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ PCR product เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วย 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE buffer (Tris-Borate-EDTA) ที่กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ แล้วจึงนำเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้รังสี Ultraviolet บันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation system (Syngene)

1.7 การสกัด DNA จาก Agarose gel

สกัด DNA จาก Agarose gel โดย Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System ตามวิธีของบริษัท Promega โดยตัดเจลที่มีแถบ DNA (ภายใต้แสง Ultraviolet) ที่ต้องการใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปล้างแล้วจึงเติม Membrane binding solution ปริมาตร

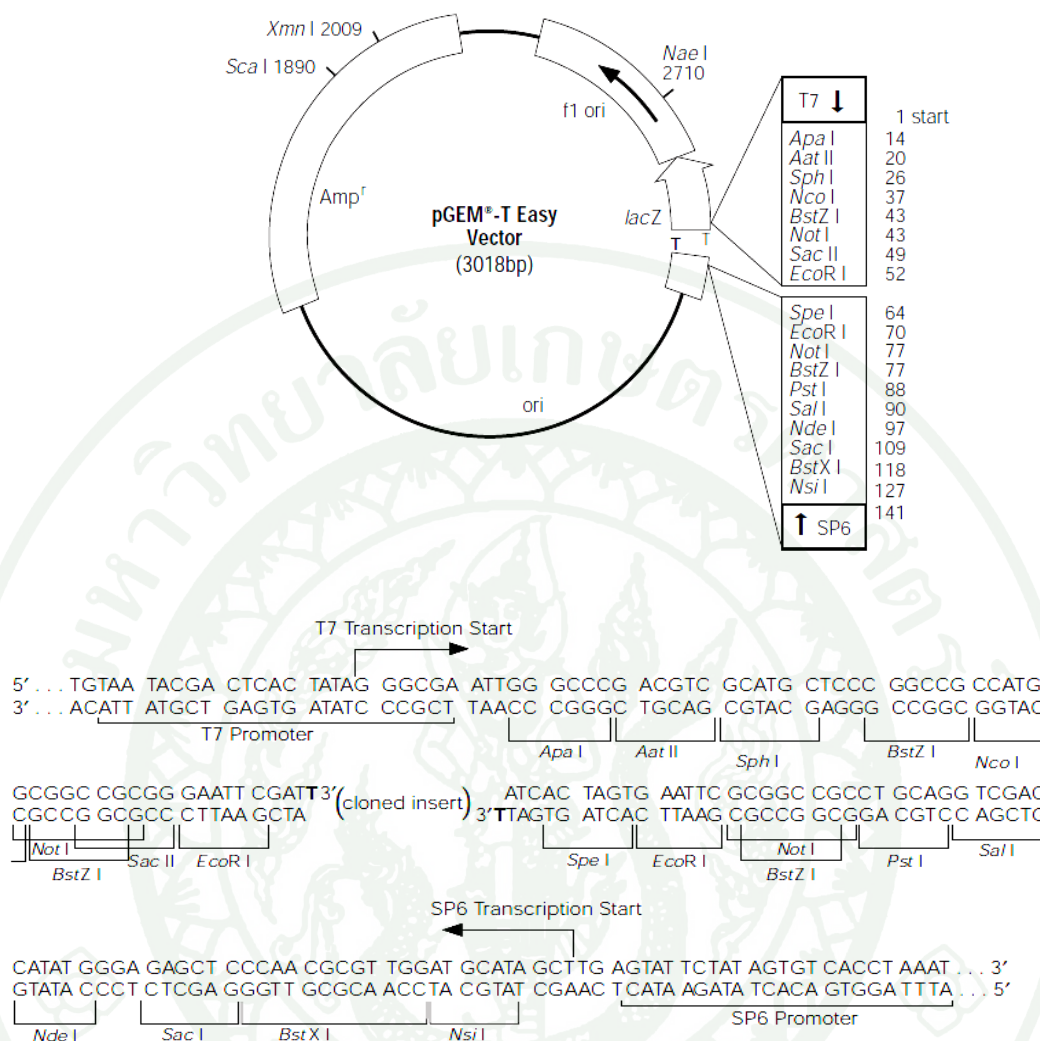
10 ไมโครลิตรต่อ 10 มิลลิกรัม ของน้ำหนักเจล Vortex เพื่อละลายหรือต้มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นระยะ ๆ จนกว่าจะละลาย แล้วนำไปใส่ใน Minicolumn บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม Membrane wash solution ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติม Membrane wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งอีกครั้ง จึงย้าย Minicolumn ไปใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 1 นาที แล้วเติม Nuclease free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จึงทิ้ง Minicolumn สุดท้ายจะได้สารละลาย DNA นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.8 การเชื่อมต่อ DNA fragment จาก PCR product เข้าสู่ Cloning vector (Ligation)

นำ PCR product ที่ต้องการมาเชื่อมต่อเข้าสู่ pGEM T-Easy vector (Promega, USA) ด้วยการนำสารละลาย DNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (จากข้อ 1.7) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร เติม เอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แล้วเติม 2X Rapid ligation buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร สุดท้ายเติม pGEM T-Easy vector (ภาพที่ 9) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร คัดเบา ๆ ด้วยมือ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

1.9 การเตรียม Competent cell

นำเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109 มาเลี้ยงบนอาหาร LB agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แยกโคโลนีเดียวมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อใน Water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน เมื่อเชื้อขึ้นแล้ว เติม 9 มิลลิลิตรของ LB broth เลี้ยงต่ออีก 3 ชั่วโมงที่สถานะเดิม จึงแบ่งใส่ Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด นำเชื้อมาแช่เย็นในน้ำแข็งนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง เติม 0.1 M ของ CaCl_2 ปริมาตร 312.5 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ โดยใช้ Micropipette แล้วแช่ในน้ำแข็งอีก 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่สถานะเดิมอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 0.1 M CaCl_2 ที่มี 15% Glycerol ปริมาตร 187.5 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้



ภาพที่ 9 แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในตำแหน่ง Polylinker ของ pGEM-T Easy vector

ที่มา: Promega (2009)

1.10 การนำ DNA ลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Transformation)

ใช้วิธี Heat shock โดยนำ Competent cell จากข้อ 1.9 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Ligation product จากข้อ 1.8 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร คีดเบา ๆ ด้วยมือ แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 25 นาที ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เติมน้ำอาหาร Super Optimal Culture (SOC) Medium ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ปิดด้วย

Parafilm บ่มเชื้อใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลดปริมาตรของสารละลายให้เหลือประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วดูดขึ้นลงโดยใช้ Micropipette แล้วจึงนำไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร LB Ampicillin, X-gal และ IPTG plate ที่เกลี่ยด้วย IPTG ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร LB agar ไว้ก่อนแล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.11 การทำ Master plate หรือ Replica plate

จากข้อ 1.10 โคโลนีที่คาดว่าจะมี Insert จะมีสีขาว ส่วนโคโลนีที่ไม่มี Insert จะมีสีฟ้า จึงทำการคัดเลือกเอาโคโลนีสีขาวเท่านั้น แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วจิ้มโคโลนี ลงใน LB Ampicillin plate ใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.12 การตรวจสอบผลของการโคลน

ทำการตรวจสอบผลของการโคลน ที่ได้จากแบคทีเรียใน Master plate ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยการใช้ Universal primer 2 ชนิด คือ M13F primer และ M13R primer (ตารางที่ 1) ใช้ DNA ในแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นบน Master plate เป็น Template โดยทำการจิ้มโคโลนีของแบคทีเรียจาก Master plate ลงในหลอด PCR tubes ซึ่งมีสารเคมีที่ใช้สำหรับทำ PCR อยู่แล้ว โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาปริมารรวม 15 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้คือ

5 U/UI <i>Taq</i> DNA polymerase	0.20 ไมโครลิตร
10X <i>Taq</i> buffer + (NH ₄) ₂ SO ₄ - MgCl ₂	1.50 ไมโครลิตร
1.25 mM MgCl ₂	1.875 ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	1.60 ไมโครลิตร
10 μM M13F primer	1.50 ไมโครลิตร
10 μM M13R primer	1.50 ไมโครลิตร
น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว	6.825 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15.00 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่อง Thermal cycler (Takara) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 10 นาที ที่กำหนดสภาวะการทำงานดังนี้คือ ช่วงแรกของปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ PCR product เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE buffer (Tris-Borate-EDTA) ที่กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นำเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้รังสี Ultraviolet บันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation system (Syngene)

1.13 การสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)

นำแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีชิ้น Insert จากข้อ 1.12 มาทำการสกัดพลาสมิด โดยใช้ Plasmid DNA extraction ตามวิธีของบริษัท Bioexcellence โดยนำโคโลนีแบคทีเรียจาก Master plate ที่นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และมีขนาดของ PCR product ใกล้เคียงกับขนาดของชิ้น Insert ที่ต้องการ มาเลี้ยงใน LB Ampicillin broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ขำคั้นมา Vortex แล้วแบ่งใส่ Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วละลายตะกอนด้วยการเติม Cell suspension solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วใช้ Micropipette คูดสารละลายขึ้นลงจนตะกอนละลายหมด จากนั้นเติม Cell lysis solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาช้า ๆ แล้วแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5-10 นาที จึงคูดสารละลายส่วนใสใส่ Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ตะกอนสีขาวติดมา) เติม Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดช้า ๆ อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5-10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วยการเติม 70% Ethanol กลับหลอดไปมาหรือเขย่า เพื่อกำจัดเกลือที่ตกค้าง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5-10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนใสออกช้า ๆ ซับ 70% Ethanol ด้วยกระดาษซับ ทำการตากตะกอนให้แห้งพอหมาดที่อุณหภูมิห้องจน Ethanol ระเหยหมด ละลาย

ตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ถ้าตะกอนไม่ละลายให้บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เข้าเป็นระยะ ๆ สูดท้ายเก็บพลาสติกที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.14 การทำ Restriction enzyme digestion

ทำการตรวจสอบพลาสติก ที่มีชิ้น Insert และขนาดของชิ้น Insert ที่สกัดได้โดยการใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนข้างชิ้น Insert ใน pGEM-T Easy vector (ภาพที่ 9) โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้คือ

10X buffer	2.00 ไมโครลิตร
<i>Eco</i> RI	0.25 ไมโครลิตร
พลาสติก DNA	2.00 ไมโครลิตร
น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว	5.75 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10.00 ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 0.6 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปตรวจสอบผลเพื่อหาขนาดของ Insert ด้วย 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE buffer (Tris-Borate-EDTA) ที่กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นำเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้รังสี Ultraviolet บันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation system (Syngene)

1.15 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน (DNA sequencing)

นำพลาสติก ที่มีชิ้น Insert ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของ PCR product ของ 5' RACE มาทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham pharmacia biotech) โดย Macrogen, Inc. (Korea)

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโนและการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Caspase-3 และยีน Granzyme ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 และยีน Granzyme ในปลานิล

นำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาทำการตัดส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vector และ Adaptor ที่อยู่ในรูปของ Chromatogram file โดยใช้โปรแกรม Genvy version 7.0 แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละโคลน มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่รายงานไว้ใน GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม BlastN ที่กำหนดให้มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และต้องมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (*E-value*) น้อยกว่า 10^{-4} แล้วจึงใช้โปรแกรม BlastX เพื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน โดยบริเวณที่เหมือนกันต้องมีจำนวนของกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 10 Residues และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนไม่น้อยกว่า 45% โดยมีความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (*E-value*) ที่น้อยกว่า 10^{-4} (Cao *et al.*, 2001)

นำผลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ใน GenBank database ซึ่งเป็นยีน Caspase-3 และ Granzyme มาทำ Alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน Caspase-3 โคลน HK 115 (Accession no. FF27959755138633) และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน Granzyme โคลน HK 28 (Accession no. FF27953355138569) จากห้องสมุด cDNA ของปลานิล (เอกพล, 2551) เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full-length) ของยีนทั้งสองในปลานิล

2.2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนและการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full-length) ของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล เฉพาะส่วนที่เป็น Open Reading Frame (ORF) ซึ่งตัด Leader peptide ออกแล้ว มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่รายงานใน

GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) อีกครั้งโดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) และโปรแกรม Emboss pairwise alignment algorithms (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) ตามลำดับ จากนั้นทำการหาบริเวณ Hydrophobic leader sequence จากลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม “DAS-Transmembrane prediction” (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) แล้วจึงหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) ด้วยวิธี UPMGA โดยมีค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้ง

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลตัวเต็มวัยน้ำหนักประมาณ 800 กรัม จำนวน 2 ตัว ที่ไม่มีอาการของโรคต่าง ๆ มาเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 1.1

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

นำเชื้อ *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ QSA001 มาเชื่อมอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดการแยกชั้นระหว่างตะกอนแบคทีเรีย บริเวณก้นหลอดกับอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสด้านบน เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ 0.85% ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำการปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ที่ Absorbance เท่ากับ 0.15 จึงนำแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (Intraperitoneal injection) ในปลานิลตัวแรก ที่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และปลาตัวที่เหลือฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เช่นกัน จากนั้นเลี้ยงปลานิลและให้อาหารต่อไปเป็นเวลา 3 วัน สังเกตอาการของปลาตลอดการเลี้ยง เพื่อเตรียมสกัด Total RNA ในขั้นตอนต่อไป

3.3 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและการเตรียม Total RNA

เมื่อครบ 3 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในปลาปกติที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและปลานิลที่ฉีดเชื้อ *S. agalactiae* จำนวน 12 อวัยวะ ซึ่งได้แก่ สมอง (Brain), เหงือก (Gills), อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad), ไตส่วนหน้า (Head kidney), หัวใจ (Heart), ลำไส้ (Intestine), ตับ (Liver), กล้ามเนื้อ (Muscle), เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes), ม้าม (Spleen), กระเพาะอาหาร (Stomach) และไตส่วนหลัง (Trunk kidney) ตามลำดับ โดยใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ๆ ล้างเนื้อเยื่อด้วย RPMI medium แล้วแยกใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol Reagent (Molecular research center) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่ลงใน Glinder เพื่อทำการบดเนื้อเยื่อให้ละเอียด ทำลาย Genomic DNA โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24 ค่อยๆเขี่ยลงประมาณ 10-15 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วจึงสกัด Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.2

3.4 การวัดความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากข้อ 3.3 มาวัดความเข้มข้นของ Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.3

3.5 การตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยวิธี Formaldehyde agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบคุณภาพ Total RNA ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ได้จากข้อ 3.4 มาตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยวิธี Formaldehyde agarose gel electrophoresis ตามวิธีการในข้อ 1.4

3.6 การสังเคราะห์ First stand cDNA จาก Total RNA

การสังเคราะห์ First stand cDNA จาก Total RNA ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ภายหลังจากการตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยใช้ RevertAid™ First stand cDNA synthesis ตามวิธีการของบริษัท Fermentas โดยทำการเตรียมส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาใส่ลงใน PCR tubes ประกอบไปด้วย Total RNA ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ปริมาตร 2 ไมโครกรัม พร้อมกับเติม Oligo (dT)₁₈ primer (0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ DEPC-treat water จนครบ 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว 3-5 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

นาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยจุ่มในน้ำแข็ง เติม 5X Reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม RiboLock™ Ribonuclease inhibitor (20U ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม 10 mM ของ dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วยการปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200U ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้อาหารละลายปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ซึ่งจะทำให้ได้ First stand cDNA template จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.7 การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิลปกติและปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้เทคนิค RT-PCR

ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิลปกติและปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้เทคนิค RT-PCR จาก First stand cDNA ที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เป็น Template และใช้ Specific primer ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของ cDNA ของยีน Caspase-3 และ Granzyme จำนวน 2 คู่ ได้แก่ Caspase F1 primer คู่กับ Caspase R1 primer และ Granzyme F1 primer คู่กับ Granzyme R1 primer (ตารางที่ 1)

แล้วนำไปเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin โดยมี Specific primer คือ β -actin F1 primer คู่กับ β -actin R1 primer (ตารางที่ 1) ซึ่งจะใช้เป็น Internal control โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ใน ปลานิล

ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้คือ

5 U/UI <i>Taq</i> DNA polymerase	0.2 ไมโครลิตร
10X <i>Taq</i> buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - MgCl_2	2.5 ไมโครลิตร
1.25 mM MgCl_2	0.8 ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	1.5 ไมโครลิตร
10 μM Forward primer	1.0 ไมโครลิตร
10 μM Reverse primer	1.0 ไมโครลิตร
น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว	17.0 ไมโครลิตร

First stand cDNA (Template)

1.0 ไมโครลิตร

ปริมาตรรวม

25.0 ไมโครลิตร

ใส่สารต่าง ๆ ลงใน PCR tubes ขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่อง Thermal cycler (Takara) ที่กำหนดสภาวะการทำงานดังนี้คือ ช่วงแรกของปฏิกิริยาใช้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 25 รอบ และช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ PCR product เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปตรวจสอบผล PCR product ด้วย 1% Agarose gel ใน 1X TBE buffer (Tris-Borate-EDTA) ที่กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นำเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วจึงล้างออกด้วย น้ำกลั่น จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้รังสี Ultraviolet บันทึกผลด้วยเครื่อง Gel documentation system (Syngene) และเปรียบเทียบขนาดของแถบ PCR products ที่เกิดจากการใช้ Specific primers ของยีน Granzyme, Caspase-3 และ β -actin ที่ได้ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาทั้งสองตัว

4. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Granzyme และ Caspase-3 ในตัวปลานิล ภายหลังจาก ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* (*In vivo*) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

4.1 การทดลองในสัตว์ตัวทดลอง (*In vivo*)

4.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลน้ำหนักประมาณ 40 กรัม จำนวน 81 ตัว ที่ไม่มีอาการของโรค มาเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 1.1 จากนั้นนำปลาแบ่งเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร ตู้ละ 9 ตัว จำนวน 9 ตู้

4.1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

นำเชื้อ *S. agalactiae* สายพันธุ์ AQSA001 มาเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.2 แล้วทำการปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันโดยแบ่งเป็น 2 ความเข้มข้นคือ ที่ความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ 1×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร

4.1.3 การวางแผนการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* (*In vivo*) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

นำปลานิลที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.1 มาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง (แต่ละกลุ่มการทดลองทำ 3 ซ้ำ โดยแยกเลี้ยงจำนวน 3 ตัว) และทำการเตรียมสภาพของการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (Control) นำปลานิลทุกตัวในกลุ่มควบคุมทั้งหมด 27 ตัว มาฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (Intraperitoneal injection)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง (Treatment 1) นำปลานิลทุกตัวในกลุ่มที่ 2 ทั้งหมด 27 ตัว มาฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 1×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดลอง (Treatment 2) นำปลานิลทุกตัวในกลุ่มที่ 3 ทั้งหมด 27 ตัว มาฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง

ทำการเลี้ยงปลาทดลองต่อไป โดยระหว่างนี้ทำการเก็บเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าเพื่อเตรียมสกัด Total RNA จากปลาทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง โดยนำปลานิลที่แบ่งเลี้ยงจากแต่ละตัว ตัวละ 1 ตัว ทั้งหมด 9 ตัว มาเก็บเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าตามช่วงเวลาดังต่อไปนี้คือที่ชั่วโมงที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ตามลำดับ โดยระหว่างที่ทำการเก็บเนื้อเยื่อ เลี้ยงปลานิลที่เหลือและให้อาหารต่อไป จนกว่าจะทำการทดลองเสร็จสิ้น

4.1.4 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและการเตรียม Total RNA

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลานิลจากทั้ง 3 กลุ่มการทดลองในช่วงเวลาต่าง ๆ มาทำการสกัดเอา Total RNA โดยใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเนื้อเยื่อของไตส่วนหน้าเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ล้างเนื้อเยื่อด้วย RPMI medium แล้วแยกใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol Reagent (Molecular research center) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่ลงใน Glinder เพื่อทำการบดเนื้อเยื่อให้ละเอียด ทำลาย Genomic DNA โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24 โดยการดูดขึ้นลงประมาณ 10-15 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วจึงสกัด Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.2

4.1.5 การวัดความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากข้อ 4.1.4 มาวัดความเข้มข้นของ Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.3

4.1.6 การตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยวิธี Formaldehyde agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพ Total RNA ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ได้จากข้อ 4.1.4 มาตรวจสอบคุณภาพ ของ Total RNA โดย Formaldehyde agarose gel electrophoresis ตามวิธีการในข้อ 1.4

4.1.7 การสังเคราะห์ First stand cDNA จาก Total RNA

สังเคราะห์ First stand cDNA จาก Total RNA ของเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลาในแต่ละกลุ่มการทดลอง ในช่วงเวลาต่าง ๆ ภายหลังจากการตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA โดยใช้ RevertAid™ First stand cDNA synthesis ของบริษัท Fermentas ตามวิธีการในข้อ 3.6

4.1.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* (*In vivo*) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

นำ First stand cDNA ที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อของไตส่วนหน้าของปลาในแต่ละกลุ่มการทดลอง ที่เก็บในช่วงเวลาต่าง ๆ จากข้อ 4.1.7 มาเป็น Template และใช้ Specific primers ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน Caspase-3 และ Granzyme จำนวน 2 คู่ ซึ่งได้แก่ Caspase F3 primer คู่กับ Caspase R3 primer และ Granzyme F2 primer คู่กับ Granzyme R2 primer (ตารางที่ 1) เพื่อนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนของ Real-time PCR

ผลที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin โดยมี Specific primers ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA โคลน HK 1101 (Accession no. FF28049155139527) ของยีน β -actin (β -actin F2 primer คู่กับ β -actin R2 primer; ตารางที่ 1) ซึ่งจะใช้เป็น Normalizer โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ซึ่งมีส่วนผสมของการทำปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบดังนี้คือ

2X Brilliant II SYBR Green QPCR master mix	12.5	ไมโครลิตร
10 μ M Forward primer	1.0	ไมโครลิตร
10 μ M Reverse primer	1.0	ไมโครลิตร
น้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว	9.5	ไมโครลิตร
First stand cDNA (Template)	1.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.0	ไมโครลิตร

ใส่สารต่าง ๆ ข้างต้น ลงใน 96 Well polypropylene plates จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Mx ProTM 3000P QPCR (Stratagene) ที่กำหนดสภาวะการทำงานดังนี้คือ ช่วงแรกของปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที สุดท้ายที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ บันทึกผลของ Threshold cycle หรือค่า C_T จากโปรแกรม MxProTM QPCR version 4.0 เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดต่อไป

4.1.9 การวิเคราะห์ผลที่ได้จากใช้เทคนิค Real-time PCR และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่า C_T ที่ได้จากทุก ๆ กลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงเวลา มาทำการคำนวณเพื่อหาค่า Relative expression ratio ตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001) โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Relative expression ratio} = 2^{-(\Delta\Delta C_T)}$$

เมื่อ ΔC_T คือความแตกต่างของค่า C_T ของยีน Granzyme และ Caspase-3 กับค่า C_T ของยีน β -actin ที่ทำการทดลองในแต่ละช่วงเวลา โดยสามารถเขียนเป็นสมการ ได้ดังนี้คือ

$$\text{Relative expression ratio ของยีน Caspase-3 } \Delta C_T = C_T \text{ Caspase-3} - C_T \beta\text{-actin}$$

$$\text{Relative expression ratio ของยีน Granzyme } \Delta C_T = C_T \text{ Granzyme} - C_T \beta\text{-actin}$$

จากนั้นนำค่า ΔC_T จากการทดลองที่เวลา 0 ชั่วโมง (ΔC_T ที่เวลา 0) ใช้เป็น Calibrator เพื่อปรับค่า ΔC_T ของการทดลองในแต่ละชั่วโมง (ΔC_T ที่เวลา X) ให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยค่าที่ได้จากการคำนวณดังกล่าวนี้คือ $\Delta\Delta C_T$ และสามารถเขียนเป็นสมการ ได้ดังนี้คือ

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ ที่เวลา X} - \Delta C_T \text{ ที่เวลา 0}$$

จากนั้นจึงแทนค่า $\Delta\Delta C_T$ ลงในสมการ เพื่อหาค่า Relative expression ratio แล้วจึงทำการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ระหว่างกลุ่มการทดลอง ในแต่ละชั่วโมงโดยแยกกัน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชั่วโมงในกลุ่มการทดลองของแต่ละยีน โดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (อนันตชัย, 2542)

5. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ในหลอดทดลอง (*In vitro*) ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

5.1 การทดลองในหลอดทดลอง (*In vitro*)

5.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลตัวเต็มวัยน้ำหนักประมาณ 800 กรัม จำนวน 18 ตัว ที่ไม่มีอาการของโรคต่างๆ มาเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 1.1

5.1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

นำเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สายพันธุ์ AQAH001 มาเขียนบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดการแยกชั้นระหว่างตะกอนแบคทีเรีย บริเวณก้นหลอดกับอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสด้านบน เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ 0.85% ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จึงทำการละลายตะกอนแบคทีเรียที่ได้ในน้ำเกลือ 0.85% ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และมีค่า Absorbance เท่ากับ 0.1 จะได้เชื้อแบคทีเรียมีความเข้มข้นประมาณ 1×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร

5.1.3 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาว

นำปลานิลขนาดประมาณ 800 กรัม ที่เตรียมไว้จำนวน 18 ตัวมาทำการดูดเลือดโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24 ตัวละ 9 มิลลิลิตร ให้ได้เลือดปริมาตรทั้งหมด 162 มิลลิลิตร จากนั้นนำเลือดทั้งหมดที่ได้มาผสมกับ Medium A (Penicillin/Streptomycin solution ปริมาตร 200 มิลลิลิตร, Heparin ความเข้มข้น 200 unit ต่อ Fecal carp serum ที่ทำการ Inactivated ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, RPMI No.1640 ปริมาตร 19 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วนเลือด ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ Medium A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้เลือดที่เจือจางแล้ว

ทั้งหมดปริมาตรรวม 486 ไมโครลิตร ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบา ๆ จากนั้นทำการแยกชั้นเม็ดเลือดโดยดูดเลือดที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แบ่งใส่ลงใน Tube ทั้งหมด 54 หลอด ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Lymphoprep (Axis-shield) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร อยู่ด้านล่าง หลอด ในอัตราส่วน 1:1 (ห้ามเขย่า) แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 400 xg (1,500 rpm) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วย Swing rotor จากนั้นเม็ดเลือดจะเกิดการแยกชั้น ทำการดูดส่วนสีเทาที่เป็นบริเวณที่รวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดขาว ออกมาใส่ Tube ขนาด 15 มิลลิลิตร อันใหม่ แล้วจึงเติม Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ Micropipette แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 xg (1,200 rpm) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างเซลล์เม็ดเลือดขาว เทสารละลาย PBS ด้านบนทิ้ง สุดท้ายจะได้ตะกอนสีขาวของเซลล์เม็ดเลือดขาว เติม PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยใช้ Micropipette ซึ่งจะได้เซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 54 หลอด

5.1.4 การวางแผนการทดลอง

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ที่เตรียมไว้ทั้งหมด 54 หลอด มาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง กลุ่มการทดลองละ 6 หลอด (แต่ละกลุ่มการทดลองทำ 3 ซ้ำ) โดยในแต่ละหลอดจะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ละลายใน PBS หลอดละ 200 ไมโครลิตร และมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^7 เซลล์ ต่อจากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดที่ได้มาจัดกลุ่มการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (Control) นำเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดที่ละลายใน PBS ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^7 เซลล์ มาเติม Medium A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว โดยจะได้เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดมีความหนาแน่นสุดท้ายประมาณ 9×10^6 เซลล์

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง (Treatment 1) นำเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดที่ละลายใน PBS ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^7 เซลล์ มาเติม Medium A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 2×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 1×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดลอง (Treatment 2) นำเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือดที่ละลายใน PBS ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^7 เซลล์ มาเติม Medium A ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มี Concanavalin A ซึ่งมีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือดที่เตรียมไว้ทั้งหมด 3 กลุ่มการทดลอง มาเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลาโดยใช้ความเร็วรอบ 25 rpm แล้วจึงเริ่มเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือด เพื่อเตรียมสกัด Total RNA โดยเก็บจากแต่ละกลุ่มการทดลอง จากแต่ละช่วงเวลา กลุ่มละ 1 หลอด ทั้งหมด 9 หลอด โดยมีช่วงเวลาที่เก็บดังต่อไปนี้คือที่ 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ระหว่างนี้เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือด ที่เหลือในสภาวะเดิม จนกว่าจะทำการทดลองเสร็จสิ้น

5.1.5 การเก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือดและการสกัด Total RNA

นำตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือดจากทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง แบ่งใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อดกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือด เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วจึงเติม Trizol Reagent (Molecular research center) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นบดเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือดให้ละเอียดด้วยที่บดเม็ดเลือดที่ฆ่าเชื้อแล้ว แล้วจึงทำลาย Genomic DNA โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24 คูดขึ้นลงประมาณ 10-15 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงสกัด Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.2

5.1.6 การวัดความเข้มข้นของ Total RNA

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือด จากข้อ 5.1.5 มาวัดความเข้มข้นของ Total RNA ตามวิธีการในข้อ 1.3

5.1.7 การตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยวิธี Formaldehyde agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพ Total RNA ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือด ที่ได้จากข้อ 5.1.6 มาตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยวิธี Formaldehyde agarose gel electrophoresis ตามวิธีการในข้อ 1.4

5.1.8 การสังเคราะห์ First stand cDNA จาก Total RNA

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวปลาในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากข้อ 5.1.5 ในแต่ละช่วงเวลามาตั้งเครื่อง First stand cDNA ภายหลังจากการตรวจสอบคุณภาพ Total RNA โดยใช้ RevertAid™ First stand cDNA synthesis ของบริษัท Fermentas ตามวิธีการในข้อ 3.6

5.1.9 การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือด ในหลอดทดลอง ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

นำ First stand cDNA ที่เตรียมได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสดเลือด ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ที่เก็บในแต่ละช่วงเวลา จากข้อ 5.1.8 มาเป็น Template และใช้ Specific primers ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน Caspase-3 และ Granzyme ได้แก่ Caspase F3 primer คู่กับ Caspase R3 primer และ Granzyme F2 primer คู่กับ Granzyme R2 primer (ตารางที่ 1) เพื่อนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยาของ Real-time PCR ตามวิธีการในข้อ 4.1.8 หลังจากนั้นผลของการแสดงออกของยีนที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับแสดงออกของยีน β -actin โดยมี Specific primers (β -actin F2 primer คู่กับ β -actin R2 primer; ตารางที่ 1) ซึ่งจะใช้เป็น Normalizer โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme เช่นเดียวกับในข้อ 4.1.8

ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาปริมารรวม 25 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบและสภาวะการทำงานของเครื่อง Mx Pro™ 3000P QPCR (Stratagene) ตามวิธีการในข้อ 4.1.8

5.1.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่า C_T ที่ได้จากทั้ง 3 กลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงเวลา มาทำการคำนวณเพื่อหาค่า Relative expression ratio โดยทำการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระสเลื้อย ในหลอดทดลอง ตามวิธีการในข้อ 4.1.9

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยดำเนินการทำวิจัยในระหว่างเดือนกันยายน 2550 - ธันวาคม 2552

ผลและวิจารณ์

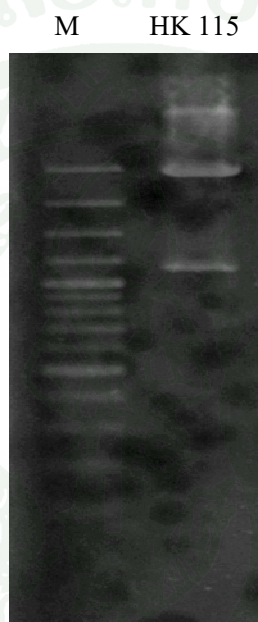
ผล

1. การโคลนและการศึกษาคุณลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Complementary DNAs (cDNAs) ของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล

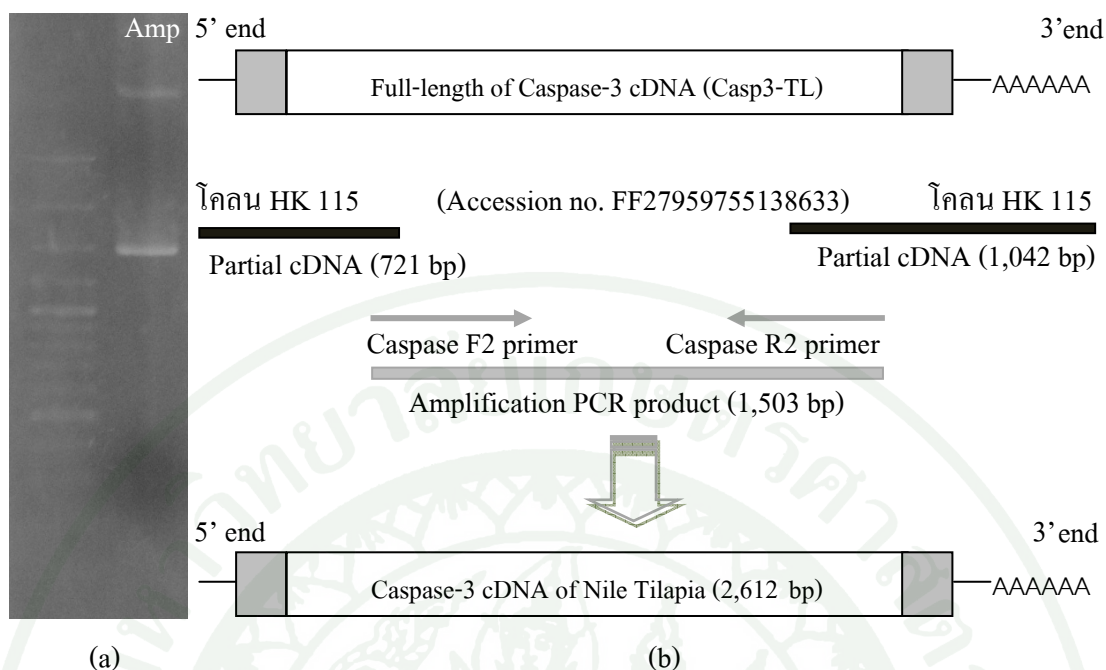
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนจากไตส่วนหน้าและม้ามใน cDNAs library ของปลานิล หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยใช้เทคนิค Expressed sequence Tags (ESTs) โดยการรายงานของ Srisapoom et al. (2008) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GeneBank Database (Direct submission, Accession no. ตั้งแต่ FF27951855138554-FF28060355139639 ที่ได้ศึกษาในไตส่วนหน้าและ Accession no. ตั้งแต่ FF28060455139640-FF28169055140732 ที่ได้ศึกษาในม้าม เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ESTs โคลนเหล่านี้มาตรวจสอบโดยการนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน (Blast N และ Blast X) กับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีรายงานใน GenBank database พบว่าภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* มีการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดกระบวนการ Apoptosis อยู่หลายชนิด หนึ่งในจำนวนนั้นคือการค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA ของยีน Caspase-3 (โคลน HK 115, Accession no. FF27959755138633) และยีน Granzyme (โคลน HK 28, Accession no. FF27953355138569) ซึ่งพบเฉพาะใน cDNA library ซึ่งสร้างจากไตส่วนหน้าของปลานิลเท่านั้น

เมื่อนำ cDNA โคลน HK 115 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Eco* RI แล้วนำไปตรวจสอบบน Agarose gel พบว่า cDNA โคลน HK 115 นี้ มีขนาดของชิ้น Insert ประมาณ 1,000 bp (ภาพที่ 10) และเมื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ cDNA โคลน HK 115 โดยการนำไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยใช้ Universal primers ชนิด M13F primer และ M13R primer (ตารางที่ 1) ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 721 bp และ 1,042 bp ตามลำดับ และเมื่อนำมาทำ Multiple alignment เพื่อหาส่วนที่ซ้อนทับกัน กลับปรากฏว่าไม่สามารถหาส่วนที่ซ้อนทับดังกล่าวได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงหลักความจริงจากขนาดของ Insert size แล้วไม่น่าเป็นไปได้หรืออาจเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน HK 115 อาจมีขนาดใหญ่กว่า 1,000 bp ผู้วิจัยจึงทำการออกแบบ Forward และ Reverse primers [Caspase F2 primer และ Caspase R2 primer (ตารางที่ 1)] แล้วนำไปเพิ่มจำนวน DNA ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้พลาสมิดโคลน HK

115 เป็นแม่แบบ (Template) ทำให้ได้ PCR products ขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 11a) เมื่อนำ PCR products นี้ไปทำการโคลนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีขนาดเท่ากับ 1,503 bp และภายหลังจากนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำ Multiple alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ M13 Forward และ M13 Reverse primers ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA โคลน HK 115 มีความยาวเท่ากับ 2,612 bp (ภาพที่ 11b) และทำการตั้งชื่อ cDNA นี้ว่า “Casp3-TL”



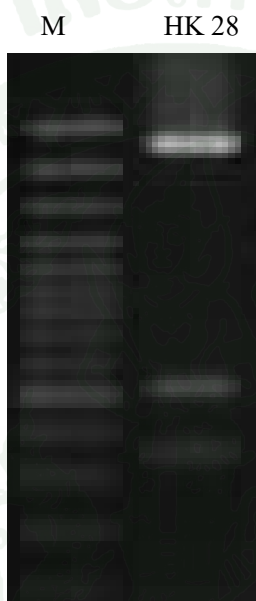
ภาพที่ 10 ขนาดของชิ้น Insert ของ cDNA โคลน HK 115 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Eco* RI บน Agarose gel โดยที่ M คือ 100 bp DNA Ladder



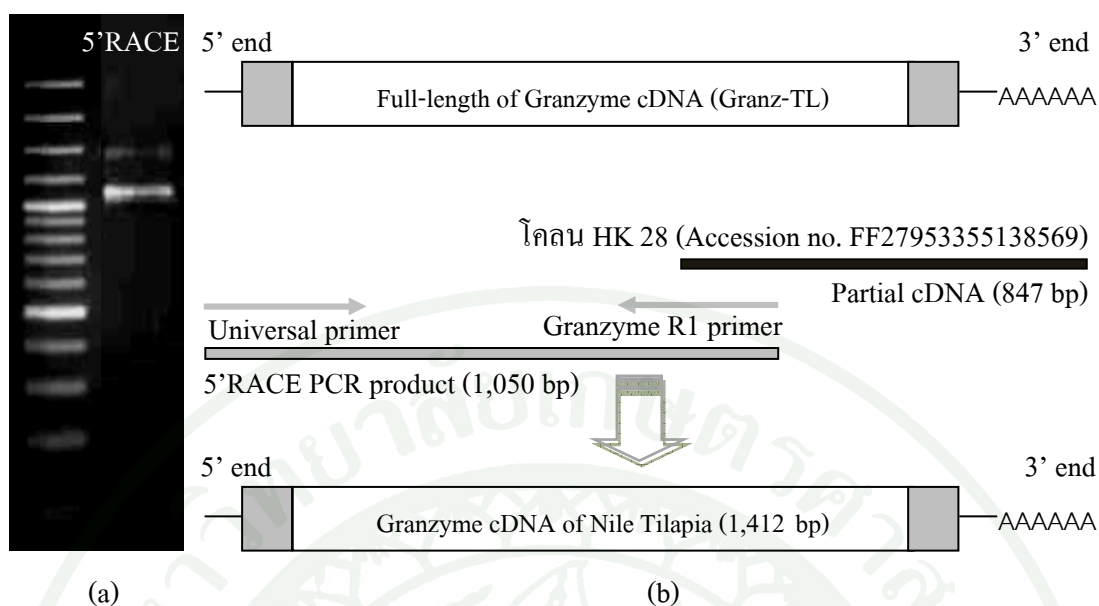
ภาพที่ 11 แบบแผนการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) (a) แถบ DNA ของ Amplification PCR product จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งช่วงกลางของ cDNA ของยีน Casp3-TL ในปลานิล (b) แผนภาพการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Casp3-TL และตำแหน่งของ Specific primers (Caspase F2 primer และ Caspase R2 primer)

เมื่อนำ Plasmid ของ cDNA โคลน HK 28 ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนจากไตส่วนหน้าใน cDNA library ของปลานิลหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้เทคนิค Expressed sequence Tags (ESTs) (เอกพล, 2551) นั้น มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Eco* RI แล้วนำไปตรวจสอบบน Agarose gel พบว่า cDNA โคลน HK 28 มีขนาดของ Insert คร่าว ๆ ประมาณ 850 bp (ภาพที่ 12) และเมื่อนำ Plasmid นี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยใช้ Universal primers ชนิด M13F primer และ M13R primer (ตารางที่ 1) พบว่า cDNAs นี้มีขนาดเท่ากับ 847 bp อย่างไรก็ตาม เมื่อนำไปทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน โดยการใช้โปรแกรม Blast X ใน GenBank database พบว่า cDNA โคลน HK 28 นี้บรรจูลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน Granzyme ในปลานิลทางด้าน 3' เท่านั้น จึงทำการออกแบบ Specific primer เพื่อใช้ในการ Amplify ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เหลือทางด้าน 5' โดยใช้เทคนิค 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ตามวิธีการของบริษัท BD SmartTM RACE cDNA Amplification kit (BD Bioscience Clontech) ทำให้ได้ PCR product

ประมาณ 1,000 bp (ภาพที่ 13a) แล้วจึงนำ PCR product ที่ได้ไปทำการโคลนเข้าสู่ pGem T Easy vector และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยการใช้ M13 Forward และ M13 Reverse primers พบว่า PCR product ที่ได้นี้มีขนาดเท่ากับ 1,050 bp และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการ Alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' ที่ได้ก่อนหน้านี้ ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิลมีความยาวทั้งสิ้นรวม 1,412 bp (ภาพที่ 13b) จึงทำการตั้งชื่อ cDNA นี้ว่า “Granz-TL”



ภาพที่ 12 ขนาดของชิ้น Insert ของ cDNA โคลน HK 28 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Eco* RI บน Agarose gel โดยที่ M คือ 100 bp DNA Ladder

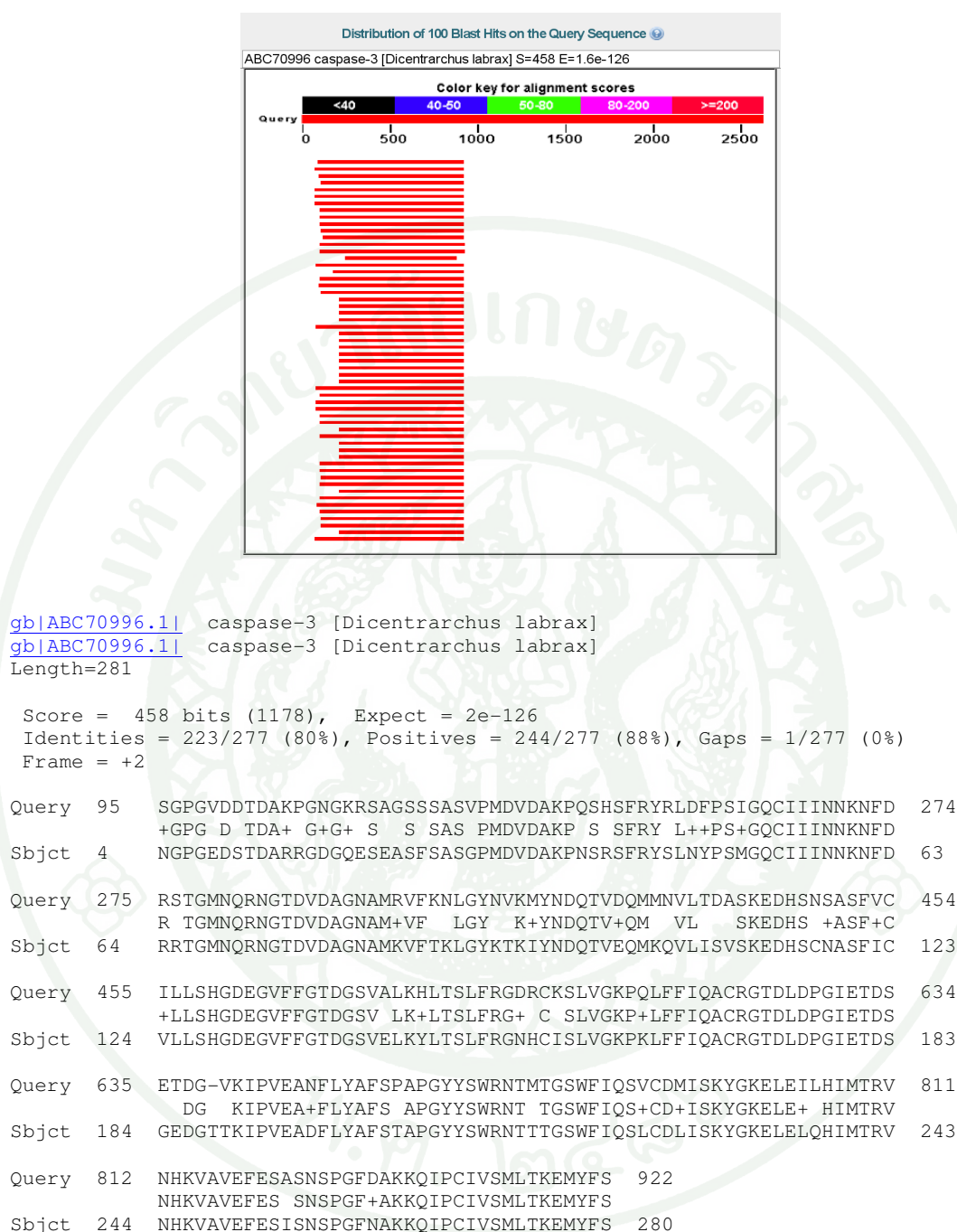


ภาพที่ 13 แบบแผนการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme (Granz-TL) ในปลานิล (a) แถบ DNA ของ 5' RACE PCR product (b) แผนภาพการโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granz-TL และตำแหน่งของ Reverse primer (Granzyme R1 primer)

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโนและการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Caspase-3 และยีน Granzyme ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 (Casp3-TL) และ Granzyme (Granz-TL) ในปลานิล

เมื่อนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) ที่ได้จากข้อ 1 ไปทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Blast X กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีการรายงานไว้ใน GenBank database พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Casp-3 TL มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ของปลา European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) มากที่สุด (ภาพที่ 14) โดยมีค่า E -values สูงสุดเท่ากับ $2e^{-126}$ รองลงมาคือยีน Caspase-3 ของปลา Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) ซึ่งมีค่า E -values เท่ากับ $4e^{-126}$ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ของปลานิล (Casp3-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้ใน GenBank database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยใช้โปรแกรม Blast X

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของ Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีค่า *E*-value สูงสุด 5 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม Blast X

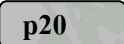
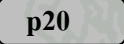
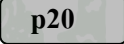
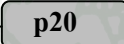
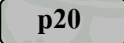
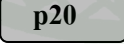
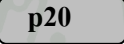
Putative genes	Closest species	<i>E</i> -values	Score (bits)	Length (residues)	Accession number
Caspase-3	<i>Dicentrarchus labrax</i>	2e-126	458	281	DQ345773
Caspase-3	<i>Larimichthys crocea</i>	4e-126	457	285	EU878546
Caspase 3B	<i>Oryzias latipes</i>	3e-121	441	280	AB032608
Caspase-3 precursor	<i>Salmo salar</i>	1e-120	438	284	BT059710
Caspase 3	<i>Takifugu rubripes</i>	2e-119	434	280	AF042797

เมื่อทำการพิจารณาแล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Casp3-TL ในปลานิล มีความยาวรวมทั้งสิ้น 2,612 bp (ภาพที่ 15) สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open reading frame หรือ ORF) มีความยาวรวม 846 bp และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' Untranslated region (UTR) ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน มีความยาวเท่ากับ 79 และ 1,684 bp ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงการเริ่มต้นการแปลรหัส (Start codon หรือ ATG) อยู่ในตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 80 bp และสามารถพบตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ATTTA (Instability) motif ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคงสภาพของ mRNA อยู่ทางด้านปลาย 3' UTR จำนวน 2 ตำแหน่ง โดยอยู่ห่างจากลำดับของ Poly A tail ทางด้านปลาย C-terminal เท่ากับ 377 และ 1,150 bp ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Polyadenylation signal sites (AATAAA) จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยอยู่ห่างจากลำดับของ Poly A tail เท่ากับ 38 bp ส่วน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงการสิ้นสุดการถอดรหัส (Termination codon หรือ TAA) อยู่ห่างจากลำดับของ Poly A tail ประมาณ 1,684 bp (ภาพที่ 15)

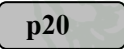
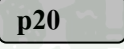
และเมื่อทำการตรวจสอบในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) พบว่ากรดอะมิโนของ Casp3-TL มีความยาวรวมทั้งสิ้น 282 Residues จากนั้นทำการหาบริเวณ Hydrophobic leader sequence จากลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม “DAS-Transmembrane prediction” (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) แล้วพบว่าไม่สามารถหาตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งของ Hydrophobic leader sequence ได้ (ภาพที่ 16) อย่างไรก็ตามกลับพบว่าลำดับกรดอะมิโนในช่วง Residues ที่ 121-130 เป็นบริเวณที่แสดงตำแหน่งของ Hydrophobic

sequence อย่างชัดเจน และเมื่อทำการหาบริเวณที่เป็น Catalytic domain โดยใช้โปรแกรม PROSITE predictions (<http://au.expasy.org/prosite>) พบว่าสามารถแบ่งโครงสร้างของโปรตีนของ Casp3-TL ออกเป็น 2 ส่วน คือ Large subunit หรือ Caspase family p20 domain (p20) และ Small subunit หรือ Caspase family p10 domain (p10) แล้วยังพบตำแหน่งตัดของ Histidine active site อีกหนึ่งตำแหน่งโดยมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้คือ $H_{117}snsaSfvCiLLSHG_{131}$ (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ตรงกับ Hydrophobic sequence พอดี โดยทั่วไปแล้วยีน Caspases ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Effector caspase ซึ่งได้แก่ Caspase-3, Caspase-6 และ Caspase-7 ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Vertebrate จะไม่พบ Prodomain ซึ่งโดยปกติแล้วจะอยู่บนตำแหน่งของ Hydrophobic leader sequence โดยยีน Caspases ในกลุ่มนี้ จะแตกต่างจากกลุ่มของ Initiator caspases และ Inflammatory caspases โดยเฉพาะ Initiator caspases จะมี Domain สำคัญ ๆ บริเวณตำแหน่งของ Prodomain เช่น Caspase activation recruitment domain (CARD) หรือ Death effector domain (DED) เป็นต้น (Takle and Andersen, 2007) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่เป็น Open reading frame พบว่ามีกรดอะมิโน Cysteine (Cys หรือ C) ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ C_{56} , C_{125} , C_{157} , C_{172} , C_{225} และ C_{269} ตามลำดับ แล้วยังสามารถพบตำแหน่งของ Glycosylation site (NXT หรือ NXS) โดย N คือ Asparagine (Asn), T คือ Threonine (Thr), S คือ Serine (Ser) และ Xaa (X) คือกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ถึง 2 ตำแหน่งด้วยกัน ได้แก่ Asn-Gly-Ser (N_4GS) และ Asn-Gly-Thr (N_7GT) ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบโครงสร้างที่เป็น Catalytic domain และบริเวณกรดอะมิโนของตำแหน่งตัด (Active site) ของกลุ่ม Caspase family และขึ้น Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) กับขึ้น Caspase-3 ของปลาชนิดต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม PROSITE predictions (<http://au.expasy.org/prosite>)

Putative genes	Common name	Catalytic domain		Proteolytic cleavage site (Histidine active site)	Amino acid
		Large Subunit	Small subunit		
Caspase-3	Nile tilapia			Histidine/ 117-131	HsnaSfvCiLLSHG
Caspase-3	European sea bass			Histidine/ 115-129	HscnaSfiCvLLSHG
				Cysteine/ 161-172	KPKLFFIQACRG
Caspase-3	Large yellow croaker			Histidine/ 119-133	HscyaSfvCvLLSHG
				Cysteine/ 165-176	KPKLFFIQACRG
Caspase-3	Zebra fish			Histidine/ 111-125	HsrcaSlvCvLLSHG
				Cysteine/ 157-168	KPKLFFIQACRG
Caspase-3	White cloud mountain minnow			Cysteine/ 157-168	KPKLFFIQACRG
Caspase-3B	Japanese medaka			Histidine/ 115-129	HsdsaSfvCiLLSHG
				Cysteine/ 161-172	KPKLFFIQACRG
Caspase- 3 precursor	Atlantic salmon			Histidine/ 117-131	HscsaSfvCvLLSHG
				Cysteine/ 163-174	KPKLFFIQACRG

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Putative genes	Common name	Catalytic domain		Proteolytic cleavage site (Histidine active site)	Amino acid
		Large Subunit	Small subunit		
Caspase-3	Fugu rubripes			Histidine/ 114-128 Cysteine/ 160-171	HsacaSfvCvLLSHG KPKLFFIQACRG
Caspase-3 precursor	Northern pike			Histidine/ 119-133 Cysteine/ 165-176	HsqsaSfvCvLLSHG KPKLFFIQACRG
Caspase-3 precursor	Sablefish			Histidine/ 129-143 Cysteine/ 175-186	HsdraSfvCvLLSHG KPKLFFIQACRG

1	GGCACGAGGGAGGCCCTTCTCTTTGTACATAGAGAGCGGAATTTGTTTGGTTAGCGTTT	60
61	AATTACTTGCCTGTGAAAAATGTCGGAAAACGGATCCGGACCTGGAGTGGACGATACAGA	120
(1)	M S E <u>N G S</u> G P G V D D T D	(14)
121	CGCAAAGCCAGGCAATGGAACGATCAGCGGGCTCTTCGTCTGCTTCTGTCCCCATGGA	180
(15)	A K P G N G K R S A G S S S A S V P M D	(34)
181	CGTGGATGCCAAGCCCCAGTCACACAGCTTCAGATACCGCCTCGATTTCCCCAGCATTGG	240
(35)	V D A K P Q S H S F R Y R L D F P S I G	(54)
241	CCAGTGTATCATTATCAACAACAAGAACTTTGACAGGAGTACAGGCATGAATCAGCGAAA	300
(55)	Q <u>(C)</u> I I I N N K N F D R S T G M N Q R <u>N</u>	(74)
301	CGGTACTGACGTGGATGCAGGCAACGCCATGAGAGTATTTAAAAATTTAGGTTATAATGT	360
(75)	<u>G T</u> D V D A G N A M R V F K N L G Y N V	(94)
361	GAAGATGTACAATGACCAGACAGTCGATCAGATGATGAATGTTTAACTGATGCATCTAA	420
(95)	K M Y N D Q T V D Q M M N V L T D A S K	(114)
421	GGAAGATCACAGCAACTCAGCCTCTTTTGTCTGCATTCTTTTGTGTCACGGGGATGAAGG	480
(115)	E D H S N S A S F V <u>(C)</u> I L L S H G D E G	(134)
481	CGTGTCTCTTTGGTACGGACGGCTCAGTAGCGCTCAAACACCTAACTTCACTTTTTTCGAGG	540
(135)	V F F G T D G S V A L K H L T S L F R G	(154)
541	CGATCGCTGTAAATCACTGGTGGGAAAACCCAGCTCTTCTTCATCCAGGCTTGCAGAGG	600
(155)	D R <u>(C)</u> K S L V G K P Q L F F I Q A <u>(C)</u> R G	(174)
601	TACAGATCTGGATCCAGGCATTGAAACAGACAGCGAAACTGATGGTGTTAAGATCCCTGT	660
(175)	T D L D P G I E T D S E T D G V K I P V	(194)
661	GGAAGCAAACCTCCTCTACGCCTTCTCCCTGCCCGAGTTACTACTCCTGGAGGAATAC	720
(195)	E A N F L Y A F S P A P G Y Y S W R N T	(214)
721	AATGACTGGGTCCTGGTTTCATCCAGTCGGTGTGCGACATGATCAGCAAGTACGGAAAAGA	780
(215)	M T G S W F I Q S V <u>(C)</u> D M I S K Y G K E	(234)
781	ACTGGAGATCCTGCACATCATGACCCGAGTGAACCACAAGGTGGCAGTAGAGTTTGAGTC	840
(235)	L E I L H I M T R V N H K V A V E F E S	(254)
841	TGCCTCCAATTCTCCAGGGTTTGATGCAAAGAAACAAATCCCCTGTATTGTGTCAATGCT	900
(255)	A S N S P G F D A K K Q I P <u>(C)</u> I V S M L	(274)
901	GACCAAAGAGATGTATTTTCTCGTTAAATGTCAGAAAAC TAGAAGAAAGGCTTTGGGAGT	960
(275)	T K E M Y F S R *	(282)

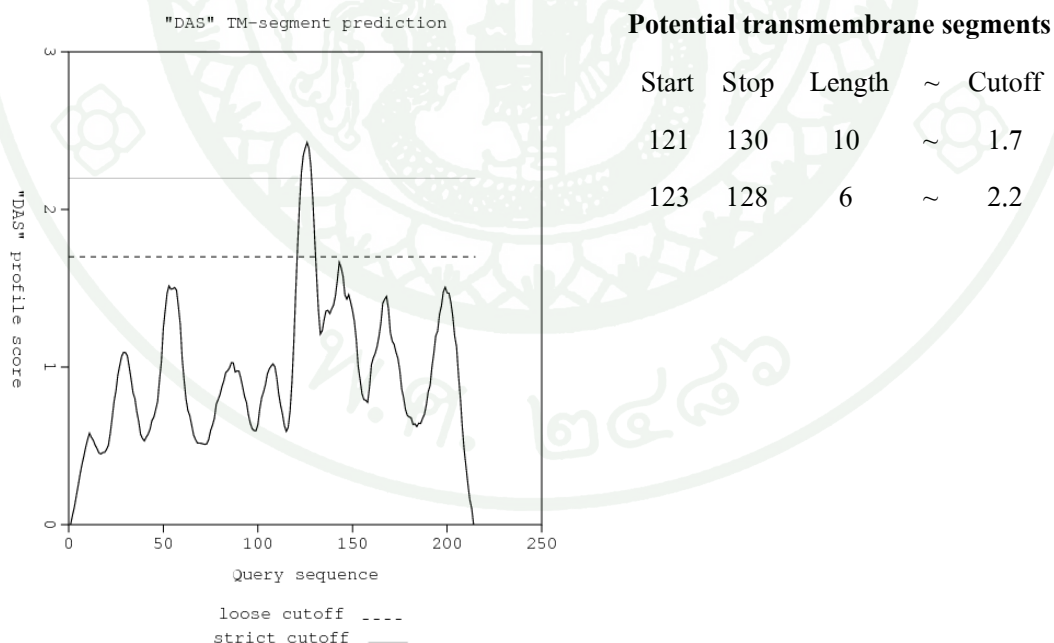
ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (อักษรแถวบน) และลำดับกรดอะมิโน (อักษรแถวล่าง) ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) โดยกรอบสี่เหลี่ยมทางด้าน 5' UTR แสดงถึง Start codon (ATG) และทางด้าน 3' UTR แสดงถึง Stop codon (TAA) วงกลมแสดงถึง Cysteine residues ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ตัวอักษรที่หนาเอนและขีดเส้นใต้แสดงถึงตำแหน่ง N-glycosylation site (NXT หรือ NXS) จำนวน 2 ตำแหน่ง และตัวอักษรที่หนาเอนและขีดเส้นใต้แสดงถึงตำแหน่งของ Polyadenylation signal site (AATAAA) และ ATTTA motif ทางด้านปลาย C-terminal

```

961      GCTTGATTTTTTTTTGATTTTTTTTTTAAATGTACACTTTGTAACCTCAATATCTCTTCTA      1020
1021     ACTTTTCATATTGCTTGGAGGGCAGACACGATGCAAATGTCAGTCATTCTTCACCACCTTG      1080
1081     GCATTATTAAGTTTATTTCAGTGTGTAGTAGTTATGTAAGTATGGCATTTCACCTTTATCCC      1140
1141     AGCAGCAGGCCCTTTAACCAAAATGAAAGTTATTTTCACATACCAACATGACACAAAAC      1200
1201     CTACAGATGTCTACAAGTAACAACAGGCTTGAATTTCCGGGCCTGAGTGTGTTGCCTTTT      1260
1261     TGCTGTTTACACTACACATTTCAGGGACATTGTTGTGAGTCAGTTTGATAGGAAATTTGA      1320
1321     CCTTTTGCATTTTGTGTTAGTCATGAAACCATAAATGGCCTGATTGTCACCAGCAGCAAT      1380
1381     ATTTTCATACATGAGGAGTTTATGTAACTTAAGTGTCTAAGCAGATGACGGTCTGTCTT      1440
1441     TATTTGTTTTCGTCTCTATTTACATTTTTTATTGTCTCCATTGTTGTGTGAGTGATGTCA      1500
1501     TTCCTGGATCGGTACCTGATGCGTTGTGCAAAGCCTAAATTAAGCACCAGCCTGAACCT      1560
1561     GGTGGGTAAATTATTATGTAGCAAATTCAAGAGGATCCTGTAAGTTAAATGTATGTGGGT      1620
1621     TAGAAAGCTCAGAATTACGTTCTTTATTTTCTGGCTTTTCTGGTCGATTTCTTTCTCTTG      1680
1681     CTTGTGAAATCTTTGATGGGAAAGCAGGTTTAATAGCCTGCATGGGAAATGCTCAGCAA      1740
1741     CCCGCACAATGCTGTTTTTTGAGCCATATTTTAACACGTTAGACATACTTGAACCTTTTTT      1800
1801     TTATTTCTACTCTTTTTTCATGGTTTCTTGACTGGGCCGATTAACTCATAGGTAGTCCA      1860
1861     CGGTGCAAAGTGTTAGACATTTTCAGGATGTGGTTAGTTTAATTAGTCAGACAACCGGAAC      1920
1921     TACAAAGATGGATTGTTTCAGACAGGTGATACTTTCACCTTTGTTTTTATCTTTGTGTAGA      1980
1981     CACAAAGCGTAGTACATCCTTTCCCGTAAACTTAAGAGGTTTGCTGCCTGGTGGTCAG      2040
2041     ACCAAACATGATCTTTGAATATGTTTCACCTTTGGCTTCAGGGATCAGTGATAATCCTTTTT      2100
2101     CCACAAACAATGAGCCAGTAAAGAAATATTGAATATTGATGGAAAAAGCTTTTGGTTG      2160
2161     CAGCCTTAAAGAAACGTTTCATGGTGGCTTTTTTTTTTTTTTAAATTAATAATTAACAAA      2220
2221     TGAAATGCAAATTTACTAAAGACATTTTGTACTTCAGTGATGCAATTTTCTTAATAACCA      2280
2281     CAAGCAAACAGTAAAGTTCTTCTGCAAAGCTCATGTCACCATGAATATCAAATAATT      2340
2341     CATAAGAGATGAAGCACAGTTTGATTGCACATTGATCCTGTTTTTACATGTGACAAATCA      2400
2401     TGAAATGCGATTGTTTATGTACACCAAGACAGCTGTATCTGTCACTTGTGCTTTTAAAT      2460
2461     AAATTCATCGTTGCATGTTTGACATGCACCTTCAATTTGGCTTTTTTGTAATCATGA      2520
2521     TTTTGTAACAGCTGTGATGTAAGTTGATGTACTGTGTTTCACGCAAAATAAAGACCAC      2580
2581     TTTGTATTCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      2612

```

ภาพที่ 15 (ต่อ)



ภาพที่ 16 การหาตำแหน่งของ Hydrophobic leader sequence ของ cDNA ของยีน Caspase-3 ใน
ปลานิล (Casp3-TL) โดยใช้โปรแกรม "DAS"- Transmembrane Prediction

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของ Casp3-TL ในปลานิล โดยใช้โปรแกรม ExPASy Proteomics Server (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) แล้ว พบว่า Casp3-TL ในปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนชนิดนี้ประมาณ 70,105.8 Da และมีค่า Theoretical isoelectric point (pI) เท่ากับ 5.09 ซึ่งค่า pI หรือจุดไอโซอิเล็กตริก เป็นค่าที่บอกถึงค่าประจุของกรดอะมิโนหรือโปรตีน สำหรับโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดนั้น จะทำให้มีหมู่อะตอมที่แตกตัวได้อยู่หลายกลุ่มด้วยกัน ค่า pI ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่มีการแตกตัวของหมู่ R ว่าจะเป็นกรดหรือด่าง การพิจารณาประจุสุทธิของโปรตีนในสารละลายทำได้โดยพิจารณาว่าถ้าหากค่า pH ของสารละลายมากกว่าค่า pI ของโปรตีน โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นลบ และถ้า pH ของสารละลายน้อยกว่าค่า pI ของโปรตีน โปรตีนจะมีประจุเป็นบวก โดยพบว่าค่า pI ของโปรตีน Casp3-TL ในปลานิลมีค่าใกล้เคียงกับโปรตีน Albumin ใน Serum คือมีค่า pI เท่ากับ 4.9 (พรงาม, 2545)

โดยทั่วไปแล้วโครงสร้างของโปรตีนมีได้ถึง 4 ระดับ ได้แก่ โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure), โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure), โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (Quarternary structure) ตามลำดับ สำหรับโครงสร้างทุติยภูมิ หรือโครงสร้างลำดับที่ 2 คือลักษณะโครงรูป (Conformation) ต่าง ๆ ของแต่ละส่วนของสายเพปไทด์ที่เกิดจากการม้วน การขดหรือการทบกันของสายเพปไทด์นั้น ๆ ในโครงสร้างทุติยภูมิลักษณะที่พบบ่อยที่สุดมีอยู่สองชนิดคือ α -helix และ β -plated sheet หรือ β -strand (พรงาม, 2545) การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ Casp3-TL จาก PSIPRED Protein Structure Prediction Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) พบว่าโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนของยีน Casp3-TL ในปลานิลประกอบด้วยส่วนที่เป็น α -helix หรือ H จำนวน 8 ส่วน สำหรับส่วนที่เป็น β -strand หรือ E จำนวน 10 ส่วน และส่วนที่เหลือจะเป็น Random coil หรือ C (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนของยีน Caspase-3 ในปลานิล (Casp3-TL) สำหรับ α -helix แทนด้วยอักษร H สำหรับ β -strand แทนด้วยอักษร E และ Random coil แทนด้วยอักษร C

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) ที่ได้จากการโคลนในข้อ 1 นั้น เมื่อนำไปทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Blast X กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้ใน GenBank database แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์นี้ มีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนของยีน Granzyme I-1 ในปลา Bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) (ภาพที่ 18) โดยมีค่า *E-values* สูงสุดเท่ากับ $4e^{-73}$ ซึ่งมีค่าเท่ากับ Granzyme III-1 ในปลา Bastard halibut (*P. olivaceus*) เช่นเดียวกัน และรองลงมาคือยีน Granzyme II ในปลา Bastard halibut (*P. olivaceus*) โดยมีค่า *E-values* เท่ากับ $2e^{-69}$ (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของ Granz-TL ในปลานิล แล้วพบว่า cDNA นี้มีความยาวรวมทั้งสิ้น 1,412 bp สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open reading frame หรือ ORF) มีความยาวรวม 765 bp และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Untranslated region ทางปลาย 5' และปลาย 3' ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน มีความยาวเท่ากับ 125 และ 519 bp ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงการเริ่มต้นการถอดรหัส (Start codon หรือ ATG) อยู่ในตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 126 bp และสามารถพบตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ATTTA motif อยู่ทางด้านปลาย 3' UTR จำนวน 2 ตำแหน่ง โดยอยู่ห่างจากลำดับของ Poly A tail ทางด้านปลาย C-terminal เท่ากับ 215 และ 400 bp ตามลำดับ และยังพบอีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Polyadenylation signal sites (AATAAA) จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยอยู่ห่างจากลำดับของ Poly A tail ประมาณ 105 bp ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงการสิ้นสุดการถอดรหัส (Termination codon หรือ TAA) อยู่ห่างจากลำดับของ Poly A tail ประมาณ 519 bp (ภาพที่ 19)

และเมื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) เท่านั้น พบว่าสามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนมีความยาวรวมทั้งสิ้น 255 Residues จากนั้นทำการหาบริเวณ Hydrophobic leader sequence จากลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม “DAS-Transmembrane prediction” (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) แล้วพบว่า cDNA ของยีน Granz-TL ในปลานิลมีความยาวของ Signal peptide ทั้งหมด 19 Residues ทำให้ได้ลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Mature protein ของยีนเท่ากับ 236 Residues (ภาพที่ 19) จากนั้นทำการหาบริเวณที่เป็น Catalytic domain โดยใช้โปรแกรม PROSITE predictions (<http://au.expasy.org/prosite>) พบว่ายีน Granz-TL ของปลานิล จัดอยู่ในกลุ่มของ Serine protease domain ชนิด Trypsin family โดยลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสเป็น Trypsin domain มีความยาวรวม 227 Residues แล้วยังพบตำแหน่งตัด (Active site) ของยีน Granz-TL ในปลานิลได้อีก 2 ตำแหน่งคือ

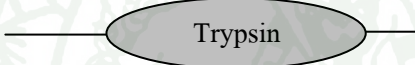
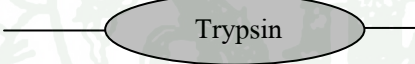
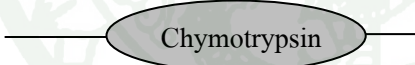
Histidine active site ที่มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น L₆₃TAAHC₆₈ และ Serine active site ที่มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น D₂₀₂TcqGDSGGPLL₂₁₃ (ตารางที่ 5)

จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่เป็น Open reading frame พบว่า โครงสร้างโปรตีน Granz-TL ของปลานิล มีกรดอะมิโน Cysteine (Cys หรือ C) ทั้งหมด 11 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ C₁₃ ซึ่งอยู่ใน Leader sequence และ C₅₂, C₆₈, C₁₁₄, C₁₁₅, C₁₄₄, C₁₇₄, C₁₉₂, C₂₀₄, C₂₁₄ และ C₂₂₈ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ใน Mature Protein แล้วยังสามารถพบตำแหน่งของ Glycosylation site (NXT หรือ NXS) ถึง 5 ตำแหน่งด้วยกัน ได้แก่ Asn-Phe-Ser (N₆FS), Asn-Glu-Ser (N₈₄ES), Asn-Gln-Ser (N₁₅₅QS), Asn-Val-Thr (N₁₆₅VT) และ Asn-Gly-Ser (N₁₉₆GT) ตามลำดับ (ภาพที่ 19) โดยตำแหน่ง Glycosylation site ตำแหน่งแรกคือ Asn₆-Phe-Ser (NFS) อยู่ในส่วนของ Putative signal peptide หรือ Leader sequence

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีค่า *E*-value สูงสุด 5 อันดับแรก โดยใช้โปรแกรม Blast X

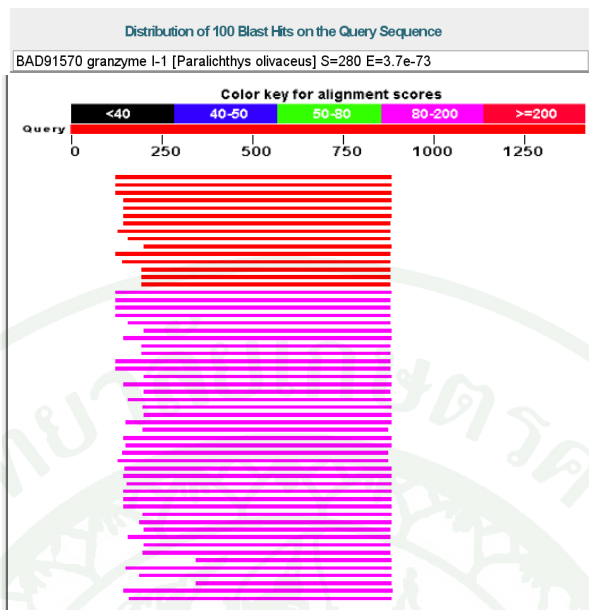
Putative genes	Closest species	<i>E</i> -values	Score (bits)	Length (residues)	Accession number
Granzyme I-1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	4e-73	280	260	AB191196.1
Granzyme III-1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	4e-73	280	261	AB191198.1
Granzyme II	<i>Paralichthys olivaceus</i>	2e-69	267	261	AB191194.1
Granzyme A	<i>Salmo salar</i>	1e-59	235	262	NM_001141037.1
Granzyme A precursor	<i>Salmo salar</i>	1e-58	231	262	BT048690.1

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบโครงสร้างที่เป็น Catalytic domain และบริเวณกรดอะมิโนของตำแหน่งตัด (Active site) ของกลุ่ม Serine protease ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) กับยีน Granzyme ในปลาชนิดต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม PROSITE predictions (<http://au.expasy.org/prosite>)

Putative gene	Common name of fish	Serine protease Domain	Position of active site	Amino acid motif
Granzyme	Nile tilapia		Histidine / 63-68 Serine / 202-213	LTAAHC DTcqGDSGGPLL
Granzyme	Channel catfish		Histidine / 60-65	LTAAHC
Granzyme-like I	Channel catfish		Histidine / 62-67 Serine / 201-212	LTAAHC GAcqGDSGGPLV
Granzyme-like III	Channel catfish		Histidine / 59-64	LTAAHC
Granzyme I-1	Bastard halibut		Histidine / 62-67 Serine / 205-216	LTAAHC DTcqGDSGGPLM

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Putative gene	Common name of fish	Serine protease Domain	Position of active site	Amino acid motif
Granzyme II	Bastard halibut	Trypsin	Histidine / 62-67 Serine / 205-216	LTAAHC ATCaGDSGGPLM
Granzyme III-1	Bastard halibut	Trypsin	Histidine / 62-67 Serine / 205-216	LTAAHC ATckGDSGGPLM
Granzyme A	Atlantic salmon	Trypsin	Histidine / 64-69 Serine / 206-217	LTAAHC DScqGDSGGPLV
Granzyme A precursor	Northern pike	Trypsin	Histidine / 68-73 Serine / 210-221	LTAAHC DAckGDSGGPLM
Granzyme-1	Nile tilapia	Chymotrypsin	Histidine / 62-67	LTAAHC



[dbj|BAD91570.1|](#) granzyme I-1 [Paralichthys olivaceus]

[dbj|BAD91571.1|](#) granzyme I-2 [Paralichthys olivaceus]

Length=260

Score = 280 bits (715), Expect = 4e-73

Identities = 145/257 (56%), Positives = 178/257 (69%), Gaps = 5/257 (1%)

Frame = +3

```

Query 126  MSSLKNFSLISCVLLFIIQPGRGSRIINGKEVEPHSLPYMAYLRTVTNSWCGGTLIHPQ 305
           M  L++F+  SC++L I+  GS IING EV P+SLPYMA L+T T  CGG LI P
Sbjct  1    MFCLRDFTGFFSCMVLLIVHSSHGSEIINGTEVTPNSLPYMALLQT-TKPVCGGILIDPS 59

Query 306  WVLTAAHCTGSYWILGAHSRTKNESKHQRV-VEKSFPHPDYCCAKIDNDLMLLKL-KE 479
           WVLTAAHG G  V+LG HS  E +  Q V VEK F HP Y  + ND+MLLKL K
Sbjct  60    WVLTAAHCKGIKTVLLGVHSIKAGEKNSRQLVKVEKHFAHPCYDPDEKVNDIMLLKLGR 119

Query 480  PVRKTRAVQWLEFGDTRDPAAGSTCLVAGWGATENN--QSSDVLMSVNVTVVDRQTCNS 653
           V++T+ V+ L+ G+ ++DP AG++C+VAGWG T N  + SDVLMS NTVVDR TCNS
Sbjct  120  SVKETKTVKCLKLGNVIKDPAGTSCIVAGWGYTNNEVKKMSDVLMSANVTVVDRGTCNS 179

Query 654  RDYYNHRPEITKHMICAGSNGTNVADTCQGDGGPPLCDGALVGVTSYGAGCGVITKPGI 833
           R YYN +P IT  MICAGS+G  DTC GDGGGPL+C+G L GVTS+G  CG  KPG+
Sbjct  180  RQYYNSKPVITSGMICAGSDGKKNTDTCGGDGGPLMCNGVLAVGVTSGHKKCGQKEKPGV 239

Query 834  YSFISEKQLYWIKTMTK 884
           Y+++S KQL WIK TMK
Sbjct  240  YTYLSVKQLSWIKKTMK 256

```

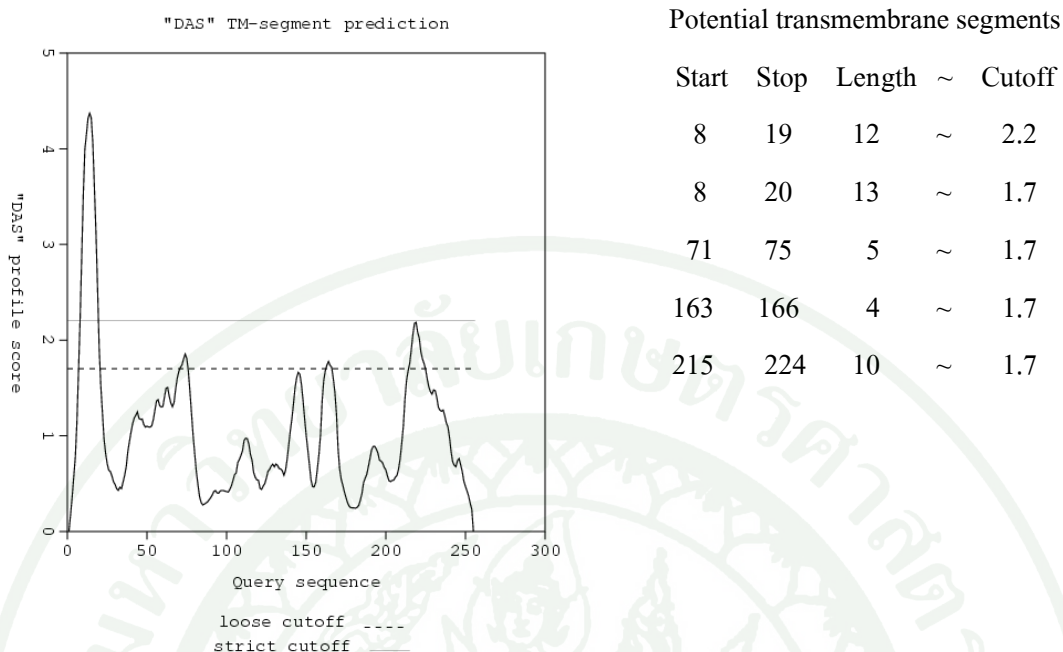
ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน

Granzyme ของปลานิล (Granz-TL) กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานไว้ใน Genbank database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยใช้โปรแกรม Blast X

1	CGGGGCAGTGAATTGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGATTTTACATCCTATAGGG	60
61	CAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGCATTAGCATCTGCTAAAAGAAGGAAG	120
121	AAGAAATGTCGTCTCTGAAAAATTCAGTCTTCTCATCTCATGTGTGCTCCTGTTTCATCA	180
(1)	M S S L K N F S L L I S (C) V L L F I I	(19)
181	TCCAGCCAGGTCGTGGATCTAGGATTATTAATGGGAAAGAGGTCGAGCCACACTCACTGC	240
(20)	Q P G R G S R I I N G K E V E P H S L P	(39)
241	CTTATATGGCCTATCTTAGAACTGTGACAAATCTTGGTGTGGAGGGACATTAATCCATC	300
(40)	Y M A Y L R T V T N S W (C) G G T L I H P	(59)
301	CACAGTGGGTGCTGACAGCTGCCACTGCACTGGGAGTTATTGGGTGATCCTGGGAGCAC	360
(60)	Q W V L T A A H (C) T G S Y W V I L G A H	(79)
361	ACTCCAGAACGAAAAACGAAAGTTCCAAGCATCAAAGAGTCGTTGAGAAAAGTTTTCCTC	420
(80)	S R T K N E S S K H Q R V V E K S F P H	(99)
421	ATCCTGACTACTGTTGTGCAAGATAGACAATGACCTCATGTTGCTGAAGCTTAAAGAAC	480
(100)	P D Y (C) (C) A K I D N D L M L L K L K E P	(119)
481	CGGTGAGGAAAACAGGGCAGTGCAGTGGCTCGAGTTTGGCGACACTGTGAGAGACCCGG	540
(120)	V R K T R A V Q W L E F G D T V R D P A	(139)
541	CAGCTGGCAGCACGTGCCTGGTGGCTGGATGGGGAGCAACTGAAAACAACCAATCATCAG	600
(140)	A G S T (C) L V A G W G A T E N N Q S S D	(159)
601	ACGTCTCATGTCTGTCAATGTGACTGTGGTGGACAGACAGACGTGCAACTCTCGTGATT	660
(160)	V L M S V N V T V V D R Q T (C) N S R D Y	(179)
661	ATTACAACCACAGACCTGAGATCACCAAACACATGATATGTGCTGGTTCAAATGGTACAA	720
(180)	Y N H R P E I T K H M I (C) A G S N G T N	(199)
721	ACGTCGCTGATACCTGTCAAGGGGATTCAAGAGGGCCGCTGTTGTGCGATGGAGCGCTGG	780
(200)	V A D T (C) Q G D S G G P L L (C) D G A L V	(219)
781	TTGGAGTCACTTCTTATGGAGCAGGCTGTGGTGTGATTACAAAACCTGGAATCTACTCAT	840
(220)	G V T S Y G A G (C) G V I T K P G I Y S F	(239)
841	TTATCTCAGAAAAACAGCTGTACTGGATCAAACTACGATGAAGTTATTCATAATGTGTG	900
(240)	I S E K Q L Y W I K T T M K L F *	(255)
901	AAACCACCAGCATCAGTCTGCATGATTTGATGTTATATCTGTCAGTGTGTCTCTGTAGA	960
961	CCATTATTCACTTTATCATTTTACTGTTCTCTTACAGTTTATGATC ATTTA GTTTCTGC	1020
1021	CAGCTTGGTATCTTTTAAAAATAGATTCTGCACTTGGCTAGTCCACCACATGAACCA	1080
1081	CATTTTAGACCTACTGAGAACAAAATTGAAACACTGTTTGAATTTTACCATCTTTTAC	1140
1141	CACACAAACCAGACAGAAACATGGTTATATCTAATCATCATTTTCCAAATA ATTTA AAG	1200
1201	AATTCACAAACAGAGTGTCTCTGGTTGTTGTCAGATGAGTGGGCTGCAGTAAACACAGG	1260
1261	GAGAAGCAATTTTATGTACACTCAAAAGCCATGATTGTAA AATAAAA AAGAGATTATTC	1320
1321	AGACTGTCAAACAGACAGATTCAACGGCTCATATAACCAACTGAACCTGAAAATGAGG	1380
1381	CCTGCGGACAGGATTGTTGAAAAA	1412

ภาพที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (อักษรแถวบน) และลำดับกรดอะมิโน (อักษรแถวล่าง) ที่สมบูรณ์

ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) โดยกรอบสี่เหลี่ยมทางด้าน 5' UTR แสดงถึง Start codon (ATG) และทางด้าน 3' UTR แสดงถึง Stop codon (TAA) กรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งของ Putative signal peptide จำนวน 19 residues วงกลมแสดงถึง Cysteine residues ทั้งหมด 11 ตำแหน่ง ตัวอักษรทึบหนาเอนและขีดเส้นใต้ แสดงถึง N-glycosylation site (NXT หรือ NXS) จำนวน 5 ตำแหน่ง และตัวอักษรทึบหนาและขีดเส้นใต้ แสดงถึงตำแหน่งของ Polyadenylation signal site (AATAAA) และ ATTTA motif ทางด้านปลาย C-terminal



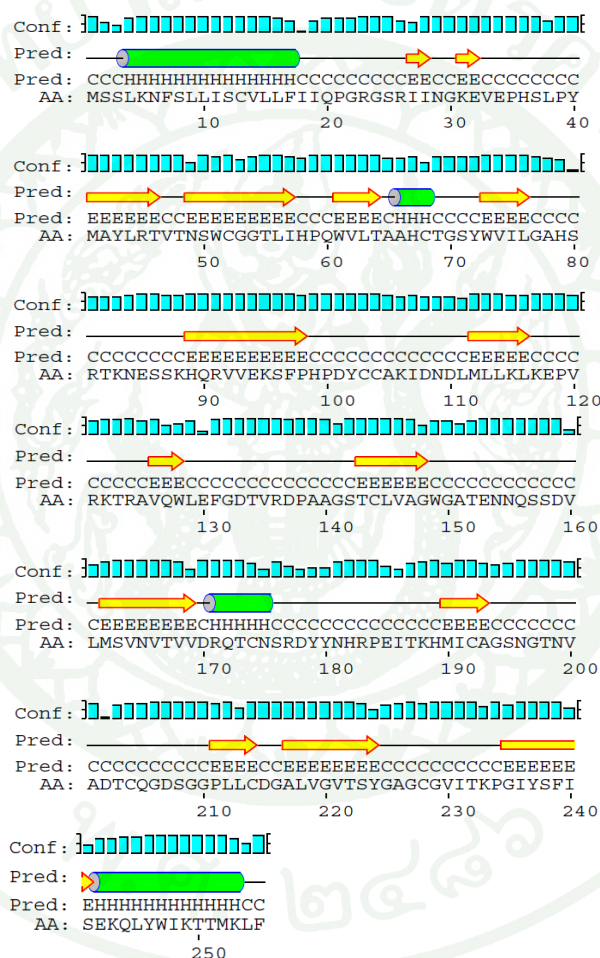
ภาพที่ 20 การหาตำแหน่งของ Hydrophobic leader sequence ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) โดยใช้โปรแกรม “DAS”- Transmembrane Prediction

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) โดยการใช้โปรแกรม ExPASy Proteomics Server (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) แล้วพบว่าโครงสร้างโปรตีนของ Granz-TL ในปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนประมาณ 62,996.4 Da และมีค่า Theoretical isoelectric point (pI) เท่ากับ 5.12 เมื่อพิจารณาแล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนของยีน Caspase-3 ในปลานิลเช่นกัน

จากนั้นทำการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิหรือโครงสร้างลำดับที่ 2 โดยใช้ PSIPRED Protein Structure Prediction Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) พบว่าโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนของยีน Granz-TL ในปลานิลประกอบด้วยส่วนที่เป็น α -helix หรือ H จำนวน 4 ส่วน สำหรับส่วนที่เป็น β -strand หรือ E จำนวน 15 ส่วน และส่วนที่เหลือจะเป็น Random coil หรือ C (ภาพที่ 21) ดังนั้นชนิดและลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโปรตีน จึงมีบทบาทสำคัญต่อการทำหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน สำหรับโปรตีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิลนั้นจัดได้ว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ในกระบวนการของปฏิกิริยาทางชีวเคมีบางประเภทที่จำเพาะภายในเซลล์ให้เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหรือ

สลายพันธะของสารชีวโมเลกุลจำนวนมาก ได้แก่ ไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease) และทริปซิน (Trypsin) เป็นต้น (พรงาม, 2545)

ในปัจจุบันลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของทั้ง Casp3-TL และ Granz-TL ของปลานิล
ได้ถูกบันทึกไว้แล้วในฐานข้อมูล GenBank database โดยมีลำดับ Accession no. เป็น
GQ421464 และ FJ429322 ตามลำดับ



ภาพที่ 21 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) สำหรับ α -helix แทนด้วยอักษร H สำหรับ β -strand แทนด้วยอักษร E และ Random coli แทนด้วยอักษร C (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>)

2.2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโนและการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Caspase-3 (Casp3-TL) และ Granzyme (Granz-TL) ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของ Casp3-TL ในปลานิล ไปทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน (Homology) ของ Casp3-TL ในปลานิล กับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีการบันทึกไว้ใน GenBank database ดังนี้คือ Zebra fish (*Danio rerio*); AB047003, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*); DQ345773, White cloud mountain minnow (*Tanichthys albonubes*); GQ406344, Japanese medaka (*Oryzias latipes*); AB032608, Atlantic salmon (*Salmo salar*); BT059710, Fugu rubripes (*Takifugu rubripes*); AF042797, Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*); EU878546, Northern pike (*Esox lucius*); BT079078, Sablefish (*Anoplopoma fimbria*); BT082348, Chimpanzee (*Pan troglodytes*); AY665274, Bolivian squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*); AY665229, Human (*Homo sapiens*); BC016926, Chinese hamster (*Cricetulus griseus*); FJ940732, Pig (*Sus scrofa*); AB029345, Norway rat (*Rattus norvegicus*); BC081854, House mouse (*Mus musculus*); BC038825, Dog (*Canis lupus familiaris*); AB085580, Chicken (*Gallus gallus*); AF083029, Domestic cat (*Felis catus*); AB090246, Cattle (*Bos taurus*); BC123503, Gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*); DQ296557, African clawed frog (*Xenopus laevis*); D89784, Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*); XM_002191258, *Caligus clemensi*; BT080223 และ Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*); AF506008 ตามลำดับ แล้วจึงเริ่มทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนนำมาทำ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) และโปรแกรม MatGat 2.01 (<http://bitincka.com/ledion/matgat>) แล้วจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนโดยการสร้าง Phylogenetic tree โดยนำลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ของปลานิลและสิ่งมีชีวิตดังกล่าวข้างต้น รวมทั้งยีน Caspases ของ Banana Prawn (*Fenneropenaeus merguensis*); AY839873 และ Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*); DQ846887 ซึ่งจะใช้เป็น Out group มาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 3 version 3.1 ตามวิธีของ UPGMA โดยใช้ค่า Bootstrap ที่ 1,000 Replicates

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลา นิลกับลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ จากการทำ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่าคุณลักษณะของลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลานิลมีความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 282 Residues ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ cDNA ของยีน Caspase-3 ของปลา European sea bass คือเท่ากับ 281 Residues (Reis *et al.*, 2007) โดยที่ลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในกลุ่มของปลาชนิดต่าง ๆ มีจำนวนกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 279-299 Residues และมีจำนวนลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม คืออยู่ในช่วง 274-283 Residues และเมื่อทำการพิจารณาถึงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนของยีน Caspase-3 ในปลานิล พบว่าประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลัก คือส่วนของ Prodomain ทางด้านปลาย N-terminal ที่มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 34 Residues และส่วนของ Domain หรือ Catalytic domain ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนย่อย ได้แก่ Large subunit หรือ Caspase family p20 domain (P17) ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 20 kDa ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำนวน 125 Residues โดยเริ่มจากลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ S₅₂ จนถึง D₁₇₆ ตามลำดับ และ Small subunit หรือ Caspase family p10 domain (P12) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำนวน 92 Residues โดยเริ่มจากลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ K₁₉₁ จนถึง R₂₈₂ ตามลำดับ คิดเป็นโปรตีนขนาดประมาณ 10 kDa (ภาพที่ 22)

โดยทั่วไปกลุ่มยีน Caspases ของปลาสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะโครงสร้างบริเวณ Prodomain ซึ่งได้แก่ กลุ่มของ Inflammatory caspases จะมี Domain ที่เรียกว่า PYRIN domain (PYD) หรือ DAPIN (Domain in apoptosis and interferon response) ในส่วนของ Prodomain ทางด้าน N-terminal ของโมเลกุลโดยเป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกระบวนการ Apoptosis และการอักเสบ (Fairbrother *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมียีน Caspase-A (Caspase), Caspase-B (Caspase2) หรือ Caspase-B like และ Caspase-C หรือ Caspase-C like จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย Caspase กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่ไม่มี Prodomain จะเรียกว่า “Cell death execution” ยีนที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ Caspase-3, Caspase-6 และ Caspase-7 ตามลำดับ และกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มของ Cell death initiation ประกอบไปด้วย Promain ที่สำคัญคือ Caspase activation recruitment domain (CARD) และ Death effector domain (DED) ที่จัดอยู่ใน Superfamily ของ Six-helix bundle death domain-fold (DD) โดย Domain เหล่านี้เป็นตำแหน่งจับกับ Adaptor molecule ของโปรตีนที่ใช้ในการกระตุ้น Effector caspases ต่าง ๆ โดยยีน Caspase ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ Caspase-8a/Caspase-8b/Caspase-8/Caspase-8 like, Caspase-8a like, Caspase-8, Caspase-10a หรือ Caspase-10c, Caspase-10, Caspase-9 และ Caspase-2 ตามลำดับ (Takle and Andersen, 2007) (ภาพที่ 23)

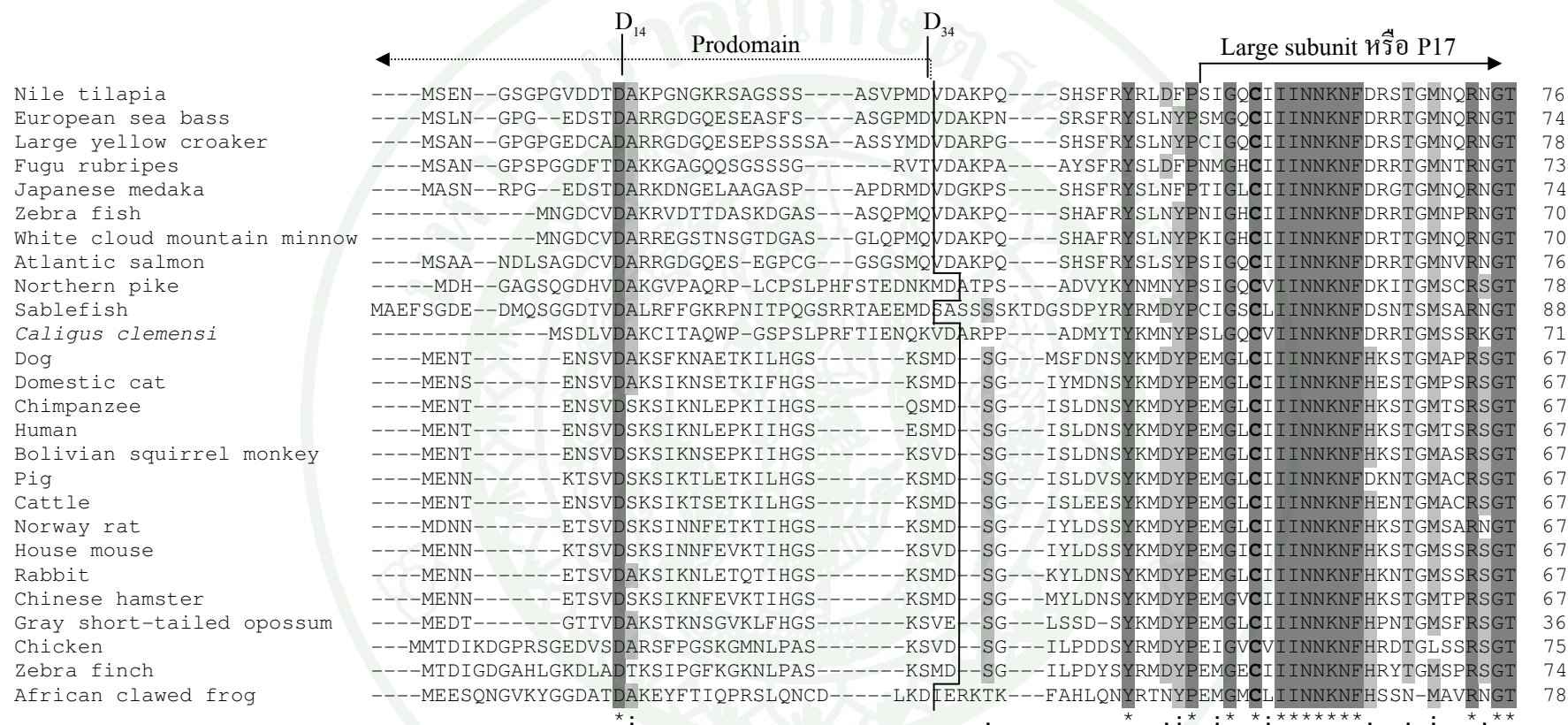
และเมื่อพิจารณาถึงลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณ Large subunit สามารถพบตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนสำคัญ ๆ ที่เป็นลักษณะเฉพาะของกลุ่มยีน Caspase family ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ Histidine active site ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลาไนเป็น HsnsaSfvCiLLSHG โดยอยู่ในช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ 117-131 และยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้ค่อนข้างคล้ายคลึงกันเมื่อเปรียบเทียบกับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ โดยมีลักษณะของ Consensus pattern ดังนี้คือ His -Xaa (4)-Ser-Xaa(2)- Cys-Xaa-Leu-Leu-Ser/Thr-His-Gly (HXXXXSXXCXLLS/THG) ซึ่ง Xaa คือกรดอะมิโนชนิดใด ๆ และตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนกรดอะมิโน โดยตำแหน่งตัดของ Histidine active site จะเป็น Histidine residues ลำดับที่สองของลำดับกรดอะมิโนใน Motif นี้ และลำดับกรดอะมิโนที่เรียกว่า Integrin-recognition motif หรือ Arginine-Glycine-Aspartate motif (Arg-Gly-Asp หรือ RGD) ที่สามารถพบได้ในทุก ๆ สิ่งมีชีวิตกรดอะมิโนในบริเวณนี้ทำหน้าที่เป็น Adhesion protein จับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งอาศัย Receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ เช่น Ligand fibrinogen เป็นต้น (Adderley and Fitzgerald, 2000) และสามารถพบลำดับกรดอะมิโน QACXG หรือ Pentapeptide active-site motif หรือ Cysteine active site เป็นตำแหน่งตัดของ Active site aspartate residue ที่อยู่บริเวณปลาย C-terminal ตำแหน่งตัดนี้จะเป็นตัวแบ่งแยกระหว่าง Large และ Small subunit โดยมีความ Conserved กันสูงในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งสามารถพบได้ในบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่ 170-174 Residues ของยีน Caspase-3 ในปลาไน (ภาพที่ 22) และในส่วนของ Small subunit สามารถพบลำดับกรดอะมิโน Tryptophan (Trp หรือ W) 2 ตำแหน่งคือที่ W₂₁₄ และ W₂₂₂ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่แสดงถึงการเรียงตัวใหม่ (Rearrangement) ทำให้กลายเป็นยีน Caspase-3 ที่ Active แล้ว (Park *et al.*, 2004) และสุดท้ายลำดับกรดอะมิโนที่เป็น Protein binding domain คือเป็นบริเวณ Active site อีกตำแหน่งหนึ่งที่ทำหน้าที่จับกับโปรตีนของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Monteiro *et al.*, 2009) โดยมีกรดอะมิโนเป็น Glycine-Serine-Tryptophan-Phenylalanine-Isoleucine (Gly-Ser-Trp-Phe-Ile หรือ GSWFI) ตรงตำแหน่ง Residues ที่ 220-224 ซึ่งพบอยู่ทางด้านปลาย C-terminal และพบว่ามีความ Conserved กันค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 22)

เมื่อพิจารณาโครงสร้างโดยรวมโดยอาศัยข้อมูลข้างต้น ทำให้สามารถสรุปได้ว่า Casp3-TL มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลที่คล้ายคลึงกับ Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว ยีน Caspase-3 จัดเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม Effector caspases ซึ่งภายหลังจากการเกิดกระบวนการ Translation โปรตีนที่ได้จะอยู่ในรูปของ Procaspase-3 ซึ่งอยู่ในสภาพที่เรียกว่า “Zymogen” หรือโปรตีนที่ยังไม่สามารถทำงานได้ (Inactive) โดยจะอยู่เป็นอิสระเพียงโมเลกุลเดียว (Monomer) จากนั้นโมเลกุลเดี่ยวของโปรตีนนี้จะถูกตัด (Cleave) ในตำแหน่ง Aspartate residues

(Asp หรือ D) อย่างจำเพาะซึ่งใน Casp3-TL โมเลกุล จะมีทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ D₁₄, D₃₄ และ D₁₇₈ โดย Caspase-9 เพื่อให้ Procaspase-3 เปลี่ยนสภาพให้อยู่ในรูปของโปรตีนที่พร้อมจะทำงาน (Active) และมีความเสถียรสูงแล้วเกิดการรวมตัวกันของ Large subunit และ Small subunit เป็น 2 โมเลกุลในลักษณะที่เป็น Dimer หรือ Heterodimer ซึ่งพร้อมที่จะไปทำหน้าที่ในการ Activated substrate ได้อย่างจำเพาะเจาะจงต่อไป ในกลไกการทำงานภายในเซลล์ (Walters, 2009) (ภาพที่ 24)

ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ Casp3-TL ในปลานิลกับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม MatGat 2.01 และเมื่อพิจารณาถึงความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน (Amino acid identity) ของ Casp3-TL ในปลานิล กับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มปลา (Fish) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 57.9-79.9% โดยมีค่าความเหมือนกันสูงสุดกับยีน Caspase-3 ของปลา European sea bass และมีค่าใกล้เคียงกันกับยีน Caspase-3 ของปลา Large yellow croaker คือเท่ากับ 79.3% รองลงมาคือยีน Caspase-3 ของปลา Fugu rubripes (76.4%), ยีน Caspase-3B ของปลา Japanese medaka (75.9%), ยีน Caspase-3 precursor ของปลา Atlantic salmon (75.7%), ยีน Caspase-3 ของปลา Zebra fish (71.1%), ยีน Caspase-3 ของปลา White cloud mountain minnow (70.7%), ยีน Caspase-3 precursor ของปลา Northern pike (58.9%) และมีค่าต่ำสุดในยีน Caspase-3 precursor ของปลา Sablefish (57.9%) ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของ Casp3-TL ของปลานิล กับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals), สิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์ปีก (Avians) และสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Invertebrates พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 51.7-57.3%, 55.9-57.6% และ 58.4% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน (Amino acid similarity) ของยีน Casp3-TL ในปลานิลกับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มปลา (Fish) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 71.6-87.2% และมีค่าความคล้ายคลึงสูงสุดกับยีน Caspase-3 ในปลา European sea bass โดยมีค่าเท่ากับ 87.2% และมีค่าใกล้เคียงกับยีน Caspase-3 ในปลา Large yellow croaker คือเท่ากับ 86.3% รองลงมาคือยีน Caspase-3 ในปลา Puffer fish (85.8%), ยีน Caspase-3B ในปลา Japanese medaka (84.4%), ยีน Caspase-3 ในปลา White cloud mountain minnow (84.4%), ยีน Caspase-3 ในปลา Zebra fish (83.3%), ยีน Caspase-3 precursor ในปลา Atlantic salmon (83.1%), ยีน Caspase-3 precursor ในปลา Northern pike (76.6%) และมีค่าต่ำสุดในยีน Caspase-3 precursor ในปลา Sablefish (71.6%) ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน Casp3-TL ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals), สิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์ปีก (Avians) และสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Invertebrates พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 68.4-71.6%, 72.4-74.5% และ 78.0% ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

นอกจากนี้ ผลจากการศึกษาและวิเคราะห์ยังพบว่าค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) มีค่าอยู่ในช่วง 58.0-81.7% เมื่อเปรียบเทียบกับยีน Caspase-3 ในกลุ่มของปลา โดยมีค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงที่สุดกับยีน Caspase-3 ในปลา European sea bass (81.7%) เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์ปีก และสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Invertebrates พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 59.0-62.5%, 38.6-62.7% และ 63.2% ตามลำดับ โดยพบว่าค่าที่ได้คล้ายคลึงและเป็นไปในการทำงานเดียวกันกับค่าความเหมือนและค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ Casp3-TL ในปลานิล กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลานิลกับลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยที่สัญลักษณ์ (*) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน (:) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูง (.) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันต่ำ (◀.....) แสดงตำแหน่งของ Prodomain (→) แสดงตำแหน่งของ Large subunit (---▶) แสดงตำแหน่งของ Small subunit และกรอบสี่เหลี่ยม แสดงตำแหน่งของ Active site, Conserve sequence และ Motif ต่าง ๆ

Nile tilapia	DVDAGNAMRVFKNLGYNVKMYNDQTVQDMMNVLTDAKEDHNSNSAFVCIILLSHGDE-GVFFGTDGSAVKHLTSLFRGDRCKSLVGKPK	165
European sea bass	DVDAGNAMKVFTKLGKTKIYNDQTVQMKQVLISVSKEDHSCNASFCVLLSHGDE-GVFFGTDGSVELKYLTSLFRGNHCISLVGKPK	163
Large yellow croaker	DVDAANVMKVFAKLGYRAKVYNDQTVQMRQVLTSVAKEDHSCYASFVCVLLSHGDE-GVFFGTDGSIELKYLTSLFRGDRCKSLVGKPK	167
Fugu rubripes	DVDAANAMKVFLSLGYKVKVHNDQTVNQMKQLLSAAEEDHSACASFVCVLLSHGDE-GVFFGTDGSVELKYLTSLFRGDRCKSLVGKPK	162
Japanese medaka	DIDAASAMKVFSKLGKRVKIYNDQTVKQIKQLLTDVSRMDSASFVCIILLSHGDE-GVFFGTDGSIELKTLTSLFRGDHCKSLVGKPK	163
Zebra fish	DVDAGNVMNVFRKLGKIVKVYNDQTVQIMQVLTVAHDDHSCASLVCVLLSHGDE-GVFFGTDTSVDLKSLSLFRGDRCPSLVGKPK	159
White cloud mountain minnow	DVDAGNVMNVFKKLGKVVKVYNDQTVMQIKQVLTAVAHDHSCASLVCVMPSHGDD-GVFFGTDGAVELKALTSLFRGDRCCSLVGKPK	159
Atlantic salmon	DVDAGNVMKVFGKLGKVKVYNDQTVQIKHVLTTASKEDHSCSASFVCVLLSHGDD-GVFFGTDASIELKSLTSLFRGDRCNLSLVGKPK	165
Northern pike	DVDAAHAMKFLTGLGYKIKFVNDQSVKQIQDLLLLKVSQEDHSQSASFVCVLLSHGDD-GVLYGTDGIVQLKKLTSLFGDKCKTLVGKPK	167
Sablefish	DVDAAAQAFSKLGYKVNVDQTVKQMKQLLYDASREDHSDRASFCVLLSHGDE-GVIYGTGDFERFEDLTIYFKGDRCRSLVGKPK	177
<i>Caligus clemensi</i>	DVDAGYARKVFERLGYNVKVANDQTVQIQQLLYTVSQDNHSQSASFVCMVLSHGEE-GVIFYGTGNVELRKLTGLFRGDRCKTLVGKPK	160
Dog	DVDAANLRETFTNLKYEVRNKNDLTCEEILELMNSVSKEDHSKRSSFCVLLSHGDE-GIIFGTNGPVDLRKVTGFFRGDYCRSLTGKPK	156
Domestic cat	DVDAANLRETFTNLKYEVRNKNDLTREQIIVALLDSVSREDHSKRSSFCVLLSHGEE-GIIFYGTNGPVDLKKLTGFFRGDYCRSLTGKPK	156
Chimpanzee	DVDAANLRETFRNLKYEVRNKNDLTREEIVELMRDVSKEHDKRSSFCVLLSHGEE-GIIFGTNGPVDLKKITNFFRGDRCRSLTGKPK	156
Human	DVDAANLRETFRNLKYEVRNKNDLTREEIVELMRDVSKEHDKRSSFCVLLSHGEE-GIIFGTNGPVDLKKITNFFRGDRCRSLTGKPK	156
Bolivian squirrel monkey	DVDAANLRETFRNLKYEVRNKNDLTREEIVELMRNVSKEHDKRSSFCVLLSHGEE-GIIFGTNGPVDLKKITSFFRGDCCRSLTGKPK	156
Pig	DVDAANLRETFTNLKYEVRNKNDLTREEILELMHSVSKEDHDKRSSFCVLLSHGEE-GKIFGTNGPVDLKKLTSFFRGDCCRTLTGKPK	156
Cattle	DVDAANLRETFRNLKYEVRNKNDLTCKEMLELMNSVSKEDHDKRSSFCVLLSHGEE-GIIFGTNGPVDLKKLASFFRGDYCRSLTGKPK	156
Norway rat	DVDAANLRETFRNLKYEVRNKNDLTREEIMELMDSVSKEDHDKRSSFCVILSHGDE-GVIFGTNGPVDLKKLTSFFRGDYCRSLTGKPK	156
House mouse	DVDAANLRETFRNLKYEVRNKNDLTREDILELMDSVSKEDHDKRSSFCVILSHGDE-GVIYGTNGPVELKKLTSFFRGDYCRSLTGKPK	156
Rabbit	DVNAANLGETFRNLKYEVRNKNDLTREEIMELMYNVSKEHDKRSSFCVILSHGDE-GVIYGTNGPIELKKLTSFFRGDYCRSLTGKPK	156
Chinese hamster	DVDAANLRETFRNLKYEVRNKNDLTCEGIVELMKNVSKEDHDKRSSFCVILSHGEE-GVIFGTNGPVDLKKLTYYFRGDYCRSLTGKPK	156
Gray short-tailed opossum	DVDAASLSDTFRSLKYEVRNKNDLTCEITELNSVSKEDHSQRSSFCVILSHGEE-GVIFGTDRSVELKRLTCFFRGDKCRSLTGKPK	155
Chicken	DADAASVREVFMKLGKVKLNNDLSSRDIFKLLKNVSEEDHDKRSSFCVLLSHGDE-GLFYGTGDPLELKVLTSLFRGDKCRSLAGKPK	164
Zebra finch	DADAASVREVFMKLGKIKINNDLSCGIFNLLKNVSEEDHDKRSSFCVLLSHGDE-GLIYGTGDPLELKALTSLFRGDRCRSLAGKPK	163
African clawed frog	DVDALKLHETFTGLGYEVMVCNDQKSSDIIGRLKKISEEDHDKRSSFCVAILSHGDEEDGSICGVDPVPIHIKNLTDLFRGDRCKTLVGKPK	167

* : * * * * ** . : : : : ** : : : : : * : * : : : : * : * : : : *

Histidine active site
(The Caspase family signature)

RGD motif

ภาพที่ 22 (ต่อ)

		D ₁₇₈		Small subunit หรือ P12	W ₂₁₄	W ₂₂₂										
Nile tilapia	LFFI	QACRG	TDLDPG-----	IETD	SETDG-----	VKIP	VEANFLYAFSPAPGYYSWRNTMTGSWFI	QSVCDMISKYGKELEILHI	240							
European sea bass	LFFI	QACRG	TDLDPG-----	IETD	SGEDGT-----	TKIP	VEADFLYAFSTAPGYYSWRNTTITGSWFI	QSLCDLISKYGKELELQHI	239							
Large yellow croaker	LFFI	QACRG	TDLDPG-----	IETD	SADDGT-----	TKIP	VEADFLYAYSTAPGYYSWRNTMTGSWFM	QSLCDMISKYGKELELQHI	243							
Fugu rubripes	LFFI	QACRG	NDLDDG-----	IETD	SAADSST-----	TKIP	VEADFLYAFSTAPGYYSWRNTTSGSWFM	QSLCDAISKYGKELELQHI	239							
Japanese medaka	LFFI	QACRG	TELDG-----	IETD	SKEDT-----	TKIP	VEADFLYAFSTAPGYYSWRNTMTGSWFI	QSLCEMLISKYGKELELHI	238							
Zebra fish	LFFI	QACRG	TELDG-----	VE	DHTDHPDIPDGRER	IP	VEADFLYAYSTVPGYYSWRNTMTGSWFI	QSLCEMMTKYGSELELLOI	240							
White cloud mountain minnow	LFFI	QACRG	TELDG-----	VE	ADAGSS---	SDGS	VRIPVEADFLYAYSTVPGYYSWRNTMTGSWFI	QSLCDMMAKYGKELELMQI	237							
Atlantic salmon	LFFI	QACRG	TDLDRG-----	IETD	SSSD-----	GS	STRIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNTQSGWFI	QSLCEMIGKYSKELEVQHI	242							
Northern pike	LFFI	QACRG	SELD-----	GG	IETDSVANDS-----	QER	IPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNTQNGSWFM	QALFKMFQQYGKTLVEMQI	244							
Sablefish	LFFI	QACRG	SDLDDG-----	SS	IETDSVDAQ-----	SER	IPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNTQNGSWFM	QSLCEMLLRFNRELELMQI	256							
Caligus clemensi	LFFI	QACRG	SDLDCGIETDSAAGGI	ETD	SVAGNY----	PER	IPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNTDKGSWFI	QALCEMLQRYGKQLDIMQI	246							
Dog	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGIEDD-----	MACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QSLCAMLKLYAHKLEFMHI	235							
Domestic cat	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGTEDD-----	IACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QSLCSMLRLYAHELEFMHI	235							
Chimpanzee	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGVDDD-----	MACH	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QSLCAMLKQYADKLEFMHI	235							
Human	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGVDDD-----	MACH	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QSLCAMLKQYADKLEFMHI	235							
Bolivian squirrel monkey	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGVDDD-----	MACH	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSRDGSWFI	QSLCAMLKQYAHKLEFMHI	235							
Pig	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGTEDD-----	MACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QSLCAALKQYVHKLELMHI	235							
Cattle	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGAEDD-----	MACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNAKNGSWFI	QALCEMLKKHAHRLELMHI	235							
Norway rat	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGTDDD-----	MACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSRDGSWFI	QSLCAMLKLYAHKLEFMHI	235							
House mouse	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGTDEE-----	MACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QSLCSMLKLYAHKLEFMHI	235							
Rabbit	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGVDYD-----	MACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSEEGSWFI	QSLCAMLKEYAHKLEFMHI	235							
Chinese hamster	LFII	QACRG	TELDG-----	IETD	SGTDDD-----	MACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QSLCAMLKLYAHKLEFMHI	205							
Gray short-tailed opossum	LFII	QACRG	TELDG-----	VE	TD	SGTDED-----	IACQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSKDGWFI	QALCAVLKQHAHKLIMQI	234						
Chicken	LFFI	QACRG	TELDG-----	IETD	SGPDE-----	TVCQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNAAEGSWFI	QSLCRMLKEHARKLELMQI	242							
Zebra finch	FFFI	QACRG	TELDG-----	IETD	SGSEE-----	TMCQ	KIPVEADFLYAYSTAPGYYSWRNSAEGSWFI	QSLCKMLKEHARKLELMQI	241							
African clawed frog	IFFI	QACRG	TELDG-----	IETD	SCSEPR-----	EEIQR	IPVEADFLYAYSTVPGYYSWRDKMDGSWFI	QSLCKMIKLYGSHLELIQI	246							
	:::	*****	:::	**	:::	*	*****	*****	:::	*	*****	:::	:	.	:::	*
				(QACXG) Pentapeptide active-site motif				Protein binding domain (GSWFI)								

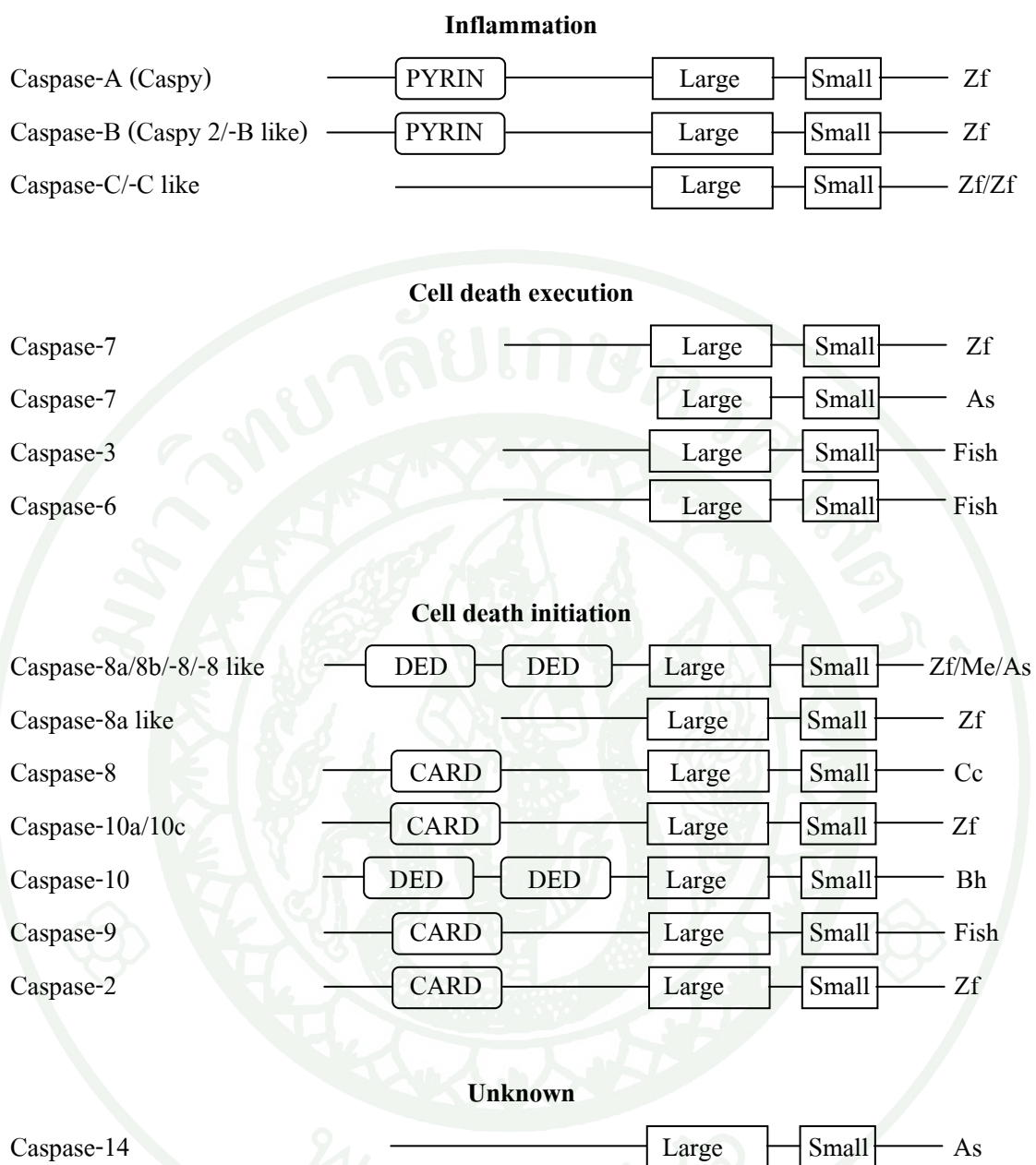
ภาพที่ 22 (ต่อ)

-----▶

Nile tilapia	MTRVNHKVAVEFESASNSPGFDAKKQIPCIVSMLTKEMYFSR-	282
European sea bass	MTRVNHKVAVEFESISNSPGFNAKKQIPCIVSMLTKEMYFSP-	281
Large yellow croaker	MTRVNHKVAVEFESISHSPPGFHAKKQIPCIVSMLTKEMYFSP-	285
Fugu rubripes	LTRVNHKVAVDVFESVSNLPGFDAKKQIPCIVSMLTKEMYFS--	280
Japanese medaka	MTRVNHMVAVEFESISLPGFHAKKQIPCIVSMLTKEMYFYP-	280
Zebra fish	MTRVNHKVALDFESTSNMPGFDKQIPCIVSMLTKEMYFTP-	282
White cloud mountain minnow	MTRVNHKVALDFVSTSNMPDFDSKKQIPCIVSMLTKEMYFSA-	279
Atlantic salmon	LTRVNHKVATEFESASNSPGFDAKKQIPCIVSMLTKEMYFTP-	284
Northern pike	MTRVNHMVALNFESSSTPGFSCKKQIPCIVPMLTKELYFPS-	286
Sablefish	MTRVNCKVALHFESASGLPGYSGKKQIPCIVSMLTKDFYFPQK	299
<i>Caligus clemensi</i>	MTRVNHKVAHDFEASAN-----KQIPCIVSMLTKHLYFPQ-	281
Dog	LTRVNRKVATEFESFSLDSAFHGKKQIPCIVSMLTKELYLYH-	277
Domestic cat	LTRVNRKVATEFESFSLDSAFHGKKQIPCIVSMLTKELYFYH-	277
Chimpanzee	LTRVNRKVATEFESFSFDTFHAQQIPCIVSMLTKELYFYH-	277
Human	LTRVNRKVATEFESFSFDTFHAQQIPCIVSMLTKELYFYH-	277
Bolivian squirrel monkey	LTRVNRKVATEFESSFDTFHAQQIPCIVSMLTKELYFYQ-	277
Pig	LTRVNRKVAVEFESFSTDSTFHAQQIPCIVSMLTKELYFYH-	277
Cattle	LTRVNRKVAIEYESFSTDSAFHAKKQIPCIIMSMLTKELY----	274
Norway rat	LTRVNRKVATEFESFSLDATFHAQQIPCIVSMLTKELYFYH-	277
House mouse	LTRVNRKVATEFESFSLDSTFHAQQIPCIVSMLTKELYFYH-	277
Rabbit	LTRVNRKVATEFESYSLDATFHAQQIPCIVSMLTKELYFYH-	277
Chinese hamster	LTRVNRKVAIEFESFSLDSTFHAQQIPCIVSMLTKELYFYQ-	277
Gray short-tailed opossum	LTRVNRKVATEFESYSLDISFHAQQVPCIMSMLTKELYFSH-	276
Chicken	LTRVNRVA-EYESCSTRQDFNAKKQIPCIVSMLTKEFYFPC-	283
Zebra finch	LTRVNRVA-EYESCSTRQDFNAKKQIPCIVSMLTKEFYFPS-	282
African clawed frog	LTCVNHMVALDFET-----FHAKKQIPCVSMLTKSFYFFK-	282

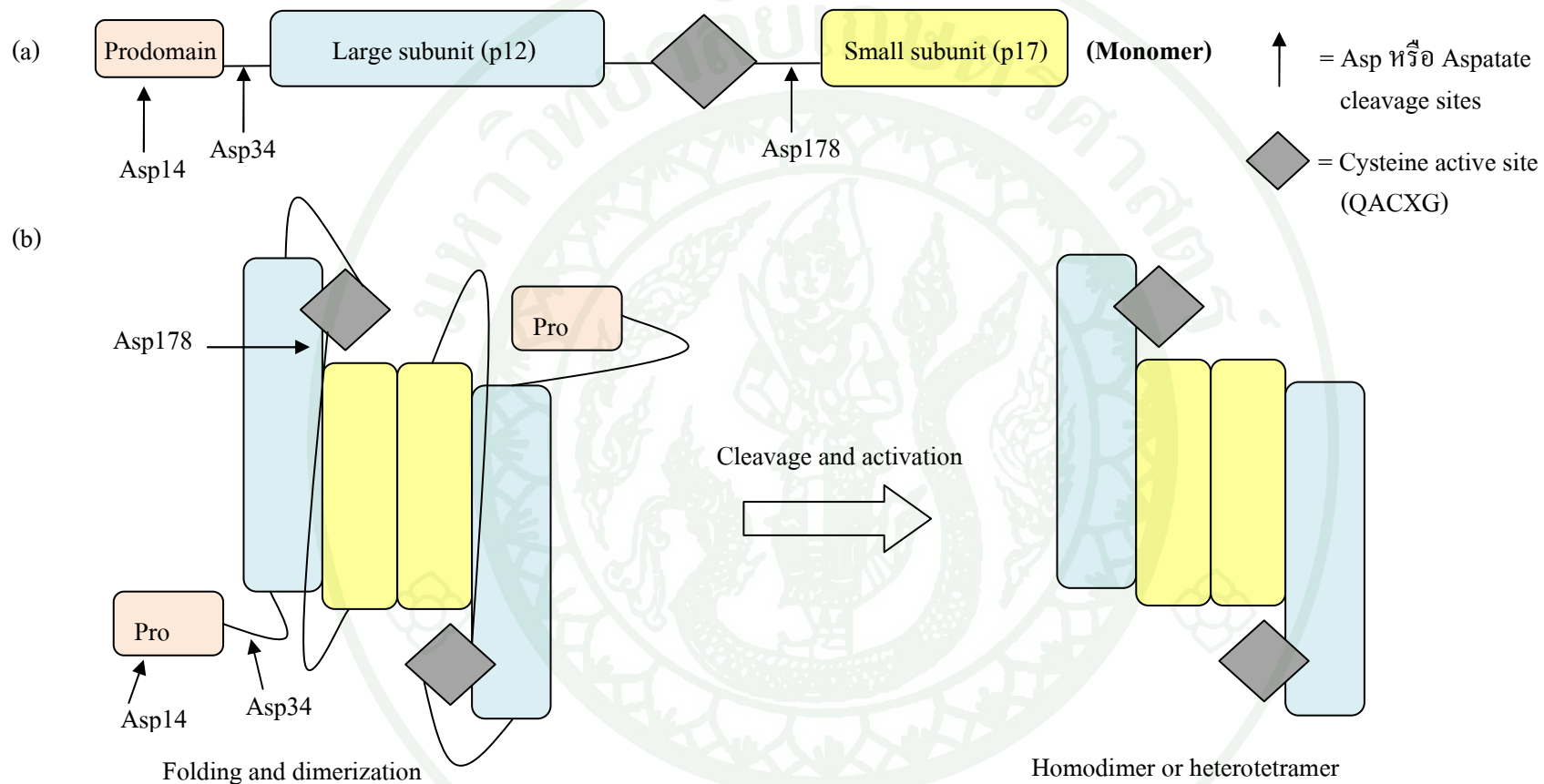
:* ** ** .: : **:***:.**** :*

ภาพที่ 22 (ต่อ)



ภาพที่ 23 การจัดกลุ่มของยีน Caspases ในปลา โดยแบ่งตามลักษณะของ Prodomain โดยที่ As คือ Atlantic, Bh คือ Bastard halibut, Cc คือ Channel catfish, Me คือ Medaka และ Zf คือ Zebrafish

ที่มา: Takle and Andersen (2007)



ภาพที่ 24 โครงสร้างโมเลกุลอย่างง่ายของอิน Caspase-3 ในปลาไน (Nile tilapia) (a) ในรูป Inactive (b) ในรูป Active

ที่มา: ดัดแปลงจาก Walters (2009)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

Common names	Putative genes	Scientific name	Amino acid		Nucleotide	Accession
			Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	number
Mammals						
Human	Caspase-3	<i>Homo sapians</i>	57.0	71.3	62.5	BC016926
Chimpanzee	Caspase-3	<i>Pan troglodytes</i>	57.0	71.3	62.4	AY665274
Bolivian squirrel monkey	Caspase-3	<i>Saimiri boliviensis</i>	56.6	71.3	62.0	AY665229
Chinese hamster	Caspase-3	<i>Cricetulus griseus</i>	56.6	69.9	62.1	FJ940732
Pig	Caspase-3	<i>Sus scrofa</i>	55.9	70.6	59.0	AB029345
Norway rat	Caspase-3	<i>Rattus norvegicus</i>	57.3	69.9	62.4	BC081854
House mouse	Caspase-3	<i>Mus musculus</i>	56.3	69.5	60.1	BC038825
Dog	Caspase-3	<i>Canis lupus familiaris</i>	56.3	69.1	61.8	AB085580
Domestic cat	Caspase-3	<i>Felis catus</i>	57.0	69.5	60.4	AB090246
Cattle	Caspase-3	<i>Bos taurus</i>	54.5	70.6	59.9	BC123503
Gray short-tailed opossum	Caspase-3-like protein 1	<i>Monodelphis domestica</i>	54.2	71.6	60.5	DQ296557
African clawed frog	XCPP32	<i>Xenopus laevis</i>	51.7	68.4	59.6	D89784
Rabbit	Cysteine protease CPP32	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	56.3	71.3	60.6	AF506008

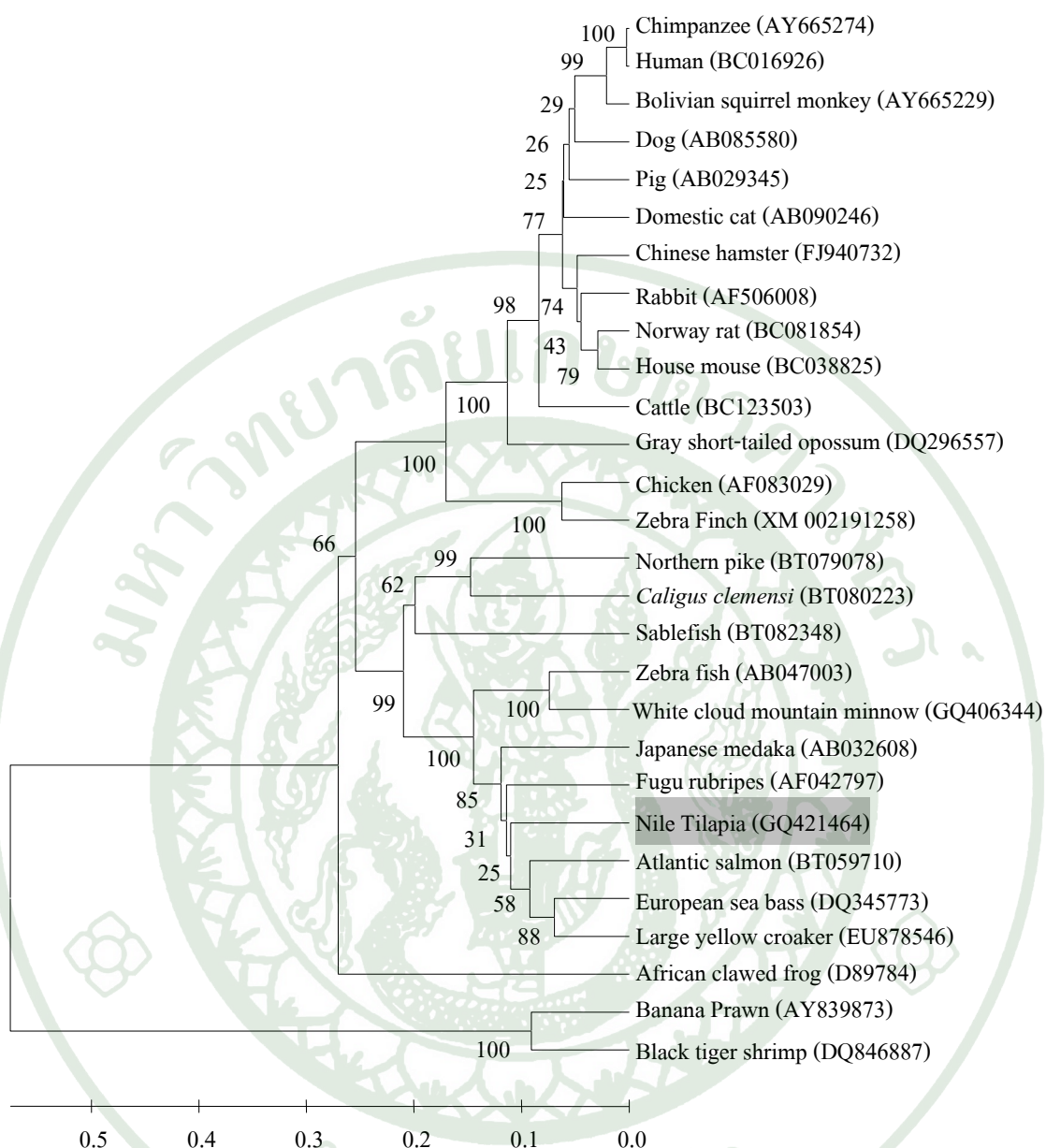
ตารางที่ 6 (ต่อ)

Common names	Putative genes	Scientific name	Amino acid		Nucleotide	Accession
			Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	number
Avian						
Chicken	Caspase-3	<i>Gallus gallus</i>	55.9	72.4	38.6	AF083029
Zebra Finch	Caspase-3	<i>Taeniopygia guttata</i>	57.6	74.5	62.7	XM_002191258
Fish						
Zebra fish	Caspase-3	<i>Danio rerio</i>	71.1	83.3	70.0	AB047003
European sea bass	Caspase-3	<i>Dicentrarchus labrax</i>	79.9	87.2	81.7	DQ345773
White cloud mountain minnow	Caspase-3	<i>Tanichthys albonubes</i>	70.7	84.4	69.5	GQ406344
Japanese medaka	Caspase-3B	<i>Oryzias latipes</i>	75.9	84.4	58.0	AB032608
Atlantic salmon	Caspase-3 precursor	<i>Salmo salar</i>	75.7	83.1	75.6	BT059710
Puffer fish	Caspase-3	<i>Takifugu rubripes</i>	76.4	85.8	76.6	AF042797
Large yellow croaker	Caspase-3	<i>Larimichthys crocea</i>	79.3	86.3	81.2	EU878546
Northern pike	Caspase-3 precursor	<i>Esox lucius</i>	58.9	76.6	66.5	BT079078
Sablefish	Caspase-3 precursor	<i>Anoplopoma fimbria</i>	57.9	71.6	63.7	BT082348

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Common names	Putative genes	Scientific name	Amino acid		Nucleotide	Accession
			Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	number
Invertebrate						
Fish lice	Caspase-3 precursor	<i>Caligus clemensi</i>	58.4	78.0	63.2	BT080223

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธีของ UPGMA เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Caspase-3 ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 27 ชนิด พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรกคือ กลุ่มของยีน Caspase-3 ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vertebrate) ชั้นสูง ที่ประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิต สองกลุ่มย่อย คือกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) และกลุ่มของสัตว์ปีก (Avians) กับกลุ่ม ที่สองคือกลุ่มของยีน Caspase-3 ของปลาทั้งหมดรวมอยู่กับ Fish lice (*Caligus clemensi*) ซึ่งเป็น Invertebrate ที่แยกตัวรวมกันเป็นกลุ่มย่อยกับปลา Northern pike กับ Sable Fish ขณะที่ Casp3-TL ของปลานิลถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยของยีน Caspase-3 โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Japanese medaka, Puffer fish, Large yellow croaker, European sea bass, Atlantic salmon, Zebra fish และ White cloud mountain minnow ตามลำดับ (ภาพที่ 25) ขณะที่ยีน Caspase-3 ของ African clawed frog ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Amphibian) กลับปรากฏว่าไม่มีความสัมพันธ์กับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตทั้งสองกลุ่มเลย นอกจากนี้ ยีน Caspases ของ Banana prawn และ Black tiger shrimp ซึ่งใช้เป็น Control out group จะพบว่าแยกออกจากกลุ่มของยีน Caspase-3 จาก สิ่งมีชีวิตทั้งสองกลุ่มอย่างชัดเจน



ภาพที่ 25 ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการระหว่างลำดับกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 ในปลานิล กับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้ใน GenBank database ด้านหลังชื่อสามัญของสิ่งมีชีวิตแสดงถึงหมายเลข Accession number

ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีน Granzyme ในปลานิล (Granz-TL) นั้น เมื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-TL ในปลานิล กับยีน Granzyme ชนิดต่าง ๆ จากสิ่งมีชีวิตที่มีการบันทึกไว้ใน GenBank database ดังนี้คือ House mouse granzyme M (*Mus musculus*); AB015728, House mouse granzyme K (*Mus musculus*); AB032200, House mouse granzyme N (*Mus musculus*); AB049454, Bastard halibut granzyme II (*Paralichthys olivaceus*); AB191194, Bastard halibut granzyme I-1 (*Paralichthys olivaceus*); AB191196, Bastard halibut granzyme III-1 (*Paralichthys olivaceus*); AB191198, Platypus granzyme (*Ornithorhynchus anatinus*); AF275653, Chicken granzyme A precursor (*Gallus gallus*); AJ544060, Horse granzyme B (*Equus caballus*); AM183299, Channel catfish granzyme (*Ictalurus punctatus*); AY286012, Nile tilapia granzyme-1 (*Oreochromis niloticus*); AY918866, Channel catfish granzyme-like I (*Ictalurus punctatus*); AY942183, Channel catfish granzyme-like III (*Ictalurus punctatus*); AY942184, Norway rat granzyme A (*Rattus norvegicus*); B082125, House mouse granzyme B (*Mus musculus*); BC002085, Human granzyme K (*Homo sapiens*); BC035802, House mouse granzyme C (*Mus musculus*); BC120757, Norway rat granzyme B (*Rattus norvegicus*); BC127475, Northern pike granzyme A precursor (*Esox lucius*); BT079306, Pig-tailed macaque granzyme K (*Macaca nemestrina*); EU526083, Pig granzyme H (*Sus scrofa*); FJ439673, House mouse granzyme G (*Mus musculus*); J02872, House mouse granzyme D (*Mus musculus*); J03255, House mouse granzyme F (*Mus musculus*); J03257, Cattle granzyme A (*Bos taurus*); NM_001099095, Atlantic salmon granzyme A (*Salmo salar*); NM_001141037 และ Norway rat granzyme-like protein III (*Rattus norvegicus*); X76996 ตามลำดับ แล้วจึงเริ่มทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน โดยการนำวิเคราะห์ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) และโปรแกรม MatGat 2.01 (<http://bitincka.com/ledion/matgat>) แล้วจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Granzyme โดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 3 version 3.1 ตามวิธีของ UPGMA โดยใช้ค่า Bootstrap ที่ 1,000 Replicates

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-TL ในปลานิลกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการทำ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่าคุณลักษณะของลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-TL ในปลานิล พบว่ามีความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 256 Residues ซึ่งพบว่าลักษณะลำดับกรดอะมิโนนั้น

คล้ายคลึงกับยีน Granzyme ในกลุ่มของปลา Bastard halibut ได้แก่ยีน Granzyme-I, ยีน Granzyme II และยีน Granzyme III-1 ตามลำดับ และพบว่าความยาวลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ที่จัดอยู่ในกลุ่มปลาชนิดอื่น ๆ มีจำนวนกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 254-263 Residues และมีจำนวนลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับยีน Granzyme ของกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือพบว่ายู่ในช่วง 239-264 Residues และในกลุ่มของ Avian ความยาวของลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme A ใน Chicken มีค่าเท่ากับ 260 Residues เมื่อทำการพิจารณาถึงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนของยีน Granz-TL ในปลาชนิดพบว่ายประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลัก ๆ ดังนี้คือส่วนของ Prodomain หรือ (Proprotein) ทางด้านปลาย N-terminal ที่มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนทั้งสิ้น 19 Residues และส่วนของ Domain หรือ Catalytic domain (Mature protein) จะเริ่มต้นตั้งแต่ +1 โดยจะมีกรดอะมิโนเริ่มต้นเป็น Isoleucine-Isoleucine-Xaa-Glycine (Ilu-Ilu-X-Gly หรือ IIXG) conserve sequence และตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน Proline-Histidine-Serine-Arginine-Proline-Tyrosine-Methionine-Alanine (Pro-His-Ser-Arg-Pro-Tyr-Met-Ala หรือ PHSRPYMA) motif ซึ่งทั้งสอง Motif นี้สามารถพบได้ทั่วไปในยีนกลุ่ม Serine protease ที่มีการแสดงออกใน Hemopoietic tissues ของสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไป (Praveen *et al.*, 2006a, Hwang *et al.*, 2007) จากการศึกษา Granz-TL ในครั้งนี้สามารถพบกรดอะมิโน Cysteine (Cys หรือ C) ถึง 11 ตำแหน่ง โดยอยู่ในบริเวณ Mature protein ถึง 10 ตำแหน่ง และพบว่ากรดอะมิโน Cysteine เหล่านี้อยู่ในตำแหน่งที่คล้ายคลึง (Conserved) กับยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตอื่นถึง 6 ตำแหน่ง และยังมีความสำคัญที่ใช้ในการสร้างพันธะ Disulfide ได้ทั้งหมด 3 คู่ คือ C₅₂-C₆₈, C₁₄₄-C₂₁₄ และ C₁₇₄-C₁₉₂ ตามลำดับ นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าผลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของยีน Granz-TL ในปลาชนิด โดยใช้โปรแกรม PROSITE predictions สามารถพบพันธะ Disulfide ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโน Cysteine อีก 1 คู่ คือที่ตำแหน่ง C₂₀₄-C₂₂₈ ซึ่งตำแหน่งของ Cysteine ทั้งสองนี้จะ Conserved เฉพาะกับยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของปลาและ Granzyme M ของ House mouse เท่านั้น (Taniguchi *et al.*, 1999) (ภาพที่ 26)

และเมื่อพิจารณาโครงสร้างโปรตีน Granz-TL ของปลาชนิด ตามรายงานก่อนหน้านี้ ยังพบลำดับกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณเร่ง (Active site) ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ทำให้เกิดการม้วนพับของสาย Polypeptide พบว่าโครงสร้างโปรตีนของยีน Granz-TL ในปลาชนิด จะมีบริเวณ Active site 3 ตำแหน่ง เช่นเดียวกับที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ (Pilat *et al.*, 1994; Rotonda and Calvo, 2001) ซึ่งให้ผลต่างไปจากการทำนายโดยการใช้โปรแกรม PROSITE predictions ที่แสดงตำแหน่งของ Active site เพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น โดยในบริเวณ Active site ที่ 1 จะมีกรดอะมิโน Histidine (His) ตำแหน่ง Active site ที่ 2 จะมีกรดอะมิโน Aspartate (Asp) และตำแหน่ง Active site ที่ 3 จะมี

กรดอะมิโน Serine (Ser) ($H_{67}-D_{110}-S_{208}$) ซึ่งจะเป็นลำดับกรดอะมิโนที่เป็นเป้าหมายที่ใช้ในการแสดงลักษณะและทำหน้าที่ของยีนในกลุ่ม Serine protease ที่เรียกว่า Catalytic tracts (Chowdhury and Lieberman, 2008) โดยพบว่าตำแหน่ง Active site ที่ 1, 2 และ 3 มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 21 ($N_{54}SWCGGTLIHPQWVLTAHCT_{74}$), 12 ($D_{110}LMLLKLKEPV_{R_{121}}$) และ 14 ($D_{202}TCQGDSGGPLLCD_{215}$) Residues ตามลำดับ (ภาพที่ 26)

ผลการศึกษาการเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-TL ในปลานิลกับยีน Granzyme ชนิดต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตจำนวนทั้งหมด 27 ชนิด ด้วยโปรแกรม MatGat 2.01 พบว่ายีน Granz-TL ในปลานิลมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน (Amino acid identity) กับยีน Granzyme I-1 ของปลา Bastard halibut มากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 55.6% รองลงมาคือยีน Granzyme III-1 ของปลา Bastard halibut (55.3%), ยีน Granzyme II ของปลา Bastard halibut (53.1%), ยีน Granzyme A ของปลา Atlantic salmon (49.6%), ยีน Granzyme A precursor ของปลา Northern pike (47.7%), ยีน Granzyme ของปลา Channel catfish (40.7%), ยีน Granzyme-1 ของปลา Nile tilapia (35.9%), ยีน Granzyme-like III ของปลา Channel catfish (35.3%) และมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 31.5% กับยีน Granzyme-like I ในปลา Channel catfish ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme กับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 31.6-42.2% และมีค่าเท่ากับ 42.9% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของสัตว์ปีก (Avian) ซึ่งมีเพียงชนิดเดียว นั่นคือยีน Granzyme A ในไก่ (Chicken) และเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน (Amino acid similarity) ของยีน Granz-TL ในปลานิล กับยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มปลา (Fish) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 50.8-70.5% ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับกลุ่มยีน Granzyme III-1 ในปลา Bastard halibut (70.5%), Granzyme I-1 ในปลา Bastard halibut (70.0%) และยีน Granzyme II ในปลา Bastard halibut (69.3%) ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) และสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์ปีก (Avian) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 46.7-60.2% และมีค่าเท่ากับ 61.5% ตามลำดับ นอกจากนี้ผลจากการศึกษาค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide identity) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 52.4-68.8% ในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของปลา (Fish) โดยมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงที่สุดกับยีน Granzyme II ในปลา Bastard halibut (68.8%) เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 50.9-55.1% และมีค่าเท่ากับ 56.1% ในยีน Granzyme A ในไก่ ตามลำดับ โดยพบว่าค่าที่ได้คล้ายคลึงและเป็นไปใน

ทำนองเดียวกันกับค่าความเหมือนและค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-
TL ในปลานิล กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (ตารางที่ 7)



	IIXG conserve sequence	+1	PHSRPYMA motif	Disulfide bridge ▼	
Nile tilapia Granzyme	--MSSLKNFSLLLISCVLLFIIQPGRGSR	I	INGKEVEPHSLPYMAYLRTV----	TNSWCGGTLIHPQWVLTAAHCT-----	74
Bastard halibut Granzyme I-1	--MFCLRDFTGFFSCMVLLIVHSSHGSEI	I	INGTEVTPNSLPYMALLQT-----	TKPVCGGILIDPSWVLTAAHCK-----	73
Bastard halibut Granzyme II	--MFCLRDFTGFFSCMVLLIVHSSHGSEI	I	IDGTEVTPHSLPYMALLQT-----	TEPVCGGILIDPSWVLTAAHCG-----	73
Bastard halibut Granzyme III-1	--MFCLRDFTGFFSCMVLLIVHSSHGSEI	I	IDGTEVTPHSLPYMALLQT-----	TEPVCGGILIDPSWVLTAAHCK-----	73
Atlantic salmon Granzyme A	--MILSTAASFWTSTMILLYLHSGDCAEII	I	GGKEVTPHSLPYMALLEDNK--GNK--	MCGGILIHQQWVLTAAHCT-----	75
Northern pike Granzyme A precursor	MTMILSMAASFWTSAVLLLC LHSGDCTEII	I	GGKEVTPHSLPYMALLENNND--GRSRSN	CGGILIHQQWVLTAAHCS-----	79
Channel catfish Granzyme	----MHVQQRSLLLILTLFQATACSGSFI	I	GGREVK--KPKPMMASVQSN---	NSHICGGTLIHQQWVLTAAHCKT---F	71
Channel catfish Granzyme-like III	--MFFSSALLVLSVLSLCGG-----	MKSGII	GGNEVDRHSRPYMASVQFK----	KAHMCGGFLIRKDYVLTAAHCVDNIDH	70
Channel catfish Granzyme-like I	--MKALHILLAAAFISLTFNATHGEEII	I	NGKAKKNSFQYMASVQSK----	GKHCGGFLISPSYVLTAAHCF-----	73
Nile tilapia Granzyme-1	--MMHAVHDLMFVYLLTCLGQHG--HGSEI	I	NGKNVPQNSMQYMASVQID----	GKHVCGGFLVSEDFVLTAAHCY-----	73
House mouse Granzyme D	----MPPILILLTLLPLRA----	GAEEII	GGHVVPKPHSRPYMAFVMSVDIKGNRIY	CGGFLIQDDFVLTAAHCKNSSVQ	72
House mouse Granzyme G	----MPPILILLTLLPLRA----	GAEEII	GGHEVVPKPHSRPYMAFIKSVDIEGKKKY	CGGFLVQDDFVLTAAHCRNR---	72
House mouse Granzyme F	----MPPILILLTLLPLRA----	GAEEII	GGHEVVPKPHSRPYMARVRFVKDNGKRHS	CGGFLVQDYFVLTAAHCTGS---	72
House mouse Granzyme N	----MLPVLILLIFLLPVGD----	GAEEVIG	GGHEVVPKPHSRPYMALVFLKVNIGIGSS	CGGFLVQDYFVLTAAHCTGS---	72
Norway rat Granzyme-like protein III	----MKLLLLLLSFLAPKT----	GAEEII	GGHEAKPHSRPYMAYLQIMDEYSGSKK	CGGFLIREDFVLTAAHCSGS---	72
Norway rat Granzyme B	----MKVLLLLLTVSLAPTT----	EAGEII	GGHEAKPHSRPYMAYLQIMDEDSGSTM	CGGFLIQEDFVLTAAHCLGS---	72
House mouse Granzyme B	----MKILLLLLTSLASRT----	KAGEII	GGHEVVPKPHSRPYMALLSIKDQQP-EAI	CGGFLIREDFVLTAAHCEGS---	71
House mouse Granzyme C	----MPVLIILLTLLPLRA----	GAEEII	GGNEIIPKPHSRPYMAYEFLKVGKKMF	CGGFLVRDKFVLTAAHCKGS---	72
Pig Granzyme H	----MQPVLLSLAFLSPGLGWPFLEAEII	I	GGHEAKPHSRPYMAFVRFVLDKES--VKR	CGGVLVRKDFVLTAAHCRGS---	75
Horse Granzyme B	----MQLLLLLLAFLSPGT----	EAGEII	GGHEARPHSRPYMALVQFLVEEK--KHR	CGGVLVRQDFVLTAAHCWGS---	71
Platypus Granzyme	-----MFLLSLLFPLEQ-----	GWRII	GGREVVPKPHSRPYMAYLKYY--KNGKVHE	CGGFLVRKDFVLTAAHCRGS---	66
Norway rat Granzyme A	MRNPCAPWVSSLTTVIFLLIPEGGCERI	I	GGDTVPHSRPYMVLLKLK----	PDSICAGALIAKNWVLTAAHCI-----	76
Cattle Granzyme A	MRNSSTFLAATLSIVVF--LLIPEDLCEKI	I	GGNQVTPHSRPYMVLLDG-----	GNICAGALIAKDWVLTAAHCS-----	73
Chicken Granzyme A precursor	MG---VFFTLSTSAIIVLLILPGDLCVDI	I	GGHEVAPHSRPFMAMLKG-----	KEFCGGALIKPSWVLTAAHCN-----	71
Human Granzyme K	MTKFSSSLFFLIVGAY--MTHVCFNMEII	I	GGKEVSPHSRPFMASIQYG----	GHHVCGGVLIDPQWVLTAAHCQYR--F	74
Pig-tailed macaque Granzyme K	MTKFSSSLFFLIAGAC--MTPVCFNMEII	I	GGKEVSPHSRPFMASIPYG----	GHHVCGGVLIDPQWVLTAAHCQYP--F	74
House mouse Granzyme K	MEHRAVFTR-----	RSALSFHTEII	GGREVQPHSRPFMASIQYR----	SKHICGGVLIHQPWVLTAAHCYSW--F	66
House mouse Granzyme M	--MEVCWSLLLLLALKTLWAAGNRFETQII	I	GGREAVPHSRPYMASLQKA----	KSHVCGGVLVHRKWVLTAAHCLSEP--	74
		:.*	..:.	* * * : : * * * * *	
				Active site 1	

ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ของปลานิลกับลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยที่สัญลักษณ์ (*) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน (:.) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูง (.) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันต่ำ และสัญลักษณ์ (▼) แสดงตำแหน่งของ Catalytic traid

Nile tilapia Granzyme ---GSYWILGAHSRTKNE--SSKHQRVVEKSFPHPDYCCAKID-NDIMLKLK-KEPVRKTRAVQWLEFGDTRDPAAG-ST 146
 Bastard halibut Granzyme I-1 ---GIKTVLLGVHSIKAGEKNSRQLVKVEKHFAHPCYDPDEKV-NDIMLKLKGKRSVKETKTKVCLKLGNIKDPAG-TS 146
 Bastard halibut Granzyme II ---GIKTVLLGVHSIKAGEKNSRQLIKVKKHFAHPCYDPDEM-NDIMLKLKGKRSVKETKTKVCLKLGNIKDPAG-TS 146
 Bastard halibut Granzyme III-1 ---GIKTVLLGVHSIKANEKNSRQLIKVEKHFAHPCYDPTKHV-NDIMLKLKGKRSVKETKTKVCLKLGNAIKDPAG-TS 146
 Atlantic salmon Granzyme A ---DINKVFLGVHSIKQEEKETRQVRKVKGRIHPHYDPDIKV-NDIMLKLKDKK-VKPTKAVKPLALPVPVADVQAG-TN 148
 Northern pike Granzyme A precursor ---HMKKVLLGVHAINKEEKETRQVRKVSEVPHPCFDHNSV-NDIMLKLKDKK-VKLSKAVNIPPLPDSVDDVPAG-TV 152
 Channel catfish Granzyme LQFKPIEVLLGAHSLTKDK--NAMRVKVLCHFISPKFSATTRV-HDIMLKLQDKVQLKKNKVDVKIPKSGKDIPAG-TK 147
 Channel catfish Granzyme-like III SGKDKLEVLLGAHNINQKE-SQQRIQVQKYILHPCYERGERP-NDIMLKLKSK-AKENKFVKVIALPKKDENLPAR-QE 150
 Channel catfish Granzyme-like I -QSN-LSVVLGTQNIADAKR-NELRRYAVKSMHIHPSYKENPRYGSNDIMLKLKSGK-VNLNKDLKVIKISSNHKRVKPN-TK 146
 Nile tilapia Granzyme-1 -KNSPMEVVIGTHNLKKNV-NNKMRYSVKTK-HPRY-DKVESGNDIMLKLKSRK-LQLDKKVKPIQLARKEIKAKDN-VK 145
 House mouse Granzyme D S---SMTVTLAGHNITAKE-ETQQIIPVAKDIPHPDYNATIFY-SDIMLKLKESK-AKRTKAVRPLKLPNSNARVKPG-DV 149
 House mouse Granzyme G ----SMTVTLAGHNITAKE-ETQQIIPVAKAIPHPAFNRKHGT-NDIMLKLKESK-AKRTKAVRPLKLPNSNARVKPG-DV 145
 House mouse Granzyme F ----SMRVILGAHNIRAKE-ETQQIIPVAKAIPHPAYDDKDNT-SDIMLKLKESK-AKRTKAVRPLKLPNSNARVKPG-HV 145
 House mouse Granzyme N ----SMTVTLAGHNLRAQE-ETQQIIPVNAKALPHPDYNPLDHT-NDIMLKLKESK-AGTRDVRPLKLPKPKDKVNPG-DV 145
 Norway rat Granzyme-like protein III ---KINVTLAGHNIKEQE-KMQQIIPVVKIIPHPAYNSKYS-NDIMLKLKSK-AKRSSAVKPLNLPNRNVKVPKPG-DV 145
 Norway rat Granzyme B ----KITVTLAGHNIKEQE-KMQQIIPVVKIIPHPAYNSKYS-NDIMLKLKSK-AKRTRAVKTLSPNSNFKVKPG-DV 145
 House mouse Granzyme B ----IINVTLAGHNIKEQE-KTQQVIPMVKCIHPDYNPKTFS-NDIMLKLKSK-AKRTRAVRPLNLPNRNVKVPKPG-DV 144
 House mouse Granzyme C ----SMTVTLAGHNITAKE-ETQQIIPVAKAIPHPDYNPDDRS-NDIMLKLKVRN-AKRTRAVRPLNLPNRNAHVKPG-DE 145
 Pig Granzyme H ----SINVTLAGHNIKKQE-ETQQVIPVRKAIRHPDYNPKRIS-NDIMLKLQLERK-AKLTAVKTLGLPGAKARVKPG-QV 148
 Horse Granzyme B ----SFKVTLAGHDIEKQE-TTQQNFSVKAIPHPDYNPKNYS-NDIMLKLKLERK-AKLTAVRPLNLPNRNAHVKPG-QV 144
 Platypus Granzyme ---KMGVLLGAHSIAYRE-ATQQRIPVAEKFSH-DYNNRTHV-NDIMLKLKLAHT-ANMTKEVNVIRLPLPVTNVKPG-TT 138
 Norway rat Granzyme A -PGKKSEVILGAHSIKKE--PEQQILSVKKAYPYPCFDKHTHE-GDLQLRLKKK-ATLNKNVAILHLPKKGDDVKPG-TR 149
 Cattle Granzyme A -LNQKSQIILGAHSRNKEE-PEKQIMFVKKEFPYPCYDPDTHE-GDLKLLKLNKK-ATLNKNVAILQLPKEGKDVPEPG-TA 147
 Chicken Granzyme A precursor -LKG-GRVILGAHSRTKRE-EEEQVIEIAEEIIRPDYCPERKE-HDIMLKLKLRK-AKINSKAVKVIPLPTSGDDLKQG-TI 145
 Human Granzyme K TKGQSPVTVVLGAHSLKNE-ASKQTEIKKFIKFSRVTSDPQS-NDIMLVKLQTA-AKLNKHVKMLHIRSK-TSLRSG-TK 152
 Pig-tailed macaque Granzyme K TKGQSPVTVVLGAHSLKNE-ASKQILEIKKFIKFSRVTSDPQS-NDIMLVKLQTA-AKLNKHVKMLHVRSK-TYLRSG-TK 152
 House mouse Granzyme K PRGHSPVTVVLGAHSLKNE-PMKQTFEIKKFIKFSRLQSGSAS-HDIMLIKLRTA-AELNKNVQLLHLGSK-NYLRDG-TK 144
 House mouse Granzyme M --LQNLKLVLLGLHNLHDLQ-DPGLTFYIREAIKHPGYNHXYEN--DLALLKLDRR-VQPSKNVKPLALPRKPRSKPAEGTW 150

: : * :

:

* : * : : *

:

.

Active site 2

ภาพที่ 26 (ต่อ)

C228

Nile tilapia Granzyme	TSYG-AG-CGVITKPGIYSFISEKQLYWIKTTMKLF-----	255
Bastard halibut Granzyme I-1	TSFG-HK-CGQKEKPGVYTYLSVKQLSWIKKTMKKSDI----	260
Bastard halibut Granzyme II	TSFGPKI-CGQNKNPVFTYLSEKQLSWIKKTMKKSDI----	261
Bastard halibut Granzyme III-1	TSFGPKI-CGQNKNPVFTYLSEKQLSWIKETMKKSDI----	261
Atlantic salmon Granzyme A	VSFG-IK-CGIKTKPGVYTLISRMYLWINKTMRKSLID---	262
Northern pike Granzyme A precursor	VSFG-EG-CGVKTKPGVYTLVT-KYLDWIKKTMGKKH-----	263
Channel catfish Granzyme	VSGSG--CGNPKKPGVYTLLSKEHIDWINKI IKK-----	255
Channel catfish Granzyme-like III	AAAYTHPHDCLNPTYPGVYMKIS-YFLPWIKQVIH-----	254
Channel catfish Granzyme-like I	VSFNLHDNCSYPNPVNYTEIS-AYADWINKVIKRDA-----	256
Nile tilapia Granzyme-1	VSFNINGNCKYPNPVNYTDIS-KHLSWIKNILNKKQC----	254
House mouse Granzyme D	FAYAK----NGTISSGIFTKV-V-HFLPWISWNMKLL-----	252
House mouse Granzyme G	VSYGI----NRTITPGVFTKV-V-HFLPWISTNMKLL-----	248
House mouse Granzyme F	LTYGL----NRTIGPGVFTKV-V-HYLPWISRNMKLL-----	248
House mouse Granzyme N	LSYVK----SKISSGVFTKV-V-HFLPWISTNMKLL-----	248
Norway rat Granzyme-like protein III	GIWDL----EIQTSRDSFTPW-L-FSFSLV-RAGTNN-----	246
Norway rat Granzyme B	VAYGS----KNGSAPEAF TKVS-TFLSWIKETMKKS-----	248
House mouse Granzyme B	VSYGY----KDGSPPRAF TKVS-SFLSWIKKTMKSS-----	247
House mouse Granzyme C	VSYGQ----TDGSAPQVFTRV-L-SFVSWIKKTMKHS-----	248
Pig Granzyme H	FSY GK----MDGTPPGVFTKV-V-HFLPWIKKTMKPL-----	251
Horse Granzyme B	VSYGR----NNGTPPRAF TKVS-SFLPWIKKTMKSL-----	247
Platypus Granzyme	VSYGR----WAGKPPNVYTRIS-FYLPWIK EILQKN-----	239
Norway rat Granzyme A	TAFGLEGRCGDPKGP GIYTL LSDKHLDWIRKTAKGAV-----	261
Cattle Granzyme A	TAFGIPGRCGDP RGPVYTL LSKKHLNWIVKTMKQAV-----	259
Chicken Granzyme A precursor	TSFGKS-PCGD PGGPGVYTRITDKYLKWIRKTIGGDL LTGF-	260
Human Granzyme K	VSGGHE--CGVATKPGIYTL LTKKYQTWIKSNLVPPHTN---	264
Pig-tailed macaque Granzyme K	VSGGHE--CGVAKKPGIYTL LNKKYQTWIKSNLAPHTN---	264
House mouse Granzyme K	VSQGYK--CGIAKKPGIYTL LTKKYQTWIKSKLAPSRAH---	256
House mouse Granzyme M	LSFSSKT-CTDIFKPPVATAVA-PYSSWIRKVIGRWSPQSLV	264

:

ภาพที่ 26 (ต่อ)

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

Common names	Putative genes	Scientific name	Amino acid		Nucleotide	Accession
			Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	number
Mammals						
Human	Granzyme K	<i>Homo sapiens</i>	41.0	58.7	54.1	BC035802
Pig-tailed macaque	Granzyme	<i>Macaca nemestrina</i>	40.9	58.3	54.5	EU526083
Platypus	Granzyme	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	36.5	52.9	51.8	AF275653
Cattle	Granzyme A	<i>Bos taurus</i>	41.1	58.7	52.6	NM_001099095
Pig	Granzyme H	<i>Sus scrofa</i>	37.5	53.7	53.7	FJ439673
House mouse	Granzyme D	<i>Mus musculus</i>	35.7	55.3	50.8	J03255
House mouse	Granzyme F	<i>Mus musculus</i>	36.6	54.5	52.5	J03257
House mouse	Granzyme G	<i>Mus musculus</i>	35.9	55.7	52.2	J02872
House mouse	Granzyme B	<i>Mus musculus</i>	39.1	54.5	53.5	BC002085
House mouse	Granzyme M	<i>Mus musculus</i>	31.6	51.9	51.6	AB015728
House mouse	Granzyme C	<i>Mus musculus</i>	37.5	52.5	50.9	BC120757
House mouse	Granzyme N	<i>Mus musculus</i>	36.1	56.5	51.6	AB049454
House mouse	Granzyme K	<i>Mus musculus</i>	40.7	60.2	55.1	AB032200

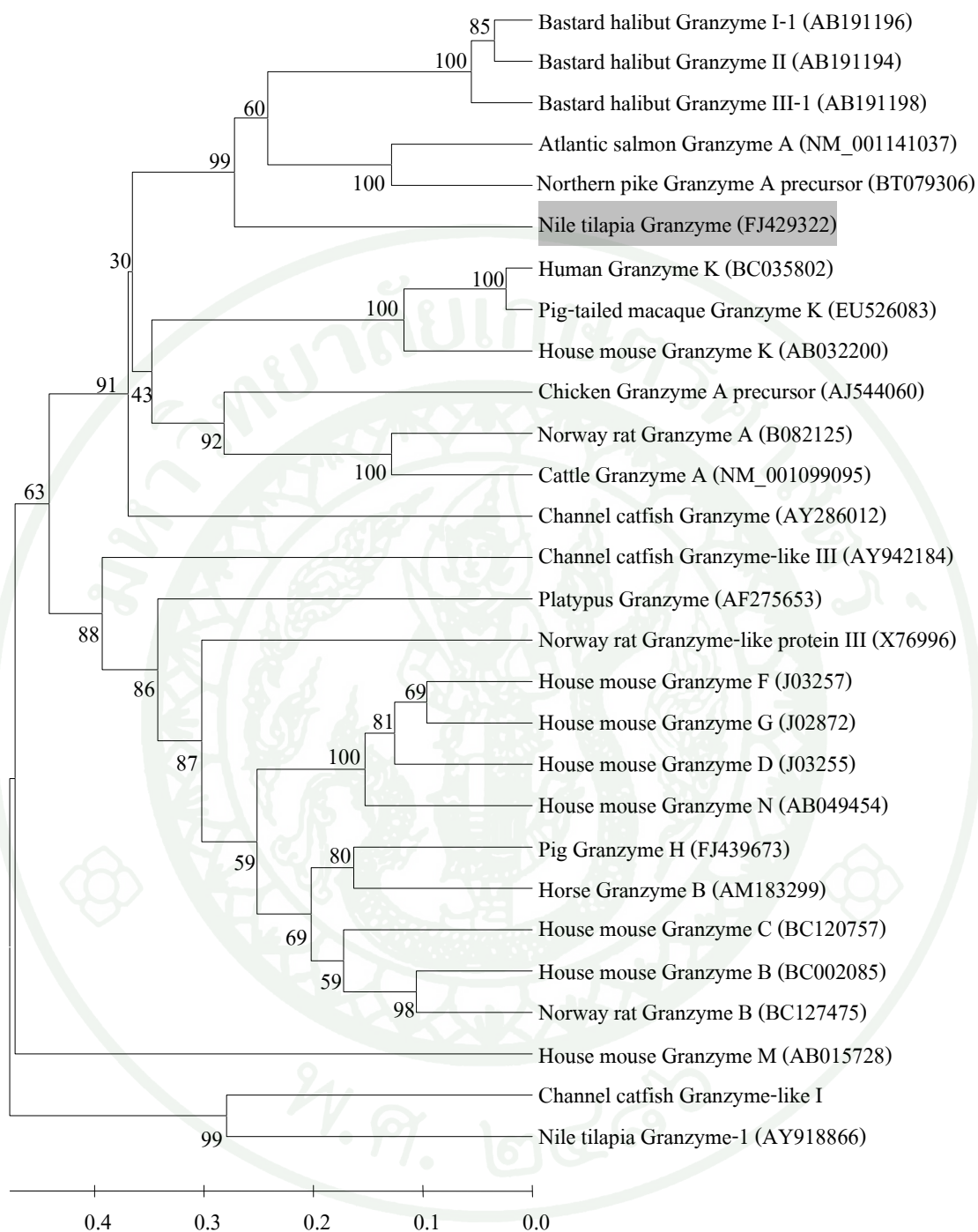
ตารางที่ 7 (ต่อ)

Common names	Putative genes	Scientific name	Amino acid		Nucleotide	Accession
			Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	number
Mammals (Continuous)						
Horse	Granzyme B	<i>Equus caballus</i>	38.4	52.5	52.2	AM183299
Norway rat	Granzyme A	<i>Rattus norvegicus</i>	42.2	57.1	52.5	B082125
Norway rat	Granzyme -like protein III	<i>Rattus norvegicus</i>	33.7	46.7	51.8	X76996
Norway rat	Granzyme B	<i>Rattus norvegicus</i>	38.8	53.7	53.0	BC127475
Avian						
Chicken	Granzyme A precursor	<i>Gallus gallus</i>	42.9	61.5	56.1	AJ544060
Fish						
Channel catfish	Granzyme	<i>Ictalurus punctatus</i>	40.7	60.4	54.9	AY286012
Channel catfish	Granzyme-like I	<i>Ictalurus punctatus</i>	31.5	50.8	52.4	AY942183
Channel catfish	Granzyme-like III	<i>Ictalurus punctatus</i>	35.3	54.1	52.9	AY942184
Bastard halibut	Granzyme I-1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	55.6	70.0	66.7	AB191196
Bastard halibut	Granzyme II	<i>Paralichthys olivaceus</i>	53.1	69.3	66.8	AB191194
Bastard halibut	Granzyme III-1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	55.3	70.5	68.5	AB191198

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Common names	Putative genes	Scientific name	Amino acid		Nucleotide	Accession
			Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	number
Fish (Continuous)						
Atlantic salmon	Granzyme A	<i>Salmo salar</i>	49.6	61.5	58.8	NM_001141037
Northern pike	Granzyme A precursor	<i>Esox lucius</i>	47.7	63.5	58.2	BT079306
Nile tilapia	Granzyme-1	<i>Oreochromis niloticus</i>	35.9	54.1	52.6	AY918866

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-TL ที่ได้จากปลาชนิดกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ โดยการสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธีของ UPGMA ที่มีค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้ง เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Granzyme ในปลาชนิดกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 28 ชนิด ซึ่งผลจากการศึกษาหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจากการสร้าง Phylogenetic tree นี้ พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Granzyme ในสิ่งมีชีวิตออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของยีน Granzyme ซึ่งประกอบด้วย Granzyme ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วย Granzyme K ของ Human, Pig-tailed macaque และ House mouse, Granzyme A ของไก่ Norway rat และ Cattle และ Granzyme ของปลา โดยพบว่า Granz-TL ของปลาก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Granzyme I-1, II และ III-1 ของปลา Bastard halibut และ Granzyme A ของปลา Atlantic salmon และปลา Northern pike ตามลำดับ และยังมียีน Granzyme ของปลา Channel catfish อีกหนึ่งชนิดที่มีความสัมพันธ์แยกจาก Granzyme ของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวข้างต้น ขณะที่กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งประกอบด้วย House mouse Granzyme B, C, D, F, G, N, Norway rat Granzyme like protein III และ Granzyme B, Pig Granzyme H และ Horse Granzyme B เป็นต้น และเป็นที่น่าสนใจว่าในกลุ่มนี้ยังมีสมาชิกเป็นยีน Granzyme ของปลา Channel catfish (Channel catfish Granzyme-like III) ขณะที่กลุ่มที่ 3 จะประกอบด้วย Channel catfish Granzyme-like I และ Nile tilapia Granzyme-1 ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Praveen *et al.*, 2006a) (ภาพที่ 27)

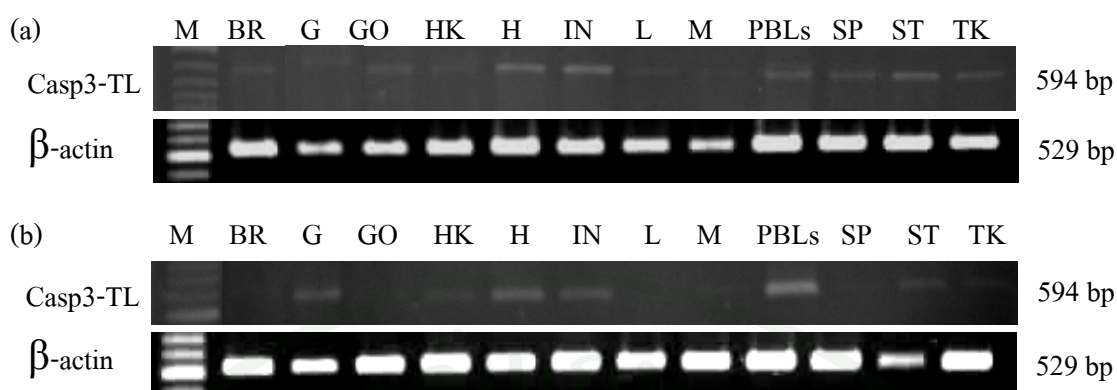


ภาพที่ 27 ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการระหว่างลำดับกรดอะมิโน (Mature protein) ของยีน Granzyme ในปลาไน กับยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้ใน Genbank database ด้านหลังชื่อสามัญของสิ่งมีชีวิตแสดงถึงหมายเลข Accession number

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

3.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิลปกติและปลานิลภายหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้เทคนิค RT-PCR

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิลปกติ จากเนื้อเยื่อทั้งหมด 12 อวัยวะ ซึ่งได้แก่ สมอง (Brain), เหงือก (Gills), อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad), ไตส่วนหน้า (Head kidney), หัวใจ (Heart), ลำไส้ (Intestine), ตับ (Liver), กล้ามเนื้อ (Muscle), เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes), ม้าม (Spleen), กระเพาะอาหาร (Stomach) และไตส่วนหลัง (Trunk kidney) ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค RT-PCR และใช้ Specific primer ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Caspase-3 คือ Caspase F1 primer และ Caspase R1 primer (ตารางที่ 1) พบว่าในปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% มีการแสดงออกของยีน Casp3-TL อย่างเบาบางในทุกอวัยวะที่ทำการตรวจสอบแต่จะเห็นแถบ PCR ขนาดประมาณ 594 bp ก่อนข้างชุดที่สมอง อวัยวะสืบพันธุ์ ไตส่วนหน้า ลำไส้ เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (PBLs) ม้าม กระเพาะอาหารและไตส่วนหลัง เท่านั้น และเมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรพบว่าสามารถสังเกตเห็นแถบ PCR ของการแสดงออกของยีน Casp3-TL แตกต่างจากปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยน้ำเกลือ 0.85% เพียงเล็กน้อย โดยสามารถสังเกตเห็นแถบ PCR ชัดเจนขึ้นในส่วนของ PBLs และแถบเบาบางในเหงือก ไตส่วนหน้า หัวใจ ลำไส้ และกระเพาะอาหารเท่านั้น ส่วนในอวัยวะอื่น ๆ นั้นไม่สามารถสังเกตเห็นแถบ PCR ได้เลย (ภาพที่ 28) ส่วนการแสดงออกของยีน β -actin ที่ใช้เป็น Internal control นั้นสามารถพบการแสดงออกได้ในทุก ๆ อวัยวะของปลานิล ซึ่งให้แถบ PCR product ที่มีความหนาใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดประมาณ 594 bp (ภาพที่ 28)

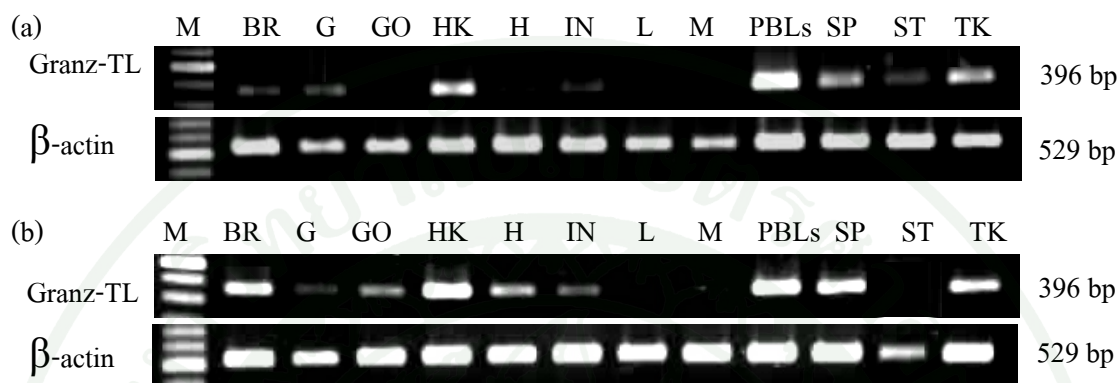


ภาพที่ 28 การแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิล (a) จากปลานิลที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (b) จากปลานิลที่ฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยใช้เทคนิค RT-PCR ใน 12 อวัยวะ โดยที่ M; 100 bp Ladder marker, BR; Brain, G; Gill, GO; Gonad, HK; Head kidney, H; Heart, IN; Intestine, L; Liver, M; Muscle, PBLs; Peripheral blood leukocytes, SP; Spleen, ST; Stomach และ TK; Trunk kidney ตามลำดับ

3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิลปกติและปลานิลภายหลังการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้เทคนิค RT-PCR

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิลปกติ จากเนื้อเยื่อทั้งหมด 12 อวัยวะ ซึ่งได้แก่ สมอง (Brain), เหงือก (Gills), อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad), ไตส่วนหน้า (Head kidney), หัวใจ (Heart), ลำไส้ (Intestine), ตับ (Liver), กล้ามเนื้อ (Muscle), เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes), ม้าม (Spleen), กระเพาะอาหาร (Stomach) และไตส่วนหลัง (Trunk kidney) ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ Specific primer ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Granz-TL พบว่าในปลานิลปกติที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% มีการแสดงออกของยีน Granz-TL มากที่สุดใน PBLs โดยสังเกตจากความหนาของแถบ PCR ซึ่งมีขนาด 396 bp และกลุ่มของอวัยวะที่มีการแสดงออกปานกลาง ได้แก่ไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลัง ขณะที่กลุ่มที่มีการแสดงออกอย่างเบาบาง ได้แก่สมอง เหงือก ลำไส้และกระเพาะอาหาร ส่วนอวัยวะที่ไม่มีการแสดงออกของยีน Granz-TL เลย คืออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ หัวใจ ตับและกล้ามเนื้อ และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปลานิลที่ฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่ายีน Granz-TL ในปลานิลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ในอวัยวะดังต่อไปนี้คือสมอง อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ไตส่วนหน้า หัวใจ ลำไส้ ม้ามและไตส่วนหลัง ตามลำดับ ในขณะที่ PBLs ยังเห็นการแสดงออกอย่างหนาแน่น

เช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มควบคุม ส่วนในกระเพาะอาหารเป็นอวัยวะเดียวที่พบว่ามีการแสดงออก
น้อยลงจนแทบไม่สามารถสังเกตได้ ขณะที่ตับและกล้ามเนื้อ ยังเป็นอวัยวะที่ไม่พบการแสดงออก
ของยีนนี้เลย (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 การแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิล (a) จากปลานิลที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (b) จากปลานิลที่ฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยใช้เทคนิค RT-PCR ใน 12 อวัยวะโดยที่ M; 100 bp Ladder marker, BR; Brain, G; Gill, GO; Gonad, HK; Head kidney, H; Heart, IN; Intestine, L; Liver, M; Muscle, PBLs; Peripheral blood leukocytes, SP; Spleen, ST; Stomach และ TK; Trunk kidney ตามลำดับ

4. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในตัวปลานิล ภายหลังจากการได้รับเชื้อ *S. agalactiae* (*In vivo*) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

เทคนิค Quantitative real-time PCR โดยทั่วไปนั้น มีความแตกต่างจากการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ตรงที่ได้ทำการพัฒนาความสามารถในการตรวจหาปริมาณ PCR products ในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ชนิดต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง Thermocycler ชนิดที่สามารถเพิ่มลดอุณหภูมิตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง Real-time thermocycler ที่มีการเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อเป็นแหล่งก่อการรวมแสงของ PCR products รวมถึงส่วนการตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR products ภายในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการใช้เทคนิค Real-time PCR จึงเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย และสามารถทำการตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ ทำให้สามารถติดตามการเกิด PCR products ในช่วง Exponential phase ได้อย่างแม่นยำ นำไปสู่การวัดปริมาณได้ โดยมีสมการของ PCR ดังนี้

$$X_n = X_0 (1 + E)^n$$

โดย X_n คือ ปริมาณ PCR product ที่ Cycle ที่ n

X_0 คือ ปริมาณเริ่มต้นของ Template

E คือ Amplification efficiency

n คือ Cycle number

การใช้ Quantitative real-time PCR จะต้องเริ่มต้นโดยการเตรียม Templates ของยีนที่เราสนใจ ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ Plasmids ที่มี cDNA ของยีนที่ต้องการตรวจสอบและทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว ซึ่งได้แก่ยีน Caspase-3, Granzyme และ β -actin ในปลานิลมาเป็น Templates สำหรับการหาความเข้มข้นของยีนทั้ง 3 ดังกล่าวนี้นี้ ทำได้โดยการวัดความเข้มข้นของ Plasmid ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน แล้วจึงนำมาคำนวณหาค่า Copy number จากโปรแกรม DNA concentration to copy number version 1.5 (<http://stanice.euweb.cz/bio/DNAtoCopy.html>) ทำการเตรียม Plasmid ให้ได้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ คือที่ความเข้มข้นของ Copy number เท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 และ 10^5 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง Real-time PCR (Mx3000p, Stratagene) จากโปรแกรม MxPro™ QPCR version 4.0 เพื่อทำการหาปริมาณ Template ที่ได้จากการการตรวจจับสารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ในการทดลองนี้

จะใช้สารเรืองแสง SYBR Green I Dye ผลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปแบบของ Amplification plot ในแต่ละยีน (ภาพที่ 30-32) โดยพบว่าโปรแกรม MxPro™ QPCR version 4.0 จะแสดงผลของค่า Melting temperature ในแต่ละยีน ออกมาในรูปแบบของ Dissociation curve ค่า Melting temperature ที่ได้จากแต่ละยีนนี้ จะใช้ในการพิจารณาถึงลักษณะของ PCR product ที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทันทีหลังจากกระบวนการเกิด PCR เสร็จสิ้นลง โดยการตรวจจับสารเรืองแสง (Fluorescence) พบว่า DNA จาก Plasmid ของยีนแต่ละชนิด จะมี Melting temperature (T_m) เฉพาะตัว โดยค่า T_m นี้จะเป็นจุดที่คู่เบสของนิวคลีโอไทด์จะแยกตัวออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของทั้งหมด การตรวจจับสารเรืองแสงจะลดลงอย่างฉับพลัน ณ จุดนั้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวและปริมาณ G และ C ที่มีใน DNA เป้าหมายของยีนแต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้แยก PCR product ออกจาก Product อื่นที่ปนเปื้อนได้ กราฟที่ได้จะเกิด Peak สำหรับยีนแต่ละตัว PCR product ที่ถูกต้องจะแสดง Peak เดียวที่อุณหภูมิสูง (ภาพที่ 33-35) โดยทั่วไปจะสูงกว่า 80°C ในขณะที่ Non-specific product หรือ Primer-dimer จะให้ Peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่า (อโนทัย, 2549)

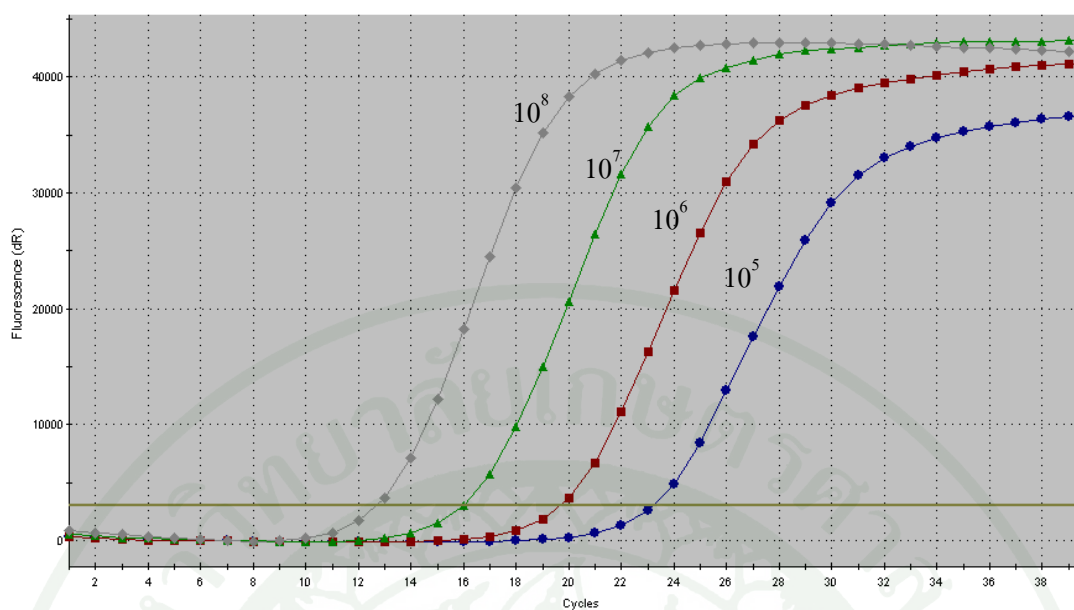
โดยเรานำกราฟ Amplification plot นี้ไปทำการหาค่าความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ต่อเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาค่า PCR Efficiency จากสูตร

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

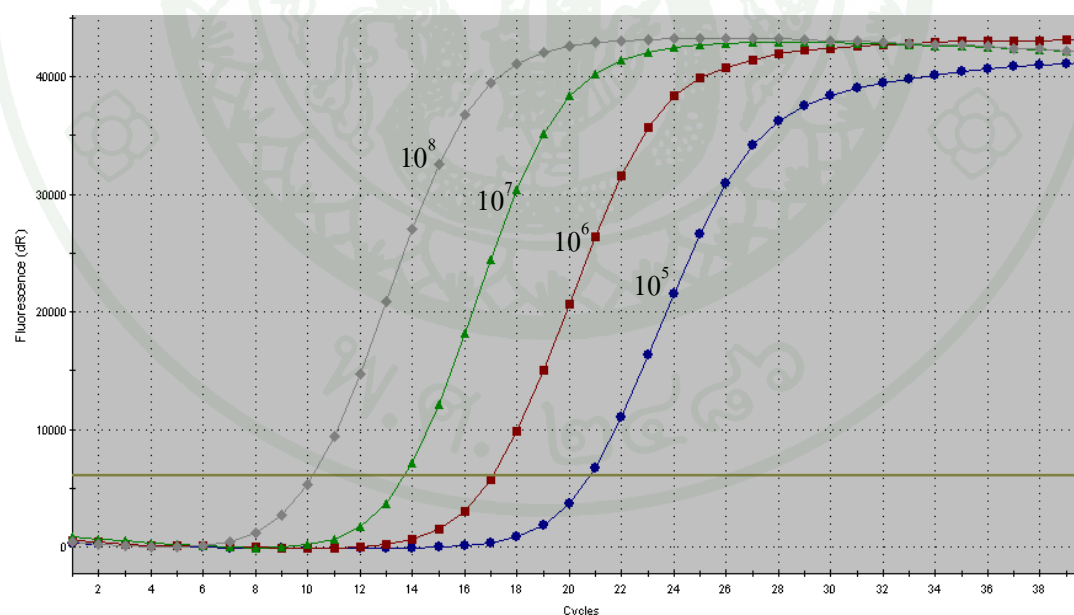
โดย E คือ ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR ที่สามารถเกิดขึ้นได้

Slope คือ ค่าความชันของกราฟใน Log scale ใน Exponential phase ของปฏิกิริยา

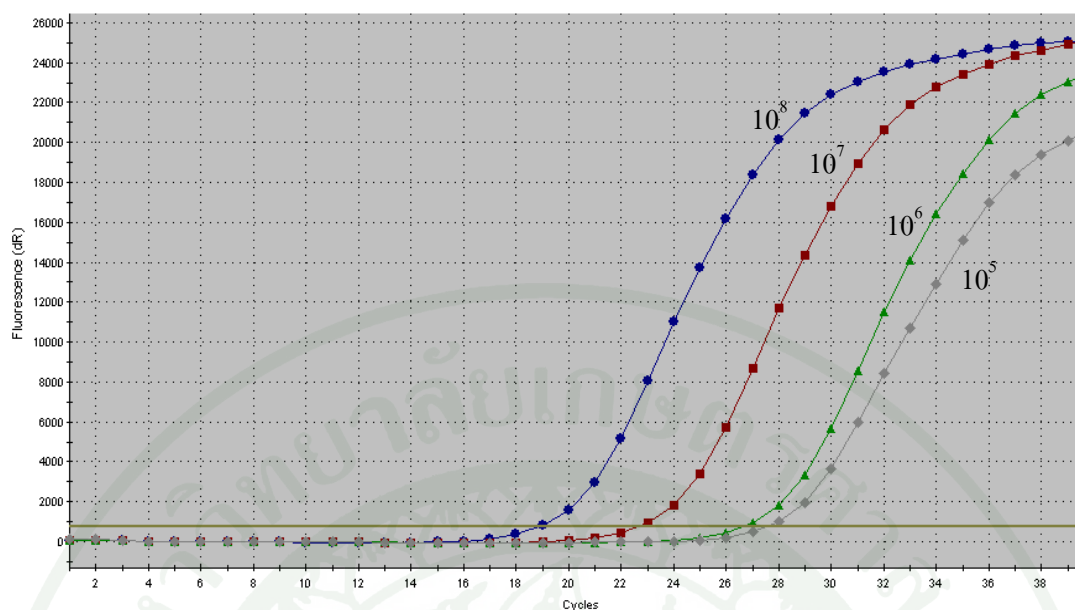
โดยทั่วไปแล้ว Efficiency ของ PCR ควรมีค่าอยู่ที่ 90-100% (Ideal slope = -3.322 ซึ่ง เป็น 100% โดย Efficiency จะหมายถึงการที่ DNA เป้าหมายนั้นได้มีการเพิ่มจำนวนเป็น 2 Copy ทุก รอบ ในขณะที่หาก Slope = -3.462, Efficiency จะเท่ากับ 1.95 นั่นคือได้ 1.95 Copy/Cycle) โดยพบว่าลักษณะความผันแปรที่มีผลต่อค่า Efficiency ของ PCR สามารถเกิดขึ้นได้ เช่น ความยาวของ Amplicon, Secondary structure และการออกแบบ Primer เป็นต้น (Kubista *et al.*, 2006) โดยในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจสอบค่า Efficiency ของยีนทั้ง 3 ได้จากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 36-39)



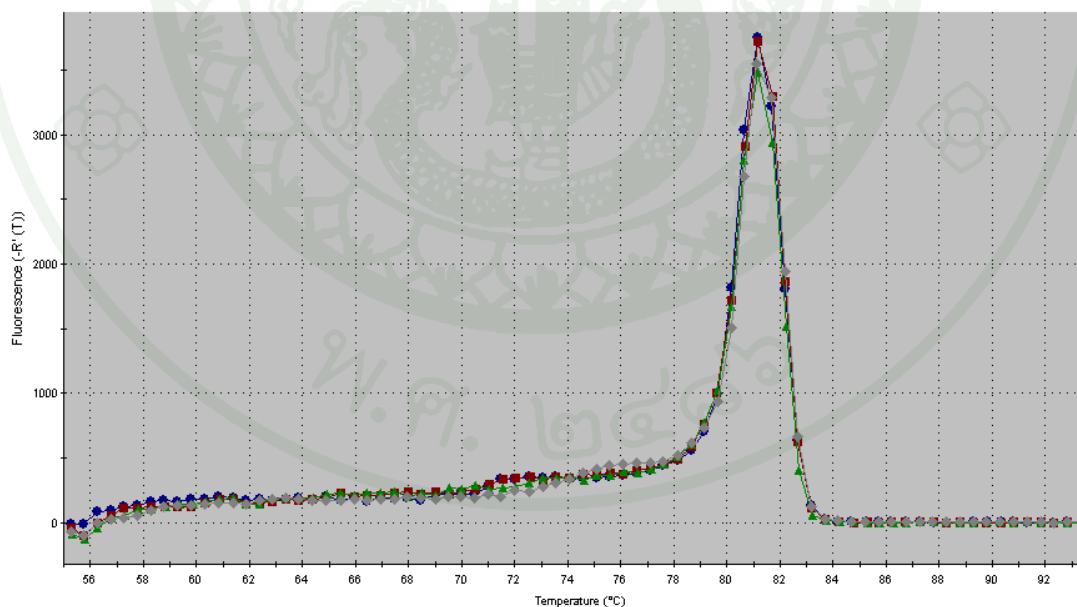
ภาพที่ 30 Amplification plot ในช่วง Exponential phase ของปฏิกิริยาจากการตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (SYBR Green I Dye) ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (Copy number เท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 และ 10^5) ของยีน Caspase-3 ในพลาสมิด



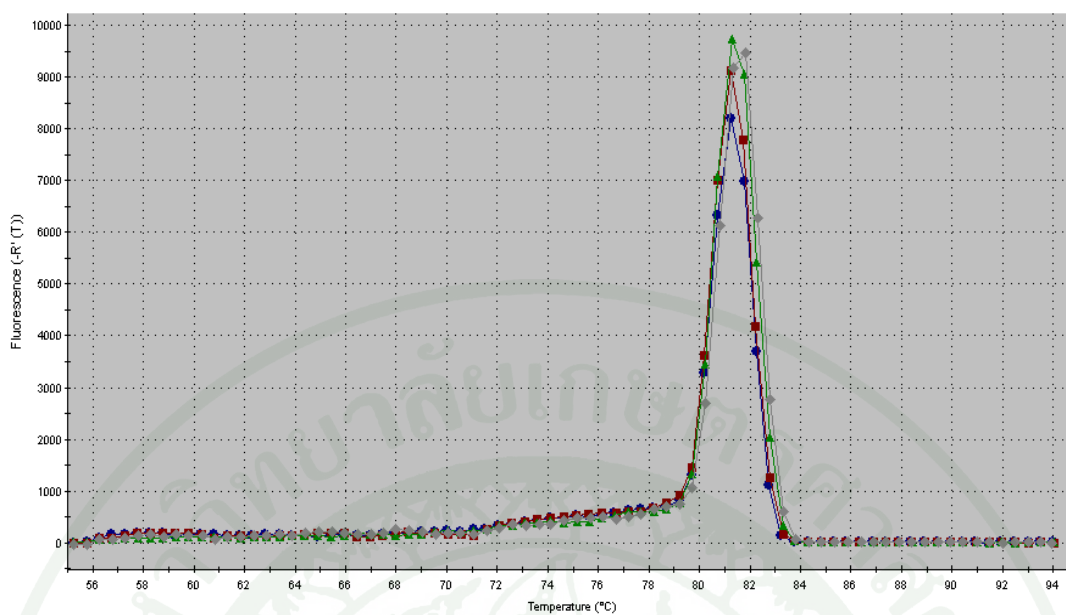
ภาพที่ 31 Amplification plot ในช่วง Exponential phase ของปฏิกิริยาจากการตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (SYBR Green I Dye) ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (Copy number เท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 และ 10^5) ของยีน Granzyme ในพลาสมิด



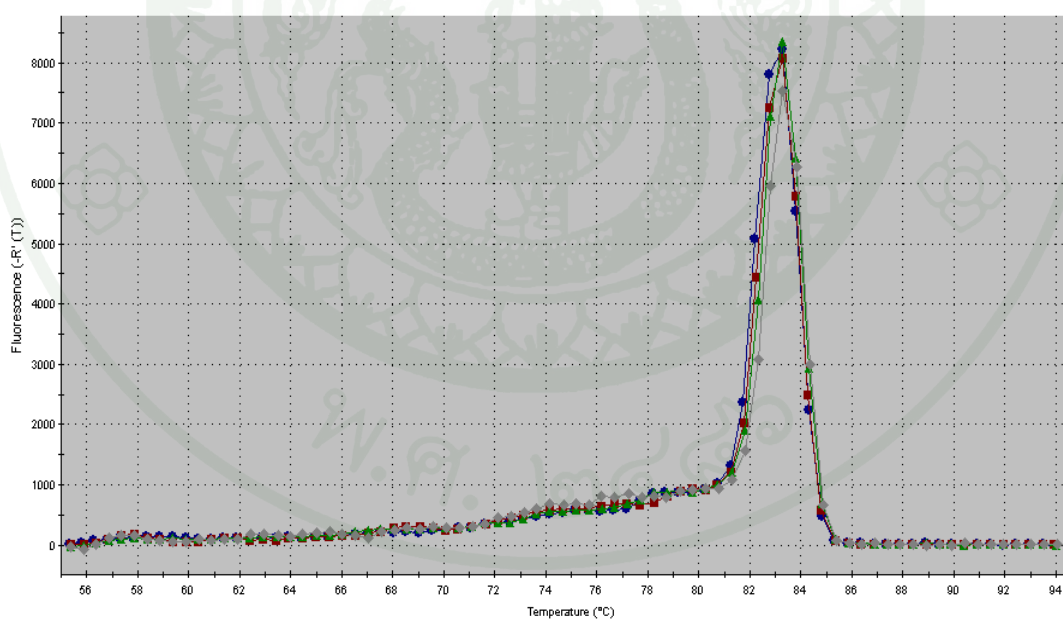
ภาพที่ 32 Amplification plot ในช่วง Exponential phase ของปฏิกิริยาจากการตรวจจับสัญญาณเรืองแสง (SYBR Green I Dye) ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (Copy number เท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 และ 10^5) ของยีน β -actin ในปลานิล



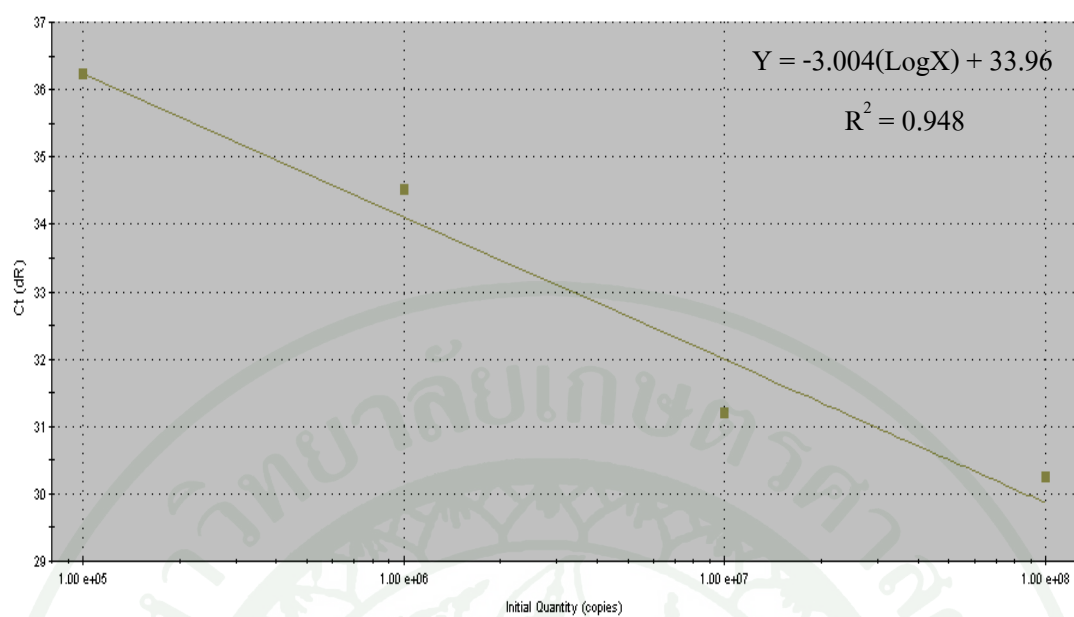
ภาพที่ 33 Dissociation curve แสดงค่า Melting temperature ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของยีน Caspase-3 ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR



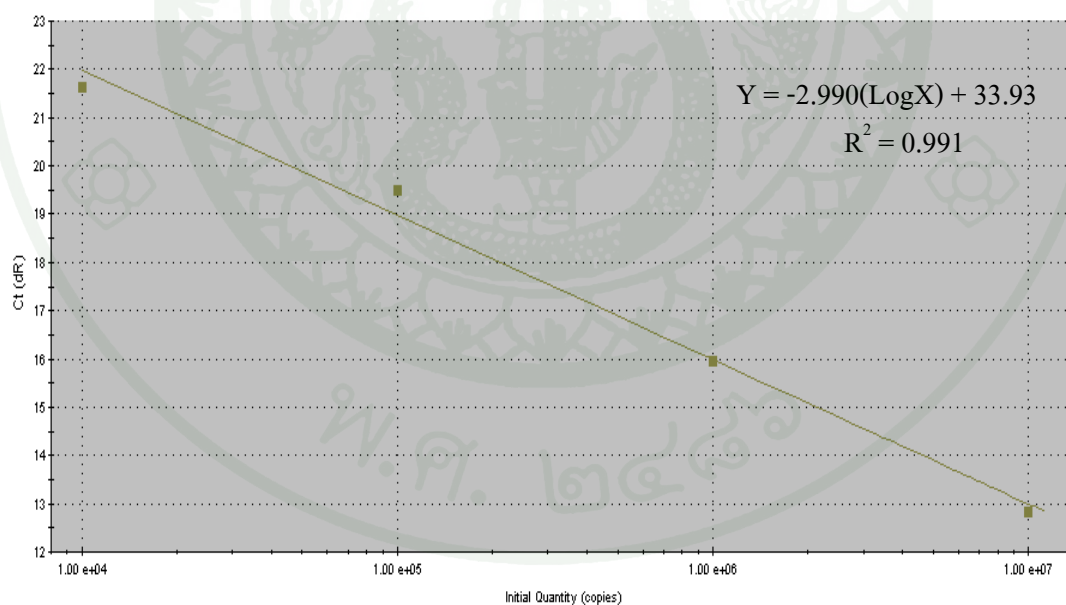
ภาพที่ 34 Dissociation curve แสดงค่า Melting temperature ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของยีน Granzyme ในปลาสมิดโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR



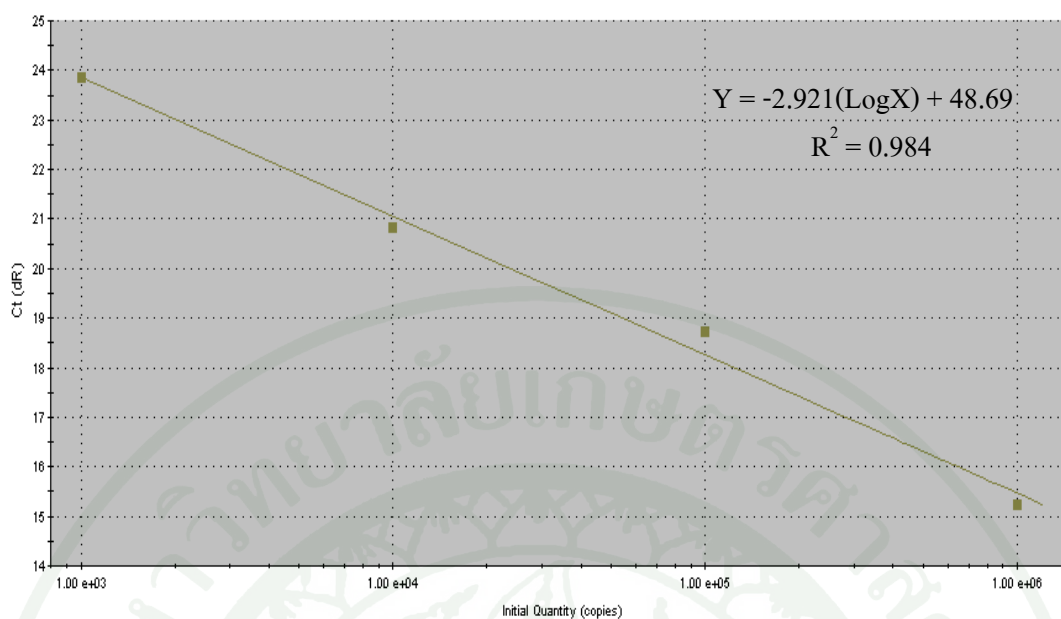
ภาพที่ 35 Dissociation curve แสดงค่า Melting temperature ของ Plasmid ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของยีน β -actin ในปลาสมิดโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR



ภาพที่ 36 Standard curve ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR



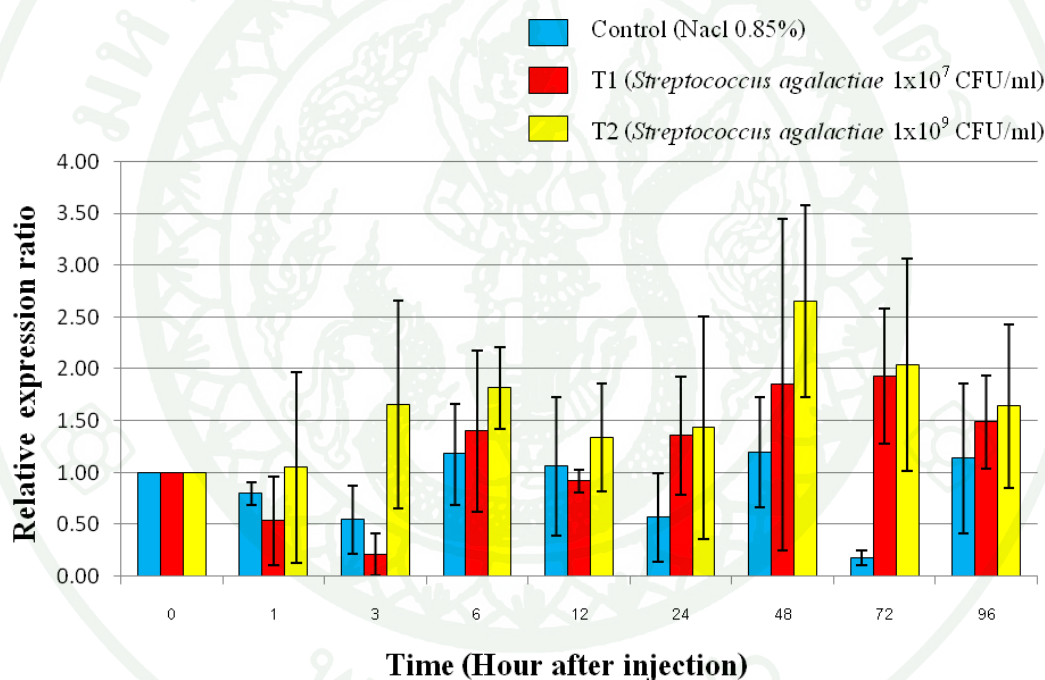
ภาพที่ 37 Standard curve ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิลโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR



ภาพที่ 38 Standard curve ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน β -actin ในพลาสมิดโดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

4.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 ในไตส่วนหน้าของปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* (*In vivo*) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

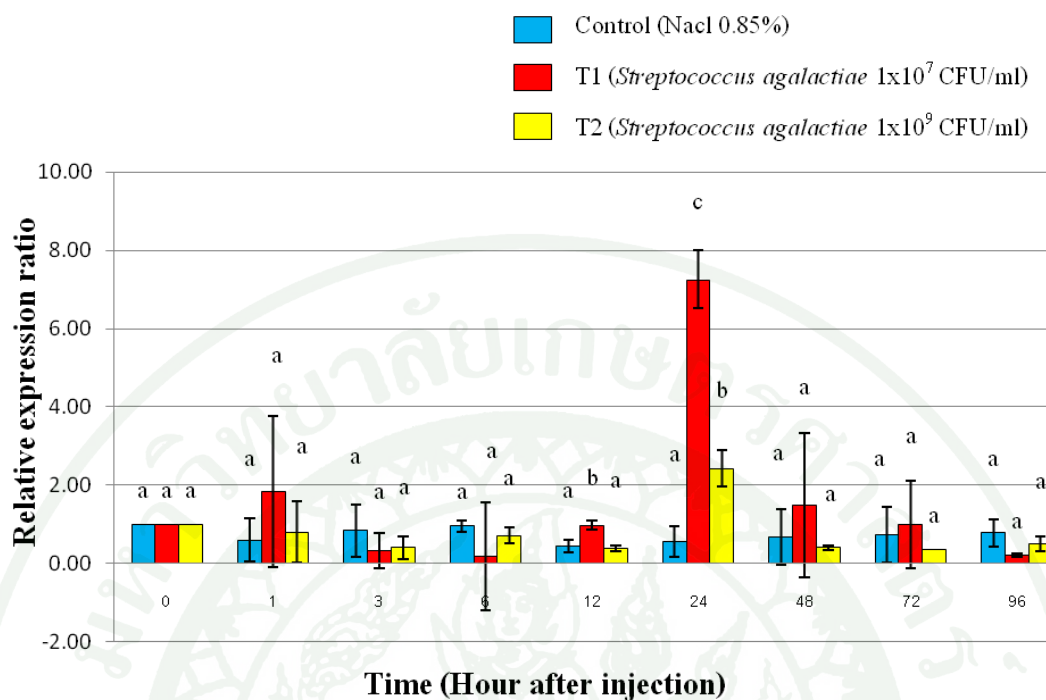
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในไตส่วนหน้าของปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มของปลาปกติที่ได้รับการฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (Control) พบว่าตลอดระยะเวลาของการทดลองปริมาณ mRNA ที่แสดงออกในปลาทั้ง 3 กลุ่ม โดยสังเกตจากค่า Relative expression ratio มีค่าไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาของการทดลอง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 ($P > 0.05$) (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 การแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิลภายหลังจากการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับปลานิลที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (Control) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR ($P > 0.05$)

4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน Granzyme ในไตส่วนหน้าของปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* (In vivo) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน Granz-TL ในไตส่วนหน้าของปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มของปลาปกติที่ได้รับการฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (Control) พบว่าภายหลังจากการฉีดกระตุ้นตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 จนถึงชั่วโมงที่ 6 ปริมาณ mRNA ของยีน Granz-TL ที่แสดงออกในปลาทั้ง 3 กลุ่ม โดยสังเกตจากค่า Relative expression ratio มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่และต่ำลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกก่อนการทดลอง อย่างไรก็ตาม ในชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 1×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร เริ่มมีค่า Relative expression ratio ของยีน Granz-TL แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ($P < 0.05$) (ภาพที่ 40) และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 1×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งมีระดับการแสดงออกมากกว่าก่อนการทดลองประมาณ 7 เท่า และยังมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ถึง 11 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ปลาในกลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ยังมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นและมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ประมาณ 3 เท่า ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 40) อย่างไรก็ตามในชั่วโมงที่ 48 ค่า Relative expression ratio ของยีน Granz-TL ในกลุ่มของปลาที่ได้รับการฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ทั้งสองกลุ่มมีค่าลดลงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 และ 96 ของการทดลอง ตามลำดับ



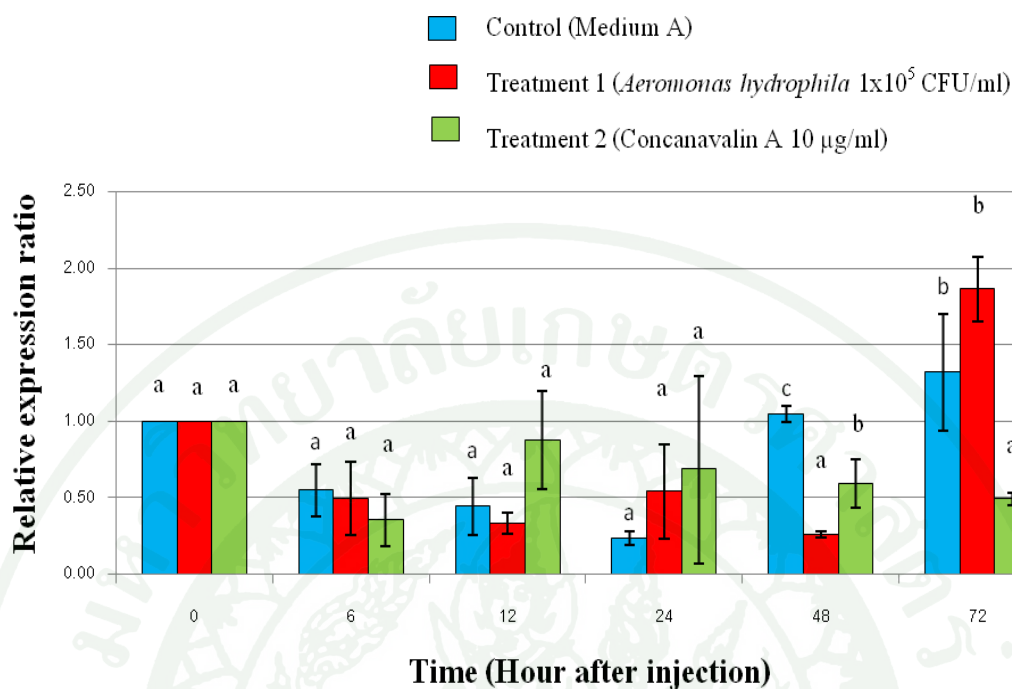
ภาพที่ 40 การแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิลภายหลังจากการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับ ปลานิลที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (Control) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

หมายเหตุ พยัญชนะภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ในหลอดทดลอง (*In vitro*) ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

5.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ในหลอดทดลอง ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากกระแสเลือด และถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้น 1×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร และ Concanavalin A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดทดลอง พบว่าในช่วงเวลาที่ 6, 12 และ 24 ของการทดลอง ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน Casp3-TL ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับก่อนการทดลอง และไม่พบว่ามีค่า Relative expression ratio ของยีน Casp3-TL ในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามในช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง ค่า Relative expression ratio ของยีน Casp3-TL ในกลุ่มของเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้น 1×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร มีค่าลดลง ซึ่งสวนทางกับกลุ่มควบคุมที่มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกับก่อนการทดลอง และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าชุดการทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* มีระดับ Relative expression ratio ของยีน Casp3-TL ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Concanavalin A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ประมาณ 3 และ 2 เท่า ตามลำดับ แต่เมื่อเข้าสู่ช่วงเวลาที่ 72 ของการทดลองเม็ดเลือดขาวของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย *A. hydrophila* กลับมีค่า Relative expression ratio เพิ่มขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Concanavalin A ในระดับประมาณ 3 และ 4 เท่า ตามลำดับ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 41)

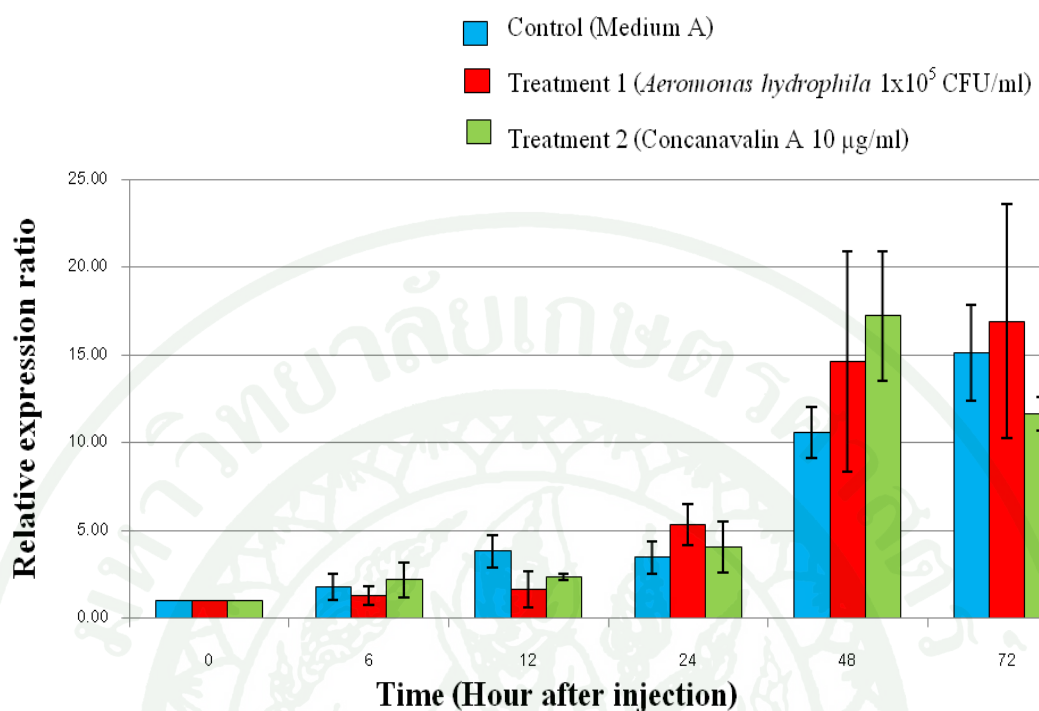


ภาพที่ 41 การแสดงออกของยีน Caspase-3 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระสเลื้อด ในหลอดทดลอง ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A เปรียบเทียบกับ เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระสเลื้อดที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (Control) โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

หมายเหตุ พยัญชนะภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน Granz-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ในหลอดทดลอง ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR

การศึกษาการแสดงออกของยีน Granz-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากกระแสเลือด และถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้น 1×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร และ Concanavalin A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดทดลอง พบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 6 ถึง 24 ของการทดลอง ระดับ Relative expression ratio ของยีน Granz-TL ของเม็ดเลือดขาวของปลาในทุก ๆ กลุ่มมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาของการทดลอง แต่ก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดทดลองแต่อย่างใด ($P > 0.05$) แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 ระดับ Relative expression ratio ของยีน Granz-TL ในปลาทุกกลุ่ม มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และแตกต่างกับ Relative expression ratio ของยีน Granz-TL เมื่อก่อนเริ่มการทดลอง ประมาณ 11, 15 และ 18 เท่าตามลำดับ แต่ก็ยังไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองแต่อย่างใด ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับชั่วโมงที่ 72 เม็ดเลือดขาวของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *A. hydrophila* ยังมีแนวโน้มของค่า Relative expression ratio ของยีน Granz-TL เพิ่มขึ้นอีก ขณะที่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Concanavalin A มีแนวโน้มลดลง โดยในชั่วโมงที่ 72 นี้ เม็ดเลือดขาวของปลาในแต่ละกลุ่มยังมีค่า Relative expression ratio ของยีน Granz-TL ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีค่าสูงกว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองเป็น 15, 18 และ 12 เท่าตามลำดับ (ภาพที่ 42)



ภาพที่ 42 การแสดงออกของยีน Granzyme ในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระสเล็ด ในหลอดทดลอง หลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A เปรียบเทียบกับ เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระสเล็ดที่ไม่ได้รับการกระตุ้น โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR ($P > 0.05$)

วิจารณ์

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Caspase-3 และยีน Granzyme ในปลานิลกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

1.1 Caspase-3

ยีนในกลุ่ม Caspases จัดเป็นกลุ่มของยีน (Family) ที่เรียกว่า Cysteine-dependent aspartate specific protease ที่มีความคล้ายคลึงกันทั้งในลำดับของกรดอะมิโนและโครงสร้างของยีน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1) Cytokine processor และ 2) Apoptosis initiator or effector (Fink and Cookson, 2005) โดยในบรรดา ยีน Caspases นี้ Caspase-3 ถือเป็นยีนที่มีความสำคัญที่สุดในการควบคุมการเกิด Apoptosis ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งโดยทั่วไปสามารถพบได้ใน Cytoplasm และ Mitochondrial intermembrane space ของทุกเซลล์ ซึ่งในสภาพเซลล์ปกติ Caspase-3 นั้นจะอยู่ในรูปของ Inactive zymogen ขนาดประมาณ 32 kDa และพร้อมจะทำงานในกระบวนการเกิด Apoptosis ในหลาย ๆ Pathway เมื่อถูกกระตุ้นและกลายเป็น Active form (Nicholson *et al.*, 1995; Fink and Cookson, 2005) โดยที่ Activated caspase-3 ถือเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นศูนย์กลางของการเกิดกระบวนการ Apoptosis โดยการตัดและการยับยั้งโมเลกุลของโปรตีนหลายชนิด ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเกิด Apoptosis ภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Program cell death

ในปัจจุบัน cDNA ของยีน Caspase-3 นั้นได้ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มของปลานั้นมีการค้นพบแล้วกว่า 9 ชนิด ซึ่งได้แก่ Zebra fish (AB047003), European sea bass (DQ345773), White cloud mountain minnow (GQ406344), Atlantic salmon (BT059710), Fugu rubripes (AF042797), Large yellow croaker (EU878546), Northern pike (BT079078), Sablefish (BT082348) และ Gudgeon (FJ612583) ซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้วเพียง 3 ชนิด คือ Zebra fish (Yabu *et al.*, 2001), Atlantic salmon (Takle *et al.*, 2006) และ European sea bass (Reis *et al.*, 2007) และเมื่อพิจารณาถึงขนาดของ Full-length ของ cDNA ของยีน Caspase-3 (Casp3-TL) ของปลานิล เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกันตั้งแต่ 829-900 bp และมีขนาดของโปรตีนประมาณ 274-299 Residues โดยพบว่า Caspase-3 ของวัว (Cattle) มีขนาดสั้นที่สุดคือ 274 Residues และ Caspase-3 ของ Sable fish มีขนาดยาวที่สุดคือ 299 Residues ขณะที่ Casp3-TL มีความยาวเท่ากับ 282 Residues

และเมื่อพิจารณาถึงความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Caspase-3 จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ กับ Casp3-TL ของปลานิล พบว่า Casp3-TL มีค่าความเหมือนกันของทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน รวมทั้งความคล้าย คลึงกันของกรดอะมิโน กับ European sea bass มากที่สุด แสดงให้เห็นว่ายีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันในเชิงวิวัฒนาการมากที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าทั้ง Nile tilapia และ European sea bass อยู่ใน Order เดียวกันคือ Order Perciformes (Nelson, 1994) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์กันในเชิงวิวัฒนาการกลับพบว่า Casp3-TL ของปลานิลกลับมีค่าความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการสูงกับยีน Caspase-3 ของปลา Atlantic salmon และปลา Large yellow croaker เช่นกัน นอกเหนือจากปลา European sea bass

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของโปรตีน พบว่าโปรตีนของยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้ง Casp3-TL ของปลานิลไม่มีบริเวณที่เป็น Hydrophobic leader sequence เหมือนกับที่พบในยีนชนิดอื่น ๆ แต่โครงสร้างของโปรตีนทั้งหมดจะประกอบด้วย Prodomain และ Catalytic domain ซึ่งประกอบด้วย Large subunit p20 และ Small subunit p10 เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Grütter (2000) ที่ได้ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจสอบ Hydrophobic sequence ด้วยโปรแกรม “DAS”- Transmembrane Prediction กลับพบว่าลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ 117-131 (HsnaSfvCiLLSHG) เป็นบริเวณที่ตรวจพบ Hydrophobic region ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยโปรแกรม PROSITE prediction พบว่าบริเวณของตำแหน่งกรดอะมิโนในบริเวณนี้เป็นบริเวณที่เรียกว่า Histidine active site ซึ่งจัดเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการจำแนกกลุ่มของยีนในกลุ่ม Caspases (Caspase family signature) นั่นเอง (Reis *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า Pentapeptide active site (QACRG) และ Aspartic acid ที่ตำแหน่ง Residues ที่ 178 ซึ่งเป็นบริเวณที่แบ่งแยกระหว่าง Large กับ Small subunit ออกจากกันซึ่งมีความเหมือนกัน (Conserved) ในทุกสิ่งมีชีวิตที่ทำการตรวจสอบและตำแหน่งของ Aspartic acid ที่ทำนายโดย Nicholson *et al.* (1995) ซึ่งทำหน้าที่ในการตัดแบ่งระหว่าง Prodomain, Large และ Small subunit สามารถพบได้ใน Casp3-TL เช่นกันในตำแหน่ง Asp14, Asp34 และ Asp178 แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของ Proenzyme ของ Casp3-TL ในปลานิลมีลักษณะคล้ายกับ Proenzyme ของโปรตีนของยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ก่อนเปลี่ยนรูปเป็น Active form ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแบบเดียวกัน เช่นเดียวกับ RGD motif ที่พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกันสูงระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ถึงแม้ว่าหน้าที่ของ RGD motif นี้ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่จากรายงานของ Pasqualini *et al.* (1995) พบว่า Aspartate-Aspartate-Xaa motif ซึ่งอยู่ใกล้กับบริเวณ Asp178 สามารถจับกับ RGD motif เพื่อกระตุ้นกระบวนการการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกระบวนการถูกกระตุ้นภายหลังที่ถูกเปลี่ยนรูปเป็น Active form (Buckley *et al.*, 1999)

1.2 Granzyme

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบดีแล้วว่ายีน Granzyme (Granule enzymes) จัดเป็นกลุ่มของยีนที่มีความคล้ายคลึงกันกับยีนในกลุ่ม Serine proteases อย่างมาก ซึ่งทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ Apoptosis แบบหนึ่งที่เกี่ยวข้องและสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลัง จึงอาจถือได้ว่ายีนในกลุ่มนี้นั้นมีบทบาทสำคัญในการเป็นเอนไซม์ที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ภายในร่างกาย (Cell death-inducing enzymes) และโดยทั่วไปแล้วโปรตีนของยีน Granzymes นั้น จะถูกสร้างและเก็บไว้ในเม็ด Granule ของเซลล์ในกลุ่ม Cytotoxic T lymphocytes และ Natural killer cells เท่านั้น เช่นเดียวกับโปรตีนของยีน Perforin และจะมีการปลดปล่อยออกมาทำลายเซลล์ที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคโดยเฉพาะไวรัสและแบคทีเรียบางชนิด รวมถึงเซลล์เนื้องอกและมะเร็ง (Tumor and cancer cells) ด้วย จึงอาจถือได้ว่ายีนในกลุ่มของ Granzyme นั้น จะมีบทบาทสำคัญทั้งในระบบภูมิคุ้มกันที่เป็น Innate และ Adaptive immunity ด้วย โดยทำหน้าที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนใน 3 Pathways ในการตายของเซลล์แบบ Apoptosis (Chowdhury and Lieberman, 2008)

นอกจากนี้แล้วยังทำหน้าที่ในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน โดยการควบคุมการอยู่รอดของ Activated lymphocytes และกระบวนการอักเสบ (Inflammation) โดยการทำปฏิกิริยากับโครงสร้างของสารแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย และจากรายงานการศึกษาในปัจจุบันพบว่าสามารถค้นพบยีน Granzyme ในคนและในหนูแล้วประมาณ 5 (A, B, H, K และ M) และ 10 ชนิด (A, B, C, D, E, F, G, H, L, M และ N) ตามลำดับ โดยยีนเหล่านี้จะสร้างจากกลุ่มของยีน (Cluster) ขนาดใหญ่ประมาณ 3 กลุ่ม และเมื่อพิจารณาจากการรายงานในปัจจุบัน พบว่ายีน Granzyme A และ Granzyme B นั้น เป็นชนิดที่มีการแสดงออกมามากที่สุด ในส่วนของ Granzyme B นั้น ถือได้ว่าเป็นยีนที่มีการศึกษามากที่สุดเมื่อเทียบกับ Granzyme ชนิดอื่น ๆ และเป็นเอนไซม์ที่มีคุณลักษณะสำคัญในการตัด Substrates ในตำแหน่งหลังกรดอะมิโน Aspartic acid (Asp) อย่างจำเพาะ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเริ่มมีนักวิจัยที่ได้เริ่มทำการศึกษายีน Granzyme ชนิดอื่น ๆ อย่างจริงจังมากยิ่งขึ้นตามลำดับ

ในปัจจุบันในกลุ่มของปลา ได้มีรายงานการค้นพบ cDNA ของยีนชนิดนี้ได้เพียง 6 ชนิด คือยีน Granzyme I-1 (AB191196), Granzyme II (AB191194) และ Granzyme III-1 (AB191198) ใน Bastard halibut, ยีน Granzyme (AY286012), Granzyme-like I (AY942183) และ Granzyme-like III (AY942184) ใน Channel catfish, ยีน Granzyme A (NM_001141037) ใน

Atlantic salmon, ยีน Granzyme A precursor (BT079306) ใน Northern pike, ยีน Granzyme like ใน Atlantic cod (AY661884) และ Granzyme-1 (AY918866) ใน Nile tilapia ซึ่งมีการตีพิมพ์แล้วเพียง 3 ชนิดคือ Channel catfish (Praveen *et al.*, 2004), Atlantic cod (Wernersson *et al.*, 2006) และ Nile tilapia (Praveen *et al.*, 2006a) และเมื่อพิจารณาถึงขนาดของ Full-length ของ cDNA ของยีน Granzyme (Granz-TL) ของปลานิล เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน ตั้งแต่ 720-795 bp และมีขนาดของโปรตีนประมาณ 239-264 Residues โดยพบว่า Granzyme ของตุ่นปากเป็ด (Platypus) มีขนาดสั้นที่สุดคือ 239 Residues และ Granzyme K ของคน (Human), Granzyme K ของ Pig-tailed macaque และ Granzyme M ของ House มีขนาดยาวที่สุดคือ 264 Residues ขณะที่ Granz-TL มีความยาวเท่ากับ 255 Residues

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของโปรตีน พบว่าโปรตีนของยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้ง Granz-TL ของปลานิลในบริเวณที่เป็น Hydrophobic leader sequence เหมือนกับที่พบในยีน Granzyme ชนิดอื่น ๆ ซึ่งเมื่อพิจารณาด้วยโปรแกรม “DAS”- Transmembrane prediction พบว่า Hydrophobic leader sequence ของ Granz-TL มีขนาดประมาณ 19 Amino acid residues แสดงให้เห็นว่า Granz-TL นี้จัดเป็นโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างออกมาแล้วหลั่งออกไปนอกเซลล์ในรูป Secrete protein ซึ่ง Hydrophobic leader sequence นี้จะมีความสำคัญต่อการเคลื่อนตัวเข้าไปใน Rough endoplasmic reticulum และการเข้าไปอยู่ใน Exocytic granules ของเซลล์ (Jenne and Tschopp, 1988) และเมื่อทำการเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน Granz-TL ของปลานิลกับยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตอื่น โดยการนำ Multiple sequence alignment พบว่าตำแหน่งของ IIXG และ PHSRPYMA motif มีความ Conserved กันสูงมากระหว่าง Granzyme ของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับที่พบในปลา Channel catfish และ Nile tilapia (Praveen *et al.*, 2004; Praveen *et al.*, 2006a) ตามลำดับ นอกจากนี้กรดอะมิโนที่ถือว่ามีความสำคัญและเป็นสัญลักษณ์ของ Catalytic triad (Charge relay system) ของยีนในกลุ่ม Serine protease ซึ่งได้แก่ His₆₇, Asp₁₁₀ และ Ser₂₀₈ ยังมีความ Conserved กันสูงมากรวมทั้งลำดับกรดอะมิโนที่อยู่รอบ ๆ กรดอะมิโนเหล่านี้พบว่ามี Conserved กันสูงเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน Cysteine ซึ่งมีความสำคัญต่อการพับตัวและการกระตุ้นการทำงาน ซึ่งโดยปกติแล้วใน Granzyme ชนิดอื่น ๆ จะมีอยู่เพียง 3 คู่ (Disulfide bonds) เท่านั้น ซึ่งจะ Form ตัวเป็น Disulfide bridges เชื่อมต่อระหว่างโครงสร้างของโปรตีน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ Granz-TL ของปลานิลจะมี Disulfide bridge เพิ่มมาอีก 1 Residue โดยเกิดจากกรดอะมิโน Cysteine ตำแหน่งที่ 204 และ 228 ตามลำดับ ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ จะเป็นลักษณะที่พบในยีน Granzyme A, K และ M เท่านั้น โดย Disulfide bridges ที่เกิดจากกรดอะมิโน Cysteine ตำแหน่งที่ 204 และ 228 จะทำงานร่วมกับกรดอะมิโน

Cysteine ตำแหน่งที่ 52 และ 68 ในการเชื่อมระหว่าง Primary และ Secondary substrate-binding sites เพื่อสร้างตำแหน่งจำเพาะที่เรียกว่า S1 subsites ใน Granzyme ทั้ง 3 ชนิดนี้ (Sattar *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ เป็นที่น่าสนใจว่า Granz-TL ของปลานิลจะมีกรดอะมิโน Cysteine ที่เพิ่มขึ้นมาอีก 2 Residues ในตำแหน่งที่ 103 และ 104 ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับยีน Granzyme ของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมจะพบว่ามีเพียง Granzyme A เท่านั้นที่มี Additional cysteine ที่เพิ่มขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการจับกับ Granzyme A อีก 1 โมเลกุลเพื่อ Form ตัวกันเป็น Dimer (Intermolecular disulfide bonds) (Bell *et al.*, 2003; Hink-Schauer *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าลำดับกรดอะมิโน Cysteine ตำแหน่งที่ 103 และ 104 ที่เพิ่มขึ้นมาใน Granz-TL นี้อาจจะทำหน้าที่ในการสร้างพันธะ Intermolecular disulfide bonds เช่นเดียวกัน

และเมื่อทำการพิจารณาถึงลำดับกรดอะมิโนรอบ ๆ กรดอะมิโน Serine ใน Active site ที่ 3 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ S1 pocket site ที่จะเป็นตัวบ่งบอกถึง Substrate specificity ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีอยู่ 3 ตำแหน่ง (Substrate specific triplet residues) ตามระบบการจัดลำดับกรดอะมิโนของ Chymotrypsin numbering ตำแหน่งที่ 189, 216 และ 226 ที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้โดย (Woulter *et al.*, 2003) ซึ่งใน Granz-TL จะพบลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งเหล่านี้เป็น D-G-G ขณะที่ Granzyme ของปลาซึ่งค้นพบก่อนหน้านี้จะมีความแตกต่างกันออกไปเช่น Granzyme-like I, II, III และ Granzyme-1 (AY286012) ที่พบใน Channel catfish (Praveen *et al.*, 2004) จะมีลำดับของกรดอะมิโนในตำแหน่งนี้เป็น G-N-N, G-T-N, A-T-G และ D-G-G ตามลำดับ ในขณะที่ Granzyme A ของปลา Atlantic salmon และปลา Northern pike รวมถึง Granzyme ของปลา Bastard halibut ก็จะมีลำดับของกรดอะมิโนในตำแหน่งนี้เป็น D-G-G เช่นเดียวกัน และยังพบว่า Mammalian Granzyme A และ K ก็ยังมีลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งนี้เป็น D-G-G อีกด้วย ขณะที่ Granzyme-1 ของปลานิลที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้โดย Praveen *et al.* (2006a) กลับมีลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งนี้เป็น G-N-N

และเมื่อพิจารณาถึงตำแหน่งของ Glycosylation site ในส่วนของ Mature protein ของยีน Granzyme จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จะพบว่ามีจำนวนแตกต่างกันออกไปตามชนิดของยีน Granzyme และสิ่งมีชีวิต เช่น Granzyme-1 ของปลานิลและปลา Channel catfish มี Glycosylation site เพียง 1 ตำแหน่ง, Granzyme A ของปลา Northern pike มี 2 ตำแหน่ง และ Granzyme A ของปลา Atlantic salmon มี 3 ตำแหน่ง เป็นต้น ซึ่งแตกต่างจาก Granz-TL ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งพบว่ามีตำแหน่ง Glycosylation site ถึง 4 ตำแหน่ง ซึ่ง Griffiths and Isaacs (1993) ได้ค้นพบว่าตำแหน่ง

Glycosylation site ของยีน Granzyme จะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ในกรณีที่ไม่มีการหลั่ง Perforin ออกมาจับกับเซลล์เป้าหมาย โดย Glycosylation site ของยีน Granzyme นี้ จะเป็นเป้าหมายสำคัญที่จะถูก Mannose-6-phosphate receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์เมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะเป็นตัวพา Granzyme เข้าไปในไซโตพลาซึมของเซลล์เป้าหมาย โดยกระบวนการ Endocytosis ในท้ายที่สุด

และเมื่อพิจารณาถึงความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Granzyme จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ กับ Granz-TL ของปลานิล พบว่า Granz-TL มีค่าความเหมือนกันของทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน รวมทั้งความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนกับปลา Bastard halibut มากที่สุด แสดงให้เห็นว่ายีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันในเชิงวิวัฒนาการมากที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าทั้ง Nile tilapia และ Bastard halibut จัดอยู่ใน Class เดียวกันคือ Class Actinopterygii (Nelson, 1994) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์กันในเชิงวิวัฒนาการกลับพบว่า Granz-TL ของปลานิลกลับมีค่าความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการสูงกับยีน Granzyme ของปลา Atlantic salmon และปลา Northern pike เช่นกัน นอกเหนือจากปลา Bastard halibut

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Granzyme ในภาพรวมทั้งหมดโดยใช้ Phylogenetic tree จากการศึกษานี้ จะให้ผลแตกต่างกับการศึกษาของ Grossman *et al.* (2003) ซึ่งพบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของยีน Granzyme ที่ได้จากหนูและมนุษย์ออกเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่ 1 จะประกอบด้วย Granzyme B, C และ H กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย Granzyme A, K และ M และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย Granzyme D, E, G, F และ N แต่เมื่อมีการนำเอาลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme ในปลา สัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ มาหาความสัมพันธ์ใน Phylogenetic tree ร่วมกับยีน Granzyme ของหนูและมนุษย์กลับพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของยีน Granzyme ในสิ่งมีชีวิตออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ เช่นเดียวกันคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย Granzyme ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งได้แก่ Granzyme K ของ Human, Pig-tailed macaque และ House mouse, Granzyme A ของไก่ Norway rat และ Cattle และ Granzyme ของปลา โดยพบว่า Granz-TL ของปลานิลก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Granzyme I-1, II และ III-1 ของปลา Bastard halibut และ Granzyme A ของปลา Atlantic salmon และปลา Northern pike ตามลำดับ และยังมียีน Granzyme ของปลา Channel catfish อีกหนึ่งชนิดที่มีความสัมพันธ์แยกจาก Granzyme ของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่ายีน Granzyme บางชนิดของปลา ก็มีสายวิวัฒนาการร่วมกันกับยีน Granzyme ของ

สัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงเช่นเดียวกัน กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งประกอบด้วย House mouse Granzyme B, C, D, F, G, N, Norway rat Granzyme like protein III และ Granzyme B, Pig Granzyme H และ Horse Granzyme B ตามลำดับ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าในกลุ่มนี้ยังมีสมาชิกเป็นยีน Granzyme ของปลา Channel catfish (Channel catfish Granzyme-like III) แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มของปลากระดูกแข็ง อาจจะมียีน Granzyme ที่มีวิวัฒนาการร่วมกันกับ Granzyme B และ Orphan granzymes ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่นเดียวกัน ขณะที่ในกลุ่มที่ 3 จะประกอบด้วย Channel catfish Granzyme-like I และ Nile tilapia Granzyme-1 แสดงให้เห็นว่าในสิ่งมีชีวิตพวกสัตว์มีกระดูกสันหลังในกลุ่มของปลา น่าจะมียีน Granzyme ชนิดอื่นที่มีสายวิวัฒนาการแยกออกจากยีน Granzyme ใน 2 กลุ่มใหญ่ ข้างต้น

นอกจากนี้ เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า เมื่อนำเอาลำดับของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เป็น Substrate specificity triplet residues ในบริเวณ S1 pocket site ของยีน Granzyme มาประกอบการพิจารณาร่วมกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใน Phylogenetic tree จะมีความสอดคล้องกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ ในกลุ่มที่ 1 ที่ประกอบด้วยยีน Granzyme A และ K ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและ Granzyme ของปลา ซึ่งมี Substrate specificity triplet residues เหมือนกันคือ D-G-G ส่วนในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยยีน Granzyme ของปลา Channel catfish, ยีน Granzyme B และ Orphan granzymes ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี Substrate specificity triplet residues ที่มีความหลากหลายเช่น A-T-G, G-N-N และ S-G-G เป็นต้น ขณะที่ในกลุ่มที่ 3 จะประกอบด้วย Channel catfish Granzyme-like I และ Nile tilapia Granzyme-1 จะมี Substrate specificity triplet residues เป็น G-N-N เท่านั้น ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะสอดคล้องและสนับสนุนผลการศึกษาศึกษาของ Praveen *et al.* (2006a)

เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Granz-TI และยีน Granzyme-1 ในปลาชนิดที่ได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Praveen *et al.*, 2006a) จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Granz-TL และยีน Granzyme-1 ในปลาชนิด มีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง (ภาพที่ 43) นอกจากนี้ผลของการเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสองนี้ ก็มีค่าเพียง 52.6 และ 35.9% ซึ่งมีค่าค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับยีน Granzyme I-1, II และ III-1 ของปลา Bastard halibut (ตารางที่ 7) ขณะเดียวกันผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน Granz-TL และ Granzyme-1 ก็ยังพบว่ายีนทั้งสองชนิดนี้ถูกจัดอยู่คนละกลุ่มใน Phylogenetic tree อย่างชัดเจน (ภาพที่ 27) ดังนั้นผลจากการศึกษาข้างต้นนี้ แสดงให้เห็นว่า cDNA ของยีน Granz-TL ของปลาชนิดที่พบในการศึกษาในครั้งนี้เป็นชนิดใหม่ ซึ่งถูกค้นพบเป็นครั้งแรก

Granz-TL	MMHAVH--DLMFVYLITCLGQHGHGSEITINGKNVPQNSMQYMASVQIDGKHVCGGFIVSE	58
Granzyme-1	-MSSLKNFSLISCVLFIIPGRGSRILINGKEVEPHSLPYMAYLRTVTNSWCGGTLIHP	59
	* : : : . * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Granz-TL	DFVLTAAHCYKNSPMEVIGTIN-LKKVNNKMRYSVKTCCKHERYDKVESGNDIMLLKLS	117
Granzyme-1	QWVLTAAHCTG--SYWILCAHSRTKNESKHKQVVEKSFPHDYCCAKIDNDLMLLKLK	117
	::***** . * : : : * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : *	
Granz-TL	RKLQLDKKVKPIQLARKEIKAKDNVKQVAGWGFTETNGKAVDVLRWVDVPLIDLNVCKR	177
Granzyme-1	EPVRKTRAVQWLEFGDITVRDPAAGSTCLVAGWGATENN-QSSDVLMSNVTVVRQTONS	176
	. : : : * : : : * ***** * : * : * : * : * : * : *	
Granz-TL	----KLKGKLPKGVICAGGSDIKNG-FQCGDSGGPLVCNGTAVGVVSEFNINGCKYPNYP	232
Granzyme-1	RDYYNHRPEITKHMICAGSNGENVADTQCGDSGGPLLCDGALGVVTSYGAG--CGVITPK	234
	: : : : * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Granz-TL	NVYTDIS-KHLSWIKNILNKKQC	254
Granzyme-1	GIYSFISEKQLYWIKTTMKLF--	255
	. : * : * : * : * : * : *	

ภาพที่ 43 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Granz-TL กับลำดับกรดอะมิโนของยีน Granzyme-1 ของปลานิล โดยที่สัญลักษณ์ (*) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน (:) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูง และ (.) แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันต่ำ

2. การศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 และ Granzyme ในปลานิล ในสภาพต่าง ๆ

2.1 การแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิล

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่ากลุ่มของยีน Caspases จัดเป็นยีนที่มีความสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์แบบ Apoptosis (Program cell death) (Nicholson and Thornberry 1997; Salvesen and Dixit, 1997; Thornberry and Lazebnik, 1998) อย่างไรก็ตาม มีหลายข้อมูลในปัจจุบันได้แสดงให้เห็นแล้วว่า การเกิด Apoptosis นั้นสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของยีนในกลุ่ม Caspases (Caspase-independent apoptosis) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้หลาย Pathway ที่อาศัยการทำงานของโปรตีนหลายชนิด เช่น โปรตีน Bax และ Bak (Ojcius *et al.*, 1998) หรือเกิดจากการกระตุ้นสารในกลุ่ม Calpains (Calcium dependent protease) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis โดยปราศจากการทำงานของยีน Caspases (Wolf *et al.*, 1999) หรือการกระตุ้นของโปรตีนในกลุ่มของ Stress kinase (C-jun NH₂-terminal kinase or JNK) ซึ่งในที่นี้จำเป็นต้องมีการทำงานร่วมกันของ Daxx-ASK ซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการ Caspase-independent mechanism สำหรับกระบวนการกระตุ้น JNK โดยอาศัย Fas protein และตัวกระตุ้นการเกิด Apoptosis อื่น ๆ (Chang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997)

อย่างไรก็ตามในบรรดา Effector molecules ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Apoptosis นั้น Activated caspase-3 จัดเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญที่สุดในการเกิด Apoptosis ซึ่งสามารถตัดและยับยั้งโมเลกุลของโปรตีนหลายชนิด เพื่อทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ตามมาในที่สุด อย่างไรก็ตามปัจจุบันการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับยีนชนิดนี้ทั้งในระดับอนุชีวโมเลกุลและบทบาทการทำหน้าที่ในกลุ่มของปลายังถือว่าจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ

ผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลานิลปกติ จากเนื้อเยื่อทั้งหมด 12 อวัยวะ โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าในปลาที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% มีการแสดงออกของยีน Casp3-TL อย่างเบาบางในทุกอวัยวะที่ทำการตรวจสอบแต่จะเห็นแถบ PCR ขนาดประมาณ 594 bp ก่อนข้างชัดที่สมอง อวัยวะสืบพันธุ์ ใต้ส่วนหน้า ลำไส้ เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (PBLs) ม้าม กระเพาะอาหารและไตส่วนหลัง เท่านั้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Reis *et al.* (2007) ที่ทำการศึกษารายการแสดงออกของยีน Caspase-3 ในปลา Sea bass โดยการใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีนชนิดนี้มีการแสดงออกอย่างเบาบางในทุกอวัยวะที่ทำการตรวจสอบ แต่จะสามารถสังเกตเห็นได้ในระดับที่สูงกว่าอวัยวะอื่น ในส่วนของ Thymus และหัวใจเท่านั้น

และเมื่อนำผลที่ได้จากการศึกษาข้างต้น ไปเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรพบว่าสามารถสังเกตเห็นแถบ PCR ของการแสดงออกของยีน Casp3-TL แตกต่างจากปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยน้ำเกลือ 0.85% เพียงเล็กน้อย โดยสามารถสังเกตเห็นแถบ PCR ชัดเจนขึ้นในส่วนของ PBLs และแถบแบนที่เบาบางในเหงือก ใต้ส่วนหน้า หัวใจ ลำไส้ และกระเพาะอาหารเท่านั้น ส่วนในอวัยวะอื่น ๆ นั้นไม่สามารถสังเกตเห็นแถบ PCR ได้เลย แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. agalactiae* สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของยีน Casp3-TL ใน PBLs ของปลานิลได้ภายหลังการฉีดกระตุ้น นอกจากนี้ การศึกษาการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในปลานิล ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มของปลาปกติที่ได้รับการฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% (Control) กลับพบว่าตลอดระยะเวลาของการทดลองปริมาณ mRNA ที่แสดงออกในปลาทั้ง 3 กลุ่ม โดยสังเกตจากค่า Relative expression ratio มีค่าไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาของการทดลอง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 96 ($P > 0.05$) ซึ่งการทดลองนี้ยังให้ผลที่แตกต่างไปจากการศึกษาของ Reis *et al.* (2007) ที่พบว่าภายหลังฉีดกระตุ้นปลา Sea bass ด้วยเชื้อ *Photobacterium damsela* spp. จะมีผลทำให้ไตส่วนหน้าของปลามีการแสดงออกของยีน Caspase-3 เพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ถึง 24 ภายหลังจากการฉีดกระตุ้น

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากกระดแลือด และถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้น 1×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร และ Concanavalin A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดทดลอง กลับพบว่าในชั่วโมงที่ 48 ค่า Relative expression ratio ของยีน Casp3-TL ในกลุ่มของเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้น 1×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร มีค่าลดต่ำลง ซึ่งสวนทางกับกลุ่มควบคุมที่มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกับก่อนการทดลอง แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 ของการทดลองเม็ดเลือดขาวของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย *A. hydrophila* กลับมีค่า Relative expression ratio เพิ่มสูงขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Concanavalin A ในระดับประมาณ 3 และ 4 เท่า ตามลำดับ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวอาจมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในช่วงเวลาที่แตกต่างกันได้ ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Shao *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาผลของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ต่อการเกิดการตายแบบ Apoptosis ใน Lymphocytes ของปลา *Carassius auratus* จากการทดลองในหลอดทดลอง (*In vitro*) พบว่าหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย *A. hydrophila* นาน 12 ชั่วโมง พบว่าลักษณะของ Lymphocytes ที่ได้จากม้ามและไตส่วนหน้าจะเกิดการเปลี่ยนแปลง ลักษณะของเซลล์ที่เป็นรูปแบบของการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้อย่างชัดเจน ทั้งจากการสังเกตจากสัณฐานวิทยาและการแตกหักของ Genomic DNA โดยการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาที่สำคัญ ได้แก่ การหดและรวมตัวของโครมาติน การเพิ่มขึ้นของ Apoptotic body การเปลี่ยนรูปร่างของ Organelle ภายในเซลล์ การเกิด Vacuole ภายในไซโตพลาซึมและการเกิดการเสียสภาพของเซลล์เมมเบรน โดยการตอบสนองโดยกระบวนการ Apoptosis จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ทำการทดลอง การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นได้ว่า Lymphocytes ของปลามีกลไกในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้อย่างชัดเจน

เป็นที่ทราบแล้วว่า Group B Streptococcus นั้น เป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง หลายชนิด รวมถึงกลุ่มของปลา ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ จะมีกลไกหลาย ๆ กลไกในการรอดพ้นจากการต้านทานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การรอดพ้นจากกระบวนการ Phagocytosis ของเซลล์ Macrophage และ Polymorphonuclear (PMN) cell โดยการใช้ Anti-phagocytic capsule (Spellerberg, 2000) นอกจากนี้ การศึกษาในหลาย ๆ รายงานในปัจจุบันได้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Group B Streptococcus หลายชนิด สามารถกระตุ้นให้เซลล์ของ Host ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไปเกิดการตายแบบ Apoptosis ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกระตุ้นทำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์ Monocytes และ Macrophage ซึ่งทำ

หน้าที่สำคัญในการต้านทานการบุกรุกของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ในการเป็นด่านแรกของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ภายหลังจากการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาภายใน Host แล้ว เซลล์ Macrophage ยังทำหน้าที่สำคัญในการเชื่อมต่อและก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงตามมา โดยจะทำหน้าที่สำคัญในการเป็น Antigen presenting cell (APC) สำหรับกลุ่มเซลล์ในระบบการตอบสนองแบบจำเพาะเจาะจง เช่น B และ Helper T lymphocytes สำหรับความสามารถของ Group B Streptococcus ในการเกิด Apoptosis เพื่อให้เซลล์รอดพ้นจากระบบภูมิคุ้มกันของ Host นั้น จะมีกลไกที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนในหลาย ๆ รายงาน เช่น การศึกษาของ Marriott and Dockrell (2006) ที่ได้ทำการศึกษาก่อให้เกิด Apoptosis ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ซึ่งโดยปกติจะก่อโรคในคนทำให้เกิดอาการของโรคที่เรียกว่า Pneumococcal meningitis และ Pneumonia โดยเฉพาะในสมองนั้น ภายหลังจากการถูกบุกรุกด้วยเชืวดังกล่าวแล้วจะมีการเกิด Apoptosis ขึ้นอย่างรุนแรง ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากองค์ประกอบของเชื้อโรค เช่น Cell wall ของเชื้อ *S. pneumoniae* และองค์ประกอบจาก Host factors เช่น Cholesterol-dependent cytolysin และ pneumolysin ในสมองซึ่งจะมีความสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Hydrogen peroxide ในกระบวนการ Pneumococcal production

เช่นเดียวกันกับ Buratta *et al.* (2002) ยังพบว่า Group B Streptococcus สามารถชักนำ Macrophage ของคนให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้เช่นกัน โดยระหว่างการเกิด Apoptosis นั้น เซลล์ Macrophage จะเกิดการหลั่ง Phosphatidylserine ออกมาเป็นจำนวนมาก จึงมีการใช้สารชนิดนี้เป็นดัชนีที่บ่งถึงการเกิด Apoptosis ในเซลล์ Macrophage ได้ นอกจากนี้ Fettucciari *et al.* (2003) ยังพบว่า Group B Streptococcus ยังสามารถชักนำทำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis ของ Macrophage ได้โดยการหลั่งสารจำพวก β -hemolysin โดยพบว่าระหว่างการเกิด Apoptosis ของเซลล์ Macrophage ที่เกิดจากการชักนำของ Group B Streptococcus ในสภาพที่มีชีวิตนั้น จะมีผลทำให้เซลล์มีการสร้างโปรตีนในกลุ่ม JNK และ p38 ออกมาพร้อมกันในปริมาณมาก พร้อมกับการยับยั้งโปรตีน Extracellular signal-regulated kinase (ERK) ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ จัดเป็นสมาชิกที่สำคัญของโปรตีนในกลุ่ม Mitogen activated protein kinases (MAPKs) ที่มีความสำคัญอย่างมากในการเกิด Apoptosis ในเซลล์ Macrophage ของสิ่งมีชีวิต เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Evans *et al.* (2000) ได้รายงานว่าปลาไนที่ได้รับการฉีดด้วยเชื้อ *S. iniae* จะมีการผลิตโปรตีนในกลุ่ม Apoptosis regulatory factors ออกมาซึ่งจะสามารถกระตุ้นให้เซลล์ Nonspecific cytotoxic cell (NCC) ที่สกัดได้จากม้าม ไตส่วนหน้าและ Peripheral blood ของปลาปกติมีการสร้าง Cytosolic FasL ซึ่งถือเป็น Factor หนึ่งที่สามารถโน้มนำทำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์ให้มีการแสดงออกของยีนชนิดนี้ได้เช่นกัน นอกจากนี้ Ulett and Anderson (2006) ที่พบว่า Group B

Streptococcus agalactiae สามารถชักนำทำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์ Macrophage ได้เช่นเดียวกัน โดยพบว่าเซลล์ Macrophage ที่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ *S. agalactiae* จะมีกิจกรรมของ Caspase-3 activity เพิ่มขึ้นสูงถึง 4.4 เท่า ในชั่วโมงที่ 24 และเป็น 1.7 เท่า ในชั่วโมงที่ 48 ภายหลังจากการติดเชื้อ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.01$) ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ ดังกล่าว นอกจากนี้ Group B *S. agalactiae* ยังสามารถชักนำให้มีการปลดปล่อยโปรตีน Cytochrome C ซึ่งสร้างจากไมโทคอนเดรียให้มีการหลั่งเพิ่มขึ้น และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ศักย์ไฟฟ้าที่บริเวณ Mitochondrial membrane อย่างรุนแรงอีกด้วย นอกจากนี้ผลของการกระตุ้นยังมีผลรวมไปถึงการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม Pro-apoptosis ซึ่งได้แก่ โปรตีน Bad และ กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมและกำหนดบริเวณในการเกิด Apoptosis ที่สำคัญได้แก่ 14-3-3, Bcl-X_L และ Omi/HtrA2 เป็นต้น

เมื่อพิจารณาข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาในครั้งนี้ และจากการรายงานที่ผ่านมาใน ข้างต้นสามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า Group B *Streptococcus* สามารถทำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis ในเซลล์ Macrophage หรือ Monocytes ของสัตว์ในกลุ่มมีกระดูกสันหลังได้จริง แต่ผลของการติดเชื้อกระตุ้นปลานิลด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ทั้งในระดับ 1×10^7 จนถึง 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ทั้งในการศึกษาโดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR และ Quantitative real-time PCR กลับไม่พบว่ากลุ่มของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีการแสดงออกของยีน Casp3-TL เพิ่มมากขึ้นแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าการเกิด Apoptosis ในปลานิลนี้จะเกิดขึ้นจากกระบวนการ (Pathway) ที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของยีน Caspase-3 ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของยีนแบบ Apoptosis

2.2 การแสดงออกของยีน Granzyme ในปลานิล

จากข้อมูลจนถึงขณะนี้ทำให้เราทราบว่าในกลุ่มของปลานั้นยังไม่ปรากฏมีการ รายงาน Population ของ T cell ในปลาที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม Nonspecific cytotoxic cells (NCC) ซึ่งทำหน้าที่เทียบได้กับ Natural killer cells ในสัตว์ชั้นสูงได้ถูกค้นพบครั้งแรกใน Channel catfish (Graves *et al.* 1985) และภายหลังก็สามารถพบการรายงานในกลุ่มของปลา Catfish, Tilapia และ Trout เช่นเดียวกัน (Faisal *et al.*, 1989; Jaso-Friedmann *et al.*, 1990; Greenlee *et al.*, 1991) แม้ กระนั้นก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้โดยตรงโดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน Granzyme นั้นยังถือว่ามียูอยู่อย่างจำกัด

จากข้อมูลในปัจจุบันพบว่า ยีน Granzymes นั้น มีการแสดงออกใน Noncytolytic lymphoid cells ซึ่งจะมีการพัฒนาไปเป็น Natural killer cells, Cytotoxic CD4 and CD8 T cells รวมทั้ง T cell บางชนิด (Regulatory T cells) ซึ่งจะมีระดับการแสดงออกแตกต่างกันออกไปโดยขึ้นกับชนิดของเซลล์และการกระตุ้นจากตัวกระตุ้นต่าง ๆ (Russell and Ley, 2002) อย่างไรก็ตาม Ebnet *et al.* (1995) ได้ใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจสอบการแสดงออกของยีน Granzyme A, B และ C พบว่า mRNA ของยีน Granzymes เหล่านี้มีการแสดงออกใน Progenitor T cells ของหนู (Mouse) ด้วย โดย Granzyme B สามารถพบการแสดงออกได้ใน Prothymocytes ของตับของตัวอ่อนหนู ขณะที่ Granzyme A, B และ C มีการแสดงออกใน Double-negative thymocytes นอกจากนี้ B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Interleukin-21 (IL-21) ซึ่งโดยปกติจะมีการแสดงออกของยีน Granzyme B ในระดับเบาบางจะสามารถถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน โดยการกระตุ้นด้วย CpG oligodeoxynucleotide หรือ Anti-B cell receptor (anti-BCR) antibody (Jahrsdorfer *et al.*, 2006) นอกจากนี้การกระตุ้นด้วย CpG oligodeoxynucleotide และ Anti-B cell receptor (anti-BCR) antibody ไปพร้อม ๆ กัน สามารถกระตุ้นการแสดงออกใน Human B cells, Epstein-Barr virus-transformed lymphoblast รวมทั้ง Lymphoma cell lines อื่นๆ อีกหลาย ๆ ชนิดได้อีกด้วย (Jahrsdorfer *et al.*, 2006)

นอกเหนือจาก Lymphoid cells ที่พบว่าการแสดงออกของยีน Granzymes แล้ว ใน Non-lymphoid cells หลายชนิดก็พบว่าการแสดงออกของยีน Granzyme เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะยีน Granzyme B ที่พบว่าสามารถพบการแสดงออกใน กลุ่มของ Myeloid cells หลายชนิดโดยไม่พบว่าการแสดงออกของยีน Perforin ควบคู่ไปด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน Human plasmacytoid dendritic cells (pDCs) (Rissoan *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับ Neoplastic human mast cells ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ทั้งการทดลองใน *In vivo* และ *In vitro* ในขณะที่หนู (Mouse) นั้นสามารถพบการแสดงออกของ Granzyme B ใน Skin-associated mast cells และใน Bone marrow derived in vitro-differentiated mast cells เท่านั้น แต่กลับไม่พบใน Mast cells ที่แยกได้จากปอด (Lung mast cells) แต่อย่างใด และยังไม่พบว่า Mast cells ของหนูนั้นมีการแสดงออกของยีน Granzyme A และ Perforin ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ใน Human basophils ซึ่งมีสายการพัฒนาที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดกับ Mast cells นั้นพบว่า IL-3 สามารถชักนำให้มีการสร้าง Granzyme B โดยไม่พบว่าการแสดงออกของยีน Granzyme A และ Perforin เลย นอกจากนี้ จากการรายงานของ Wagner *et al.* (2004) และ Hochegger *et al.* (2007) ได้รายงานว่า Human neutrophils สามารถสร้าง Granzyme B และ Perforin ได้พร้อม ๆ กัน อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวนี้ได้ออกให้เกิดขึ้นได้แต่เพียงตามมามากมาย

นอกจากนี้การแสดงออกของ Granzyme B ก็สามารถพบได้ในระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์โดยเฉพาะ Spermatocytes ที่กำลังพัฒนา รวมทั้ง Trophoblasts ที่พบในรก (Placenta) ด้วย (Hirst *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Sasson *et al.* (2001) ก็พบว่า Granulosa cells ของ Human ovary ก็สามารถสร้าง Granzyme ชนิดนี้ เพื่อตอบสนองต่อ Follicle stimulating hormone เช่นเดียวกัน ขณะที่การแสดงออกของ Granzyme ชนิดอื่น ๆ ก็สามารถพบได้ใน Non-lymphoid cells ของหนู Mouse ที่สำคัญคือ Granzyme K และ Granzyme M โดยพบว่า Granzyme M นั้น มีการแสดงออกอย่างเบาบางใน Photoreceptor cells ของ Retina อีกด้วย (Taniguchi *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามการสร้าง mRNA ของเซลล์เหล่านี้สามารถผลิต mRNA ในรูปแบบของ Alternatively splicing form ออกมาในปริมาณที่สูงกว่ามาก เช่นเดียวกับ Granzyme M, Granzyme K ก็สามารถพบ Alternatively splicing form แสดงออกอย่างมากในเซลล์สมองเช่นเดียวกัน (Suemoto *et al.* 1999)

จากการศึกษาการแสดงออกของ Granzyme ของปลานิลหรือ Granz-TL โดยการใช้เทคนิค RT-PCR ในครั้งนี้พบว่าในปลาปกติที่ถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85% จะมีการแสดงออกของ Granz-TL ในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับ Lymphoid cells อย่างชัดเจน โดยมีการแสดงออกสูงสุดใน PBLs รองลงมาคือ ไตส่วนหน้า ไตส่วนหลังและม้ามเท่านั้น ขณะที่อวัยวะอื่น ๆ ไม่มีการแสดงออกเลย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Praveen *et al.* (2004) ที่ใช้เทคนิค RT-PCR ในการศึกษาการแสดงออกของ Granzyme ในปลา Channel catfish ซึ่งพบว่า ในปลาปกติ ไตส่วนหน้า และ NCC cell เป็นเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ Granzyme มากที่สุดและพบการแสดงออกปานกลางในม้าม ตับ เหนือกและไตส่วนหลัง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการสกัดเอาเฉพาะ NCC cell จาก Peripheral blood ไตส่วนหน้าและม้าม ทำให้สามารถพบการแสดงออกของ Granzyme ในปลา Channel catfish ได้มากขึ้นอย่างชัดเจน

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wernersson *et al.* (2006) ที่ใช้เทคนิค Northern blot analysis เพื่อศึกษาการแสดงออกของ Granzyme A/K และ Granzyme-like I ในปลา Atlantic cod ซึ่งพบว่า Granzyme A/K มีการแสดงออกในม้าม ไตส่วนหน้า Thymus และหัวใจเท่านั้น โดยม้ามจะมีการแสดงออกมากที่สุด ขณะที่อวัยวะอื่น ๆ มีการแสดงออกอย่างเบาบางเท่านั้น ในขณะที่ Granzyme-like I มีการแสดงออกในระดับที่สูงและสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนในม้าม ไตส่วนหน้าและ Thymus เท่านั้น นอกจากนี้ Praveen *et al.* (2006a) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ Granzyme ในปลานิล (TLGR-1) โดยการใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า Granz-TLGR-1 มีการแสดงออกใน Nonspecific cytotoxic cells ที่แยกได้จากเลือดของปลานิล Peripheral blood

leukocytes และไตส่วนหน้าเท่านั้น ผลจากการศึกษาข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่าในปลาปกติถึงแม้ไม่ได้อยู่ในสภาพของการติดเชื้อก็ยังสามารถพบการแสดงออกของยีน Granzyme ได้ในอวัยวะสำคัญ ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากอวัยวะเหล่านั้นน่าจะมี NCC cell ของปลาหรือ cytotoxic T cell subpopulation กระจายตัวอยู่ในอวัยวะเหล่านั้นก็ได้

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบกับปลานิลที่ติดเชื้อกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* กลับพบว่าไตส่วนหน้า ไตส่วนหลังและม้าม มีการแสดงออกของยีน Granz-TL เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับในสมองที่มีการแสดงออกมาในปริมาณที่มากและเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับปลาปกติที่พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน Granz-TL เลย นอกจากนี้อวัยวะที่พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน Granz-TL เช่น อวัยวะสืบพันธุ์ หัวใจและลำไส้ กลับปรากฏแถบของ PCR product ขึ้นมาให้เห็นในระดับที่พอสามารถสังเกตได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. agalactiae* สามารถเหนี่ยวนำให้ปลานิลมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยการสร้าง Granz-TL ออกมาอย่างชัดเจน และเมื่อทำการศึกษากการแสดงออกของยีน Granz-TL ภายหลังจากการติดเชื้อปลานิลทดลองด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ด้วยเทคนิค Real-time PCR กลับพบว่าในชั่วโมงที่ 24 ภายหลังจากการติดเชื้อ ปลาในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ทั้งสองความเข้มข้นจะมีการแสดงออกของยีน Granz-TL ในไตส่วนหน้าเพิ่มขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมถึง 11 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. agalactiae* สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกระบวนการ Cytotoxicity ได้ เช่นเดียวกัน ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Caipang *et al.* (2009) ที่ได้ทำการศึกษาผลของการให้วัคซีน Heat-killed *Vibrio anguillarum* ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในม้ามของปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) โดยการใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR พบว่าภายหลังจากที่ได้รับวัคซีน ตั้งแต่วันที่ 1, 3, 7 และ 10 ของการให้วัคซีน ปลาในกลุ่มที่ได้รับวัคซีนจะมีการแสดงออกของยีน Non-specific cytotoxic cell receptor protein-1 (NCCRP-1) และ Granzyme A/K เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ($P < 0.05$) เช่นเดียวกับการรายงานของ Wang *et al.* (2009) ที่พบว่าภายหลังจากที่หนูทดลองที่ได้รับการติดเชื้อด้วย *Mycobacterium tuberculosis* vaccine จะมีการแสดงออกของยีน Granzyme B เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ซึ่ง Toossi *et al.* (2004) และ Andersson *et al.* (2007) ได้อธิบายว่ากลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการต้านทานต่อเชื้อ *M. tuberculosis* จะขึ้นอยู่กับการทำงานของ Effector molecules หลายชนิดโดยเฉพาะโปรตีนในกลุ่มของ Granzymes ซึ่งได้แก่ Granzyme B ที่มีการหลั่งออกมาจาก $CD8^+$ T cells ในกระบวนการ Cytotoxicity ในการทำลายเซลล์เป้าหมายที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* อยู่ภายใน

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Granz-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A ในหลอดทดลอง (*In vitro*) ด้วยเทคนิค Real-time PCR กลับพบว่าตลอดช่วงเวลาที่ทำการทดลองตั้งแต่ 6 จนถึง 72 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน Granz-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาทั้งสองกลุ่มรวมถึงกลุ่มควบคุม มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ที่พบว่าการแสดงออกสูงสุด โดยที่ในชั่วโมงที่ 72 จะมีระดับการแสดงออกของยีน Granz-TL ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และ Concanavalin A เป็น 15, 18 และ 12 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทดลอง แต่ก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ($P > 0.05$) ทั้งนี้อาจจะมีผลเนื่องมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBLs) ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้มาจากการสกัดจากปลานิลตัวอย่างหลาย ๆ ตัว ซึ่งอาจเป็นผลทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า Mixed leukocytes reaction (MLR) (Heiger *et al.*, 1977; Caspi *et al.*, 1984) โดย Population ของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ Cytotoxic like T cell รวมทั้ง Nonspecific cytotoxic cell (NCC) เกิดการแยกแยะและจดจำเซลล์เม็ดเลือดขาวใน Population ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีการหลั่ง Effector molecules ออกมาทำลายซึ่งกันและกันเป็นจำนวนมาก โดยหนึ่งในนั้นอาจเป็นยีน Granz-TL ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Praveen *et al.* (2006a) ที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Granzyme-1 (TLGR-1) ภายหลังจากการกระตุ้น NCC cell ซึ่งแยกได้จาก PBLs ในปลาทดลองเพียงตัวเดียว โดยใช้ Recombinant tilapia TNF-alpha, Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) ผสมกับ Calcium ionophore และ Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งสกัดได้จาก *E. coli* พบว่า Recombinant tilapia TNF-alpha สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน TLGR-1 ใน NCC cell ได้ถึง 29 และ 12 เท่า ภายใน 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่ PMA ผสมกับ Calcium ionophore สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน TLGR-1 ใน NCC cell ได้ถึง 2 และ 2.5 เท่า ภายใน 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วน LPS ซึ่งสกัดได้จาก *E. coli* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน TLGR-1 ใน NCC cell ได้ถึง 2 และ 7 เท่า ภายใน 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการทดลองดังกล่าวนี้ทำให้สามารถทราบถึงกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลในการสร้างโปรตีน Granzyme ออกมาตอบสนองต่อตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะการตอบสนองต่อ Concanavalin A ซึ่งเป็นที่ทราบดีแล้วว่ามีคุณสมบัติในการเป็นสาร Mitogen ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเม็ดเลือดขาวในกลุ่ม T lymphocytes ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

การศึกษาในครั้งนี้สามารถค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ (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 ซึ่ง Full-length ของ cDNA ของยีน Casp3-TL มีขนาด 2,612 bp ซึ่งประกอบด้วย 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 ประกอบไปด้วย Domain ที่สำคัญได้แก่ Prodomain, Large และ Small subunit ซึ่งไม่พบว่ามีส่วนของ Hydrophobic leader sequence อยู่เลย ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยพบว่าในส่วนของ Catalytic domain ประกอบไปด้วย Histidine active site ซึ่งจัดเป็นลำดับกรดอะมิโนที่เป็นสัญลักษณ์ของยีนในกลุ่มนี้ (The Caspase family signature) และ Pentapeptide active-site motif หรือ Cysteine active site (QACRG) ที่อยู่ในบริเวณ Large subunit และ Protein binding domain (GSWFI) ที่พบในบริเวณ Small subunit ตามลำดับ ส่วนการศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Casp3-TL พบว่า Casp3-TL ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีน Caspase-3 ของปลาและแยกออกจากกลุ่มยีน Caspase-3 ของสัตว์มีกระดูกสันหลังอย่างชัดเจน

ขณะที่ Full-length ของ cDNA ของยีน Granz-TL มีขนาด 1,412 bp ซึ่งประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน ทางด้านปลาย 5' และ 3' เป็น 125 และ 519 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF มีความยาวเท่ากับ 765 bp คิดเป็นสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนความยาว 255 Residues เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของ Mature โปรตีนพบว่า Granz-TL ของปลานิล ประกอบด้วยบริเวณ Active site 3 ตำแหน่ง เช่นเดียวกับที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ โดยในบริเวณ Active site ที่ 1 จะมีกรดอะมิโน Histidine (His), ตำแหน่ง Active site ที่ 2 จะมีกรดอะมิโน Aspartic acid (Asp) และตำแหน่ง Active site ที่ 3 จะมีกรดอะมิโน (H₆₇-D₁₁₀-S₂₀₈) ซึ่งจะเป็นลำดับกรดอะมิโนที่เป็นเป้าหมายที่ใช้ในการแสดงลักษณะและทำหน้าที่ของยีนในกลุ่ม Serine protease ที่เรียกว่า Catalytic triads ส่วนการศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ Phylogenetic tree พบว่า Granz-TL ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีน Granzyme A/K ของปลาและ Granzyme A และ K ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง และแยกออกจากยีน Granzyme-1 ในปลานิลที่ถูกรายงานไว้ก่อนหน้านี้ชัดเจน

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าในปลาปกติ ยีน Casp3-TL มีการแสดงออกเบาบางในทุก ๆ อวัยวะ ขณะที่ยีน Granz-TL มีการแสดงออกมากที่สุด ในเม็ดเลือดขาวในเลือด (Blood peripheral leukocytes: PBLs) และมีการ

แสดงออกไม่มากนักในไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลังเท่านั้น และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิด ในปลานิลที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 3 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Casp3-TL ไม่มีความแตกต่างกับปลาปกติ ขณะที่ยีน Granz-TL มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในสมอง ไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลังตามลำดับ 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 ซึ่งต่างจากยีน Granz-TL ที่พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียมีการแสดงออกของยีนชนิดนี้เป็น 11 และ 3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบในเม็ดเลือดขาว (PBLs) ของปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ Concanavalin A พบว่าการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาที่ถูกกระตุ้นด้วย *A. hydrophila* จะถูกยับยั้งในชั่วโมงที่ 48 ขณะที่กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Concanavalin A มีการแสดงออกลดลงเช่นเดียวกัน ในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ตามลำดับ ขณะที่ยีน Granz-TL พบว่าการแสดงออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ตามลำดับ แต่ก็ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นกับกลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลาของการทดลองแต่อย่างใด

จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการศึกษากาโคลนและการแสดงออกของยีน Caspase-3 (Casp3-TL) ในครั้งนี้ถือเป็นการรายงานครั้งแรกในปลานิล และถือเป็นปลาชนิดที่ 7 ที่ยีนชนิดนี้ได้ถูกรายงาน ผลของการศึกษาแสดงให้เห็นว่า Casp3-TL นั้น มีความคล้ายคลึงกับยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ และเมื่อทำการศึกษากการแสดงออกของยีนชนิดนี้ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* กลับพบว่ายีนชนิดนี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นข้อมูลในการสนับสนุนว่าการเกิด Apoptosis ของเซลล์ Macrophage ซึ่งเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรีย Group B *S. agalactiae* ในปลานิล ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด Apoptosis ที่ต้องอาศัยกลไกการตอบสนองที่ผ่านทางยีน Caspase-3 เป็นสำคัญ

และถึงแม้ว่าก่อนหน้านี้จะมีการรายงานการค้นพบยีน Granzyme ในปลานิลไปก่อนหน้านี้แล้ว อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ Phylogenetic tree, รูปแบบ (Pattern) ของการแสดงออกของยีน โดยใช้เทคนิค RT-PCR และตำแหน่งของ Substrate specificity triplet pocket site ที่มีลำดับ

กรดอะมิโนเป็น D-G-G แสดงให้เห็นว่า Granz-TL ที่พบในปลานิลครั้งนี้ เป็นยีน Granzyme ชนิดใหม่ที่ถูกค้นพบในการศึกษานี้ และการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR และ Quantitative real-time PCR ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ทำให้ทราบว่ายีนชนิดนี้น่าจะมีส่วนสำคัญในการตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรีย Group B *S. agalactiae* ในปลานิล และถึงแม้ว่า Cytotoxic T lymphocytes ในปลานิลยังไม่มี การค้นพบหรือ Nonspecific cytotoxic cell ที่ถูกค้นพบไปก่อนหน้านี้ การค้นพบยีน Granz-TL ในการศึกษานี้ เป็นข้อมูลที่ใช้ในการสนับสนุนอย่างชัดเจนว่าในระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล จะต้องมีการมี Population ของเซลล์ที่ทำหน้าที่เทียบได้กับ Cytotoxic T lymphocytes และ Natural killer cell ที่พบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงเช่นเดียวกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาในครั้งนี้สามารถค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ cDNA ของยีน Caspase-3 (Casp3-TL) และ cDNA ของยีน Granzyme (Granz-TL) ในปลานิล โดยพบว่า Full-length ของ cDNA ของยีน Casp3-TL และ cDNA ของยีน Granz-TL ในปลานิลนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นเต็มความยาว 2,612 และ 1,412 bp ตามลำดับ และมีส่วนของ Open reading frame ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 846 และ 765 bp ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นลำดับอะมิโนความยาว 282 และ 255 Residues ตามลำดับ

2. การศึกษาคุณลักษณะของ Casp3-TL ในปลานิลครั้งนี้ พบว่าส่วนที่เป็น Catalytic domain จะประกอบด้วย Histidine active site, Pentapeptide active site motif และ Protein binding domain เช่นเดียวกับที่พบในยีน Caspase-3 ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และการศึกษาคุณลักษณะของ Granz-TL ที่พบในปลานิล มีบริเวณที่เป็น Catalytic domain จะประกอบด้วย IIXG conserve sequence, PHSRPYMA motif และ Catalytic traid residues ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ His₆₇, Asp₁₁₀ และ Ser₂₀₈ ซึ่งเป็นลักษณะเอกลักษณ์ของยีนในกลุ่ม Serine protease ที่พบในยีน Granzyme ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และเมื่อพิจารณาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการรวมถึงการศึกษาแสดงออกของยีน ทำให้ทราบว่ายีน Granz-TL ในปลานิลนี้แตกต่างหรือเป็นยีนคนละชนิดกับยีน Granzyme-1 ในปลานิลที่ได้มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ และยังพบว่ายีน Granz-TL ในปลานิลมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน Granzyme A/K ของปลา รวมถึงยีน Granzyme A และยีน Granzyme K ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอีกด้วย

3. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าในปลาปกติ ยีน Casp3-TL มีการแสดงเบาบางในทุก ๆ อวัยวะ ขณะที่ยีน Granz-TL มีการแสดงออกมากที่สุด ในเม็ดเลือดขาวในเลือด (Peripheral blood leukocytes: PBLs) และมีการแสดงออกบ้างในไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลังเท่านั้น ตามลำดับ และการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดในปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 3 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน Casp3-TL ไม่มีความแตกต่างกับปลาปกติ ขณะที่ยีน Granz-TL มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในสมอง ไตส่วนหน้า ม้ามและไตส่วนหลัง ตามลำดับ นอกจากนี้ การศึกษาการแสดงออก

โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time PCR ยังพบว่าปลานิลที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^7 และ 1×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร มีการแสดงออกของยีน Casp3-TL ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา ซึ่งต่างจากยีน Granz-TL ที่พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียมีการแสดงออกของยีนชนิดนี้เป็น 11 และ 3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ และพบว่าการแสดงออกของยีน Casp3-TL ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาที่ถูกกระตุ้นด้วย *A. hydrophila* จะถูกยับยั้งในชั่วโมงที่ 48 ขณะที่กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Concanavalin A การแสดงออกของยีน Granz-TL มีการแสดงออกลดลงเช่นเดียวกัน ในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษากการแสดงออกของยีน Granz-TL ใน PBLs ของปลาทุกกลุ่ม มีแนวโน้มของการแสดงออกเพิ่มขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ตามลำดับ แต่ก็ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นกับกลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลาของการทดลองแต่อย่างใด

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญในการทำใหทราบและเข้าใจถึงกลไกการทำงานในรูปแบบต่าง ๆ ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล ให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งข้อมูลดังกล่าว อาจสามารถใช้เป็นองค์ความรู้ในการแสวงหาแนวทางการป้องกัน ควบคุมและรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งอาจจะเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *A. hydrophila* หรือเชื้อโรคชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุในการทำให้เกิดโรคในปลานิลได้ในอนาคต ซึ่งถือเป็นหัวใจสำคัญของการประยุกต์ใช้ความรู้ทางด้านอนุชีววิทยาโมเลกุล ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะการเกิดโรคในสัตว์น้ำ ซึ่งถือว่าเป็นปัญหาสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของโลกในปัจจุบันให้มีผลที่เป็นรูปธรรมในที่สุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สาวิตรี ศิลาเกษ, วุฒิพร พรหมขุนทอง และ สัทธิ บุญยรัตผลิน. 2539. โรคและพยาธิปลา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

คณิต ชูคันหอม และ อนุชา เสนาราช. 2551. ปริศนากายนอกที่พบในปลาสวยงามในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่น, น. 208-214. ใน ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข. ครั้งที่ 9 “สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้” 11-12 มิถุนายน 2551. คณะแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

ศิริ ก่ออนันตกุล. 2542. การเพาะเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

เจษฎา ชนกิจกร. 2540. การปรับปรุงความทนทานต่อความเค็มในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยวิธีการผสมข้ามชนิดกับปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาญณรงค์ รอดคำ. 2550. โรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย, น. 319-326. ใน ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ครั้งที่ 33. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ฐิติพร เพชรจินดา. 2542. พยาธิใบไม้ในปลาน้ำจืด. วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ 9 (2): 3-6.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นเรศ ช้วนยุค, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร คงประดิษฐ์ และ กิจการ ศุภมาตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล. ว สงขลานครินทร์ วทท. 27 (1): 307-319.

นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2547. การวินิจฉัยและการป้องกันรักษาโรคในสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยง-สัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิลบล กิจอันเจริญ. 2544. โรคปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. เอกสารประกอบการเรียนการสอน วิชา 118341. โรคปลาและปรสิตตัวน้ำ. ภาควิชาประมง, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นิลบล ยูสาละ, ชุตติมา หาญจวนิช และ นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2545. การพัฒนาวิธีการในการป้องกัน รักษาโรคที่เกิดกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสาร ประกอบงานวิจัยทุนอุดหนุนประจำปี 2545. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรงาม ลิ้มตระกูล. 2545. ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิกและโปรตีน. ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ดาว. เชียงใหม่.

มารุต สุขสมจิต. 2539. การใช้เวอร์จิเนียมัยซินเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) เพศผู้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ไชยบุตร. 2543. การเลี้ยงปลานิล. เอกสารคำแนะนำ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย. 2544. คาสเพส (Caspases) กับการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis). เชียงใหม่เวชสาร 40 (2): 105-110.

_____ 2548. การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน. ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ดาวคอมพิวกราฟิค. เชียงใหม่.

วรพงษ์ นลินานนท์. 2545. การกำจัดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในเนื้อปลานิล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิน เขษมศรี. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน. ครั้งที่ 1. ห้างหุ้นส่วนจำกัด. เมตตาเกือบปีปรีน. นครปฐม.

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์, ทินวรรณ ศรีสุข และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2550. ประสิทธิภาพของวัคซีนที่ เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอค- โคซิสในปลานิล. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 17 (1): 43-52.

- ศิลปพร ชื่นสุรัตน์. 2544. การวิเคราะห์เศรษฐกิจการผลิตปลานิลในจังหวัดสุพรรณบุรีปี 2542. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนันตชัย เชื้อนธรรม. 2542. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เอกพล วัจกะชาติ. 2551. การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman and J. S. Pober. 2000. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Adams, J. M. and S. Cory. 2001. Life or death decisions by the Bcl-2 protein family. **Trends Biochem. Sci.** 26: 61-66.
- Adderley, S. R and D. J. Fitzgerald. 2000. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists induce apoptosis in rat cardiomyocytes by caspase-3 activation. **J. Biol. Chem.** 275: 5760-5766.
- Andersson, J., A. Samarina, J. Fink, S. Rahman and S. Grundström. 2007. Impaired expression of perforin and granzysin in CD8⁺ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. **Infect. Immun.** 75: 5210-5222.
- Anonymous. 2009. **Cell signaling and neuroscience**. Available Source: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/granzyme-b.html>, March 12, 2009.
- Areechon, N., M. Endo, D. Jantawan, P. Srisapoom and N. Pirarat. 2005. Streptococcal infection in tilapia culture of Thailand, pp. 166-174. *In* **JSPS-NRCT International Symposium Joint Seminar**, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

- Bell, J. K., D. H. Goetz, S. Mahrus, J. L. Harris, R. J. Fletterick and C. S. Craik. 2003. The oligomeric structure of human granzyme A is a determinant of its extended substrate specificity. **Nat. Struct. Biol.** 10: 527-534.
- Bras, M., B. Queenan and A. Susin. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different models of dying. **Biochemistry** 70: 284-293.
- Brune, B. A. 2003. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it on. **Cell Death Differ.** 10: 864-869.
- Bode, W., E. Jr. Meyer and J. C. Powers. 1989. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: x-ray crystal structure, mechanism, substrate specificity and mechanism-based inhibitors. **Biochem.** 28: 1951-1963.
- Bols, N. C., J. L. Brubacher, R. C. Ganassin and J. Lee. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 853-873.
- Bots, M. and J. P. Medema. 2006. Granzymes at a glance. **J. Cell Sci.** 119: 5011-5014.
- Buckley, C., D. Pilling, N. V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D. L. Simmons, A. N. Akbar, J. M. Lord and M. Salmon. 1999. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. **Nature** 397: 534-539.
- Buratta, S., K. Fettucciari, R. Mambrini, I. Fetriconi, P. Marconi and R. Mozzi. 2002. Group B *Streptococcus* (GBS) modifies macrophage phosphatidylserine metabolism during induction of apoptosis. **FEBS Letters** 520: 68-72.
- Buzza, M. S. and P. I. Bird. 2006. Extracellular granzymes: current perspectives. **Biol. Chem.** 387: 827-837.

- Caipang, C. M., M. F. Brinchmann and V. Kiron. 2009. Profiling gene expression in the spleen of Atlantic cod, *Gadus morhua* upon vaccination with *Vibrio anguillarum* antigen. **Comp. Biochem. Physiol. B** 153: 261-267.
- Catalfamo, M. and P. A. Henkart. 2003. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. **Curr. Opin. Immunol.** 15: 522-527.
- Cao, D., A. Kocabas, Z. Ju, A. Karsi, P. Li, A. Patterson and Z. Liu. 2001. Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of genes and expression profiles of the head kidney. **Anim. Genet.** 32: 169-188.
- Caspi, R. R. and R. R. Avtalion. 1984. The mixed leukocyte reaction (MLR) in carp: bidirectional and unidirectional MLR responses. **Dev. Comp. Immunol.** 8: 631-637.
- Caughey, G. H. 2007. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. **Immu. Revs.** 217: 141-154.
- Chang, H. Y., H. Nishitoh, X. Yang, X. Ichijo and D. Baltimore. 1998. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. **Science** 281: 1860-1863.
- Chang, M. X., P. Nie, H. X. Xie, G. L. Wang and Y. Gao. 2006. Characterization and expression analysis of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 110: 51-63.
- Cheah, F. C., M. B. Hampton, B. A. Darlow, C. C. Winterbourn and M. C. Vissers. 2005. Detection of apoptosis by caspase-3 activation in tracheal aspirate neutrophils from premature infants: relationship with NF-KB activation. **J. Leukoc. Biol.** 77: 432-437.
- Chen, M. and J. Wang. 2002. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. **Apoptosis** 7: 313-319.

Chiarugi, A. and M. A. Moskowitz. 2002. PARP-1 a perpetrator of apoptotic cell death. **Science** 297: 200-201.

Chowdhury, D., P. J. Beresford, P. Zhu, D. Zhang, J. S. Sung, B. Demple, F. W. Perrino and J. Lieberman. 2006. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. **Mol. Cell.** 23: 133-142.

_____ and J. Lieberman. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. **Annu. Rev. Immunol.** 26: 389-420.

Croston, G. 2009. **Granzyme A mediated apoptosis pathway**. Available Source: http://www.biocarta.com/pathfiles/h_setPathway.asp, November 26, 2009.

Cullen, S. P. and S. J. Martin. 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. **Cell Death Differ.** 15: 251-262.

Danilova, N., V. S. Hohman, E. H. Kim and L. A. Steiner. 2000. Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish. **Immunogenetics** 52: 81-91.

Dash, P. 2009. **Cell death**. Available Source: <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>, November 16, 2009.

Dixon, B. and R. J. Stet. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 683-699.

Ebnet, K., M. Hausmann, F. Lehmann-Grube, A. Mullbacher, M. Kopf, M. Lamers and M. M. Simon. 1995. Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. **EMBO J.** 14: 4230-4239.

- Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 827-839.
- Evans, D. L., S. L. Taylor, J. H. Leary III, G. R. Bishop, A. Eldar and L. J. Friedmann. 2000. *In vivo* activation of tilapia nonspecific cytotoxic cells by *Streptococcus iniae* and amplification with apoptosis regulatory factor (s). **Fish Shellfish Immunol.** 10: 419-434.
- _____, J. H. Leary III and L. J. Friedmann. 2001. Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 791-805.
- Fairbrother, W. J., N. C. Gordon, E. W. Humke, K. M. O'Rourke, M. A. Starovasnik, J. P. Yin and V. M. Dixit. 2001. The PYRIN domain: a member of the death domain-fold superfamily. **Protein science.** 10: 1911-1918.
- Faisal, M., II Ahmed, G. Peters and E. L. Cooper. 1989. Natural cytotoxicity of tilapia leucocytes. **Dis. Aquat. Organ.** 7: 17-22.
- Farmer, E. 2006. **Labelled diagram of a cell undergoing apoptosis.** Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Apoptosis.png>, December 4, 2009.
- Fan, Z., P. J. Beresford, D. Y. Oh, D. Zhang and J. Lieberman. 2003. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. **Cell** 112: 659-672.
- _____ and Q. Zhang. 2005. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity **Cell. Mol. Immunol.** 2: 259-264.

- Fernandes, T. A., G. Litwack and E. S. Alnemri. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **J. biol. Chem.** 269: 30761-30764.
- Fettucciari, K., I. Fetriconi, A. Bartoli, R. Rossi and P. Marconi. 2003. Involvement of mitogen-activated protein kinases in Group B *Streptococcus*-induced macrophage apoptosis. **Pharmacol. Res.** 47: 355-362.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.** 73: 1907-1916.
- Graves, S. S., D. L. Evans and D. L. Dawe. 1985. Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **J. Immunol.** 134: 78-85.
- Greenlee, A. R., R. A. Brown and S. S. Ristow. 1991. Nonspecific Cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms. **Dev. Comp. Immunol.** 15: 153-164.
- Griffiths, G. M. and S. Isaaz. 1993. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. **J. Cell. Biol.** 120: 885-896.
- Grütter, M. G. 2000. Caspases: key players in programmed cell death. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 10: 649-655.
- Grossman, W. J., P. A. Revell, Z. H. Lu, H. Johnson, A. J. Bredemeyer and T. J. Ley. 2003. The orphan granzymes of humans and mice. **Curr. Opin. Immunol.** 15: 544-552.
- Guerrero, I. and A. R. Altaba. 2003. Development, longing for Ligand: hedgehog, patched and cell death. **Science** 301: 774-776.

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.

Heiger, H. M., H. O. Hodgins and J. M. Chiller. 1977. Evolution of the lymphoid system II. Evidence for immunoglobulin determinants on all rainbow trout lymphocytes and demonstration of mixed leukocyte reaction. **Eur. J. Immunol.** 7: 881-887.

Hink-Schauer, C., E. P. Estebanez, F. C. Kurschus, W. Bode and D. E. Jenne. 2003. Crystal structure of the apoptosis-inducing human granzyme A dimer. **Nat. Struct. Biol.** 10: 535-540.

Hirst, C. E., M. S. Buzza, V. R. Sutton, J. A. Trapani, K. L. Loveland and P. I. Bird. 2001. Perforin-independent expression of granzyme B and proteinase inhibitor 9 in human testis and placenta suggests a role for granzyme B-mediated proteolysis in reproduction. **Mol. Hum. Reprod.** 7: 1133-1142.

Hochegger, K., P. Eller, J. M. Huber, D. Bernhard, G. Mayer, J. G. Zlabinger and A. R. Rosenkranz. 2007. Expression of granzyme A in human polymorphonuclear neutrophils. **Immunology** 121: 166-173.

Hwang, J. Y., I. Hirono and T. Aoki. 2007. Cloning and expression of a novel serine protease from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Dev. Comp. Immunol.** 31: 587-595.

Jahrsdorfer, B., S. E. Blackwell, J. E. Wooldridge, J. Huang, M. W. Andreski, L. S. Jacobus, C. M. Taylor and G. J. Weiner. 2006. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. **Blood** 108: 2712-2719.

- Jaso-Friedmann, L., D. T. Harris, A. John, H. S. Koren and D. L. Evans. 1990. A monoclonal antibody-purified soluble target cell antigen inhibits nonspecific cytotoxic cell activity. **J. Immunol.** 144: 2413-2418.
- Jenne, D. E. and J. Tschopp. 1988. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. **Immunol. Rev.** 103: 53-71.
- Johnson, H., L. Scorrano, S. J. Korsmeyer and T. J. Ley. 2003. Cell death induced by granzyme C. **Blood** 101: 3093-3101.
- Jones, S. R. 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 841-852.
- Kaiser, P., L. Rothwell, S. Avery and S. Balu. 2004. Evolution of the interleukins. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 375-394.
- Kelly, J. M., N. J. Waterhouse, E. Cretney, K. A. Browne, S. Ellis, J. A. Trapani and M. J. Smyth. 2004. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. **J. Biol. Chem.** 279: 22236-22242.
- Klein, J. and V. Horejsi. 1997. **Immunology**. Blackwell Science Inc.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonaák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg and N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.** 27: 95-125.
- Kumar, S. 1997. The apoptosis cysteine protease CPP32. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 29: 393-396.

- _____, Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3: an integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.** 5: 150-163.
- Kurobe, T., I. Hirano, H. Kondo, T. S. Taki and T. Aoki. 2007. Molecular cloning, characterization, expression and functional analysis of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* Fas ligand. **Dev. Comp. Immunol.** 7: 687-695.
- Leeuwenburgh, C. 2003. Role of apoptosis in sarcopenia. **J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.** 58: 999-1001.
- Lieberman, J. and Z. Fan. 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. **Curr. Opin. Immunol.** 15: 553-559.
- Lindenstrøm, T., C. J. Secombes and K. Buchmann. 2004. Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 97: 137-148.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25: 402-408.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 137-151.
- Marriott, H. M. and D. H. Dockrell. 2006. *Streptococcus pneumoniae*: The role of apoptosis in host defense and pathogenesis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 38: 1848-1854.
- Martinvalet, D., P. Zhu and J. Lieberman. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. **Immunity** 22: 355-370.

- Miller, N. W. and L. W. Clem. 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-dependent and thymus-dependent antigens. **J. Immunol.** 133: 2356-2359.
- Monteiro, S. M., N. Santos, M. Calejo, A. F. Fernandes and M. Sousa. 2009. Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: effects in apoptosis induction and cell proliferation. **Aquat. Toxicol.** 94: 219-228.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. **Cell** 88: 355-365.
- . 2000. Apoptosis DNA fragmentation. **Exp. Cell. Res.** 256: 12-18.
- Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd ed. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle and Y. A. Lazebnik. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. **Nature** 376: 37-43.
- . and N. A. Thornberry. 1997. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem. Sci.** 22: 299-306.
- Ojcius, D. M., P. Souque, J. L. Perfettini and V. A. Dautry. 1998. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. **J. Immunol.** 161: 4220-4226.
- Pao, L. I., N. Sumaria, J. M. Kelly, S. V. Dommelen, E. Cretney, M. E. Wallace, D. A. Anthony, A. P. Uldrich, D. I. Godfrey, J. M. Papadimitriou, A. Mullbacher, M. A. Degli-Esposti and M. J. Smyth. 2005. Functional analysis of granzyme M and its role in immunity to infection. **J. Immunol.** 175: 3235-3243.

- Park, S., H. R. Moon, H. Seok and M. Lee. 2004. Rearrangement of tryptophan residues in caspase-3 active site upon activation. **Biochim. Biophys. Acta.** 1700: 5-9.
- Pasqualini, R., E. Koivunen and E. Ruoslahti. 1995. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. **J. Cell Biol.** 130: 1189-1196.
- Pasquier, L. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol. B** 129: 1-15
- Phongdara, A., W. Wanna and W. Chotigeat. 2006. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp (*Penaeus merguensis*). **Aquaculture** 252: 114-120.
- Pilat, D., T. Fink, B. O. Skrobanek, M. Zimmer, H. Werkerle, P. Lichter and D. E. Jenne. 1994. The human met-ase gene (GZMM): structure, sequence, and close physical linkage to the serine protease gene cluster on 19p1 3.3. **Genomics** 24: 445-450.
- Praveen, K., L. E. Donald and L. J. Friedmann. 2004. Evidence for the existence of granzyme-like serine proteases in teleost cytotoxic cells. **J. Mol. Evol.** 58: 449-459.
- _____, J. H. Leary III, D. L. Evans and L. J. Friedmann. 2006a. Molecular characterization and expression of a granzyme of an ectothermic vertebrate with chymase-like activity expressed in the cytotoxic cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Immunogenetics** 58: 41-55.
- _____, _____, _____ and _____. 2006b. Molecular cloning of cellular apoptosis susceptibility (CAS) gene in *Oreochromis niloticus* and its proposed role in regulation of non-specific cytotoxic cell (NCC) functions. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 647-655.

Promega. 2009. **pGem-T and pGem-T Easy vector systems**. Available Aource:

<http://www.promega.com/tbs/tm042.pdf>, Aprail 13, 2009.

Pokpong, P., N. Weerapreeyakul and S. Barusrux. 2007. Apoptosis: pathway and assay.

J. Health. Res. 21: 227-238.

Rehm, M., H. J Huber, H. Dussmann1 and J. HM Prehn. 2006. Systems analysis of effector caspase activation and its control by X-linked inhibitor of apoptosis protein. **EMBO. J.** 25: 4338-4349.

Reis, M. I., D. S. Nascimento, A. D. Vale, M. T. Silva and N. M. Santos. 2007. Molecular cloning and characterisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene. **Mol. Immunol.** 44: 774-783.

Rissoan, M. C., T. Duhén, J. M. Bridon, N. B. Vermare, C. Peronne, B. S. Vis, F. Briere and E. M. Bates. 2002. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. **Blood** 100: 3295-3303.

Rotonda, J. and M. G. Calvo. 2001. The three dimensional structure of human granzyme B compared to caspase-3, a key mediator of cell deathwithcleavage specificity for aspartic acid in P1. **Chem. Biol.** 8: 357-368.

Russell, J. H. and T. J. Ley. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annu. Rev. Immunol.** 20: 323-370.

Sattar, R., S. A. Ali and A. Abbasi. 2003. Bioinformatics of granzymes: sequence comparison and structural studies on granzyme family by homology modeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 308: 726-735.

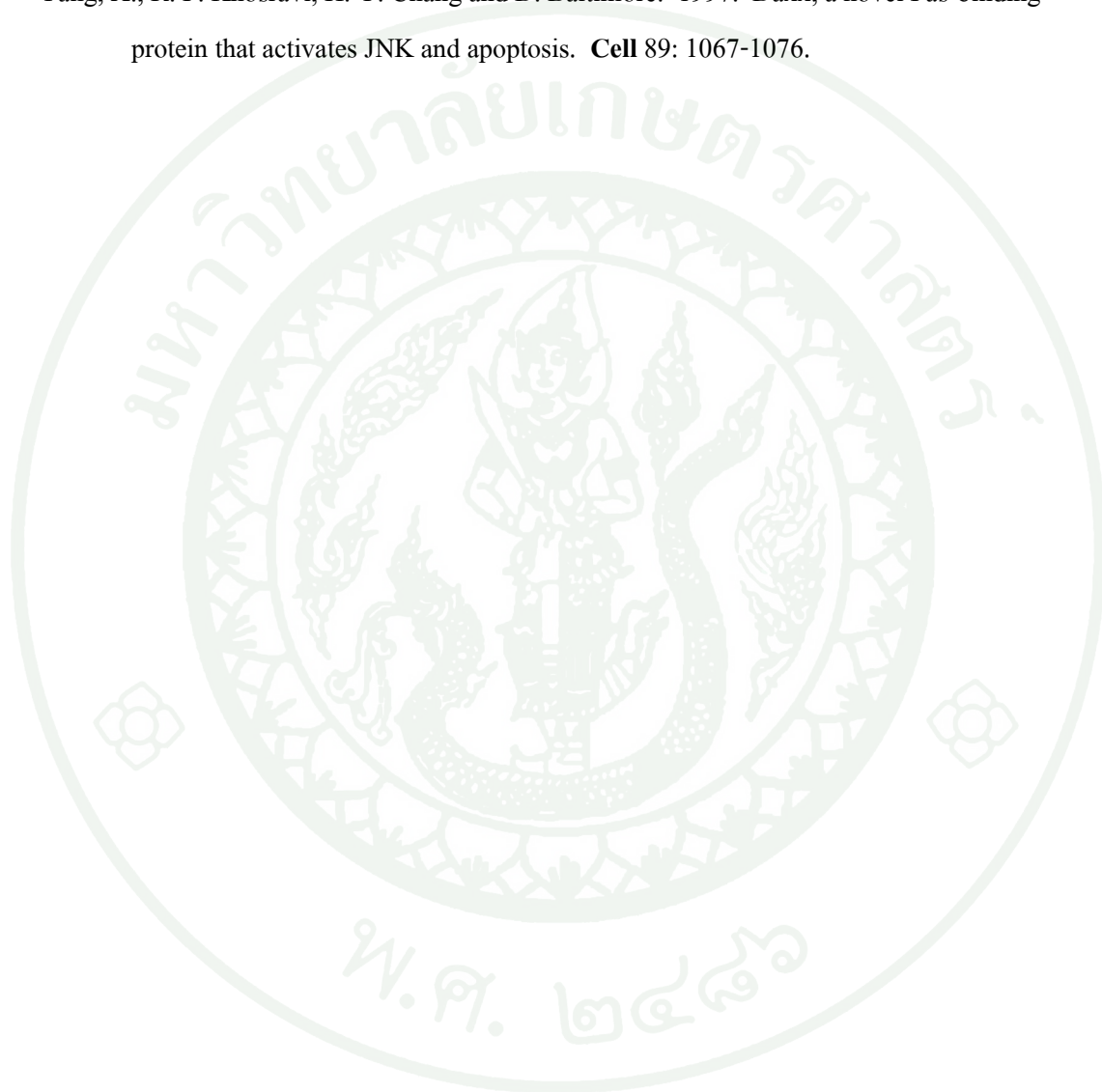
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell** 91: 443-446.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York.
- Sasson, R., K. Tajima and A. Amsterdam. 2001. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. **Endocrinology** 142: 802-811.
- Secombes, C. J., J. Zou, K. Laing, G. D. Daniels and C. Cunningham. 1999. Cytokine genes in fish. **Aquaculture** 172: 93-102
- Shao, J. Z., J. Liu and L. X. Xiang. 2004. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes *in vitro*. **Aquaculture** 229: 11-23.
- Shi, L., C. M. Kam, J. C. Powers, R. Aebersold and A. H. Greenberg. 1992. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. **J. Exp. Med.** 176: 1521-1529.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation, inhibition and reactivation: a mechanism view. **Protein Science** 13: 1979-1987.
- Spellerberg, B. 2000. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. **Microbes. Infect.** 2: 1733-1742.
- Srisapome, P., E. Wangkahart and N. Areechon. 2008. Gene expression analyses in head kidney and spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus agalactiae* by Expressed Sequence Tags (ESTs) technique. NCBI GenBank database, Direct submission

- Suemoto, T., M. Taniguchi, S. Shiosaka and S. Yoshida. 1999. cDNA cloning and expression of a novel serine protease in the mouse brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 70: 273-281.
- Takle, H., A. McLeod and O. Andersen. 2006. Cloning and characterization of the executioner caspases 3, 6, 7 and Hsp70 in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos. **Comp. Biochem. Physiol. B** 144: 188-198.
- _____ and Ø Andersen. 2007. Caspases and apoptosis in fish. **J. Fish. Biol.** 71: 326-349.
- Tan, Y., M. R. Demeter, H. Ruan and M. J. Comb. 2000. BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. **J. Biol. Chem.** 275: 25865-25869.
- Taniguchi, M., N. Tani, T. Suemoto, I. Ishimoto, S. Shiosaka and S. Yoshida. 1999. High Expression of alternative transcript of granzyme M in the mouse retina. **Neurosci. Res.** 34: 115-123.
- Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** 267: 1456-1462.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. **Science** 281: 1312-1316.
- Toossi, Z, M. Kizza, A. Kanost, K. Edmonds, M. Mchugh and C. Hirsch. 2004. Protective Responses in tuberculosis: induction of genes for interferon-gamma and cytotoxicity by *Mycobacterium tuberculosis* and during human tuberculosis. **Scand. J. Immunol.** 60: 299-306.
- Ulett, G. C. and E. E. Adderson. 2006. Group B *Streptococcus*-induced macrophage apoptosis. **Int. Congr. Ser.** 1289: 271-274.

- Wagner, C., C. I. Konert, B. Deneffle, S. Stegmaier, F. Hug and G. M. Hansch. 2004. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. **Blood** 103: 1099-1104.
- Wang, Q. L., Q. Pan, Y. Ma, K. Wang, P. Sun, S. Liu and X. L. Zhang. 2009. An attenuated *Salmonella*-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine** 27: 6712-6722.
- Walters, J. A. 2009. **Structure, folding and assembly of (pro) caspase-3. The role of the dimer interface in active site formation.** The degree of doctor of philosophy, North carolina state University.
- Warr, G. W. 1995. The immunoglobulin genes of fish. **Dev. Comp. Immunol.** 19: 1-12.
- Werlen, G., B. Hausmann, D. Naehrer and E. Palmer. 2003. Signaling life and death in the thymus: timing is everything. **Science** 299: 1859-1863.
- Wernersson, S., J. M. Reimer, M. Poorafshar, U. Karlson, N. Wernstam, E. Bengten, M. Wilson, L. Pilstrom and L. Hellman. 2006. Granzyme-like sequences in bony fish shed light on the emergence of hematopoietic serine proteases during vertebrate evolution. **Dev. Comp. Immunol.** 30: 901-918.
- Whyte, S. K. 2007. The innate immunity response of finfish-a review of current knowledge. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 1127-1151.
- Wolf, B. B., J. C. Goldstein, H. R. Stennicke, H. Beere, G. P. Amarante, G. S. Salvesen and D. R. Green. 1999. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. **Blood** 94: 1683-1692.
- Wouters, M. A., K. Liu, P. Riek and A. Husain. 2003. A despecialization step underlying evolution of a family of serine proteases. **Mol. Cell.** 12: 343-354.

Yabu, T., S. Kishi, T. Okazaki and M. Yamashita. 2001. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo. **Biochem. J.** 360: 39-47.

Yang, X., R. F. Khosravi, H. Y. Chang and D. Baltimore. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. **Cell** 89: 1067-1076.





1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 Luria Bertani (LB) Broth (ต่อลิตร)

10 กรัม ของ NaCl

10 กรัม ของ Tryptone

5 กรัม ของ Yeast extract

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

1.2 Luria Bertani (LB) Agar (ต่อลิตร)

10 กรัม ของ NaCl

10 กรัม ของ Tryptone

5 กรัม ของ Yeast extract

20 กรัม ของ Agar

นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20-25 มิลลิลิตร และปล่อยให้อาหารแข็งตัว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 Luria Bertani (LB) Agar ที่เติม Ampicillin (ต่อลิตร)

เตรียม LB Broth ปริมาตร 1 ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม Ampicillin ปริมาตร 10 มิลลิกรัม (ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20-25 มิลลิลิตร และปล่อยให้อาหารแข็งตัว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 Trypticase Soy Broth (TSB) (ต่อลิตร)

4 กรัม ของ TSA

15 กรัม ของ Bacto Agar

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

1.5 Trypticase Soy Agar (TSA) (ต่อลิตร)

เตรียม TSB ปริมาตร 1 ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปั่นให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20-25 มิลลิลิตร และปล่อยให้อาหารแข็งตัว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.6 Super Optimal Culture Medium (SOC Medium) (ต่อ 100 มิลลิลิตร)

2 กรัม ของ Tryptone

0.5 กรัม ของ Yeast extract

1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1 โมล ของ NaCl

0.25 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1 โมล ของ KCl

เติมน้ำกลั่น 97 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 2 โมล ของ Mg^{2+} ด้วย Filter sterilize และ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 2 โมล ของ Glucose ด้วย Filter sterilize

1.7 Yeast extract (2YT Broth) (ต่อลิตร)

10 กรัม ของ NaCl

10 กรัม ของ Yeast extract

16 กรัม ของ Tryptone

ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

1.8 Medium A

200 มิลลิลิตร ของ Penicillin/Streptomycin solution

200 unit ของ Heparin

1 มิลลิลิตร ของ Heat inactivated fetal calf serum (FCS)

19 มิลลิลิตร ของ RPMI no.1640

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับงานทางอณูชีวโมเลกุล

2.1 10X TBE (ต่อลิตร)

108 กรัม ของ Tris-base

55 กรัม ของ Boric acid

40 มิลลิลิตร ของ 0.5 M EDTA

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2.2 10X MOP buffer

200 mM 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid (MOPS)

50 mM Sodium acetate

10 mM EDTA

ปรับ pH ให้ได้ 6.5-7.0 ด้วย NaOH ห้าม Autoclave

2.3 1 M IPTG

2.38 กรัม ของ Isopropylthio- β -D-thiogalactoside

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.4 X-Gal

100 มิลลิลิตร ของ 5-bromo-4 chloro-3-indoyl- β -D-thiogalactoside

2 มิลลิลิตร ของ Dimethyl-formamide

2.5 Phosphate Buffer-saline (PBS) (ต่อลิตร)

8.0 กรัม ของ NaCl

0.2 กรัม ของ KCl

1.44 กรัม ของ Na_2HPO_4

0.24 กรัม ของ KH_2PO_4

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 11.8 มิลลิโมล ของ PO_4 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2.6 การเตรียม Gel

เตรียม Agarose gel 1% โดยชั่ง Gel 1 กรัม ละลายใน TBE 1X 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนนาน 1 นาที แล้วเทลงใน Chamber จากนั้นใส่ Comb รोजनแข็งตัว จึงนำมา Load ได้

เตรียม Agarose formaldehyde 1% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยชั่ง Gel 0.5 กรัม ละลายใน 1xMOP ปริมาตร 47.32 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนนาน 1 นาที เติม 40% Formaldehyde (Absolute) 268 มิลลิลิตร แล้วเทลงใน Chamber จากนั้นใส่ Comb รोजนแข็งตัว จึงนำมา Load ได้

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวอังคณาลักษณ์ แจ่มอนันต์
 เกิดวันที่ 4 ตุลาคม 2524
 สถานที่เกิด อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (ประมง) สาขาชีววิทยาประมง คณะประมง
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ตำแหน่งปัจจุบัน -
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -
 ทุนการศึกษาที่ได้รับ -